



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CELULAR Y BIOCÁTALISIS

Ingeniería metabólica en *Escherichia coli* para la producción de ácido succínico a partir de glicerol

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

IBQ. MARÍA DE LOS ÁNGELES MARTÍNEZ GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA – UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. LILIANA PARDO LÓPEZ- INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA - UNAM
DR. MIGUEL Á. CEVALLOS GAOS - CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS - UNAM

CUERNAVACA, MORELOS. OCTUBRE DE 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

MIEMBROS DEL COMITÉ JURADO

PRESIDENTE	DR. LORENZO PATRICK SEGOVIA FORCELLA
SECRETARIO	DRA. CLARITA OLVERA CARRANZA
VOCAL	DRA. MARIA ESPERANZA MARTÍNEZ ROMERO
VOCAL	DRA. ANDREA SABIDO RAMOS
VOCAL	DR. RICARDO OROPEZA NAVARRO

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Alfredo Martínez Jiménez en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Para la realización del mismo se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y de la Universidad Nacional Autónoma de México, a través del proyecto PAPIIT-DGAPA-UNAM IV100119.

AGRADECIMIENTOS

Dios,

Gracias por la vida, porque sin tu sustento no hubiese sido posible llegar hasta aquí. Gracias por cumplir mi deseo de realizar una maestría, y en este lugar; por la gracia que me diste durante todo este tiempo para entender y aprender lo que no sabía, y para cumplir con mis responsabilidades dentro de las aulas, en el laboratorio, como fuera de ellos; por rodearme de las personas correctas, que me dieron más de lo que necesitaba. Gracias, a ti la gloria.

Familia,

Papá Leonardo y mamá Blanqui, gracias por todo el apoyo que me dieron durante todo este tiempo, por estar siempre al pendiente de mí aun en la distancia. Gracias porque, a pesar de estar viviendo esa situación complicada, me permitieron salir de casa para llegar hasta aquí y poder cumplir uno de mis más grandes deseos; por comprender y aceptar mis decisiones.

Gracias, hermano Leo, porque tú fuiste unas de mis motivaciones para poder culminar este sueño.

Gracias, abuelita Margarita, por tenerme en sus oraciones. Gracias, abuelito, por acordarse de mí en la distancia.

Dr. Alfredo Martínez,

Le agradezco tanto por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por abrirme las puertas del laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas y poder realizar el presente proyecto de tesis. Gracias por cumplir de forma excelente su papel de tutor, dándome el apoyo académico necesario, críticas, correcciones y recursos oportunos durante mi formación. Gracias también por mostrar tolerancia y empatía en situaciones personales, poniendo de manifiesto que su entrega en lo que hace va más allá de libros y experimentos.

Personal técnico del laboratorio,

Gracias, Georgina Hernández, por el apoyo en el uso del HPLC para los metabolitos reportados; y Luz María Martínez, por el apoyo en uso de las técnicas de Biología Molecular; gracias, Manuel, por preparar el material y reactivos necesarios para llevar a cabo los experimentos; señora Aure, gracias por la limpieza de los materiales que usamos, por las veces que me preguntaba cómo había amanecido después de una noche de cinética en el laboratorio, por regalarme galletas cuando más necesitaba glucosa para seguir con las labores.

Personal académico del laboratorio,

Gracias, doctores, por sus comentarios constructivos durante los seminarios.

Comité tutor,

Gracias, Dr. Miguel Ángel y Dra. Liliana, por estar presentes en cada examen de tutorial para criticarme de forma constructiva y animarme a seguir generando los resultados.

Comité jurado,

Gracias, doctores, por sus críticas constructivas y aportaciones valiosas que enriquecieron el presente escrito.

Amigos y compañeros de laboratorio y de departamento,

Gracias por brindarme su amistad y su apoyo durante este recorrido. Por enseñarme cosas que yo no sabía ni entendía. Un agradecimiento especial a Estefa y Tlakaeelel, que me enseñaron lo

necesario antes y durante las cinéticas microbianas y otros experimentos. Gracias a todos por aconsejarme en los momentos más necesarios, tanto en asuntos del laboratorio como personales, por preocuparse por mí. A todos ustedes, gracias por ser parte de este crecimiento.

Hermanos en Cristo,

Gracias por contarme en sus oraciones, por exhortarme y darme palabras de aliento durante este recorrido, por compartirme de ese hermoso Evangelio que vino a hacer de mi maestría algo inolvidable.

Conacyt,

Gracias por el recurso económico, sin esto no hubiera sido posible llegar hasta este lugar y terminar este proyecto.

*Muéstrame, oh Jehová, tus caminos;
Enseñame tus sendas.
Salmo 25:4*

ÍNDICE TEMÁTICO

Contenido	Página
1. Resumen	12
2. Introducción	14
3. Antecedentes	15
3.1 Glicerol.	15
3.1.1 Usos del glicerol puro.	16
3.1.2 Usos del glicerol crudo.	16
3.2 Ácido succínico y su producción.	17
3.2.1 Microorganismos productores de ácido succínico (AS).	19
3.3 Ingeniería metabólica en <i>E. coli</i> para la producción de AS.	22
4. Justificación	26
5. Hipótesis.	27
6. Objetivos.	27
6.1 General.	27
6.2 Específicos.	27
7. Materiales y estrategia experimental.	28
7.1 Cepas, plásmidos, oligonucleótidos y técnicas de biología molecular utilizadas.	28
7.1.1 Eliminación cromosomal de los genes propuestos en <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) mediante transducción por fagos.	29
7.1.2 Escisión cromosomal del gen de resistencia a kanamicina (<i>km</i>) flanqueado por los sitios FRT.	31
7.2 Construcciones derivadas del vector pACYCDuet-1 con los genes de interés.	32
7.2.1 Ligación de genes a plásmidos con la enzima ligasa T4.	34
7.3 Evaluación de <i>E. coli</i> en minifermentadores.	34
7.3.1 Obtención del preinóculo.	34
7.3.2 Preparación del inóculo.	34
7.3.3 Cultivo en minifermentadores de evaluación.	35
7.4 Evaluación de <i>E. coli</i> en biorreactores de 1 L.	35
7.4.1 Obtención del preinóculo.	35
7.4.2 Preparación del inóculo.	36
7.4.3 Cultivo en biorreactor.	36
7.5 Determinación de la actividad enzimática de Pck (Fosfoenolpiruvato carboxicinas).	36
7.5.1 Cosecha de las células.	36
7.5.2 Actividad enzimática de la Pck.	37
7.6 Métodos analíticos.	37
7.6.1 Determinación de la concentración de biomasa.	37
7.6.2 Cuantificación de sustratos y productos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).	37
7.7 Cálculos realizados.	38
8. Resultados y discusión.	40
8.1 Construcción de las cepas y vectores de expresión.	40
8.1.1 Comprobación de la cepa <i>E. coli</i> MG1655 (DE3).	40
8.1.2 Eliminación del gen <i>gldA</i> en <i>E. coli</i> MG1655 (DE3).	41
8.1.3 Eliminación del gen <i>ppc</i> en <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) $\Delta gldA::FRT$.	42
8.1.4 Eliminación del gen <i>pck</i> en <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) $\Delta gldA::FRT$, $\Delta ppc::FRT$.	44
8.1.5 Eliminación del gen <i>pykF</i> en <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) $\Delta gldA::FRT$, $\Delta ppc::FRT$, $\Delta pck::FRT$.	46
8.2 Construcción de los vectores de expresión con pACYCDuet-1.	46
8.2.1 Construcción del vector 1: pACYCDuet-1/ <i>pck</i> _{As} (gen sintetizado por la compañía GENEWIZ).	47
8.2.2 Construcción del vector 2: pACYCDuet-1/ <i>glpK</i> _{Ec} .	48
8.2.3 Construcción del vector 3: pACYCDuet-1 <i>pck</i> _{As} <i>glpK</i> _{Ec} .	48

8.2.4 Construcción del vector 4: pACYCDuet-1/ <i>pck</i> * _{As} (gen amplificado del cromosoma de <i>A. succinogenes</i> 130Z).	49
8.2.5 Construcción del vector 5: pACYCDuet-1/ <i>pck</i> * _{As} , <i>glpK</i> _E .	50
8.3 Caracterización de las cepas.	51
8.3.1 <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) presenta un metabolismo lento en glicerol con respecto a glucosa.	51
8.3.2 El crecimiento de la cepa silvestre <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) con glicerol se ve favorecido en medio mineral enriquecido, pero no la producción de succinato.	59
8.3.3 <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) genera una fermentación ácido-mixta, favoreciendo la producción de acetato en medio mineral enriquecido con glucosa como fuente de carbono.	62
8.3.4 La eliminación de la glicerol deshidrogenasa, <i>GldA</i> , bajo condiciones no aireadas reduce drásticamente la velocidad volumétrica de consumo de glicerol y genera una producción baja de acetato.	65
8.3.5 La producción de succinato a partir de glucosa no se vio favorecida en las cepas <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) y AG03 que poseían el gen <i>pck</i> _{As} sintético clonado, en condiciones sin aireación.	68
8.3.6 La triple mutante AG03 transformada con pACYCDuet-1 <i>pck</i> _{As} , <i>glpK</i> _{Ec} , evaluada bajo condiciones sin aireación en medio mineral – glicerol - enriquecido, crece lentamente y no produce succinato.	71
8.3.7 Las cepas AG03/pACYCDuet-1 <i>pck</i> _{As} , <i>glpK</i> _{Ec} y AG04/pACYCDuet-1 <i>pck</i> _{As} , <i>glpK</i> _{Ec} evaluadas bajo condiciones limitantes de oxígeno en medio mineral – glicerol – enriquecido, presentan un crecimiento rápido, aumentan el consumo de glicerol, pero no generan succinato.	75
8.3.8 La producción de succinato no se ve favorecida al usar el vector pLoxGentrc <i>pck</i> , cuyo gen <i>pck</i> es nativo de <i>E. coli</i> , en la cepa AG04; ni cuando se usa este vector o el pACYCDuet-1/ <i>pck</i> _{As} en la cepa BL21 (DE3), en medio AM1m-YE-T-Gly bajo condiciones limitantes de oxígeno.	81
8.3.9 Otras consideraciones en el metabolismo de glicerol para la producción de ácido succínico.	87
9. Conclusiones	91
10. Prospectivas	92
11. Bibliografía	93
12. Anexos	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Estructura química del glicerol.	15
Figura 2. Estructura química del ácido succínico (AS).	18
Figura 3. Compuestos derivados del ácido succínico.	18
Figura 4. Vía metabólica de <i>E. coli</i> silvestre para la producción de AS a partir de glicerol.	21
Figura 5. Vía metabólica en <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) después de las modificaciones genéticas planteadas en el presente proyecto.	25
Figura 6. Estructura de los vectores de expresión pACYCDuet-1 construidos en este estudio.	33
Figura 7. Confirmación de la cepa <i>E. coli</i> MG1655 (DE3).	40
Figura 8. Eliminación del gen <i>gldA</i> del cromosoma de <i>E. coli</i> MG1655 (DE3).	41
Figura 9. Eliminación casete de kanamicina en la cepa <i>E. coli</i> MG1655 DE3 $\Delta gldA::FRT-Km-FRT$.	42
Figura 10. Eliminación del gen <i>ppc</i> en la cepa <i>E. coli</i> MG1655 DE3 $\Delta gldA::FRT$.	43
Figura 11. Eliminación del casete de kanamicina en la cepa <i>E. coli</i> MG1655 DE3 $\Delta gldA::FRT, \Delta ppc::FRT-Km-FRT$.	44
Figura 12. Eliminación del gen <i>pck</i> en la cepa <i>E. coli</i> MG1655 DE3 $\Delta gldA::FRT, \Delta ppc::FRT$.	45
Figura 13. Eliminación del casete de kanamicina en la cepa <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) $\Delta gldA::FRT, \Delta ppc::FRT, \Delta pck::FRT-Km-FRT$.	45
Figura 14. Eliminación del gen <i>pykF</i> en la cepa <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) $\Delta gldA::FRT, \Delta ppc::FRT, \Delta pck::FRT$.	46
Figura 15. pACYCDuet-1 linealizado con enzimas de restricción.	47
Figura 16. Comprobación de la construcción pACYCDuet-1/ <i>pckAs</i>	47
Figura 17. Comprobación de la construcción pACYCDuet-1/ <i>glpKEc</i> .	48
Figura 18. Comprobación de la construcción pACYCDuet-1/ <i>pckAs, glpKEc</i> .	48
Figura 19. Comprobación de la construcción pACYCDuet-1/ <i>pck*As</i> con el gen amplificado del genoma de <i>A. succinogenes</i> 130Z.	49
Figura 20. Comprobación de la construcción pACYCDuet-1/ <i>pck*As, glpKEc</i> .	50
Figura 21. Metabolismo de glucosa y glicerol en <i>E. coli</i> bajo condiciones sin aireación.	57
Figura 22. Metabolismo de glicerol en <i>E. coli</i> en medio AM1m-YE-T-Gly bajo condiciones sin aireación.	60
Figura 23. Metabolismo de glucosa en <i>E. coli</i> en medio AM1m-YE-T-Glc en condiciones sin aireación.	64
Figura 24. Metabolismo de glicerol en cepas mutantes de <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) en medio AM1m-YE-T-Gly bajo condiciones sin aireación.	67
Figura 25. Metabolismo de glucosa en <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) pACYCDuet-1/ <i>pckAs</i> y AG03 pACYCDuet-1/ <i>pckAs</i> en medio AM1m-YE-T-Glc en condiciones sin aireación.	70
Figura 26. Metabolismo de glicerol en la cepa AG03 pACYCDuet-1/ <i>pckAs, glpKEc</i> en medio AM1m-YE-T-Gly bajo condiciones sin aireación.	72
Figura 27. Inhibición de GlpK por FBF.	73
Figura 28. Metabolismo de glicerol en la cepa AG03 y AG04 transformadas con pACYCDuet-1/ <i>pckAs, glpKEc</i> en medio AM1m-YE-T-Gly bajo condiciones limitantes de oxígeno.	79
Figura 29. Metabolismo de glicerol en las cepas AG04 y BL21 (DE3) transformadas con el vector pLoxGentrcpck y la cepa BL21 (DE3) transformada con el vector pACYCDuet-1/ <i>pckAs</i> , (con <i>pckAs</i> sintético) en medio AM1m-YE-T-Gly, bajo condiciones limitantes de oxígeno.	85
Figura 30. Metabolismo de glicerol que genera una fuerza protón-motriz adicional, como energía adicional para el crecimiento celular y exportación de succinato.	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Volumen de mercado de algunas aplicaciones del AS para el año 2020.	19
Tabla 2. Producción de AS por algunos microorganismos silvestres y modificados genéticamente.	20
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.	28
Tabla 4. Cepas y plásmidos utilizados en este estudio.	29
Tabla 5. Construcción de vectores de expresión con pACYCDuet-1.	32
Tabla 6. Componentes del medio AM1 modificado.	35
Tabla 7. Obtención de los inóculos de <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) en minifermentadores.	51
Tabla 8. Parámetros cinéticos y estequiométricos de la cepa <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) en glicerol bajo condiciones sin aireación.	52
Tabla 9. Fermentación de glicerol por cepas derivadas de <i>E. coli</i> K-12 y <i>E. coli</i> B.	53
Tabla 10. Parámetros cinéticos y estequiométricos de la cepa <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) cultivada en glucosa bajo condiciones sin aireación.	54
Tabla 11. Parámetros cinéticos y estequiométricos de la cepa <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) cultivada en glicerol más KCl bajo condiciones sin aireación.	56
Tabla 12. Comparación entre el perfil de productos obtenidos con la cepa silvestre en este trabajo y los obtenidos por otros autores con glicerol o glucosa en medio mineral.	56
Tabla 13. Parámetros cinéticos y estequiométricos de <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) cultivada en medio AM1m-YE-T-Gly bajo condiciones sin aireación.	60
Tabla 14. Parámetros cinéticos y estequiométricos de <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) en medio AM1m-YE-T-Glc bajo condiciones sin aireación.	63
Tabla 15. Parámetros cinéticos y estequiométricos de cuatro mutantes derivadas de <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) en medio AM1m-YE-T-Gly, bajo condiciones sin aireación.	66
Tabla 16. Parámetros cinéticos y estequiométricos cepas <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) silvestre y triple mutante en medio AM1m-YE-T-Glc bajo condiciones sin aireación.	69
Tabla 17. Parámetros cinéticos y estequiométricos <i>E. coli</i> AG03 pACYCDuet-1/pck _{AS} , glpK _{Ec} (con el gen pck _{AS} original y sintético) en medio AM1m-YE-T-Gly bajo condiciones sin aireación.	71
Tabla 18. Crecimiento de las cepas AG03 y AG04 transformadas con el vector pACYCDuet-1/pck _{AS} , glpK _{Ec} (con pck _{AS} sintético en medio AM1m-YE-T-Gly, bajo condiciones limitantes de oxígeno.	77
Tabla 19. Caracterización cinética de las cepas AG04 y BL21 (DE3) transformadas con el vector pLoxGentrcpck y la cepa BL21 (DE3) transformadas con el vector pACYCDuet-1/pck _{AS} , (con pck _{AS} sintético) en medio AM1m-YE-T-Gly, bajo condiciones limitantes de oxígeno.	83

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico	Página
Gráfico 1. Cinética de crecimiento, consumo de glicerol y formación de productos de fermentación de <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) con glicerol como fuente de carbono y bajo condiciones sin aireación.	52
Gráfico 2. Cinética de crecimiento, consumo de glucosa y formación de productos de fermentación de <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) con glucosa como fuente de carbono y bajo condiciones sin aireación.	53
Gráfico 3. Cinética de crecimiento, consumo de glicerol y formación de productos de fermentación de <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) con glicerol como fuente de carbono en medio AM1 modificado en presencia de KCl y bajo condiciones sin aireación.	55
Gráfico 4. Cinética de crecimiento, consumo de glicerol y formación de productos de fermentación de <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) con glicerol en medio AM1m-YE-T-Gly bajo condiciones sin aireación.	59
Gráfico 5. Cinética de crecimiento, consumo de glucosa y formación de productos de fermentación de <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) en medio AM1m-YE-T-Glc y bajo condiciones sin aireación.	63
Gráfico 6. Caracterización cinética de cuatro mutantes derivadas de <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) AM1m-YE-T-Gly bajo condiciones sin aireación.	65
Gráfico 7. Cepa silvestre con el gen <i>pck_{AS}</i> sintético evaluada en medio AM1m-YE-T-Glc, en condiciones no aireadas.	68
Gráfico 8. Cepas AG03 y AG03 con el gen <i>pck_{AS}</i> sintético, evaluadas en medio AM1m-YE-T-Glc, en condiciones no aireadas.	69
Gráfico 9. Crecimiento de las cepas triples mutantes transformadas con el vector pACYCDuet-1/ <i>pck_{AS}</i> , <i>glpK_{Ec}</i> , en medio AM1m-YE-T-Gly bajo condiciones no aireadas.	71
Gráfico 10. Actividad enzimática de Pck de <i>A. succinogenes</i> en extractos de la cepa AG03 pACYCDuet-1/ <i>pck_{AS}</i> , <i>glpK_{Ec}</i> (con el gen <i>pck</i> sintético) crecidas en AM1m-YE-T-Gly bajo condiciones no aireadas.	74
Gráfico 11. Caracterización cinética de las cepas AG03 y AG04 transformadas con el vector pACYCDuet-1/ <i>pck_{AS}</i> , <i>glpK_{Ec}</i> (con <i>pck_{AS}</i> sintético en medio AM1m-YE-T-Gly, bajo condiciones limitantes de oxígeno.	76
Gráfico 12. Actividad enzimática de Pck de <i>A. succinogenes</i> en extractos de la cepa AG03 pACYCDuet-1/ <i>pck_{AS}</i> , <i>glpK_{Ec}</i> y AG04 pACYCDuet-1/ <i>pck_{AS}</i> , <i>glpK_{Ec}</i> (ambas con el gen <i>pck_{AS}</i> sintético) crecidas en medio AM1m-YE-T-Gly, bajo condiciones limitantes de oxígeno.	79
Gráfico 13. Caracterización cinética de las cepas AG04 y BL21 (DE3) transformadas con el vector pLoxGentrcpck y la cepa BL21 (DE3) transformada con el vector pACYCDuet-1/ <i>pck_{AS}</i> , (con <i>pck_{AS}</i> sintético) en medio AM1m-YE-T-Gly, bajo condiciones limitantes de oxígeno.	82
Gráfico 14. Actividad enzimática de la Pck en extractos de las cepas AG04 y BL21 (DE3) transformadas con el vector pLoxGentrcpck y de la cepa BL21 (DE3) transformada con el vector pACYCDuet-1/ <i>pck_{AS}</i> , (con <i>pck_{AS}</i> sintético) crecidas en medio AM1m-YE-T-Gly, bajo condiciones limitantes de oxígeno.	84

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

SÍMBOLOS/UNIDADES DE MEDIDA		ABREVIATURAS	
%	Porcentaje	MT	Miles de toneladas
±	Más menos (Desviación estándar)	PEP	Fosfoenolpiruvato
Δ	Eliminación de gen(es)	OAA	Oxalacetato
°C	Grado centígrado	ATP	Adenosín trifosfato
μg	Microgramo	GlpF*	Facilitador de glicerol
μM	Micromolar	GlpK	Glicerol cinasa
μm	Micrómetro	GldA	Glicerol deshidrogenasa
g	Gramo	DhaKLM	Dihidroxiacetona cinasa
h	Hora	GlpD	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (aerobia)
H ⁺	Protón	GlpABC	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (anaerobia)
L	Litro	QH ₂	Quinona reducida
mg	Miligramo	Pck	Fosfoenolpiruvato carboxicinasa
min	Minuto	Ppc	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
mL	Mililitro	Pyc	Piruvato carboxilasa
mM	Milimolar	MaeA, MaeB	Enzimas málicas
N	Normal	Mdh	Malato deshidrogenasa
nm	Nanómetro	FumAB	Fumarasa
s	Segundo	FrdABCD	Fumarato reductasa
μmol	Micromol	PykA, PykF	Piruvato cinasas
mmol	Milimol	LdhA	Lactato deshidrogenasa
kb	Kilobase	PoxB	Piruvato oxidasa
w/v	Peso-volumen	FdhF	Formato deshidrogenasa
λ	Lambda	PfIB	Piruvato formato liasa
U	Unidad enzimática	Pta	Fosfato acetil transferasa
V	Voltio	AckA	Acetato quinasa
®	Marca registrada	AceEF	Piruvato deshidrogenasa
kg	Kilogramo	AdhE	Alcohol aldehído deshidrogenasa
Pa	Pascal	Pts	Sistema fosfotransferasa
M	Molar	GlpR	Represor del regulón glicerol-3-fosfato
rpm	Revoluciones por minuto	midarpA	Mitad del regulador de la acetil-CoA sintetasa
pb	Pares de base	SOC	Caldo súper óptimo (medio rico)
c/lb	Centavo de dólar por libra	O.D. ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nanómetros
vvm	Litros de aire por litro de disolución por minuto (flujo de aire por unidad de volumen)	NBS	Medio mínimo NBS
		Fw	Forward (Delantero)
		Rv	Reverse (Reverso)
		ADP	Adenosín difosfato
		IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
		HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
		MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico
		CDW	Peso celular seco
		km	Kanamicina
		cb	Carbenicilina
		cm	Cloranfenicol
		MD	Malato deshidrogenasa
		Acetil-CoA	Acetil coenzima A
		PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
		DTT	Ditiotreitol
		NADH	Nicotinamida Adenina dinucleótido reducido
		NAD ⁺	Nicotinamida Adenina dinucleótido oxidado
		LB	Medio Luria (Luria Broth)

*Los genes que codifican las enzimas que van desde GlpF hasta GlpR se escriben en cursiva y las primeras tres letras en minúscula.

1. RESUMEN

El glicerol es uno de los residuos más importantes que se genera, principalmente, en la industria del biodiesel. Debido al aumento en su producción y a que su purificación es costosa, hoy en día se buscan nuevas aplicaciones para el glicerol crudo. Una de las estrategias prometedoras para el aprovechamiento del glicerol son las fermentaciones, donde se usa como fuente de carbono. Con respecto a glucosa y xilosa, el glicerol presenta la ventaja de ser abundante y de bajo costo, por lo que puede utilizarse para la producción de metabolitos de interés comercial como el ácido succínico.

Existen varios microorganismos productores de ácido succínico, entre ellos están *Actinobacillus succinogenes*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Mannheimia succiniciproducens* y *Basfia succiniciproducens* que acumulan elevadas cantidades de este compuesto. Microorganismos como *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* solo llegan a producir bajas concentraciones del mismo. *E. coli* ha sido objeto de estudio para la producción de ácido succínico en muchos grupos de trabajo. Si bien produce cantidades pequeñas de este metabolito, mediante el uso de ingeniería de vías metabólicas es posible la construcción de cepas que permitan la conversión de gran parte de la fuente de carbono en ácido succínico.

En el presente estudio, se partió de *E. coli* MG1655 (DE3) para la construcción de una cepa sobreproductora de ácido succínico a partir de glicerol bajo condiciones sin aireación. Mediante ingeniería de vías metabólicas se generaron, entre otras, las cepas *E. coli* AG03 ($\Delta gldA::FRT$, $\Delta ppc::FRT$, $\Delta pck::FRT-Km-FRT$) y *E. coli* AG04 ($\Delta gldA::FRT$, $\Delta ppc::FRT$, $\Delta pck::FRT$, $\Delta pykF::FRT-Km-FRT$), diseñadas para dirigir la fuente de carbono a la producción de ácido succínico, en las cuales se sobreexpresaron los genes pck_{As} y $glpK_{Ec}$ (para la generación de succinato y consumo de glicerol, respectivamente) mediante el vector pACYCDuet-1.

Utilizando la cepa AG03 pACYCDuet-1/ pck_{As} , $glpK_{Ec}$ en medio AM1 modificado y enriquecido con los componentes del medio LB y glicerol, bajo condiciones sin aireación, no se encontró un efecto positivo de los genes clonados debido a que no se consumió la fuente de carbono como se esperaba y no se favoreció la producción de succinato. Se analizaron algunos extractos proteicos de dicha cinética, en donde no se encontró actividad enzimática de Pck bajo las condiciones evaluadas. Debido a que para la eficiente metabolización de glicerol se requiere la presencia de un aceptor final de electrones como el O_2 , se optó por evaluar la cepa en mención bajo condiciones limitantes de O_2 . Encontrándose un aumento en el consumo de glicerol, pero ninguna producción de succinato; la fuente de carbono se dirigió a la producción de otros metabolitos de fermentación como acetato, etanol y formiato.

Con el objeto de confirmar el efecto positivo del gen *glpK_{Ec}* clonado sobre el consumo de glicerol, y evitar la formación de otros compuestos de fermentación, se evaluó la cepa AG04 pACYCDuet-1/*pck_{As}*, *glpK_{Ec}*, que carece del gen *pykF* (que codifica para la enzima principal con actividad piruvato cinasa). Con esta cepa, en medio AM1 modificado y enriquecido con los componentes del medio LB y glicerol, bajo condiciones limitantes de oxígeno, tampoco se favoreció la producción de succinato porque no se encontró actividad de Pck, y aunque no se midió actividad de GlpK se sugiere que ésta sí existió debido al consumo eficiente de glicerol y por el perfil de metabolitos generado.

La producción de succinato no se vio favorecida al usar un vector de expresión distinto, pLoxGentrcpck que tiene clonado el gen *pck* nativo, en la cepa AG04; ni cuando se usa este vector o el pACYCDuet-1/*pck_{As}* en una cepa distinta a MG1655 (DE3), la cepa BL21 (DE3), bajo condiciones limitantes de oxígeno, por lo que se proponen otras estrategias para favorecer la producción del metabolito de interés.

2. INTRODUCCIÓN

La demanda en el uso de estrategias biotecnológicas para el tratamiento de residuos agroindustriales ha incrementado en los últimos años, teniendo como objetivos la disminución en el uso de combustibles fósiles, conservación del medio ambiente y obtención de compuestos de valor agregado, entre otros. El glicerol constituye uno de los residuos más importantes que se genera, principalmente, en la industria del biodiésel y de la producción de jabones. En México, se han establecido seis plantas de biodiésel con una capacidad de producción de 42.2 millones de litros anuales (SAGARPA, 2017), por lo que es inevitable imaginar la alta generación de glicerol como residuo industrial. Además, debido a que el mercado del biodiésel ya se ha consolidado en muchos países y se espera una expansión geográfica del mismo, es preciso contar con una herramienta útil y eficaz que permita aprovechar el glicerol como materia prima para otros procesos, p. ej. como los biotecnológicos. Mediante fermentaciones es posible obtener, a partir de glicerol, compuestos de valor agregado como el ácido succínico (AS). Éste, puede ser convertido en una diversidad de compuestos, por ejemplo 1,4-butanediol (BDO), tetrahidrofurano (THF), γ -butirolactona (GBL), n-metil-2-pirrolidinona (NMP), entre otros, que son usados en una vasta variedad de productos comerciales (Nghiem *et al.*, 2017). Se ha estimado que el precio comercial del AS será de \$2.3 dólares/kg en 2025, información que refleja el potencial industrial que posee esta molécula (Nghiem *et al.*, 2017).

La producción de AS es parte del metabolismo central de muchos microorganismos, entre ellos *Escherichia coli*. Aunque cepas silvestres de *E. coli* no acumulan cantidades elevadas de este compuesto, mediante recombinación genética se han creado mutantes capaces de convertir gran parte de la fuente de carbono en AS en fermentadores. Por lo tanto, el presente estudio tiene el objetivo de construir, mediante ingeniería de vías metabólicas, una cepa de *E. coli* sobreproductora de AS usando glicerol como fuente única de carbono en condiciones sin aireación.

Partiendo de la cepa silvestre *E. coli* MG1655 (DE3), se realizó la sobreexpresión de genes que codifican para enzimas que potencialmente permitirían dirigir la fuente de carbono y energía hacia la producción de AS, como *glpK* (codifica para una glicerol cinasa) y *pck* (codifica para la fosfoenolpiruvato carboxicinas); y la eliminación en cromosoma de aquellos que conllevaran a la formación de productos de fermentación no deseados.

3. ANTECEDENTES

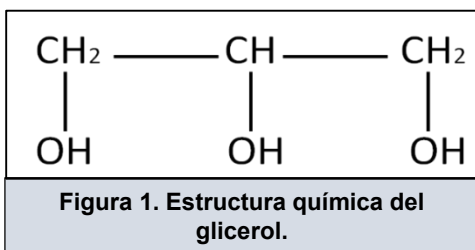
El uso de microorganismos modificados genéticamente, a través de ingeniería de vías metabólicas, para el tratamiento de residuos agroindustriales ha cobrado muchísima importancia; no sólo porque resuelve problemas ambientales, que es fundamental, sino también porque otorga valor agregado a aquellos procesos que generan grandes cantidades de dichos residuos.

El glicerol es un residuo industrial de gran importancia debido a que es subproducto principal en la obtención de biodiésel y saponificación de grasas. Ante el impulso del uso de fuentes de energía renovables más eficientes y limpias como los biocombustibles, la presencia de biodiesel en el mercado ha incrementado (hasta en más de dos millones de toneladas por año) y, por consiguiente la del glicerol, ya que por cada 10 kg de biodiesel producido se genera 1 kg de glicerol crudo. En 2016 la producción mundial de glicerol fue de aproximadamente 3.2 millones de toneladas (Ciani, 2016). Ciertas especies de algas también pueden llegar a biosintetizar y acumular cantidades considerables de este compuesto (Blankschien *et al.*, 2017). Como ejemplo, arriba de 7.8 M de glicerol (lo equivalente a 718 g/L de glicerol en agua) es producido por el alga *Dunaliella genus* (Clomburg & González, 2013).

3.1 Glicerol

El glicerol ($C_3H_8O_3$) es un polialcohol, líquido a temperatura ambiente, incoloro, inodoro, soluble en agua y otros disolventes polares, insoluble en hidrocarburos y éteres. Es una sustancia higroscópica con un pH neutro, químicamente estable bajo condiciones normales de almacenamiento y manejo, y de baja toxicidad ambiental. Sin embargo, puede ser explosivo cuando entra en contacto con agentes oxidantes. Tiene un alto punto de ebullición (290°) y viscosidad (1.5 Pa) provocado por los puentes de hidrógeno que se forman entre sus moléculas (Tan *et al*, 2013).

En cuanto a su estructura química, el glicerol no contiene ningún carbono asimétrico (fig. 1), no presenta estereoisometría, pero es una molécula proquiral ya que si se esterifican los grupos -OH de los C-1 y C-3, con sustituyentes diferentes, el C-2 pasa a ser un carbono asimétrico (Lafuente, 2017).



Posee un gran número de posibles reacciones químicas debido a la presencia de grupos alcohólicos primarios y secundarios que pueden ser reemplazados por otros grupos funcionales y formar derivados como los ésteres, aminas y aldehídos. Se ha demostrado que el glicerol puede actuar como agente reductor y fuente de hidrógeno en la hidrogenación de compuestos orgánicos (Díaz & Cadierno, 2013).

3.1.1 Usos del glicerol puro

Actualmente se conocen diversos usos del glicerol en su forma refinada en los campos alimentario, farmacéutico, cosmético, químico y sector energético. A continuación, se mencionan tan solo algunos usos de este compuesto:

- Como agente emoliente y humectante, para evitar la pérdida de hidratación en diversos productos alimentarios y farmacéuticos, p. ej. en mezcla con alcoholes como agente antibacterial y antiviral con propiedades humectantes.
- Como agente anticongelante, debido a la presencia de grupos hidroxilos que pueden formar enlaces de hidrógeno con moléculas de agua. El punto de congelación del glicerol es de -38 °C.
- Para reducir la presión intraocular y el volumen vítreo antes de cirugías oftálmicas o para reducir la presión intracraneal y/o el volumen de fluido cerebroespinal en casos de infarto cerebral.
- Para la generación de H₂ como fuente de energía renovable y éteres de glicerol como aditivos en combustibles.

La mayoría de las aplicaciones anteriores del glicerol precisan de su purificación; sin embargo, en este proceso se requieren operaciones unitarias como absorción con carbón activado, cromatografía de exclusión de iones, evaporación y destilación fraccionada volviéndolo muy costoso. Además, las compañías que a nivel mundial manejan el mercado tradicional del glicerol puro son incapaces de absorber el aumento en la producción de glicerol generada por la industria del biodiesel (Lines, 2009). Por esta razón, en países latinoamericanos aún se discuten las posibles aplicaciones del glicerol no purificado (Oviedo, 2012).

3.1.2 Usos del glicerol crudo

El glicerol crudo es el que proviene directamente de los procesos de transesterificación y saponificación. Químicamente, contiene una gran cantidad de contaminantes o impurezas dependiendo de la materia prima que se use en su generación y del proceso de generación. El glicerol proveniente de la producción de biodiesel, está constituido por una mezcla de glicerol, metanol, detergente, sales de sodio o potasio, otras materias, agua, etc. (Tezuka *et al*, 2010),

cuya presencia y proporción, como se dice arriba, depende del proceso químico usado en su producción. Este glicerol es de difícil aceptación en el mercado, lo que se convierte en un grave problema para su disposición final (Thompson *et al*, 2006). Así, el uso del glicerol crudo se considera un reto para el consumo de las grandes cantidades producidas a nivel mundial.

Una estrategia alternativa para la valorización del glicerol crudo son los procesos de fermentación donde se usa como sustrato para la obtención de compuestos químicos de interés industrial. Estos estudios han aumentado de forma continua, adquiriendo así la industria de biodiésel y saponificación un valor agregado en el concepto de bioeconomía circular. En estos casos, se aprovecha la capacidad que tienen algunos microorganismos de metabolizar glicerol. Se han descrito numerosos microorganismos que pueden utilizar glicerol crudo como fuente de carbono y energía, como cepas del género *Citrobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Lactobacillus spp.* y *Escherichia spp.* (Cregg *et al*, 2009), produciendo metabolitos como etanol, hidrógeno, 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol y dihidroxiacetona; logrando procesos, hasta cierto punto, rentables y sostenibles.

Las ventajas de usar glicerol crudo como fuente de carbono con respecto a las más utilizadas como glucosa, sacarosa o xilosa son las siguientes:

- Bajo costo, debido a que el acelerado crecimiento de la producción de biodiésel ha generado un excedente de glicerol crudo que ha llevado a una caída de sus precios. Hasta a finales del 2019, se reportó un precio de 8-15 c/lb (Oleoline®, 2019).
- Abundante, ya que de la cantidad total de biodiésel se genera un 10% de glicerol.
- Posee un estado más reducido, el grado de reducción de los átomos de carbono en la molécula de glicerol es de 4.7 en comparación con 4 para glucosa y xilosa (Clomburg & González, 2013).
- Permite la obtención de compuestos reducidos de interés, como el ácido succínico (Dharmadi *et al.*, 2010; Blankshien *et al.*, 2006)

Como se observa, una de las estrategias prometedoras para el aprovechamiento del glicerol crudo son las fermentaciones, donde se usa como fuente única de carbono para la producción de compuestos de valor agregado, uno de ellos, el ácido succínico (AS).

3.2 Ácido succínico y su producción

El ácido succínico, también llamado ácido butanodioico ($C_4H_6O_4$), es un intermediario del ciclo de Krebs que, por ser un ácido dicarboxílico (fig. 2), puede ser convertido en una diversidad de compuestos como los que se muestran en la figura 3. Estos compuestos pueden dividirse en dos grandes grupos según su aplicación final; por un lado, están los '*Commodity chemicals*' o

químicos base que pueden formar polímeros con variadas aplicaciones y, por otro lado, los ‘*Specialty chemicals*’ o químicos de especialidad que requieren de alta pureza al ser destinados al sector alimentario, cosmético y farmacéutico.

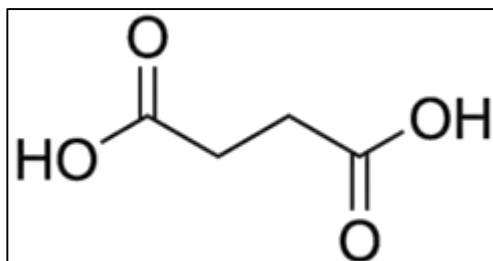
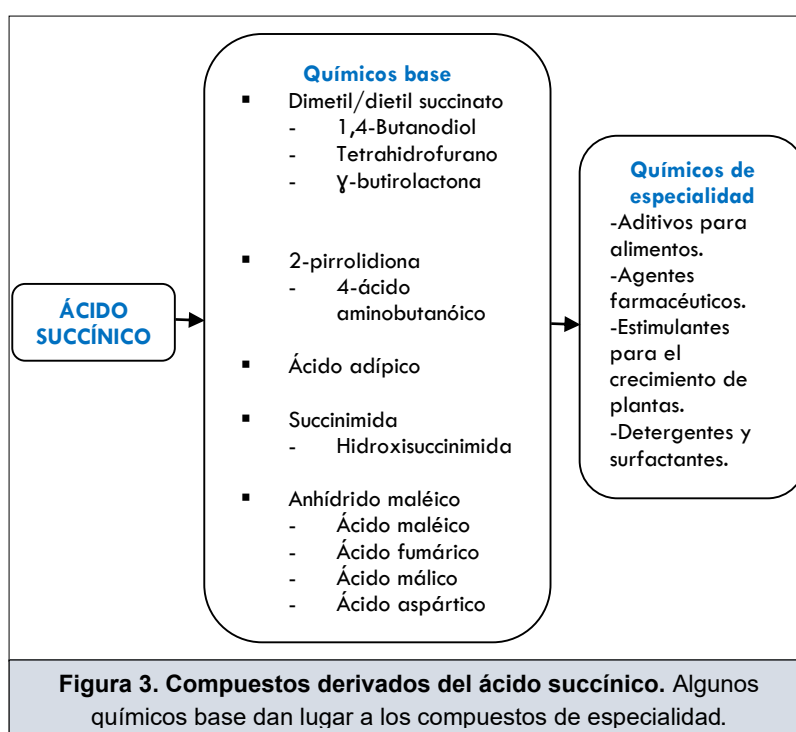


Figura 2. Estructura química del ácido succínico (AS).



La figura 3 muestra algunos compuestos derivados y subderivados del AS. Por mencionar algunas aplicaciones, a partir del dimetil o dietil succinato se puede formar 1,4-butanodiol que da lugar a la producción de ésteres o poliésteres; el anhídrido maléico origina el ácido con el mismo nombre, cuya principal aplicación industrial es la polimerización con glicoles y epóxidos insaturados lineales a poliésteres. Algunos compuestos del grupo “Químicos base” también forman parte de los “Químicos de especialidad”, por ejemplo, la γ -butirolactona es un profármaco del γ -hidroxibutírico (GHB) es usado como anestésico, el ácido fumárico se utiliza en la industria alimentaria como agente reductor, mejorador de textura, regulador de pH y agente conservante (López *et al*, 2017).

El AS permite la fabricación de una vasta variedad de productos comerciales, por lo que el volumen de mercado proyectado para el presente año, 2020, de varios productos es prometedor (Tabla 1). Para el 2025 se estima un precio de \$2.3 dólares/kg de AS (Nghiem *et al*, 2017) que, aunque parece un precio relativamente bajo, en combinación con su alta demanda por ser uno de los 12 bloques o moléculas base para la generación de diversos compuestos químicos, le otorgan gran potencial industrial.

Tabla 1. Volumen de mercado de algunas aplicaciones del AS para el año 2020. (Fuente: Modificado de Nghiem <i>et al</i> , 2017)	
Productos	Volumen de mercado (1000 MT) en 2020
BDO (1,4-butanediol)	316
PBS (Succinato de polibutileno) PBST (Poli (tereftalato de succinato de butileno)	82
Alimentarios	26
Farmacéuticos	21
Cosméticos	12

MT: Tonelada métrica

Comúnmente, el AS se obtiene mediante la hidrogenación catalítica del anhídrido maléico, un proceso basado en combustibles fósiles. Sin embargo, debido al incremento en el precio del petróleo y en la contaminación ambiental, la producción de AS a partir de fuentes renovables ha recibido mucha atención en los últimos años. Una de estas fuentes lo constituye la biomasa microbiana que, mediante fermentaciones, pueden generar grandes cantidades de AS.

Hoy en día, existen varios grupos de trabajo y compañías reconocidos encargados de producir y comercializar AS proveniente de microorganismos, entre éstas últimas están BioAmber, Myriant, Reverdia y Succinity, donde se usa glucosa como fuente de carbono y azúcares derivados de biomasa lignocelulósica (Nghiem, 2017).

Así, el empleo del glicerol proveniente de la industria del biodiésel y saponificación de grasas como fuente de materia prima en fermentaciones para la producción de AS cobra importancia; y es ahí donde se aprovecha la capacidad que tienen ciertos microorganismos para metabolizar glicerol y producir el metabolito en cuestión.

3.2.1 Microorganismos productores de ácido succínico (AS).

Existen muchos microorganismos silvestres productores de AS como *Actinobacillus succinogenes*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Basfia succiniciproducens*, *Mannheimia succiniciproducens*, *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* (Ho Ahn *et al.*, 2017). Los primeros acumulan elevadas cantidades de AS; sin embargo, requieren

medios de cultivo complejos que aumentan los costos de producción (Tabla 2), y los tres últimos sólo acumulan pequeñas concentraciones de esta molécula.

Tabla 2. Producción de AS por algunos microorganismos silvestres y modificados genéticamente. (Fuente: Modificado de Jantama <i>et al.</i> , 2008)				
Microrganismo	Condiciones de cultivo	Título de AS (g/L) ^a	Rendimiento (g AS/g Glc) ^b	Referencia
<i>Actinobacillus succinogenes</i> FZ53	Glucosa (130 g/L) suplementada con licor de maíz fermentado (15 g/L), extracto de levadura (5 g/L) y MgCO ₃ (80 g/L), fermentación anaerobia en lote, 78 h de incubación	106.04 [1.36]	0.82	Guettler <i>et al.</i> , 1996
<i>E. coli</i> AFP111 Δ <i>pflAB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>ptsG</i> , <i>Rhizobium etli pyc</i> sobreexpresada	Glucosa inicial (40 g/L) en medio suplementado con triptona (20 g/L), extracto de levadura (10 g/L) y MgCO ₃ (40 g/L), fermentación de dos fases en lote alimentado, 76 h de incubación.	99.31 [1.31]	1.10	Vemuri <i>et al.</i> , 2002
<i>E coli</i> KJ060 Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , Δ <i>ackA</i> , Δ <i>focA</i> , Δ <i>pflB</i> , <i>pck*</i> , <i>ptsI*</i>	Medio mineral AM1 + glucosa (100 g/L) con 10 g/L KHCO ₃ , fermentación por lote, 120 h de incubación, control de pH con mezcla 1:1 de KOH 6 M + K ₂ CO ₃ 3 M	73.45 [0.61]	1.06	Jantama <i>et al.</i> , 2008
<i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i> ATCC 53488	Glucosa (120 g/L) en medio peptona/extracto de levadura, biorreactor-electrodialisis, con burbujeo de CO ₂ , 150 h de incubación	83.02 [0.55]	0.89	Meynial-Salles <i>et al.</i> , 2007
<i>Corynebacterium glutamicum</i> R	Glucosa (40 g/L) en medio mineral definido con NaHCO ₃ (400 mM), fermentación en lote alimentado, 6 h de incubación	23.03 [3.83]	0.19	Okino <i>et al.</i> , 2005

^a La productividad volumétrica de ácido succínico se muestra entre corchetes [g/ L·h].

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

Como se observa, todos los estudios reportados en la tabla 2 consideran la producción de ácido succínico a partir de glucosa, en pocos estudios se ha empleado glicerol como fuente de carbono (Clomburg *et al.*, 2013).

E. coli ha sido el objeto de estudio para la producción de AS debido a las siguientes características (Jarboe *et al.*, 2010):

- Corto tiempo de duplicación.
- Fondo genético fácil de manipular.
- Capacidad para crecer en medios de cultivo minerales con fuentes de carbono baratas.
- Capacidad para metabolizar hexosas y pentosas.
- Puede utilizar como sustrato la totalidad de los componentes de la biomasa vegetal presente en residuos lignocelulósicos.
- No requiere procesos de fermentación complicados.
- Es tolerante a concentraciones de sustratos y productos elevadas.

Aunque las cepas de *E. coli* silvestres no acumulan altas cantidades de AS a partir de glicerol, mediante ingeniería de vías metabólicas es posible la construcción de cepas capaces de convertir la fuente de carbono en AS. En la figura 4 se presenta la vía metabólica que usa *E. coli* para producir AS a partir de glicerol bajo condiciones de fermentación.

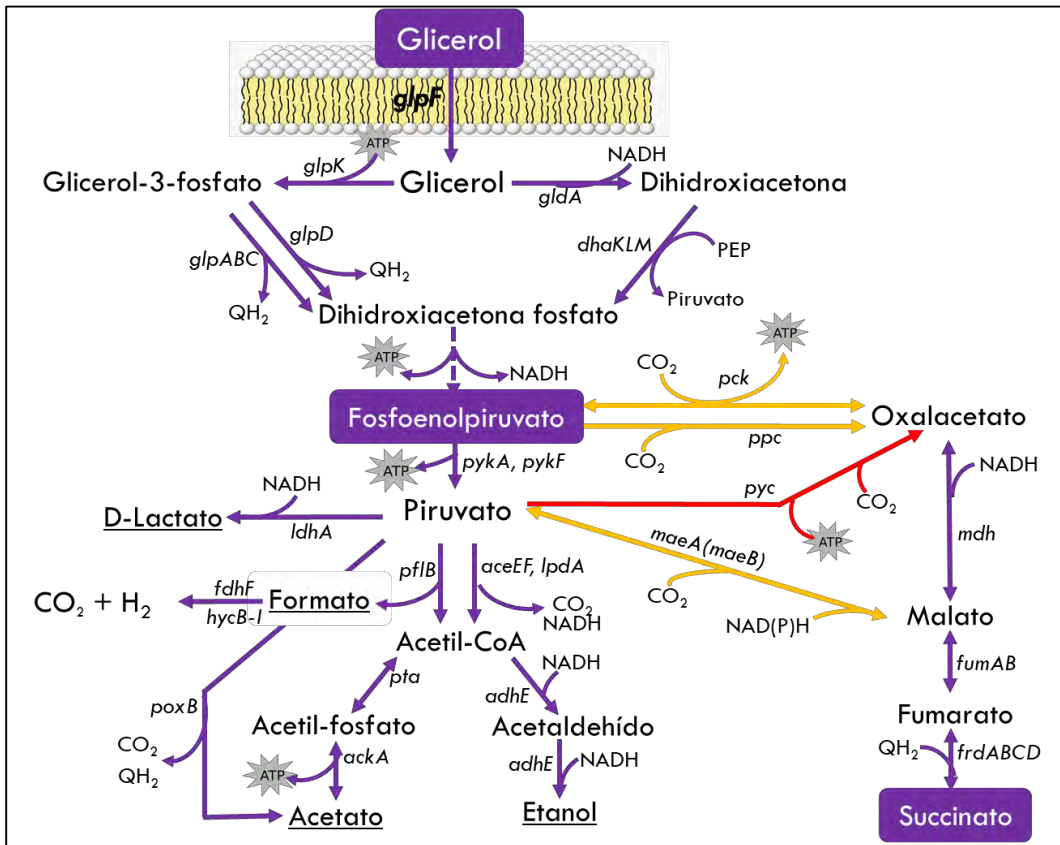


Figura 4. Vía metabólica de *E. coli* silvestre para la producción de AS a partir de glicerol. Se observa la formación de otros ácidos orgánicos como D-lactato, acetato, etanol, formiato (que se descompone en CO₂ y H₂). Las flechas amarillas indican las tres maneras que presenta el microorganismo para formar oxalacetato o malato (que posteriormente pueden dar lugar a la producción de AS). La flecha en rojo indica una vía heteróloga, con la enzima Pyc, para la generación de oxalacetato a partir de piruvato. En esta figura los genes que codifican para las enzimas respectivas se escriben en cursiva. Fuente: Blankschien *et al.*, 2017

En la figura 4 se observa que el glicerol entra a través de la membrana plasmática por difusión facilitada, mediante la permeasa GlpF. Una vez en el interior, puede metabolizarse por dos vías según las condiciones de aireación. Mediante condiciones anaerobias es sustrato de la enzima glicerol deshidrogenasa (GldA, lado derecho) para convertirla en dihidroxiacetona, la cual es fosforilada, usando fosfoenolpiruvato (PEP), por la dihidroxiacetona cinasa (DhaKLM) para generar dihidroxiacetona fosfato. En condiciones aerobias, el glicerol es sustrato de la enzima glicerol cinasa (GlpK), que lo transforma en glicerol-3-fosfato por fosforilación con ATP. Se ha reportado que en el metabolismo del glicerol esta es la etapa limitante y que GlpK es requerida para el crecimiento cuando este compuesto es la única fuente de carbono y energía bajo condiciones aireadas (Zwaig, 1970). El glicerol-3-fosfato es convertido en dihidroxiacetona fosfato

por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GlpD) usando ubiquinona como aceptor de electrones. El glicerol también puede ser metabolizado por las enzimas GlpK y GlpABC como una ruta minoritaria bajo condiciones anaerobias (Zhang *et al.*, 2010).

El nodo común de ambas vías (dihidroxiacetona fosfato) genera PEP y piruvato, éstos son muy importantes ya que ambos conducen a la formación de oxalacetato (OAA) y malato, intermediarios directos de succinato. En *E. coli*, existen dos vías para la generación de OAA. A través de la enzima fosfoenolpiruvato carboxinasa (Pck) con la generación neta de una molécula de ATP; sin embargo, esta reacción es gluconeogénica bajo condiciones normales de crecimiento. Y a través de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (Ppc), enzima principal de carboxilación de PEP en este microorganismo, aunque sin generación de ATP. Hay una sola vía para la formación de malato a partir de piruvato, a través de las enzimas málicas (MaeA, MaeB), pero la dirección en este sentido es desfavorable. Una cuarta vía, heteróloga, usada en varios grupos de investigación para la producción de AS consiste en el uso de la piruvato carboxilasa (Pyc) que conduce a la formación de OAA a partir de piruvato, con el gasto de una molécula de ATP (Blankschien *et al.*, 2010).

Cabe mencionar que los productos mayoritarios tras la fermentación de glicerol por *E. coli* silvestre son ácido fórmico y etanol, seguido por ácido succínico y ácido acético (Zhang *et al.*, 2010; Li *et al.* 2006).

3.3 Ingeniería metabólica en *E. coli* para la producción de AS

Son varios los grupos de trabajo que han usado *E. coli* como objeto de estudio para la producción de AS. En éstos se han sobreexpresado genes que conducen a un aumento en la obtención AS y se han eliminado aquellos que llevan a la síntesis de enzimas que permiten la formación de metabolitos no deseados tales como lactato, formiato, acetato y etanol.

En 2010, Blankschien *et al.* obtuvieron la cepa *E. coli* MG1655 $\Delta adhE$, Δpta , $\Delta poxB$, $\Delta ldhA$, Δppc , [pZS-*pyc*] (*pyc* de *L. lactis*) para la producción de AS a partir de glicerol. En este genotipo se eliminaron los genes que llevan a la formación de productos no deseados como etanol, acetato y lactato, se eliminó el gen que codifica para enzima principal de carboxilación de PEP (*ppc*) y se sobreexpresó el gen heterólogo *pyc* de *Lactococcus lactis*. Tales autores evaluaron la cepa bajo condiciones microaeróbicas. Obtuvieron el inóculo en medio mínimo MOPS suplementado con 10 g/L triptona, 5 g/L extracto levadura y 10 g/L glicerol a 37 °C y 200 rpm. Con ello, inocularon los matraces que contenían medio mínimo MOPS suplementado con 20 g/L de glicerol. Las cinéticas se realizaron a 200 rpm, 37 °C y pH 7 (controlado con CaCO₃ 55 g/L), encontrando un título final de 14 g AS/L y un rendimiento másico de 0.69 g AS/g glicerol después de 72 h de

fermentación. Tales resultados demostraron que la sobreexpresión del gen no nativo *pyc* evita los problemas relacionados al nodo de PEP del metabolismo en *E. coli*, dirigiendo el flujo a la generación de oxalacetato (OAA), para después formar AS. Cabe recordar que existen tres vías para la formación de OAA (véase figura 4): 1) a partir de la enzima Pck, aunque tiende a ser gluconeogénica tomando al OAA como sustrato; 2) mediante Ppc, la principal para carboxilar PEP, la cual tiene baja afinidad por este sustrato en comparación con DhaKLM, otra enzima que usa PEP para fosforilar dihidroxiacetona durante la formación de dihidroxiacetona fosfato; y 3) por Pyc, que es una enzima carente en *E. coli*. Sin embargo, el uso de esta última como enzima principal para la carboxilación de PEP, conlleva un gasto de ATP cuya inversión se recupera sólo si el cultivo ocurre en presencia de oxígeno.

En ese mismo año, Zhang *et al.* (2010) obtuvieron la cepa *E. coli* ATCC8739 *pck**, $\Delta ptsI$, $\Delta pflB$, donde se realizó una mutación en el promotor del gen *pck* para su sobreexpresión, se eliminó el gen *ptsI* participante en la fosforilación de la dihidroxiacetona usando PEP y se eliminó el gen *pflB* para evitar la formación de formiato y disminuir la acumulación de etanol. El cultivo se llevó a cabo bajo condiciones anaeróbicas en presencia de glicerol como única fuente de carbono. El inóculo fue obtenido en matraz en medio mineral NBS suplementado con 2% glicerol a 37 °C y 120 rpm después de 16 h. Las cinéticas se realizaron en medio NBS con 5% w/v de glicerol a 150 rpm, 37 °C y pH 7 (controlado con una mezcla de K_2CO_3 2.4 M – KOH 1.2 M), reportando un título final de 9.4 g AS/L y un rendimiento de 0.7 g AS/g glicerol. Aunque esta estrategia permitió la generación neta de 1 ATP por molécula de AS producida debido a la sobreexpresión del gen *pck* de *E. coli*, el rendimiento alcanzado se obtuvo después de un tiempo de cultivo relativamente largo, 6 días.

En nuestro grupo de trabajo, Martínez Valenzuela (2018) obtuvo la cepa MS01 *frdA* $P_{trc}pck$ Δppc (*E. coli* MG1655 $\Delta pflB$, $\Delta adhE$, $\Delta xyIFGH$, Δreg 27.3 kb, *gatC* S184L, $\Delta midarpA$, $\Delta ldhA$ $P_{trc}pck$ Δppc) para la producción de AS a partir de glucosa. En esta cepa se reintegró el gen *frdA* de la enzima fumarato reductasa (eliminada previamente en la cepa MS01), para la síntesis de ácido succínico. Además, se realizó la integración cromosomal del gen *pck* (que codifica para la enzima fosfoenolpiruvato carboxinasa) en el locus de *lacZ*, para usarla como mecanismo principal de carboxilación de PEP y se eliminó el gen *ppc*. Después de 48 h de cultivo, bajo condiciones de limitación de oxígeno en biorreactor ($2.24 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) en medio mineral AM1 y 40 g/L glucosa a 37 °C, 150 rpm y pH 7 (controlado con una mezcla 1:1 de KOH 4 M - K_2CO_3 2 M), se obtuvo un título de 13.5 g AS/L y un rendimiento de 0.33 g AS/g glucosa. Pese a que en este estudio no se usó glicerol como fuente de carbono, los resultados reflejan que es posible dirigir el flujo metabólico a la producción de AS a partir de la sobreexpresión de una enzima gluconeogénica como Pck, como mecanismo principal de carboxilación de PEP.

En el presente proyecto se partirá de *E. coli* MG1655 (DE3) (*E. coli* K12F-, $\Delta\lambda$ -, *ilvG*, *rfb-50*, *rph-1*, DE3) para la construcción de una cepa sobreproductora de AS en condiciones sin aireación a partir de glicerol. Se sobreexpresarán los genes *glpK* de *E. coli* y *pck* de *A. succinogenes* y se eliminarán los genes *gldA*, *ppc*, *pykF* y de ser necesario, de acuerdo a los resultados, aquellos que conduzcan a la formación de productos no deseados (lactato, formiato, acetato y etanol) como *ldhA*, *poxB*, *ackA* y *adhE*; con lo que se espera obtener un balance redox favorable dando lugar a rendimientos iguales o mayores a 1 g de AS/g de glicerol.

La razón de la propuesta anterior radica en la naturaleza de las primeras reacciones durante la asimilación del glicerol. Como se observa en la figura 4, el glicerol entra a la célula por difusión facilitada usando la permeasa GlpF y tiene dos vías para metabolizarse. En condiciones aerobias, el glicerol es fosforilado con ATP por la enzima GlpK para luego convertirse en DHAP por la enzima GlpD. En ausencia de oxígeno, el glicerol es oxidado a DHA por GldA que luego se fosforila por DhaKLM usando PEP como donador de grupo fosfato. Ésta última ruta es desfavorable para la obtención de AS debido a que usa parte del PEP producido durante la glucólisis que debería dirigirse a la formación de AS; en otras palabras, desvía la fuente de carbono a la formación de otro metabolito (piruvato). Por esta razón, aunque en el presente estudio se trabajará en condiciones sin aireación, no se usarán GldA para metabolizar glicerol ya que se ha reportado que las enzimas GlpK y GlpABC son vías metabólicas minoritarias que asimilan glicerol bajo condiciones anaerobias (Zhang *et al.*, 2010). Por lo que se espera que en condiciones sin aireación la sobreexpresión de GlpK aumente el flujo a la formación de PEP, sustrato de la otra enzima que también se sobreexpresará, la Pck de *A. succinogenes* debido a que se ha reportado que el uso de esta enzima no nativa incrementa la producción de AS hasta 6.5 veces en *E. coli* (Kim *et al.*, 2004).

Con respecto a la eliminación del gen que codifica para PykF, se espera que esta modificación permita solo la producción del piruvato necesario para el crecimiento microbiano. En *E. coli* existen dos enzimas formadoras de piruvato, PykA y PykF; la primera representa un 93% de la actividad total de piruvato quinasa en condiciones aerobias, mientras que la PykA representa el 7% (Zhao *et al.*, 2017). Bajo condiciones anaerobias, la actividad de PykF contribuye con un 70% y la PykA con un 30%. Esto indica que la PykA juega un papel más importante en condiciones de fermentación debido a que su transcripción aumenta hasta tres veces (Zhao *et al.*, 2017). Por lo tanto, en nuestra propuesta, al dejar PykA como única enzima formadora de piruvato, a *E. coli* no se le privaría de este precursor necesario para su crecimiento.

Soellner *et al.*, (2013) consideran la formación de piruvato a partir de PEP por las enzimas PykA y PykF como una ruta que compite con la producción de AS. Ellos mencionan que la eliminación

de estas enzimas en una cepa de *E. coli* evitaría la formación de piruvato o derivados de éste, como lactato o etanol, logrando una máxima producción de succinato. Sin embargo, una cepa sin ninguna actividad piruvato quinasa no crecería en glicerol o no sería del todo viable (Pertierra and Cooper 1977; Cunningham et al., 2009), por lo que en este trabajo se propone solo la eliminación de PykF.

En resumen, en este proyecto se propone la construcción de la siguiente vía metabólica para la producción de AS a partir de glicerol en condiciones sin aireación (Fig. 5).

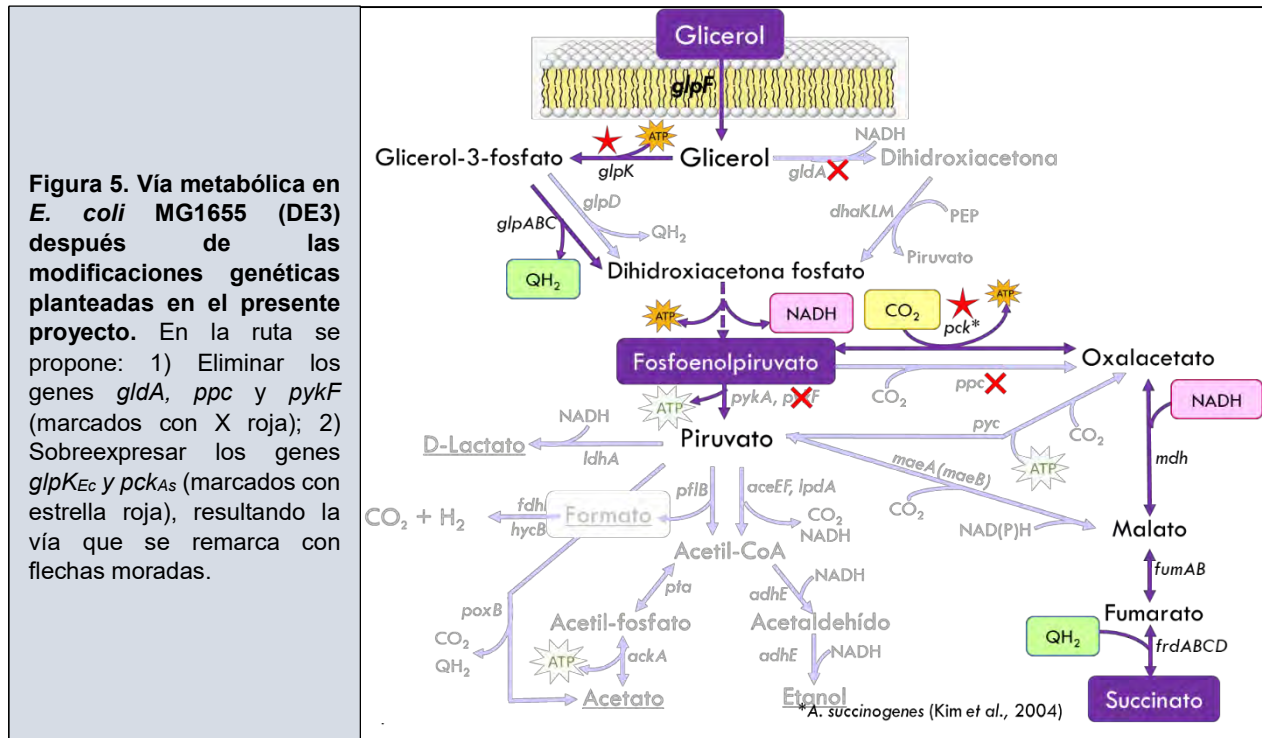


Figura 5. Vía metabólica en *E. coli* MG1655 (DE3) después de las modificaciones genéticas planteadas en el presente proyecto. En la ruta se propone: 1) Eliminar los genes *gldA*, *ppc* y *pykF* (marcados con X roja); 2) Sobreexpresar los genes *glpKEc* y *pckAs* (marcados con estrella roja), resultando la vía que se remarca con flechas moradas.

Con esta estrategia se propone:

- Conseguir la generación neta de 1 molécula de ATP por PEP carboxilado, lo cual representa una ventaja para la célula en términos energéticos;
- Favorecer la producción de AS;
- Obtener un balance redox $[NADH]/[NAD^+]$ en condiciones sin aireación, debido a que GlpABC y GapA generan QH_2 y NADH, respectivamente, los cuales se propone sean consumidos por Mdh y FrdBCD durante la formación de AS; y,
- Conseguir altos rendimientos, debido a que en condiciones sin aireación se pretende que la mayor parte de la fuente de carbono se dirija al producto de interés, aunado a la necesidad de oxidar QH_2 y NADH generadas durante la vía.

4. JUSTIFICACIÓN

El glicerol es un residuo agroindustrial abundante proveniente, principalmente, de la industria de producción de biodiésel y de jabones. Debido a que el mercado del biodiésel ya se ha consolidado en muchos países y se espera una expansión geográfica del mismo es preciso contar con una herramienta útil y eficaz que permita su aprovechamiento, una de ellas es el uso de glicerol como fuente de carbono en procesos fermentativos para la producción de compuestos de valor agregado, como el ácido succínico, propuesta de este proyecto.

Existen pocos estudios sobre la producción de AS a partir de glicerol bajo condiciones sin aireación, por lo que con este proyecto se estaría generando conocimiento básico del tema bajo las modificaciones genéticas específicas propuestas.

A través de la estrategia planteada, construcción de una cepa sobreproductora de AS, se está aprovechando la capacidad que tiene *E. coli* para utilizar glicerol como fuente de carbono que permitiría, en un momento dado, disminuir el uso de combustibles fósiles empleados comúnmente en la producción química de AS y otorgar valor agregado a los procesos industriales que generan glicerol como residuo. Al llevar a cabo un proyecto como éste se estaría desarrollando una tecnología verde ya que durante la formación de AS se consume CO₂ (gas de efecto invernadero) para la carboxilación de PEP.

Por otro lado, con la vía metabólica propuesta, se espera que al dirigir el flujo de carbono y energía hacia la producción de AS bajo condiciones sin aireación en minifermentador se alcancen rendimientos cercanos o mayores a 1 g AS/g de glicerol (el máximo teórico es 1.282) debido a que la vía metabólica está diseñada para que haya balance redox, donde el NADH y QH₂ formados tenderán a oxidarse promoviendo la formación de AS, resultando en un alto rendimiento del producto de interés.

5. HIPÓTESIS

Mediante la sobreexpresión de los genes *glpK_{Ec}* y *pck_{As}* y la eliminación de los genes *gldA*, *ppc* y *pykF* en *E. coli* MG1655 (DE3) se obtendrá una cepa sobreproductora de ácido succínico en condiciones sin aireación.

6. OBJETIVOS

6.1 General

Dirigir el flujo de carbono y poder reductor hacia la sobreproducción de ácido succínico en *E. coli* usando glicerol como fuente de carbono, en condiciones sin aireación.

6.2 Específicos

1. Generar una cepa de *E. coli* que no utilice la vía fermentativa en el metabolismo de glicerol, la cual conlleva a una capacidad reducida de interconversión de fosfoenolpiruvato en oxalacetato.
2. Promover el metabolismo de glicerol a glicerol-3-fosfato mediante la sobreexpresión de la glicerol cinasa (GlpK) de *E. coli*, en condiciones sin aireación.
3. Regenerar el metabolismo directo de fosfoenolpiruvato a oxalacetato expresando el gen de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (Pck) de *A. succinogenes*.
4. Limitar la producción de metabolitos de fermentación mediante la eliminación de la piruvato cinasa F (PykF).
5. Evaluar el efecto de sobreexpresar *glpK_{Ec}* y *pck_{As}*, sobre el consumo de glicerol, crecimiento celular, generación de succinato y productos de fermentación en medio mineral sin aireación, en las mutantes generadas.
6. En cepas de *E. coli* expresando *glpK_{Ec}* y *pck_{As}*, evaluar parámetros cinéticos y estequiométricos del metabolismo de glicerol en medio mineral enriquecido en condiciones sin aireación y de limitación de oxígeno.
7. Comprobar la funcionalidad de Pck_{As} mediante la determinación de su actividad enzimática.

7. MATERIALES Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

7.1 Cepas, plásmidos, oligonucleótidos y técnicas de biología molecular utilizadas.

En este estudio se partió de la cepa MG1655 (DE3) (*E. coli* K12F-, $\Delta\lambda$ -, *ilvG*, *rfb-50*, *rph-1*, *DE3*; este último gen codifica para la RNA polimerasa del fago λ), la cual es muy utilizada en el laboratorio debido a que permite la expresión de vectores que están bajo un promotor fuerte como T7.

En este estudio se utilizaron y/o generaron los siguientes oligonucleótidos (Tabla 3).

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.		
Oligonucleótido	Secuencia	Referencia
Fw-gldA	5' AGG GGC AAA ATA CGT TGC TC 3'	Este trabajo
Rv-gldA	5' TTT CAT CTG GTT CGT CCG TG 3'	Este trabajo
Fw-pck	5'GCG TGG TGA ATC GAT ACT TTA CC 3'	Este trabajo
Rv-pck	5' GAA CAA CGT AAG CAC CTG TTC C 3'	Este trabajo
Fw-ppc	5'GCA TCT TAT CCG ACC TAC AC 3'	Martínez-Gómez <i>et al.</i> , 2012
Rv-ppc	5'GCC TGT AGC AGA GTA GAG AA 3'	Martínez-Gómez <i>et al.</i> , 2012
Fw-pykF-2127	5'TGT AGA ACT CAA CGA CTC AAA AAC A 3'	Este trabajo
Rv-pykF-2128	5'AAA ATT GAG AGA AAA CAG GAT GCT T 3'	Este trabajo
Fw- pACYCDuet-1	5'GTG AGC GGA TAA CAA TTC CCC TG 3'	Este trabajo
Rv- pACYCDuet-1	5'GGT TAT GCT AGT TAT TGC TCA GCG G 3'	Este trabajo
Fw-glpK_{Ec}-PvuI	5'CGA TTC GAT CGG CGA TCG GGC ATT TAC ATT ATT CGT CGT GTT CTT CCC AC 3'	Este trabajo
Rv-glpK_{Ec}-NdeI	5'GCA CGC ACG TCC CAT ATG ACT GAA AAA AAA TAT ATC GTT GCG CTC GAC CAG GG 3'	Este trabajo
Fw-pcK_{As}-SacI	5'CAG CTA CGC TGC GAG CTC CTT TTA CAG TTT TAT GCT TTT GGA CCG 3'	Este trabajo
Rv-pcK_{As}-NcoI	5'CGG ACT CGG CTA CGA GCT ACC ATG GGA TGA CTG ACT TAA ACA AAC TCG TTA AAG 3'	Este trabajo
k1	5'CAG TCA TAG CCG AAT AGC CT3'	Datsenko & Wanner, 2000
k2	5'CGG TGC CCT GAA TGA ACT GC3'	Datsenko & Wanner, 2000
csgC	5'ACA ACG CGA CCG CTC ATC AG3'	Hayashi, et al., 2006
ymdA	5'CGT CAC ATG CCG GTT CCA CA3'	Hayashi, et al., 2006

Las cepas y plásmidos utilizados y/o generados se enlistan a continuación (Tabla 4).

Tabla 4. Cepas y plásmidos utilizados en este estudio.		
Cepa/plásmido	Genotipo o descripción	Referencia
MG1655 (DE3)	(<i>E. coli</i> K12F-, $\Delta\lambda$ -, <i>ilvG</i> , <i>rfb-50</i> , <i>rph-1</i> , <i>DE3</i> ; este último gen codifica para la RNA polimerasa del fago λ).	Colección del laboratorio
BL21 (DE3)	-	Colección del laboratorio
<i>A. succinogenes</i> 130Z	-	Colección del laboratorio
Keio Δ<i>gldA</i>::<i>Km</i>^R	Keio Δ <i>gldA</i> :: <i>FRT-Km</i> ^R - <i>FRT</i>	Collección de Keio
Keio Δ<i>pck</i>::<i>Km</i>^R	Keio Δ <i>pck</i> :: <i>FRT-Km</i> ^R - <i>FRT</i>	Collección de Keio
Keio Δ<i>ppc</i>::<i>Km</i>^R	Keio Δ <i>ppc</i> :: <i>FRT-Km</i> ^R - <i>FRT</i>	Collección de Keio
Keio Δ<i>pykF</i>::<i>Km</i>^R	Keio Δ <i>pykF</i> :: <i>FRT-Km</i> ^R - <i>FRT</i>	Collección de Keio
pCP20	Plásmido que porta los genes de la recombinasa FLP.	Datsenko & Wanner, 2000
pACYCDuet-1	Vector de expresión con dos sitios de clonación	Protocolo TB340 Rev. F 0211JN de Novagen® (www.merck4biosciences.com)
pACYCDuet-1/<i>pck</i>_{As}	Vector de expresión que contiene el gen <i>pck</i> de <i>A. succinogenes</i> 130Z optimizado con el uso de codones para <i>E. coli</i> .	Este trabajo
pACYCDuet-1/<i>glpK</i>_{Ec}	Vector de expresión que contiene el gen <i>glpK</i> de <i>E. coli</i> .	Este trabajo
pACYCDuet-1/<i>pck</i>_{As}, <i>glpK</i>_{Ec}	Vector de expresión que contiene el gen <i>pck</i> de <i>A. succinogenes</i> 130Z optimizado con el uso de codones para <i>E. coli</i> y el gen <i>glpK</i> de <i>E. coli</i> .	Este trabajo
pACYCDuet-1/<i>pck</i>^{*As}	Vector de expresión que contiene el gen <i>pck</i> de <i>A. succinogenes</i> 130Z.	Este trabajo
pACYCDuet-1/<i>pck</i>^{*As}, <i>glpK</i>_{Ec}	Vector de expresión que contiene el gen <i>pck</i> de <i>A. succinogenes</i> 130Z y el gen <i>glpK</i> de <i>E. coli</i> .	Este trabajo
pLoxGentrc<i>pck</i>	Plásmido derivado de pLoxGentrc portador del gen <i>pck</i> de <i>E. coli</i>	Martínez Valenzuela, 2018

7.1.1 Eliminación cromosomal de los genes propuestos en *E. coli* MG1655 (DE3) mediante transducción por fagos.

La eliminación de los genes *gldA*, *ppc*, *pck* y *pykF* del cromosoma de *E. coli* MG1655 (DE3) se llevó a cabo utilizando el protocolo de transducción por fagos (modificación de la metodología de Miller H., 1992).

Se preparó un cultivo en 4 mL de medio LB con el antibiótico respectivo de la cepa donadora (30 μ g/mL de *Km*^R para cepas de la colección de Keio) y se incubó a 37 °C y 300 rpm toda la noche. Al día siguiente, se preparó el lisado del bacteriófago P1 en la cepa donadora. Para ello, se centrifugó 1.5 mL del cultivo de la cepa donadora a 13,000 rpm por 1 minuto y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 750 μ L de solución amortiguadora MC preparada previamente (anexo 4). Se preparó la siguiente serie de microtubos a temperatura ambiente:

TUBO	Volumen de células (µL)	Volumen de fagos* (µL)	Notas
1	100	...	Control de contaminación con bacteriófagos, verificación de que las células son viables.
2	100	10	Diferentes concentraciones del bacteriófago para encontrar la que provoque una mayor efectividad del fago, es decir, una buena infección y mayor lisis celular.
3	100	50	
4	100	100	
5	**	10	Control de contaminación con bacterias.

*Los fagos P1 (que aún no contenían ADN de *E. coli*) fueron proporcionados en el laboratorio.

**Se adicionó 100 µL de solución MC. Se mezcló suavemente.

Estos se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. En este tiempo, se fundieron con microondas 25 mL de agar suave y se dejaron enfriar. Poco antes de que terminara el tiempo de incubación, se verificó que el agar suave se hubiera enfriado lo suficiente para agregar 250 µL de MgSO₄ 1 M y 125 µL de CaCl₂ 1 M para alcanzar una concentración final de 10 y 5 mM, respectivamente. Se colocó 4 mL de la preparación de agar suave con sales en 5 tubos Falcon® de 25 mL. A cada tubo con agar suave se le agregó el contenido de la suspensión células-fago de la serie anterior y se agitó con vortex a velocidad mínima. Se plateó cada preparación en una caja con LB sin antibiótico y se incubó a 37 °C toda la noche. Al día siguiente, se raspó el agar suave de las cajas donde hubo lisado y se pasó a un tubo cónico de 50 mL. A éste se le añadió 5 mL de LB y 200 µL de cloroformo y se agitó a máxima velocidad. Se centrifugó a 5000 rpm por 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se filtró en una membrana de 0.45 µm para conservarse a 4 °C.

Para la transducción del bacteriófago P1 en la célula receptora, que es la célula de interés a la que se le quiere eliminar el gen, se preparó un cultivo de esta cepa en 4 mL de medio LB y se incubó a 37 °C y 300 rpm toda la noche. Se centrifugó 1.5 mL de dicho cultivo a 13000 rpm por 1 minuto y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 750 µL de solución amortiguadora MC preparada previamente. Se preparó la siguiente serie de microtubos a temperatura ambiente:

Tubo	Volumen de células (µL)	Volumen de fago Keio (µL)	Notas
1	100	...	Control de contaminación con bacteriófagos, verificación de que las células son sensibles al antibiótico y que el antibiótico en las cajas está activo.
2	100	10	Diferentes concentraciones de bacteriófago
3	100	50	
4	100	100	
5	*	10	Control de contaminación con bacterias.

* Se adicionó 100 µL de solución MC y se mezcló suavemente.

Los microtubos se incubaron a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente se agregaron 100 μ L de citrato de sodio 1 M y se mezclaron suavemente, sin usar vortex. Se plateó todo el contenido de cada tubo en una caja con el medio de selección (LB + Km) y se incubó a 37 °C por 24 horas. La eliminación del gen de interés se comprobó por PCR con los oligonucleótidos externos al gen a eliminar e internos del casete de kanamicina.

7.1.2 Escisión cromosomal del gen de resistencia a kanamicina (*km*) flanqueado por los sitios FRT

En la transducción por fagos, el gen de interés se sustituye por el casete de resistencia a kanamicina, el cual debe de escindir-se si se desea hacer eliminaciones sucesivas.

En primer lugar, se transformó la cepa a la que se le quiere eliminar el casete de Km con el plásmido pCP20. Se recuperó en 1 mL de medio rico SOC a 30 °C y 300 rpm por 2-3 horas. Se platearon 100 μ L directo de la transformación y 100 μ L de una dilución 1:10 en placas con medio de selección LB_{Cb100} y se incubaron a 30 °C durante 24 horas. De una de estas placas se seleccionaron 16 colonias (resistentes a Cb) y se probó el fenotipo de pérdida de FRT-km en cajas con medio LB_{Km30} y LB sembrándolas con palillo, por guion, en ese orden para asegurar que la última placa también recibiera el inóculo. Se incubó a 37 °C toda la noche.

Se seleccionaron 2 colonias candidatas que mostraron el fenotipo de pérdida del casete, es decir, colonias sensibles a kanamicina. Se estriaron en placa de LB y se hizo el primer pase de incubación a 42 °C toda la noche, para promover la eliminación del plásmido pCP20 en colonias aisladas. Se demostró la escisión del casete FRT-km con una reacción de PCR a partir de ADN cromosomal de las dos candidatas.

Se seleccionaron de 10-20 colonias aisladas de cada una de las dos candidatas estriadas en las cajas de LB y se probó en placa el fenotipo de crecimiento en LB_{Cb100} y LB estriándolas, por guion, en ese orden para asegurar que la última caja también recibiera el inóculo. Se incubó a 30 °C toda la noche. Aquellas que no crecieron en LB_{Cb100} son las que perdieron el plásmido pCP20.

7.2 Construcciones derivadas del vector pACYCDuet-1 con los genes de interés.

En este estudio se realizaron las siguientes construcciones (Tabla 5 y figura 6).

Tabla 5. Construcción de vectores de expresión con pACYCDuet-1.	
No	Construcción
1	pACYCDuet-1/ <i>pck</i> _{As}
2	pACYCDuet-1/ <i>glpK</i> _{Ec}
3	pACYCDuet-1/ <i>pck</i> _{As} , <i>glpK</i> _{Ec}
4	pACYCDuet-1/ <i>pck</i> [*] _{As}
5	pACYCDuet-1/ <i>pck</i> [*] _{As} , <i>glpK</i> _{Ec}

*Gen *pck* amplificado del genoma de *A. succinogenes* 130Z

El gen *pck* se mandó a sintetizar con el uso optimizado de codones para *E. coli* con los sitios de corte NcoI y HindIII (Anexo 1), y se integró en el vector pACYCDuet-1 inducible por IPTG (vector 1), ambas actividades realizadas por la empresa GENEWIZ® (www.genewiz.com). Sobre esta construcción se insertó el gen *glpK* amplificado del cromosoma de *E. coli* usando los oligonucleótidos Fw-*glpK*-PvuI y Rv-*glpK*-NdeI (vector 3). Más adelante se incluye el protocolo de ligación de genes a plásmidos utilizando la ligasa T4.

También se construyó el vector pACYCDuet-1/*glpK*_{Ec} que contiene únicamente el gen *glpK* amplificado de *E. coli* (vector 2). Así mismo, se realizó la construcción de los vectores 4 y 5 con el gen *pck* amplificado directamente del genoma de *A. succinogenes* 130Z como alternativa al vector 1 y 3, y porque se podía conocer si hay alguna diferencia entre usar un gen heterólogo cuya secuencia está optimizada para *E. coli* y otra que no.

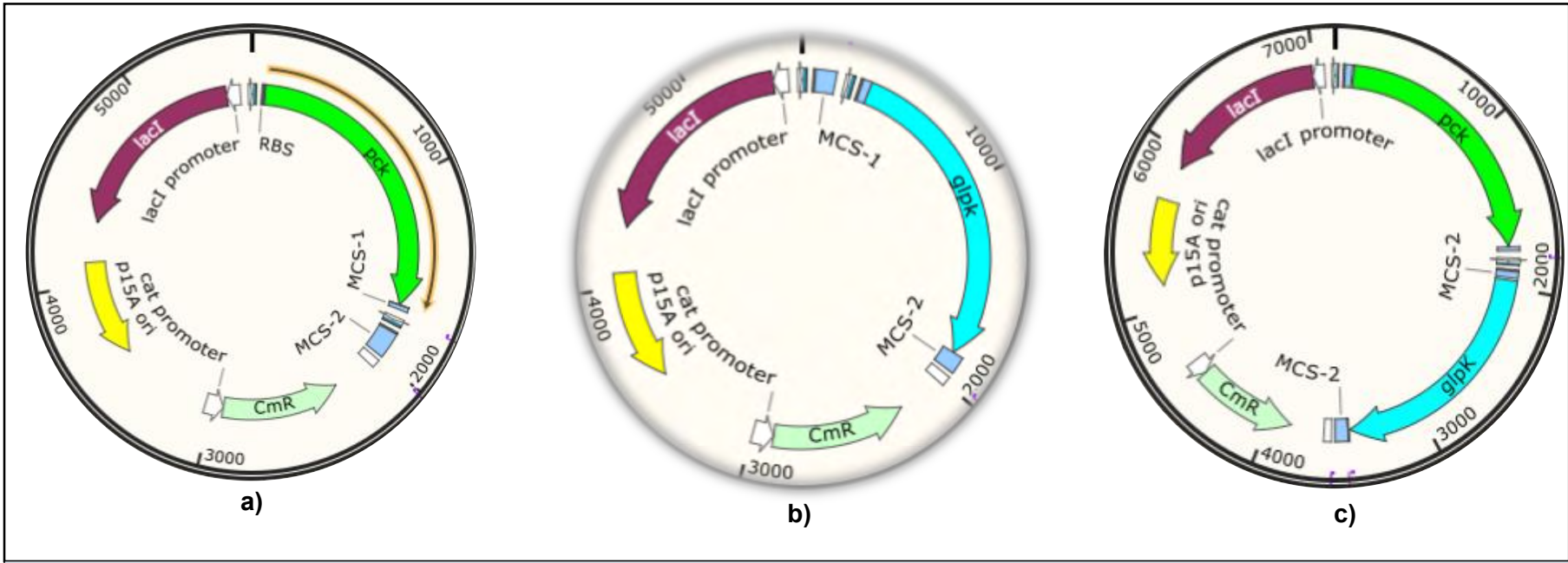


Figura 6. Estructura de los vectores de expresión pACYCDuet-1 construidos en este estudio. a) Estructura de los vectores 1 y 4, b) Estructura del vector 2, c) Estructura del vector 3 y 5, según la tabla 4.

7.2.1 Ligación de genes a plásmidos con la enzima ligasa T4.

Para cada ligación, se partió de 2 mg del plásmido extraído por miniprep por lisis alcalina y 50 µL del gen amplificado con la polimerasa Phusion (Thermo Fisher Scientific). Ambos se digirieron por separado con cada una de las enzimas de restricción correspondientes a 37 °C por 8 horas. Posteriormente, el producto de digestión del plásmido se trató con la enzima fosfatasa alcalina de camarón (SAP, por sus siglas en inglés) de Thermo Fisher Scientific durante 1 hora, con el fin de quitar los fosfatos terminales resultantes de la digestión y evitar una recircularización del plásmido y la obtención de falsas positivas en la reacción de ligación. Se procedió a purificar el vector e inserto. Primero, mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7% corriéndolos a 50 V por 4 h, aproximadamente; y segundo, por purificación en columna con el kit "GeneJet Gel Extraction Kit" (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA).

Para la ligación de los genes al vector se usó la enzima ligasa T4 (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA). En esta reacción, con un volumen de 20 µL, se utilizaron 60 ng del plásmido y la cantidad respectiva del gen para una relación plásmido:inserto de 1:3, ATP y DTT de acuerdo al protocolo de la DNA ligasa T4, 1 Weiss U/µL de Thermo Fisher Scientific.

La reacción de ligación se incubó a 4 °C por cuatro días y con el producto de ligación se transformó la cepa de *E. coli* DH5α electrocompetente, dejándolo recuperar en medio SOC por 24 h. Se sembraron 100 µL de la recuperación concentrada y 100 µL de una dilución 1:10 en cajas de medio LB con el marcador de selección del vector, cloranfenicol (30 µg/mL).

Para comprobar la ligación se extrajo DNA plasmídico con el método de Miniprep por lisis alcalina y se digirió con las enzimas de restricción correspondientes observándose los tamaños esperados para el vector linealizado y el gen *pck* y/o *glpk* en gel de agarosa al 1%.

7.3 Evaluación de *E. coli* en minifermentadores.

7.3.1 Obtención del preinóculo.

Las cepas silvestres o mutantes (guardadas en congelación en glicerol al 40% como criopreservador) se sembraron en cajas de medio Luria (LB) sólido con el antibiótico respectivo (para las mutantes). Se incubaron durante 24 horas a 37 °C. De éstas, se tomaron 3 colonias aisladas y se cultivaron durante 4-5 horas a 37 °C y 300 rpm en tubos de vidrio (16x150 mm) con 4 mL de medio LB líquido (los antibióticos se añadieron en caso de ser necesarios).

7.3.2 Preparación del inóculo.

Para preparar el inóculo se vertió el contenido de los tubos con las células preparadas en el punto 7.3.1 en los minifermentadores de 300 mL con 200 mL de medio mineral AM1 modificado (Tabla 6; Martinez *et al.*, 2007) suplementado con glicerol (5 g/L) y, como en la sección de resultados se

mencionará, en algunos casos se adicionó triptona (10 g/L; Difco) y extracto de levadura (5 g/L; Difco). El antibiótico correspondiente se añadió en caso de ser necesario. El cultivo se realizó a 37 °C, 150 rpm y a pH 6.3 controlado con una mezcla 1:1 de NaOH 4 M y Na₂CO₃ 2 M hasta llegar a una densidad óptica (medida a 600 nm: D.O.₆₀₀) de 0.6, correspondiente a la fase exponencial. Se tomó el volumen necesario para iniciar el cultivo en los minifermentadores de evaluación a D.O.₆₀₀ de 0.1 (ver sección 7.7) y se centrifugó a 5,000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. H

Compuesto	Concentración en el medio
Sales de amonio (NH ₄) ₂ HPO ₄	19.92 mM
NH ₄ H ₂ PO ₄	7.56 mM
Ácido cítrico	0.1 g/L
MgSO ₄ 7H ₂ O	1 mM
Betaina	1 mM
Elementos traza	1.5 mL
Bicarbonato de sodio	2 g/L

*Los componentes del medio AM1 se encuentran en el anexo 5.

7.3.3 Cultivo en minifermentadores de evaluación.

Para evaluar las cepas silvestres o mutantes se determinaron parámetros cinéticos (velocidades específicas de crecimiento, consumo de glicerol, formación de AS y otros productos) y estequiométricos (rendimientos biomasa/glicerol, productos de fermentación/glicerol y AS/glicerol) en minifermentadores de evaluación de 300 mL. Las cepas se cultivaron en 200 mL de medio mineral suplementado con 10 g/L glicerol y, esta vez, con bicarbonato de sodio (4 g/L), triptona (10 g/L) y extracto de levadura (5 g/L) a 37 °C, 150 rpm y pH 6.3 controlado con una mezcla 1:1 de NaOH 4 M y Na₂CO₃ 2 M. Para estas cinéticas, con cepas que contenían los vectores de expresión a evaluar, se les añadió IPTG a una concentración final de 10 µM. Se añadió el antibiótico correspondiente a la cepa mutante evaluada.

Las cinéticas de evaluación se llevaron a cabo por triplicado.

7.4 Evaluación de *E. coli* en biorreactores de 1 L.

7.4.1 Obtención del preinóculo.

Las cepas evaluadas (guardadas en congelación en glicerol al 40% como criopreservador) se sembraron en cajas con LB sólido con el antibiótico respectivo. Se incubaron durante 24 horas a 37 °C. De éstas, se tomó 1 colonia aislada y se cultivó toda la noche a 37 °C y 300 rpm en tubos de vidrio (16x150 mm) con 5 mL de medio LB (los antibióticos se añadieron en caso de ser necesarios).

7.4.2 Preparación del inóculo.

Se inoculó todo el volumen del preinóculo anterior a un matraz de 250 mL con 45 mL de medio LB (los antibióticos se añadieron en caso de ser necesarios). Se cultivó a 37 °C y 300 rpm hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ entre 1.5-2, correspondiente a la fase de crecimiento exponencial (después de 2-3 h, aproximadamente).

7.4.3 Cultivo en biorreactor.

Se realizó la evaluación del crecimiento y producción de ácido succínico y otros productos de fermentación utilizando glicerol como fuente de carbono en biorreactores Applikon ADI 1010/ ADI 1025 (Schiedam, The Netherlands) de volumen nominal de 1 L.

También, se evaluó la capacidad de crecimiento, producción de ácido succínico y otros metabolitos, y consumo de glucosa durante 48 horas en 750 mL de medio AM1 2X (el doble de la concentración de las sales de la tabla 5) suplementado con glicerol, bicarbonato de sodio (4 g/L), triptona de caseína 10 g/L y extracto de levadura 5 g/L, a 37 °C, 400 rpm, pH 6.3, 0.1 y 0.5 vvm (según se indique en los resultados). En caso de ser necesario, se añadió el antibiótico respectivo e IPTG (10 µM). El control de pH se realizó con una mezcla 1:1 de NaOH 4 M y Na₂CO₃ 2 M. Se tomó el volumen necesario del inóculo anterior (sección 5.4.2), para iniciar el cultivo en biorreactor a 0.1 D.O.₆₀₀, y se centrifugó a 5,000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y se resuspendió en el medio preparado en el biorreactor.

Las cinéticas en biorreactor se realizaron por duplicado.

7.5 Determinación de la actividad enzimática de Pck (Fosfoenolpiruvato carboxicinas).

7.5.1 Cosecha de las células.

Las células obtenidas durante los muestreos de las cinéticas, colocadas en tubos Eppendorf® de 1.5 mL, se centrifugaron a 12,000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Se lavaron 2 veces con Tris-HCl 100 mM (pH 7.0), centrifugando a las mismas condiciones ya mencionadas. El paquete celular se resuspendió en 1 mL del amortiguador. Se sonicó (Sonicador Soniprep 150) con 4 pulsos de 15 s cada uno con amplitud de 14-16 micrones y 1 min de reposo, manteniendo el tubo en hielo con etanol. Los restos celulares se removieron centrifugando 10 minutos a 12,000 rpm y a 4 °C. El extracto crudo resultante se usó para determinar la actividad enzimática o se guardó a -20 °C. Todas las operaciones se llevaron a cabo en hielo.

7.5.2 Actividad enzimática de la Pck.

La determinación de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford (Anexo 3). La mezcla para la reacción enzimática consistió en NaHCO_3 35 mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 16 mM, NADH 0.3 mM, DTT 1 mM, ADP 10 mM, PEP 5 mM y malato deshidrogenasa (MD) 10 U. El volumen restante para 1 mL de reacción se completó con el amortiguador, para ensayo enzimático, Tris HCl 100 mM (pH 6.6) y al final se añadió 100 μL del extracto enzimático. Se siguió la oxidación del NADH a 340 nm, a 37 °C con el equipo Nanodrop, durante 3 minutos.

La actividad enzimática específica fue reportada como unidades internacionales por miligramo de proteína celular total [$\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg}$ proteína)], la cual se define como la cantidad de enzima necesaria para convertir 1 μmol de sustrato a un producto específico por minuto por mg de proteína.

7.6 Métodos analíticos.

7.6.1 Determinación de la concentración de biomasa.

La concentración celular de los cultivos fue cuantificada como densidad óptica (D.O.) Ésta se determinó a 600 nm (D.O._{600}) en un espectrofotómetro marca Thermo Scientific modelo GENESYS 10S UV-VIS. Para calcular la concentración de biomasa en gramos de peso seco celular se usó el factor $1 \text{ O.D.}_{600} = 0.43 \text{ g}_{\text{DCW}}/\text{L}$ (Centeno, 2013).

7.6.2 Cuantificación de sustratos y productos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La cuantificación de los metabolitos se llevó a cabo por HPLC con H_2SO_4 , 30 mM como fase móvil, a un flujo de 0.3 mL/min, en una columna Aminex HPX-87H a 42 °C (Dharmadi *et al.*, 2006). La detección se hizo simultáneamente con un detector de arreglo de diodos a 210 nm (Waters 996) y un detector de índice de refracción (Waters 410). La determinación se realizó mediante la comparación de las áreas bajo la curva de los analitos y los estándares, éstos últimos a diferentes concentraciones. El análisis y procesamiento de datos se realizó con el sistema Empower 2. Los sobrenadantes, antes de ser analizados, fueron filtrados en membranas de 0.45 μm .

7.7 Cálculos realizados.

- **Cálculo del volumen de cultivo necesario para iniciar las fermentaciones a una D.O.₆₀₀ de 0.1 (o a cualquier otra).**

Se usó la fórmula de Volumen 1 (V1) x Concentración 1 (C1) = Volumen 2 (V2) x Concentración 2 (C2)

De donde

V1 = Es la incógnita

C1 = Es la D.O.₆₀₀ del inóculo

V2 = Es el volumen final del cultivo de evaluación

C2 = Es 0.1 D.O.₆₀₀ o cualquier otra con la que se requiera iniciar el cultivo de evaluación

- **Corrección de los datos obtenidos por el factor de dilución**

La concentración de biomasa, ácido succínico producido, sustrato consumido y demás productos obtenidos fueron corregidos en función al volumen de base, para controlar el pH a 6.3, adicionado a cada tiempo mediante un factor de dilución (FD).

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

V_i = Volumen inicial del cultivo

V_b = Volumen de base añadido

Corregidos los valores, se calcularon los parámetros que a continuación se mencionan.

- **Velocidad de crecimiento microbiano**

La velocidad de crecimiento (μ) se determinó durante la fase exponencial del crecimiento, como criterio se utilizó un coeficiente de correlación mayor a 0.98 en las pendientes. La ecuación usada fue:

$$\mu = (\ln(\text{Biomasa final}) - \ln(\text{Biomasa inicial})) / (\text{tiempo inicial} - \text{tiempo final})$$

- **Rendimientos globales**

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

$$Y_{x/s} = (\text{Biomasa final} - \text{biomasa inicial}) / \text{g de sustrato consumido}$$

- **Parámetros cinéticos**

- Productividad volumétrica: $Q_p = (\text{g/L producto final} - \text{g/L producto inicial}) / \text{tiempo}$ (al cual se agota el sustrato o se llega a la máxima concentración de producto).
- Consumo volumétrico: $Q_s = (\text{g/L sustrato inicial} - \text{g/L sustrato final}) / \text{tiempo}$
- Consumo específico: $q_s = \mu / Y_{x/s \text{ Exp}}$
 μ = velocidad de crecimiento microbiano
 $Y_{x/s \text{ exp}}$ = rendimiento de biomasa con respecto al sustrato durante la fase exponencial

- **Actividad volumétrica:**

$$\text{Uenzima/ mL} = [(\Delta A_{340\text{nm}} / \text{min})(1 \text{ mL})] / [(6.22)(V_{\text{Ext}})(1 \text{ cm})].$$

340 nm = Longitud de onda empleada.

1 mL = Mezcla final de reacción.

$6.22 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ = Coeficiente de extinción milimolar de NAD^+ , NADH y NADP a 340 nm.

V_{Ext} = Volumen del extracto celular empleado (100 μL).

1 cm = Medida del paso de la luz en la cubeta.

- **Actividad específica:**

$$\text{UI / min} * \text{mg proteína} = (\text{actividad volumétrica UI / mL} * \text{min}) / (\text{mg proteína / mL})$$

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

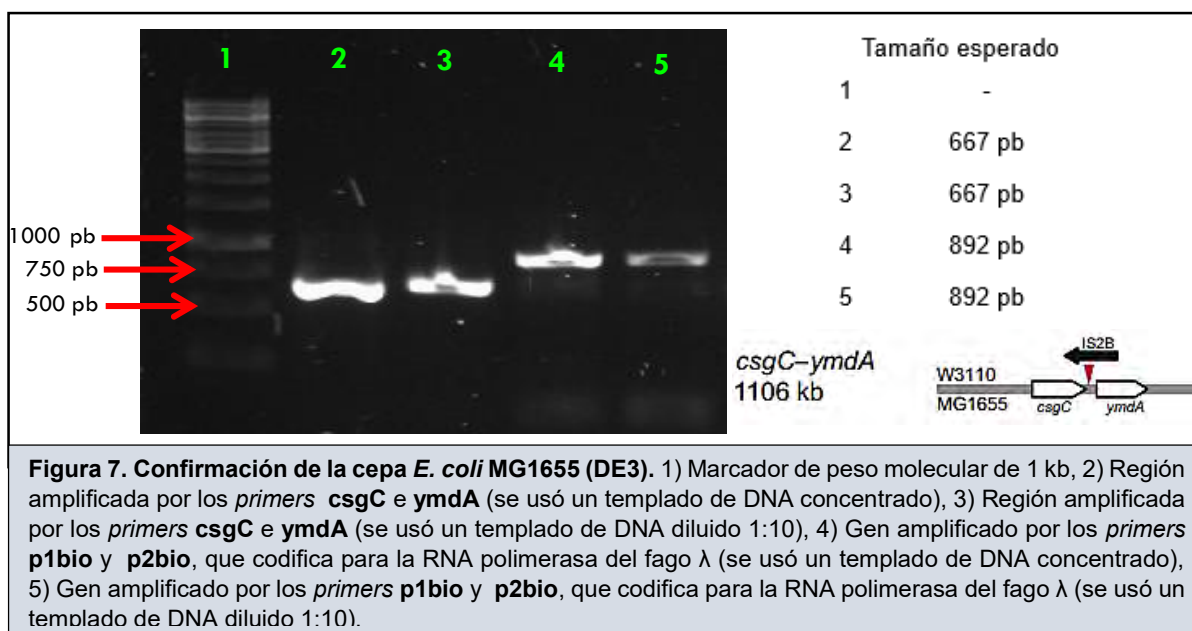
8.1 Construcción de las cepas y vectores de expresión.

8.1.1 Comprobación de la cepa *E. coli* MG1655 (DE3).

Antes de iniciar las modificaciones genéticas y caracterización cinética de la cepa silvestre a utilizar, *E. coli* MG1655 (DE3), se comprobó por PCR que verdaderamente se tratara de ésta.

Las cepas manejadas en el laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas (IBt – UNAM), *E. coli* MG1655 y *E. coli* W3110, se diferencian en que esta última posee una secuencia de inserción de 1106 pb (IS2B) entre las regiones *csgC* e *ymdA* del genoma (Hayashi et al., 2006). Por tanto, con los oligonucleótidos necesarios (*csgC* e *ymdA*) se amplificó por PCR la secuencia mencionada en la cepa *E. coli* MG1655 (DE3) dando como resultado un tamaño de 667 pb (fig. 7).

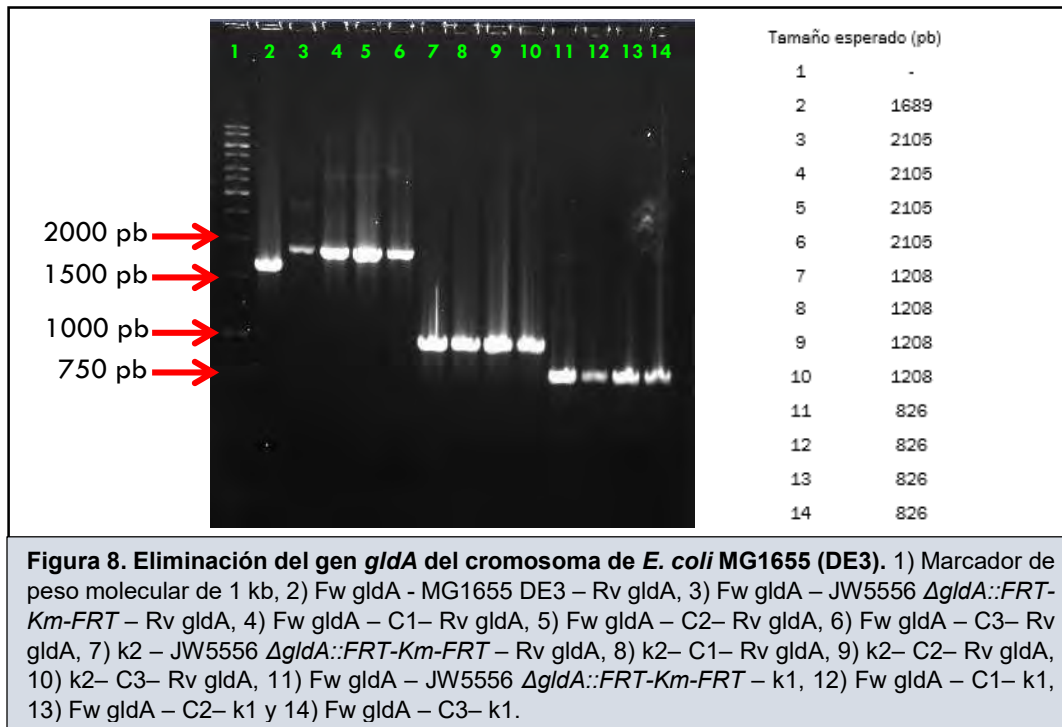
En el gel (Figura 7) se aprecian las bandas que confirman que la cepa evaluada es la MG1655, ya que los oligonucleótidos *csgC* y *ymdA* no amplifican la región de 1106 pb que corresponde a IS2B, sino una región de 667. Además, es una cepa DE3, es decir, posee el gen que codifica para la RNA polimerasa del fago T7 (necesaria para la transcripción de genes insertados en vectores de expresión), ya que la región amplificada por los oligonucleótidos *p1bio* y *p2bio* corresponde al tamaño esperado, 892 pb.



En este caso, solo para fines prácticos, se trabajó con diluciones 1:10 del templado de DNA usado en la preparación estándar de la reacción de PCR.

8.1.2 Eliminación del gen *gldA* en *E. coli* MG1655 (DE3).

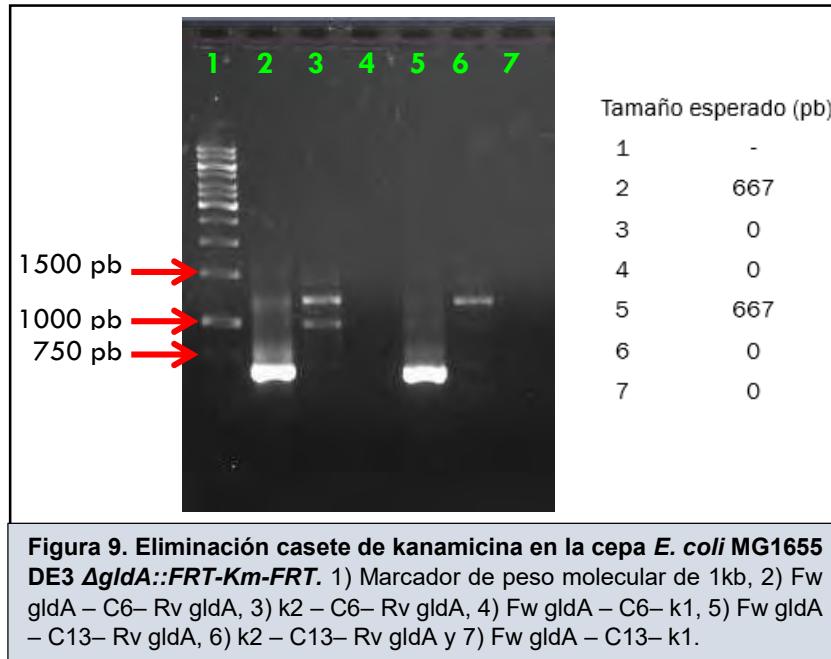
Se eliminó el gen *gldA* mediante transducción por fagos a partir de un lisado de la cepa JW5556 ($\Delta gldA::FRT-Km-FRT$) de la colección Keio. Se seleccionaron tres colonias candidatas que mostraron el fenotipo de resistencia a kanamicina (C1, C2 y C3) después de la transducción. A éstas, se les amplificó por PCR la región insertada en lugar del gen *gldA* usando oligonucleótidos externos a éste (Fw-*gldA* y Rv-*gldA*); dicha región corresponde al gen de resistencia a kanamicina (*km*). También se amplificaron las regiones comprendidas entre uno de los oligonucleótidos externos con un oligonucleótido interno al gen *km* (k1 y/o k2) (fig. 8).



La figura 8 muestra claramente que el gen *gldA* fue eliminado del cromosoma en las tres candidatas evaluadas, ya que las bandas obtenidas en el gel tuvieron el mismo tamaño que las bandas de la cepa control, la cepa JW5556 $\Delta gldA::FRT-Km-FRT$. Sin embargo, hubo un problema en los tamaños esperados, ya que todas las bandas de los carriles 3-14 presentaron tamaños con 250-300 pb menos que en los obtenidos en la simulación realizada con el programa SnapGene™ 1.1.3 (los cuales se anotan a lado derecho de la figura). La falta de esos pares de bases tuvo lugar en todos los casos, por lo que se concluyó que el problema está en la secuencia anotada del gen de kanamicina.

Se seleccionó la candidata 1 y se le denominó cepa AG01 (*E. coli* MG1655 DE3 $\Delta gldA::FRT-Km-FRT$). Posteriormente, se eliminó el casete de Km de esta cepa resultante para poder realizar la eliminación del gen *ppc*. La escisión del casete de Km se realizó utilizando la enzima flipasa,

expresada en el plásmido pCP20, que reconoce los sitios FRT, los cuales flanquean al gen *Km*. La comprobación se realizó por PCR usando los oligonucleótidos externos e internos al casete de *Km* como se muestra en la figura 9. Se evaluaron dos colonias candidatas (C6 y C13), para seleccionar la cepa *E. coli* MG1655 (DE3) Δ *gldA*::*FTR*.



En ambas candidatas se eliminó la región correspondiente al casete de kanamicina (de 1439 pb) ya que el tamaño obtenido fue mucho menor en comparación que cuando tenían dicho marcador (ver figura 8). Al amplificar las regiones usando el oligonucleótido externo Rv *gldA* y el interno al casete, k2, se observaron bandas que corresponden a inespecificidades, lo que no sucedió al usar el par Fw *gldA*-k1. Estas candidatas también se evaluaron fenotípicamente, mostrando sensibilidad al antibiótico en cuestión. Se eligió la candidata 13: *E. coli* MG1655 (DE3) Δ *gldA*::*FTR*.

8.1.3 Eliminación del gen *ppc* en *E. coli* MG1655 (DE3) Δ *gldA*::*FTR*.

El gen *ppc* se eliminó por transducción por fagos a partir de un lisado de la cepa JW3928 de la colección Keio. Se seleccionó una colonia candidata que mostró el fenotipo de resistencia a kanamicina (C2) después de la transducción. A ésta, se le amplificó por PCR la región insertada en lugar del gen *ppc* usando oligonucleótidos externos a éste (Fw-*ppc* y Rv-*ppc*), dicha región corresponde al gen de resistencia a kanamicina. También se amplificaron las regiones comprendidas entre uno de los oligonucleótidos externos con un oligonucleótido interno al gen *Km* (k1 y/o k2) y la región que demostrara el genotipo Δ *gldA*::*FRT*, esto último para asegurar que dicha colonia aún conservara esa eliminación (figura 10).

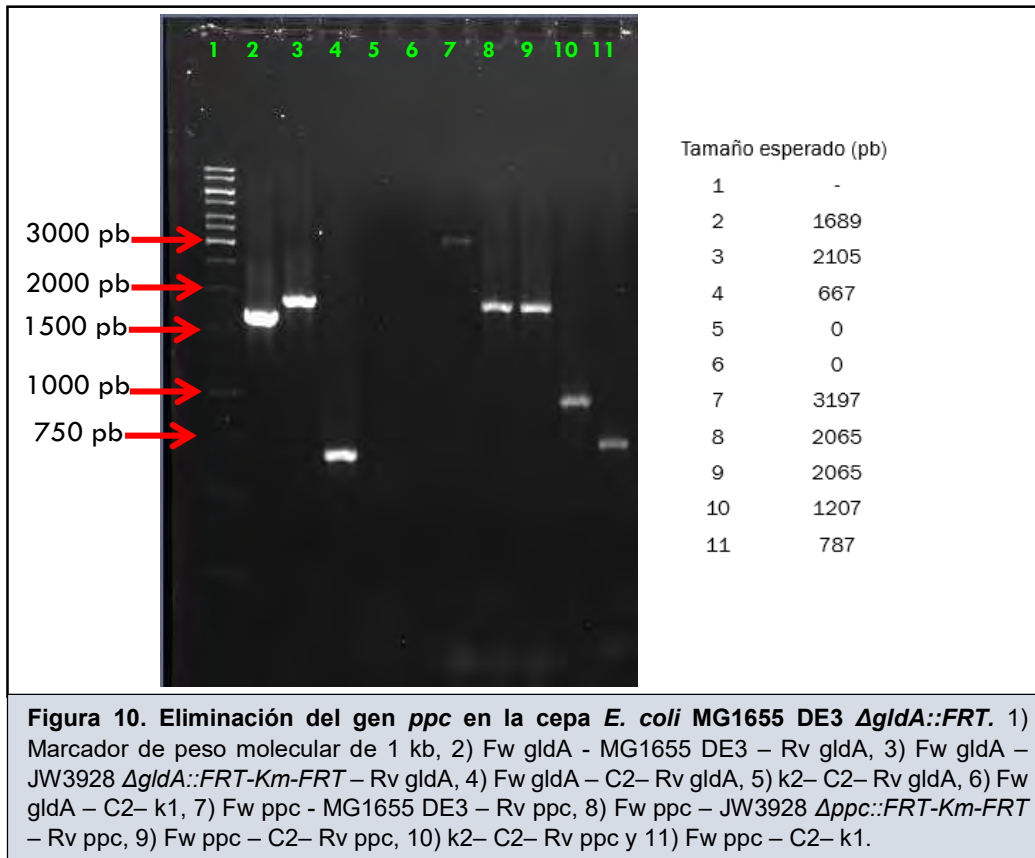
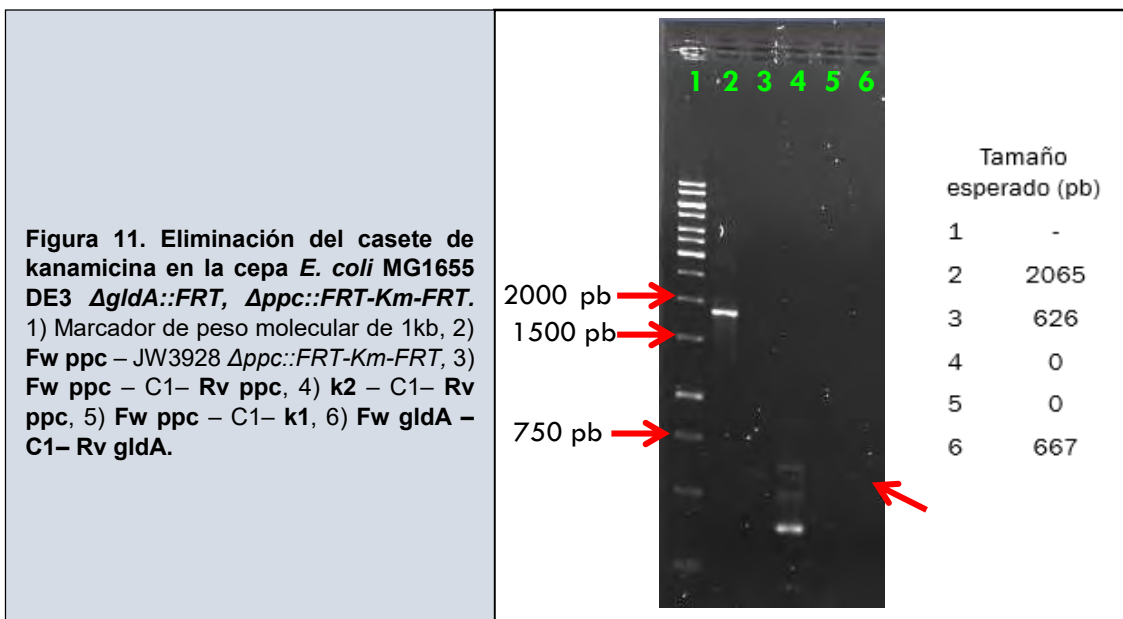


Figura 10. Eliminación del gen *ppc* en la cepa *E. coli* MG1655 DE3 $\Delta gldA::FRT$. 1) Marcador de peso molecular de 1 kb, 2) Fw *gldA* - MG1655 DE3 - Rv *gldA*, 3) Fw *gldA* - JW3928 $\Delta gldA::FRT-Km-FRT$ - Rv *gldA*, 4) Fw *gldA* - C2- Rv *gldA*, 5) k2- C2- Rv *gldA*, 6) Fw *gldA* - C2- k1, 7) Fw *ppc* - MG1655 DE3 - Rv *ppc*, 8) Fw *ppc* - JW3928 $\Delta ppc::FRT-Km-FRT$ - Rv *ppc*, 9) Fw *ppc* - C2- Rv *ppc*, 10) k2- C2- Rv *ppc* y 11) Fw *ppc* - C2- k1.

En esta figura, los carriles 2-6 muestran que la cepa evaluada tiene el gen *gldA* eliminado, ya que la banda del carril 4 es mucho más pequeña que la del control positivo (carril 3) perteneciente al casete de kanamicina en la cepa Keio. Así también, en los carriles 5 y 6 no hay bandas debido a que como la región del casete de kanamicina ya no está en la cepa evaluada, los oligonucleótidos k1 y k2 no hibridaron y no hubo amplificación. Los carriles 7-11 muestran el fenotipo $\Delta ppc::FRT-Km-FRT$. La banda del carril 9 (de la cepa candidata evaluada) fue del mismo tamaño del casete de kanamicina en la cepa Keio JW3928 $\Delta ppc::FRT-Km-FRT$, por tanto, este gen sí fue eliminado del cromosoma. La candidata evaluada se nombró AG02 (*E. coli* MG1655 DE3 $\Delta gldA::FRT$, $\Delta ppc::FRT-Km-FRT$).

Se eliminó el casete de Km de la cepa AG02 antes de realizar la siguiente eliminación mediante transducción por fagos (fig. 11).



La comprobación se realizó por PCR usando los oligonucleótidos externos e internos al casete de Km como se muestra en la figura 11. Se evaluó solo una colonia (C1), después de la transformación de la cepa electrocompetente con el vector pCP20 que codifica para la flipasa, debido a la baja eficiencia de dicho plásmido, ya que esta transformación se intentó varias veces. En la candidata evaluada se eliminó la región correspondiente al casete de kanamicina de 1439 pb, el tamaño de la banda obtenida fue mucho menor en comparación que cuando se tenía dicho marcador. Al amplificar las regiones usando el oligonucleótido externo Rv ppc y el interno al casete, k2, se observan bandas que corresponden a inespecificidades, lo que no sucedió al usar el par Fw gldA y k1; una situación similar ocurrió al comprobar la eliminación de *km* de *E. coli* MG1655 (DE3) $\Delta gldA::FRT-Km-FRT$.

Se verificó la región comprendida entre los oligos Fw-gldA y Rv-gldA de 667 pb, con una banda muy tenue.

8.1.4 Eliminación del gen *pck* en *E. coli* MG1655 (DE3) $\Delta gldA::FRT$, $\Delta ppc::FRT$.

La razón de eliminar el gen *pck* del cromosoma de *E. coli* fue para evitar un ciclo fútil entre la actividad de su producto (que es gluconeogénica) y la del gen *pck* de *A. succinogenes* a expresar en el vector pACYCDuet-1, que va en la dirección contraria (de fosfoenolpiruvato a oxalacetato). Dicho gen también se eliminó por transducción por fagos, a partir de un lisado de la cepa JW3366 de la colección Keio. Se seleccionaron tres colonias candidatas que mostraron el fenotipo de resistencia a kanamicina (C1, C2, C3) después de la transducción. Se les amplificó por PCR el gen de *km*, insertado en lugar de *pck*, usando oligonucleótidos externos a éste (Fw-pck y Rv-pck), como se presenta en la figura 12.

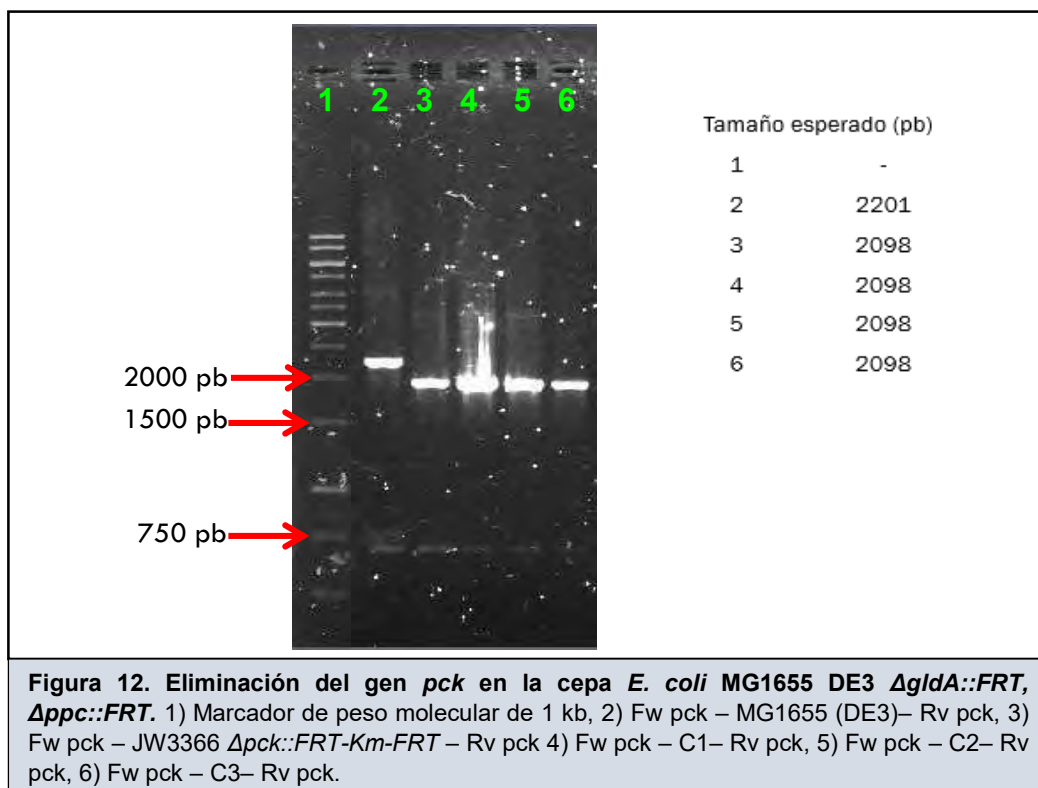


Figura 12. Eliminación del gen *pck* en la cepa *E. coli* MG1655 DE3 $\Delta gldA::FRT$, $\Delta ppc::FRT$. 1) Marcador de peso molecular de 1 kb, 2) Fw *pck* – MG1655 (DE3)– Rv *pck*, 3) Fw *pck* – JW3366 $\Delta pck::FRT-Km-FRT$ – Rv *pck* 4) Fw *pck* – C1– Rv *pck*, 5) Fw *pck* – C2– Rv *pck*, 6) Fw *pck* – C3– Rv *pck*.

Se tomó la candidata 1 y se le denominó cepa triple mutante AG03 (*E. coli* MG1655 (DE3) $\Delta gldA::FRT$, $\Delta ppc::FRT$, $\Delta pck::FRT-Km-FRT$).

De la misma forma que las mutantes anteriores, se eliminó el casete de kanamicina con el plásmido pCP20. Se evaluaron tres colonias candidatas (C1, C2, C3), donde todas presentaron el fenotipo y genotipo de pérdida del marcador de kanamicina (figura 13), eligiéndose a C1 para ser *E. coli* MG1655 (DE3) $\Delta gldA::FRT$, $\Delta ppc::FRT$, $\Delta pck::FRT$.

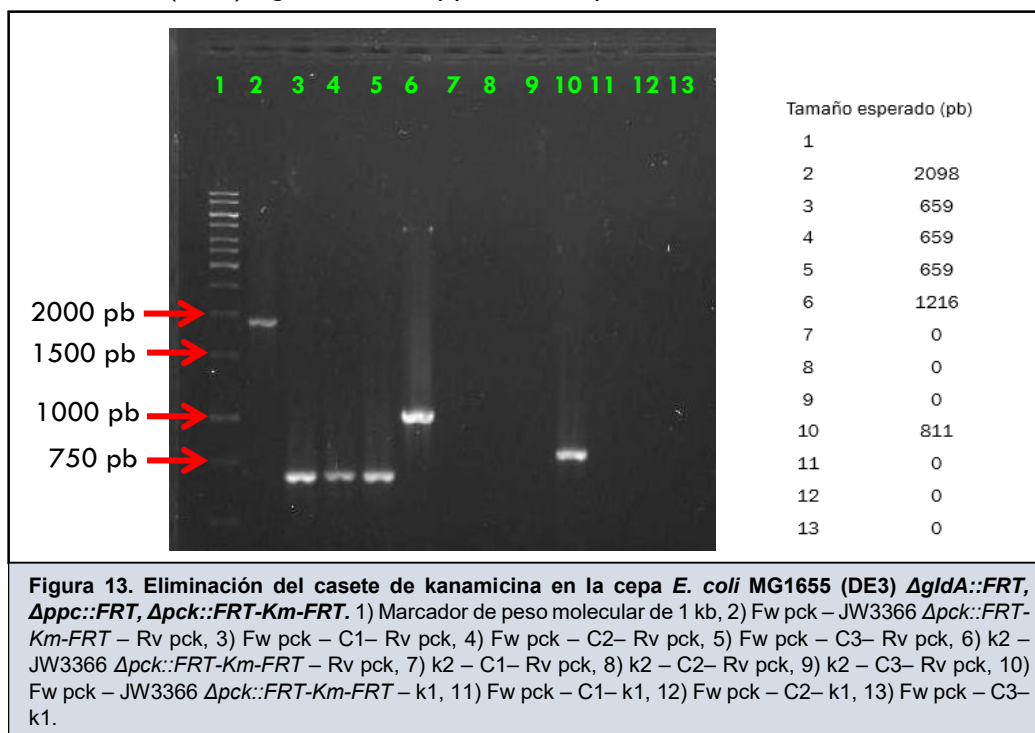
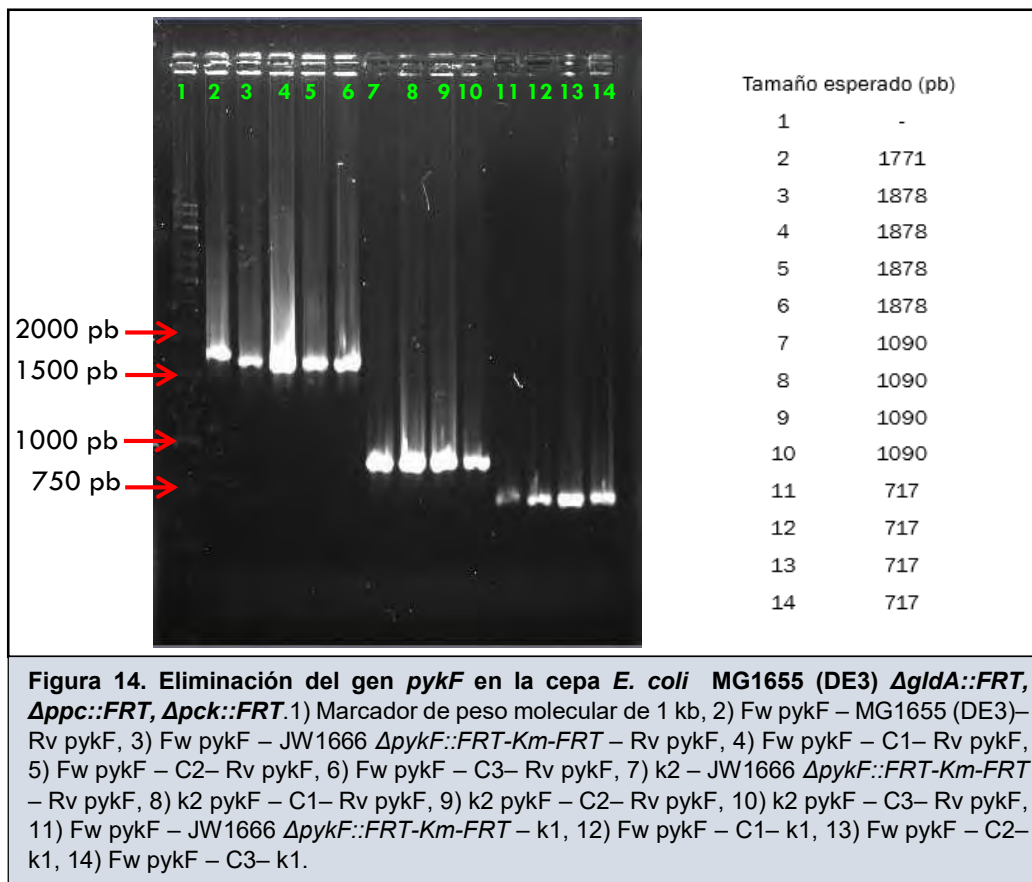


Figura 13. Eliminación del casete de kanamicina en la cepa *E. coli* MG1655 (DE3) $\Delta gldA::FRT$, $\Delta ppc::FRT$, $\Delta pck::FRT-Km-FRT$. 1) Marcador de peso molecular de 1 kb, 2) Fw *pck* – JW3366 $\Delta pck::FRT-Km-FRT$ – Rv *pck*, 3) Fw *pck* – C1– Rv *pck*, 4) Fw *pck* – C2– Rv *pck*, 5) Fw *pck* – C3– Rv *pck*, 6) k2 – JW3366 $\Delta pck::FRT-Km-FRT$ – Rv *pck*, 7) k2 – C1– Rv *pck*, 8) k2 – C2– Rv *pck*, 9) k2 – C3– Rv *pck*, 10) Fw *pck* – JW3366 $\Delta pck::FRT-Km-FRT$ – k1, 11) Fw *pck* – C1– k1, 12) Fw *pck* – C2– k1, 13) Fw *pck* – C3– k1.

8.1.5 Eliminación del gen *pykF* en *E. coli* MG1655 (DE3) $\Delta gldA::FRT$, $\Delta ppc::FRT$, $\Delta pck::FRT$.

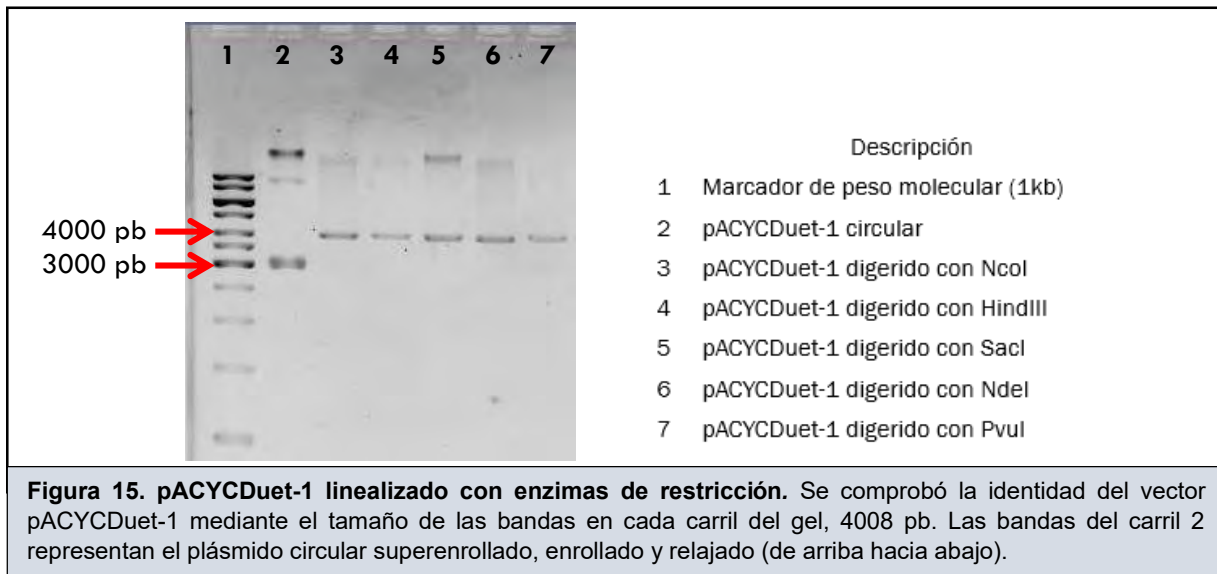
La eliminación del gen *pykF* fue la última realizada por el método de transducción por fagos, a partir de un lisado de la cepa JW1666 de la colección Keio. De la misma manera, se seleccionaron tres colonias candidatas que mostraron el fenotipo de resistencia a kanamicina (C1, C2, C3) después de la transducción. Se amplificó por PCR la región insertada en lugar del gen *pykF* usando oligonucleótidos externos a éste (Fw-ppc y Rv-ppc). También se amplificaron las regiones comprendidas entre uno de los oligonucleótidos externos con un oligonucleótido interno al gen de kanamicina (k1 y/o k2), tal como se aprecia en la figura 14.



Se tomó la candidata 1 para ser cepa cuádruple mutante AG04 (*E. coli* MG1655 DE3 $\Delta gldA::FRT$, $\Delta ppc::FRT$, $\Delta pck::FRT$, $\Delta pykF::FRT-Km-FRT$).

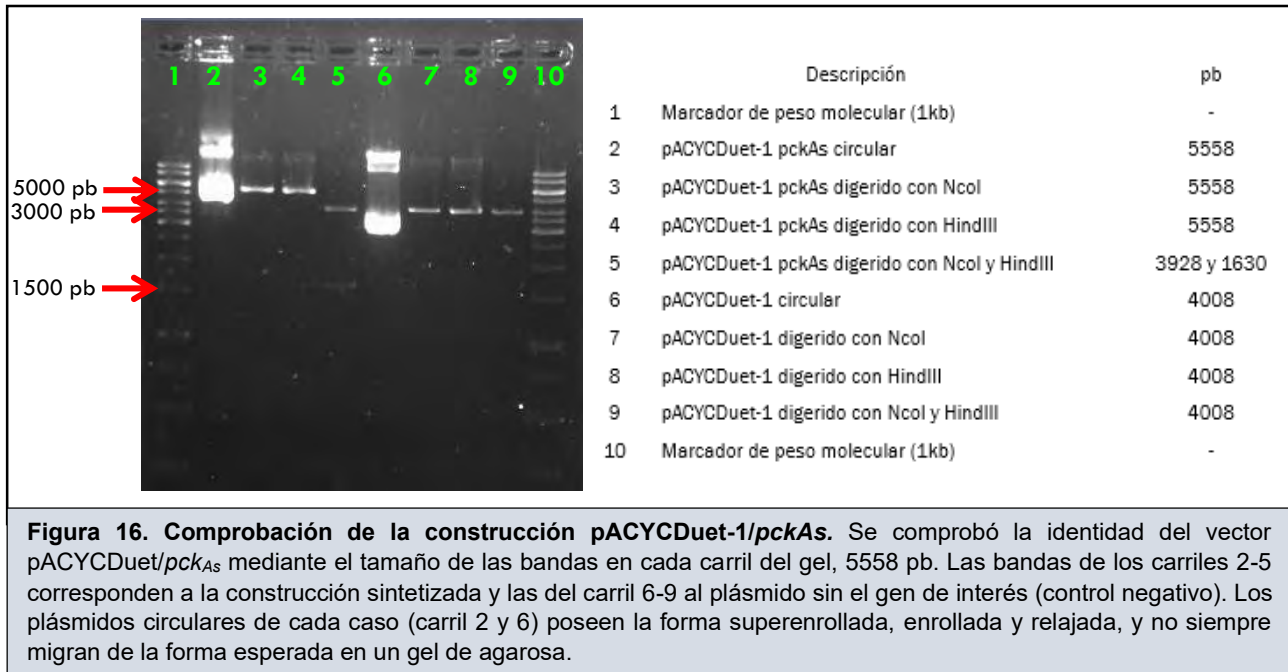
8.2 Construcción de los vectores de expresión con pACYCDuet-1.

Se comprobó la identidad del vector pACYCDuet-1 mediante la digestión con las enzimas de restricción a trabajar en este estudio: NcoI, HindIII, SacI, NdeI y PvuI. El tamaño esperado para el vector linealizado es de 4008 pb, el cual se muestra en la siguiente figura 15.



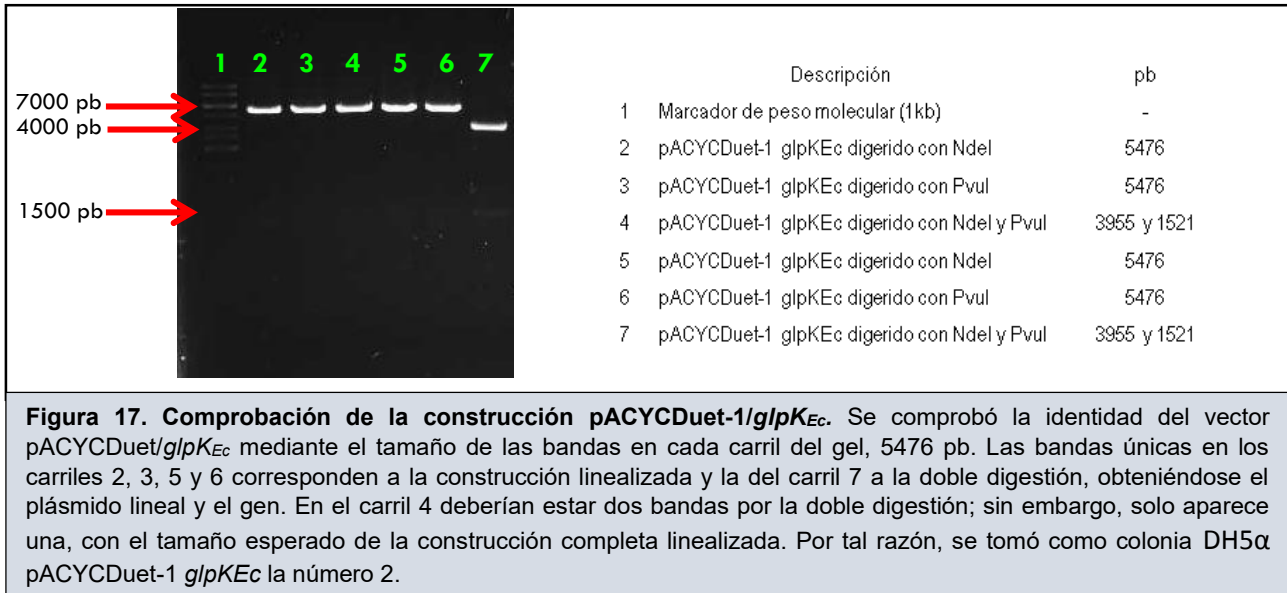
8.2.1 Construcción del vector 1: pACYCDuet-1/*pck*_{As} (gen sintetizado por la compañía GENEWIZ).

Como se comentó en la sección de la metodología, el gen *pck* de *A. succinogenes* se envió a sintetizar con el uso optimizado de codones para *E. coli* por la compañía GENEWIZ, gen que se clonó directamente en el plásmido pACYCDuet-1, de bajo número de copias. La construcción pACYCDuet-1/*pck*_{As} se comprobó con enzimas de restricción (figura 16; véase anexo 1).



8.2.2 Construcción del vector 2: pACYCDuet-1/*glpK_{Ec}*.

El gen *glpK* se amplificó del cromosoma de *E. coli* MG1655 (DE3) usando los oligonucleótidos Fw-*glpK_{Ec}*-NdeI y Rv-*glpK_{Ec}*-PvuI que contienen los sitios de corte para las enzimas de restricción NdeI y PvuI y se clonó en el vector pACYDuet-1 (fig. 17). La construcción se transformó en una cepa DH5 α electrocompetente. Se evaluaron dos colonias candidatas que mostraron el fenotipo de resistencia a cloranfenicol, el marcador de selección del plásmido en cuestión.



8.2.3 Construcción del vector 3: pACYCDuet-1 *pck_{As}* *glpK_{Ec}*.

El gen *glpK_{Ec}* se ligó en el vector 1. La construcción se comprobó mediante enzimas de restricción. Se realizaron digestiones única y doble con NdeI y PvuI para el gen recién ligado. El patrón de bandas para el plásmido construido y extraído de una de las candidatas resistentes a cloranfenicol es la siguiente (fig. 18).

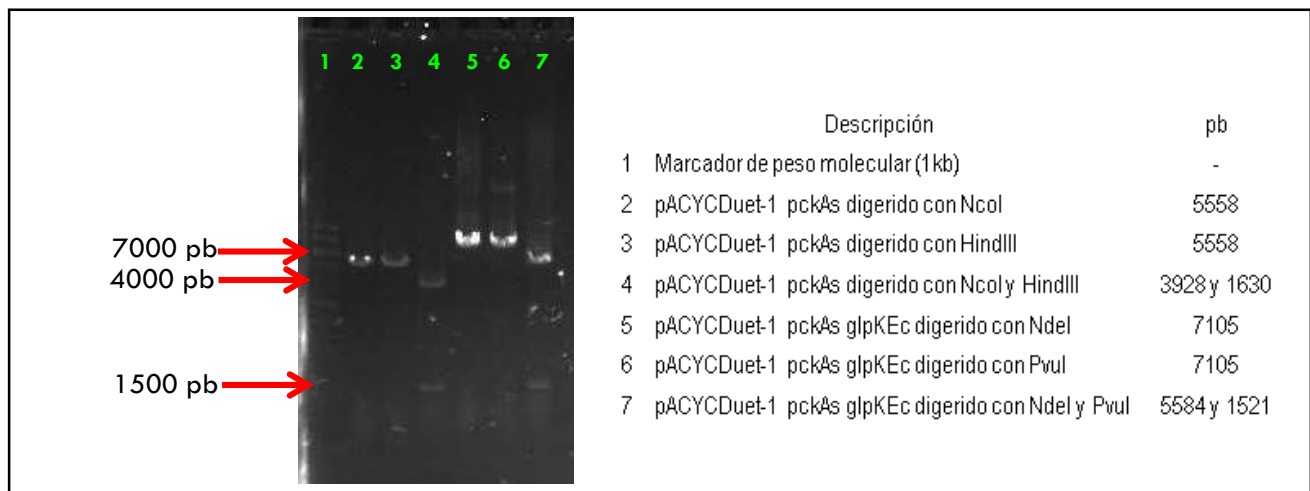


Figura 18. Comprobación de la construcción pACYCDuet-1/*pck_{As}*, *glpK_{Ec}*. En el carril 2, 3 y 4 se aprecian las bandas correspondientes al vector 1 (que aún no tiene el gen *glpK_{Ec}* ligado). Cabe mencionar que, en cuanto a longitud, el gen *pck_{As}* y *glpK_{Ec}* sólo difieren en 100 pb, aproximadamente. El carril 5 y 6 muestran la construcción linealizada, con 7105 pb; y el carril 7, la doble digestión, mostrando la banda del plásmido con el gen *pck_{As}* (5584 pb) y la banda del gen *glpK_{Ec}* (1521 pb).

8.2.4 Construcción del vector 4: pACYCDuet-1/*pck**_{As} (gen amplificado del cromosoma de *A. succinogenes* 130Z).

Se amplificó, por PCR, el gen *pck* de *A. succinogenes* 130Z usando los oligonucleótidos Fw-*pck*_{As}-Sacl y Rv-*pck*_{As}-NcoI que contienen los sitios de corte para las enzimas de restricción Sacl y NcoI. Para comprobar la ligación del vector pACYCDuet-1 con el gen *pck*_{As} se realizó digestión única y doble del DNA plasmídico extraído de tres candidatas DH5α resistentes a cloranfenicol (crecidas en placa después de la transformación) para comprobar su genotipo pACYCDuet-1/*pck*_{As}. La comprobación se presenta en la figura 19.

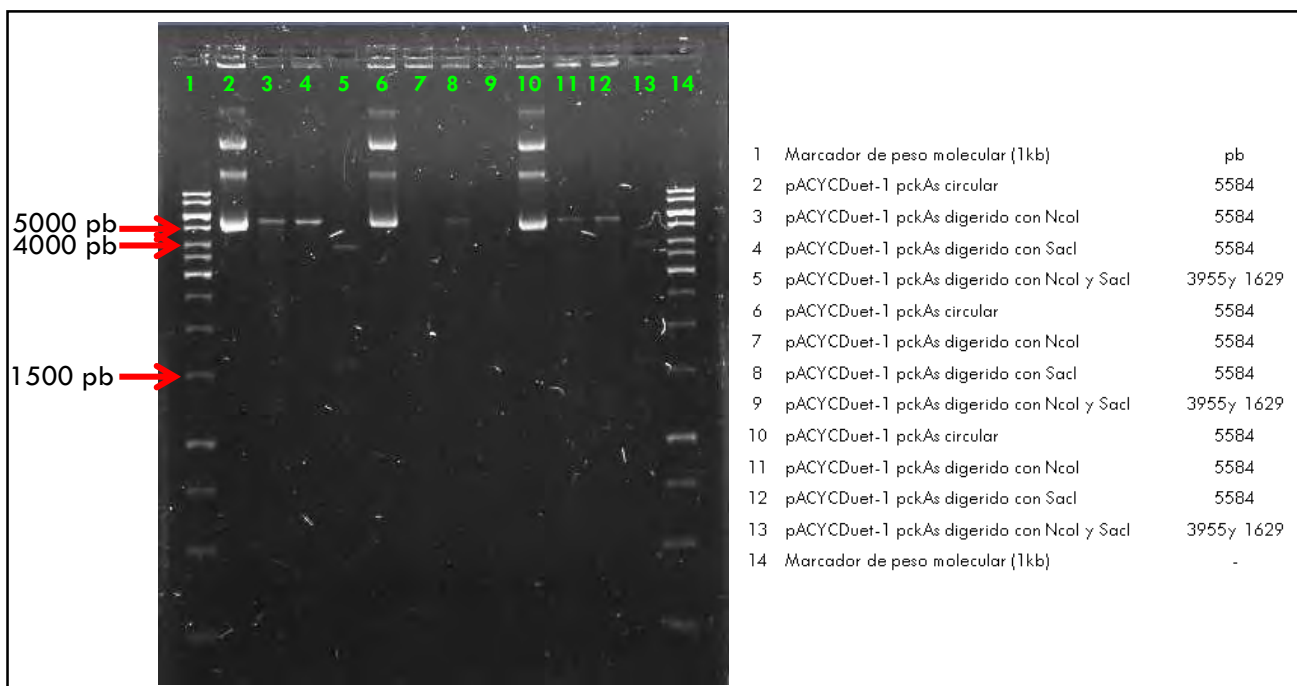
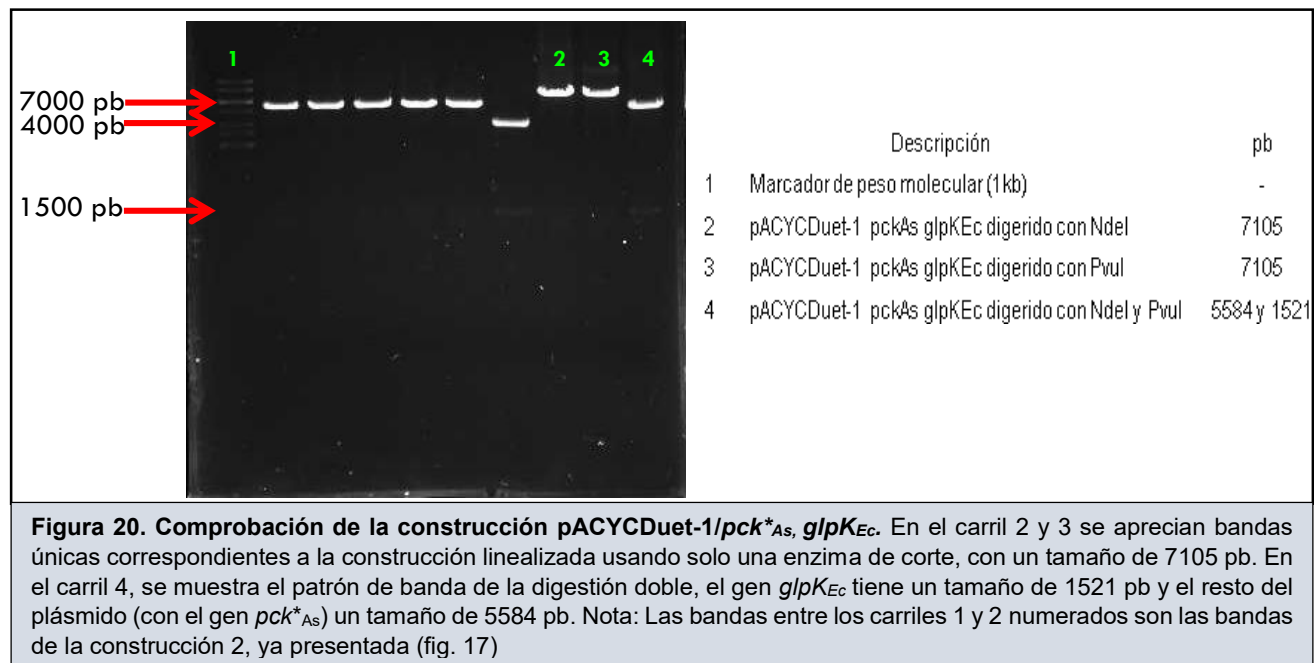


Figura 19. Comprobación de la construcción pACYCDuet-1/*pck_{As} con el gen amplificado del genoma de *A. succinogenes* 130Z.** Las tres candidatas muestran el mismo patrón de digestión. Los carriles 2, 6 y 10 presentan la forma superenrollada, enrollada y relajada del plásmido. Los carriles 5, 9 y 13 presentan dos bandas, una correspondiente al vector linealizado y la otra al gen mencionado. Aunque en la candidata 2 (carril 9) no se aprecia muy bien el patrón de doble digestión, por el tamaño de la digestión única (carril 7 y 8 con bandas también muy tenues) se puede asegurar la correcta ligación en pACYCDuet-1 de esta colonia.

8.2.5 Construcción del vector 5: pACYCDuet-1/*pck**_{As}, *glpK*_{Ec}.

A partir de la construcción 4, se ligó el gen *glpK*_{Ec}. La construcción se comprobó mediante enzimas de restricción. Se realizaron digestión única y doble con NdeI y PvuI para el gen recién ligado. El patrón de bandas para el plásmido extraído de una de las candidatas resistentes a cloranfenicol es la siguiente (fig. 20).



8.3 Caracterización de las cepas.

8.3.1 *E. coli* MG1655 (DE3) presenta un metabolismo lento en glicerol con respecto a glucosa.

Durante la obtención de los inóculos de *E. coli* MG1655 (DE3) cuyas condiciones de cultivo fueron, en un principio, 200 mL de medio mineral AM1 modificado y 20 g/L glicerol sin aireación a 37 °C, 150 rpm y pH 7 controlado con una mezcla 1:1 de NaOH 4 M y Na₂CO₃ 2 M, se notó un crecimiento muy lento de la cepa. Cabe mencionar que las condiciones del medio utilizado, así como la concentración de la fuente de carbono (20 g/L para la obtención del inóculo y 40 g/L para la cinética de evaluación) se eligieron con base al trabajo de Martínez Valenzuela (2018) del presente grupo de trabajo, que también tuvo el objetivo de sobreproducir AS, pero a partir de glucosa.

En la tabla 6 se presentan las distintas condiciones de cultivo que se usaron para mejorar el crecimiento. El medio AM1 modificado contenía los componentes que se muestran en la tabla 6 más los que se indican en la fila “condiciones de cultivo” de la tabla 7.

Tabla 7. Obtención de los inóculos de <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) en minifermentadores*.			
Condiciones de cultivo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
	pH 7 KCl (2 mM) C ₂ H ₃ NaO ₂ (2 g/L)	pH 6.3 C ₂ H ₃ NaO ₂ (2 g/L)	pH 6.3
μ (h ⁻¹)	0.023±0.003	0.012±0.001	0.024±0.000
D.O. máxima alcanzada	1.071 en 76 h	0.553 en 73 h	1.77 en 76 h

*Los resultados están por duplicado.

El primer experimento se llevó a cabo a pH 7 en presencia de sales de potasio y acetato de sodio, obteniendo una velocidad de crecimiento de 0.023 h⁻¹. Sin embargo, previamente se ha reportado que para la fermentación de glicerol se requiere un pH de 6.3. Dharmadi *et al.* (2006) encontraron que *E. coli* es capaz de fermentar glicerol anaeróbicamente de una manera pH-dependiente, más específicamente, a un pH ligeramente ácido. Esto es, porque la fermentación del glicerol está ligado a la disponibilidad de CO₂ en el medio y éste incrementa su solubilidad a un pH de 6.3. Además, la enzima que produce CO₂ por la oxidación del formiato (formiato hidrógeno liasa, FHL), presenta su mayor actividad a ese pH (Dharmadi *et al.*, 2006). La disponibilidad de este compuesto es muy importante, porque es sustrato de varias reacciones durante el crecimiento normal de *E. coli*, ya sea para la síntesis de moléculas pequeñas, de ácidos grasos, así como de moléculas del metabolismo central (oxalacetato). Por tanto, un enriquecimiento con CO₂ tiene un impacto positivo en la fermentación de glicerol en la cepa MG1655 bajo condiciones ligeramente ácidas (Murarka *et al.*, 2008). Por tal motivo, se optó por cambiar el pH a 6.3 para mejorar el crecimiento de *E. coli* en glicerol.

Por otro lado, en varios estudios se han cambiado las sales de potasio por sales de sodio para favorecer la fermentación de glicerol (Hu *et al.*, 2009; Blankshien *et al.*, 2010). Esto se probó eliminando la adición de KCl del medio y usando como fuente de Na únicamente el contenido en el bicarbonato de sodio que suplementa al medio AM1 modificado en este trabajo (tabla 6). A pesar de este cambio, la velocidad de crecimiento microbiano no mejoró, sino que bajó hasta la mitad, 0.012 h^{-1} . También se excluyó el acetato de sodio del medio, debido a que la cepa evaluada no tiene características genotípicas que le permitan crecer en presencia de acetato. En dicha evaluación (experimento 3), se obtuvo una velocidad de crecimiento similar a la obtenida en el experimento 1 (0.024 h^{-1}), pero se obtuvo 60% más biomasa en un tiempo de incubación similar.

Bajo la condición del experimento 3, que fue la mejor, tanto en velocidad de crecimiento como en formación de biomasa, se realizaron las cinéticas de evaluación (ahora con 40 g/L de glicerol) para caracterizar la cepa silvestre MG1655 (DE3). La gráfica de crecimiento, consumo de sustrato y producción de metabolitos se muestra a continuación (gráfico 1).

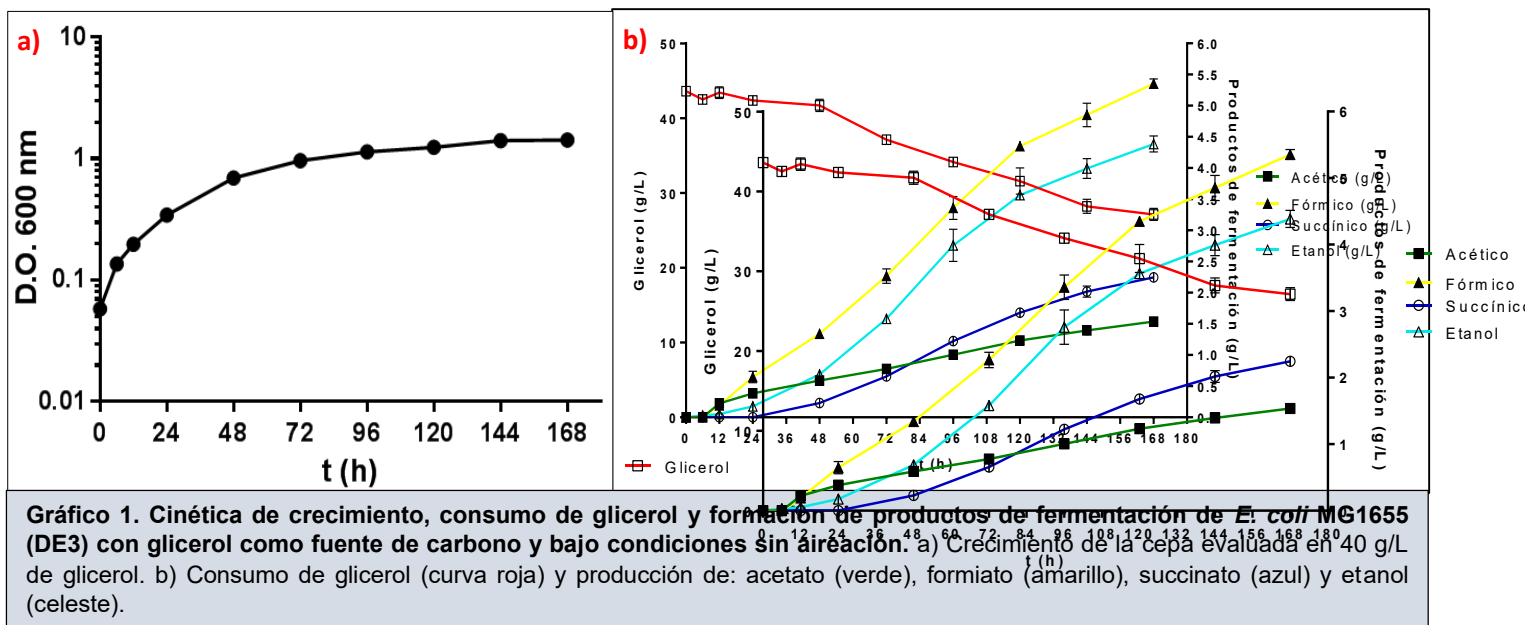


Tabla 8. Parámetros cinéticos y estequiométricos de la cepa *E. coli* MG1655 (DE3) en glicerol bajo condiciones sin aireación.

$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$X_{\text{final}} \text{ (gDCW/L)}$	$Y_{x/s}^* \text{ (g}_{\text{CEL}}/\text{g}_{\text{GLY}})$	$q_s^{**} \text{ (g}_{\text{GLY}}/\text{g}_{\text{x}}\cdot\text{h)}$	$Q_p \text{ (g}_{\text{AS}}/\text{L}\cdot\text{h)}$	$Y \text{ succinato (mol}_{\text{AS}}/\text{mol}_{\text{GLY}})$
0.038 ± 0.001	0.61 ± 0.021 En 168 h	0.036 ± 0.002	1.062 ± 0.1	0.0139 ± 0.001	0.11 ± 0.009

* $Y_{x/s}$, parámetro global calculado como el incremento en masa celular por fuente de carbono consumida al alcanzar la fase estacionaria.

** q_s , consumo específico calculado en la fase exponencial.

Como se observa, bajo condiciones sin aireación *E. coli* no consumió toda la fuente de carbono propuesta para la caracterización, aun en 7 días, y presentó un crecimiento lento, alcanzando solo 1.42 D.O.₆₀₀, (Tabla 8).

Esta velocidad de crecimiento es similar a lo reportado por Murarka *et al.*, en 2008. Estos autores compararon las velocidades de crecimiento de algunas cepas de *E. coli* derivadas de la K-12 en glicerol bajo condiciones anaerobias en medio mínimo (MM) suplementado con 2 g/L de triptona, 5 μM de selenito de sodio y 10 g/L de glicerol, a 37 °C, pH 6.3, 200 rpm. Dichas velocidades de crecimiento variaron de 0.029 a 0.04 h^{-1} (tabla 9). Para la cepa de este estudio, MG1655, se reporta una μ de 0.04 h^{-1} , prácticamente igual a la registrada en la tabla 8. Así también, el rendimiento de biomasa con respecto al sustrato ($Y_{x/s}$) obtenido en este trabajo, 0.031 $\text{g}_{\text{CEL}}/\text{g}_{\text{GLY}}$, es similar al reportado por estos autores.

Tabla 9. Fermentación de glicerol por cepas derivadas de <i>E. coli</i> K-12 y <i>E. coli</i> B. (Adaptado de Murarka <i>et al.</i> , 2008)		
<i>E. coli</i>	μ (h^{-1})	$Y_{x/s}$ ($\text{mg}_{\text{CEL}}/\text{g}_{\text{GLY}}$)
MG1655	0.040 \pm 0.003	32.9 \pm 2.9
W3110	0.031 \pm 0.002	32.2 \pm 3.1
MC4100	0.029 \pm 0.004	54.9 \pm 8.8
B	0.036 \pm 0.002	34.1 \pm 2.7

μ , parámetro calculado durante la fase de crecimiento exponencial.

$Y_{x/s}$, parámetro calculado como el incremento en masa celular por glicerol consumido al alcanzar la fase estacionaria.

E. coli fermenta glicerol anaeróticamente; sin embargo, presenta una tasa de crecimiento muy baja, la cual es hasta 40 veces menor que en crecimiento aerobio en medio LB (Hu *et al.*, 2009). Maeda *et al.*, en 2018 compararon el crecimiento en glicerol con respecto al crecimiento en glucosa de una cepa de *E. coli* bajo condiciones anaerobias. Ellos reportan que con glicerol el microorganismo presenta una μ de 0.05 h^{-1} y con glucosa una μ de 0.5 h^{-1} , es decir, 10 veces mayor creciendo con glucosa. Esto concuerda con lo obtenido en el presente estudio al llevar a cabo la cinética de crecimiento con glucosa (40 g/L) como fuente única de carbono (gráfico 2).

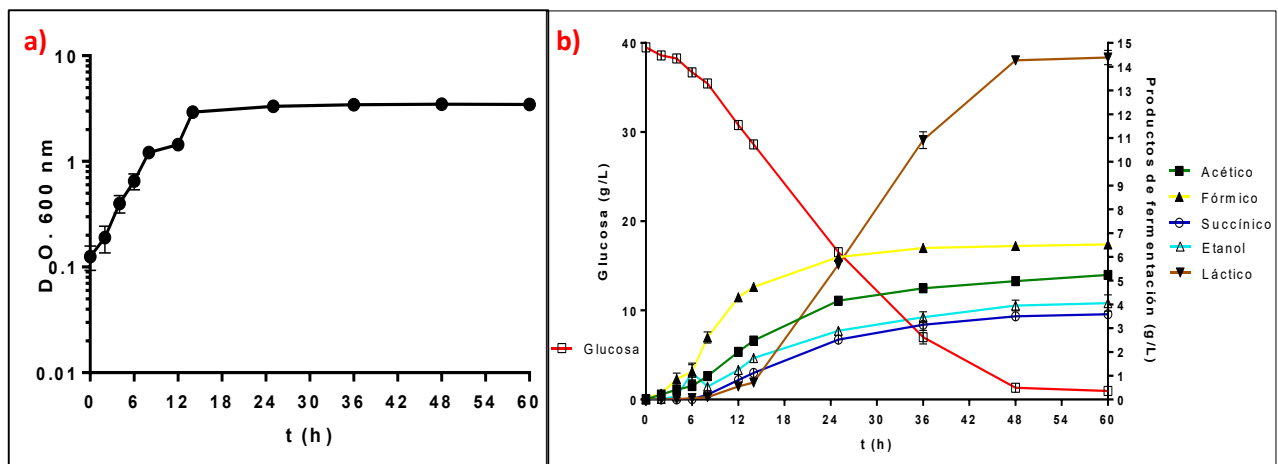


Gráfico 2. Cinética de crecimiento, consumo de glucosa y formación de productos de fermentación de *E. coli* MG1655 (DE3) con glucosa como fuente de carbono y bajo condiciones sin aireación. a) Crecimiento de la cepa evaluada en 40 g/L de glucosa. b) Consumo de glucosa (curva roja) y producción de: acetato (verde), formiato (amarillo), succinato (azul), etanol (celeste) y láctico (café).

Los parámetros cinéticos y estequiométricos correspondientes se registran en la siguiente tabla 10.

Tabla 10. Parámetros cinéticos y estequiométricos de la cepa <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) cultivada en glucosa bajo condiciones sin aireación.					
μ (h ⁻¹)	X _{final} (g _{DCW} /L)	Y _{x/s} * (g _{CEL} /g _{GLC})	q _s ** (g _{GLC} /g _x ·h)	Q _p (g _{AS} /L·h)	Y succinato (mol _{AS} /mol _{GLC})
0.31±0.03	1.5±0.02 En 60 h	0.037±0.001	7.832±0.13	0.06±0.0	0.14±0.0

* Y_{x/s}, parámetro global calculado como el incremento en masa celular por fuente de carbono consumida al alcanzar la fase estacionaria.

** q_s, consumo específico calculado en la fase exponencial.

En el panel a) del gráfico 2 se observa que a las 48 h de cultivo se alcanza el doble de biomasa en comparación con la obtenida durante la fermentación en glicerol. En cuanto a la velocidad de crecimiento, es casi 9 veces mayor en glucosa, 0.31 h⁻¹, que en glicerol, 0.038 h⁻¹. Este resultado es cercano al reportado por Martínez Valenzuela (2018), quien obtuvo un μ de 0.37 h⁻¹ bajo las mismas condiciones de crecimiento (medio AM1, 40 g/L de glucosa, condiciones sin aireación, pH 7, 150 rpm), con la cepa *E. coli* MG1655.

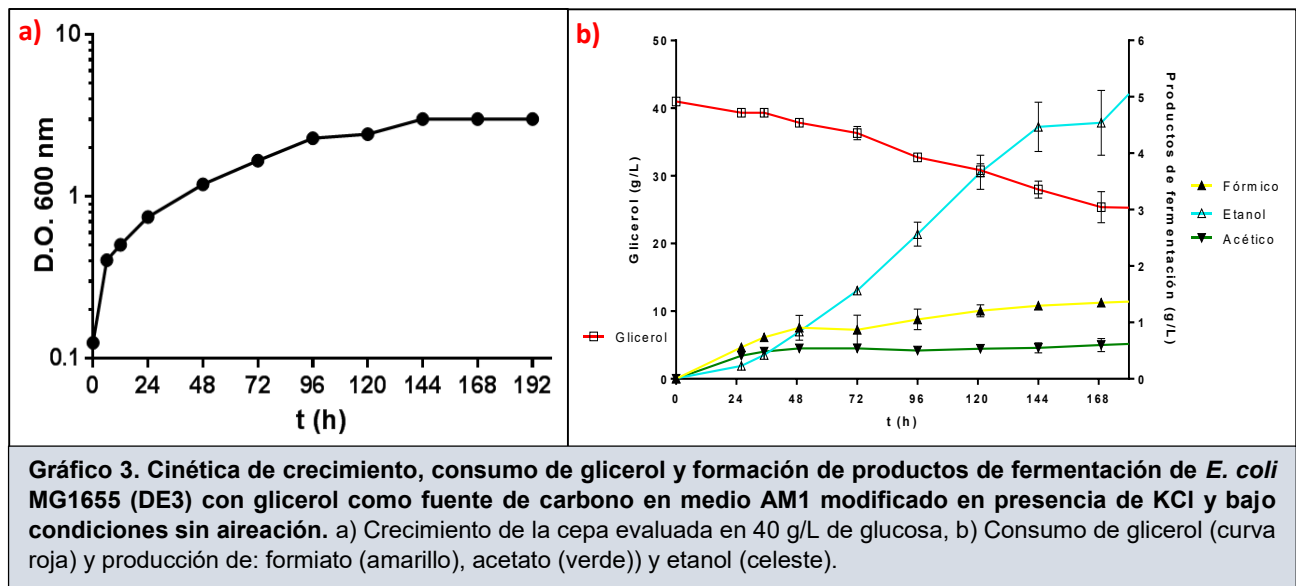
Estos resultados indican una capacidad limitada en el metabolismo de glicerol en condiciones de fermentación, probablemente debido a su grado de reducción, a la falta de un aceptor final de electrones exógeno o a la falta de otros metabolitos requeridos como precursores de componentes de la biomasa. No obstante, el rendimiento biomasa/substrato basado en el consumo de la fuente de carbono es similar para ambas fuentes de carbono.

Debido a que el glicerol es una molécula más reducida que otras fuentes de carbono, se requiere la presencia de un aceptor de electrones exógeno (como fumarato, por ejemplo) (Li *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2018) para su eficiente metabolización en ausencia de oxígeno; sin embargo, la fermentación pH-dependiente es una buena estrategia cuando no existe dicho aceptor de electrones (Dharmadi *et al.*, 2006).

Para acelerar el crecimiento microbiano en glicerol y, de esta forma, su asimilación y la producción del metabolito de interés, otros autores optan por el enriquecimiento de los medios mínimos usados con triptona de caseína, extracto de levadura o selenitos (Hu *et al.*, 2009); este último para mejorar la actividad enzimática de la formiato hidrógeno liasa (FHL), importante enzima para la fermentación de glicerol. Por cuestiones prácticas, en el presente estudio se optó por enriquecer el medio mínimo AM1 modificado con los componentes del medio LB provenientes de proteínas (10 g/L de bacto triptona de caseína y 5 g/L de bacto extracto de levadura), con el objetivo de favorecer el crecimiento de las cepas a evaluar y reducir el tiempo de los cultivos (ver sección 8.3.2).

Con respecto a la producción de ácido succínico (AS), la cepa silvestre produjo un título máximo de 2.5 g/L en glicerol y 3.5 g/L en glucosa. Blankschien *et al.* en 2010 obtuvieron un título máximo de AS de 2.1 g/L en fermentación microaeróbica con la misma cepa, MG1655, a partir de glicerol.

En la tabla 7, donde se presentan algunas condiciones evaluadas en la obtención del inóculo, se observa que no se había evaluado la combinación “Medio mínimo AM1 modificado con 2 mM KCl, sin acetato de sodio y pH 6.3” (los componentes del medio AM1 modificado de este experimento son los que se encuentran en la tabla 6; sin los componentes del medio LB); por lo que se realizó el experimento y los resultados se muestran en el gráfico 3.



En el gráfico 3 se observa que la D.O.₆₀₀ alcanzada a los 7 días de fermentación fue más de 3.0, a diferencia de cuando no se agrega KCl en el medio. Sin embargo, el perfil de metabolitos producidos cambió. Con KCl en el medio no se formó ácido succínico, el metabolito de interés. Como productos mayoritarios se formaron etanol y ácido fórmico, seguido de acético. Este resultado es relevante, ya que esta cepa bajo dichas condiciones de cultivo sería una buena candidata para la producción de etanol a partir de glicerol. El rendimiento teórico máximo de formación de moles de etanol / moles de glicerol metabolizado es de 1, y el rendimiento de etanol con respecto a glicerol que se obtuvo en este experimento fue de 0.75 ± 0.047 mol_P/mol_{SUS} (tabla 11).

Tabla 11. Parámetros cinéticos y estequiométricos de la cepa *E. coli* MG1655 (DE3) cultivada en glicerol más KCl bajo condiciones sin aireación.

μ (h ⁻¹)	X _{final} (g _{DCW} /L)	Y _{x/s} * (g _{CEL} /g _{SUS})	q _s ** (g _{SUS} /g _X ·h)	Q _p EtOH(g/L·h)	Y EtOH (mol _P /mol _{SUS})
0.026±0.002	1.40±0.018 En 168 h	0.097±0.011	0.27±0.05	0.032±0.006	0.75±0.047

* Y_{x/s}, parámetro global calculado como el incremento en masa celular por fuente de carbono consumida al alcanzar la fase estacionaria.

** q_s, consumo específico calculado en la fase exponencial.

En la tabla 12, se registra el perfil de metabolitos obtenidos en los tres experimentos reportados hasta aquí y se compara con los obtenidos por otros autores. El producto mayoritario se coloca en primer lugar de la lista.

Tabla 12. Comparación entre el perfil de productos obtenidos con la cepa silvestre en este trabajo y los obtenidos por otros autores con glicerol o glucosa en medio mineral.

Referencia	Este trabajo	Este trabajo	Este trabajo	Zhang <i>et al.</i> , 2010	Li <i>et al.</i> , 2016	Liu <i>et al.</i> , 2013
Cepas silvestres	<i>E. coli</i> MG1655 (DE3)	<i>E. coli</i> MG1655 (DE3)	<i>E. coli</i> MG1655 (DE3)	<i>E. coli</i> ATCC8739	<i>E. coli</i> MG1655	<i>E. coli</i> K12
Fuente de carbono	Glicerol (40 g/L)	Glicerol (40 g/L)	Glucosa (40 g/L)	Glicerol (15 g/L)	Glicerol (15 g/L)	Glucosa (20 g/L)
Condiciones de cultivo	Medio mineral AM1*. 37 °C, 150 rpm, pH 6.3 controlado con 1:1 de NaOH 4 M y Na ₂ CO ₃ 2 M. Sin aireación**.	Medio mineral AM1 con KCl 1 mM. 37 °C, 150 rpm, pH 6.3 controlado con 1:1 de NaOH 4 M y Na ₂ CO ₃ 2M. Sin aireación.	Medio mineral AM1. 37 °C, 150 rpm, pH 6.3 controlado con 1:1 de NaOH 4 M y Na ₂ CO ₃ 2 M. Sin aireación.	Medio mineral NBS. 37 °C, 150 rpm, pH 7 controlado con 2.4 M K ₂ CO ₃ - 1.2 M KOH). Condiciones anaerobias***.	Medio mineral SM. 37 °C, 220 rpm, pH 6.3 controlado con MgCO ₃ . Condiciones anaerobias.	Medio mineral CD. 30 °C, 170 rpm, pH 6.6 controlado con (Mg ₅ (CO ₃) ₄ (OH) ₂) 16 g/L. Condiciones anaerobias.
Perfil de productos	Fórmico (5.4)**** Etanol (4.4) Succínico (2.2) Acético (1.5)	Etanol (5.8) Fórmico (1.4)	Láctico (14.4) Fórmico (6.5) Acético (5.2) Etanol (4) Succínico (3.6)	Fórmico (5) Etanol (3.7) Succínico (3) Acético (1)	Etanol (0.8) Fórmico (0.5) Succínico (0.3) Acético (0.08)	Láctico (6.1) Etanol (2.9) Acético (2) Succínico (1.3) Fórmico (0.3)

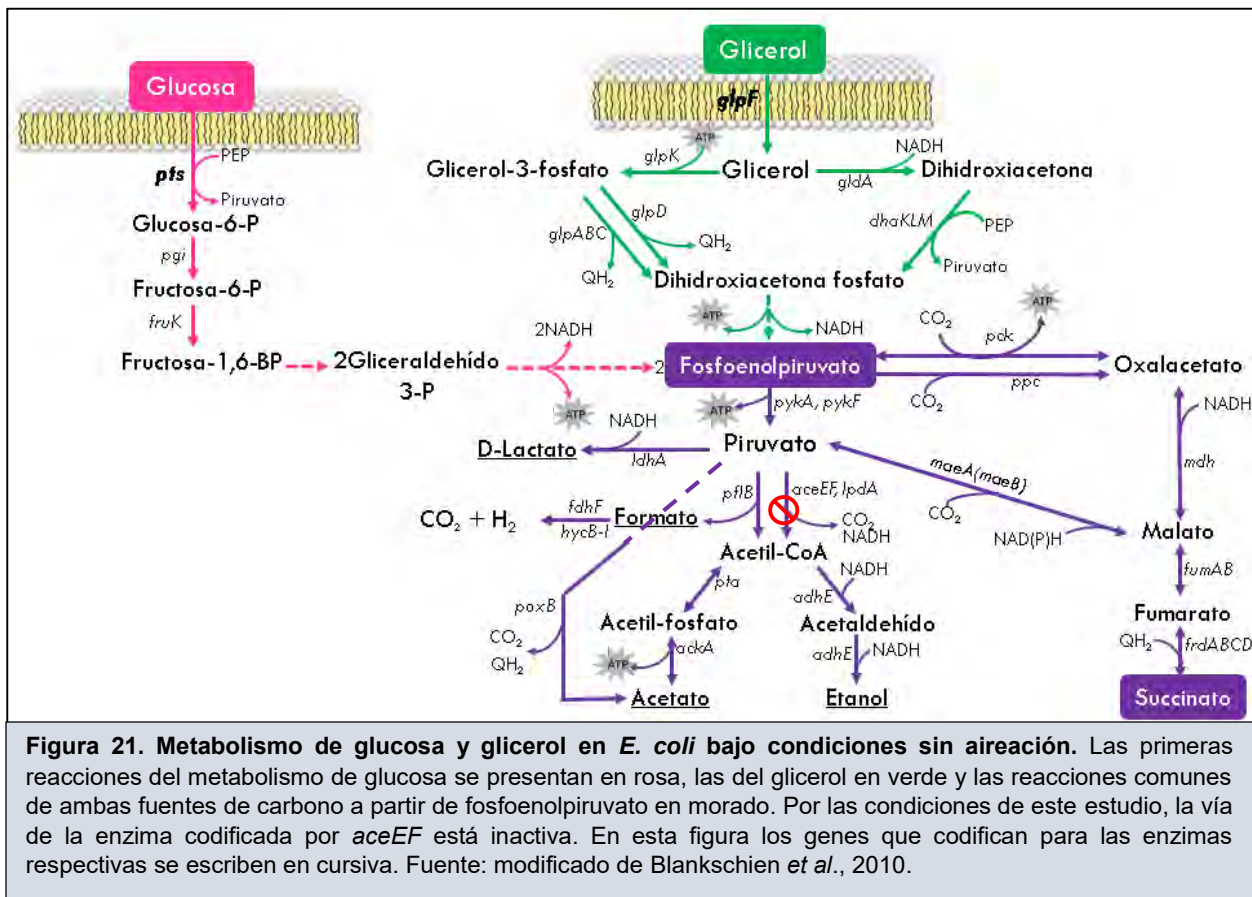
*El medio AM1 es el que se presenta en la tabla 5.

**La condición "sin aireación" se refiere a que el minifermentador utilizado en los experimentos no tiene un sellado hermético, pero no permite la entrada ni salida de aire. Solo está presente el O₂ del aire inicial, que es poco, el cual se consume al inicio de los cultivos.

*** La condición anaerobia se logró cuando en tales experimentos se usó CO₂ puro para llenar el espacio superior de los recipientes.

**** Los valores entre paréntesis están en g/L.

Como se observa, el perfil de metabolitos producidos cuando se usa glicerol como fuente de carbono en medio AM1 (sin KCl) es similar a lo reportado por Zhang *et al.* (2010) y Li *et al.* (2016); este último, a partir de la cepa *E. coli* MG1655, donde se producen etanol y ácido fórmico como productos mayoritarios, cantidades menores de ácido succínico y acético y ninguna de ácido láctico. El perfil de metabolitos usando glucosa como fuente de carbono varía un poco con respecto al reportado por Liu *et al.* en 2013, donde se producen elevadas cantidades de lactato, como productos secundarios se forman formiato y acetato, y muy poco etanol y succinato.



De acuerdo a la figura 21, la generación de formiato y etanol como productos mayoritarios a partir de glicerol en el gráfico 1 se obtiene, primeramente, por la enzima codificada por *pflB* (piruvato formiato liasa). Esta enzima solo está activa bajo condiciones anaerobias, el nivel de proteínas PFL incrementa durante el crecimiento anaerobio de *E. coli* (Sawers, 1988), por lo cual se producen elevadas cantidades de formiato y acetil-CoA. Cabe mencionar que el complejo de la piruvato deshidrogenasa está inhibida en ausencia de O₂ (Parés, 1997). El acetil-CoA formado puede dirigirse hacia la formación de acetato y etanol. Debido al balance redox, el metabolismo se dirige principalmente hacia la producción de etanol, ya que en las primeras reacciones de la asimilación de glicerol se producen dos moléculas de NADH las cuales se invierten en la formación de etanol, en consecuencia se detectó más de este compuesto que de acetato.

A pH 6.3 la hidrógeno formiato liasa (codificada por *fdhF*) presenta su mayor actividad, generando H₂ y CO₂ a partir de formiato (Dharmadi *et al.*, 2006). Como en este experimento (gráfico 1) se detectaron elevadas cantidades de dicho metabolito, podría cuestionarse la actividad de la enzima; sin embargo, esto pudo deberse a que como no hay mucha biomasa y aún queda fuente de carbono en el medio, no hubo necesidad de convertir el formiato en CO₂, molécula importante en varias reacciones del crecimiento.

Parte del glicerol metabolizado fue dirigido a la formación de ácido succínico, probablemente debido a que se tiene activa la enzima principal de carboxilación de fosfoenolpiruvado, la Ppc, y porque se tienen presentes moléculas de NADH y QH₂ para ser utilizadas por las enzimas Mdh y FrdABCD, respectivamente. No obstante, esta utilización no fue eficiente debido a que en estas condiciones metabólicas no se logra un balance redox por esta vía, por lo cual se generaron cantidades pequeñas de ácido succínico. Cabe mencionar que la presencia de QH₂ se debe a que la vía GlpK-GlpABC también está activa bajo condiciones sin aireación aunque en menor grado, ya que es una ruta minoritaria (Zhang *et al.*, 2010).

En cuanto a la glucosa (gráfico 2), su producto principal, lactato, se produce a partir de piruvato por la lactato deshidrogenasa que es inducida durante el metabolismo anaerobio de una amplia variedad de fuentes de carbono (Jantama *et al.*, 2008). Esta enzima realiza la reacción mediante la utilización del NADH producido por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Ver fig. 21), regenerándolo a NAD⁺, molécula necesaria para que más moléculas de glucosa se sigan metabolizando. Con glucosa, se presentó una fermentación ácido-mixta. Donde además de producirse lactato se forman formiato, acetato, etanol o succinato.

El perfil de productos mayoritarios de fermentación entre glucosa y glicerol fue diferente. Con glucosa se formó, principalmente, lactato seguido de formiato y acetato; mientras que con glicerol, los dos productos principales fueron formiato y etanol, y como coproductos secundarios succinato y acetato, sin producción de lactato. El análisis de este comportamiento muestra que el grado de reducción del glicerol y las vías iniciales de su catabolismo, en comparación al de glucosa, generan una distribución de productos de fermentación muy diferente. Esta distribución permite sugerir el uso de glicerol y técnicas de ingeniería metabólica sobre *E. coli* para la construcción de cepas homo productoras de etanol o succinato, como en este estudio, y el uso de glucosa para producir lactato.

Por otro lado, el perfil de metabolitos del glicerol en medio AM1 modificado con KCl cambió con respecto al medio que no contenía esta sal. Se formaron cantidades elevadas de etanol y cantidades minoritarias de acetato y, curiosamente, formiato. En muchos grupos de trabajo que tienen como objetivo la producción de ácido succínico a partir de glicerol, optan por el uso de sales de sodio en el medio mineral que emplean en lugar del uso de sales de potasio (Wong *et al.*, 2014; Blankschien *et al.*, 2010, Murarka *et al.*, 2008). La razón no es clara, pero puede radicar en que en la estructura nativa de la enzima Pck siempre hay un ion sodio enlazado de manera putativa (que es reconocido como propio de la proteína) al átomo O de la tirosina 29 y al átomo O^{δ1} del aspartato 307 y a moléculas de H₂O que interaccionan con éstos (Leduc *et al.*, 2005). En la estructura proporcionada por Protein Data Bank (PDB) se identifican numerosas entradas de

iones de sodio para una gran variedad de interacciones, pero las mencionadas anteriormente son las principales (Leduc *et al.*, 2005). Por lo que se podría sugerir que la presencia de iones sodio es indispensable para la estructura y funcionalidad de la Pck, y sin combinar con potasio debido a que podría existir una competencia entre ellos. En cuanto a esto último se reflejó su importancia, si se elimina el potasio del medio quedando solo sodio (ver tabla 6) se favorece la producción de succinato y si está presente se favorece la producción de etanol.

Para esta sección experimental concluimos que el metabolismo del glicerol no solo difiere del metabolismo de glucosa en el crecimiento obtenido por la cepa silvestre sino también en el perfil de metabolitos generado, favoreciéndose la producción de etanol y formiato con glicerol, y lactato con glucosa.

Debido a que *E. coli* MG1655 (DE3) solo consumió alrededor del 34% del glicerol propuesto (40 g/L para las cinéticas de evaluación), se decidió disminuir su concentración a 10 g/L en los subsecuentes experimentos, aunado al enriquecimiento del medio AM1 modificado con los componentes del medio LB.

8.3.2 El crecimiento de la cepa silvestre *E. coli* MG1655 (DE3) con glicerol se ve favorecido en medio mineral enriquecido, pero no la producción de succinato.

Se llevó a cabo la caracterización de la cepa silvestre en medio AM1 modificado y enriquecido con 10 g/L de triptona de caseína y 10 g/L de extracto de levadura en 10 g/L de glicerol (AM1m-YE-T-Gly). La cinética de crecimiento, perfil de metabolitos y parámetros cinéticos se presentan en el gráfico 4 y tabla 13.

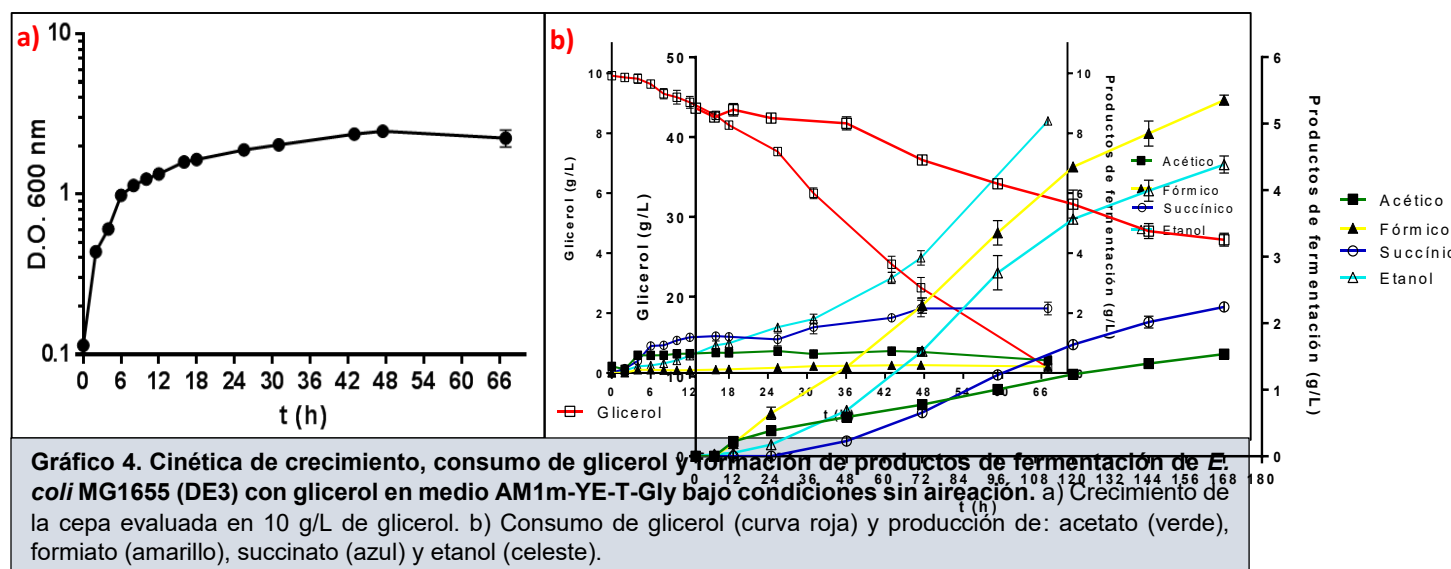


Tabla 13. Parámetros cinéticos y estequiométricos de *E. coli* MG1655 (DE3) cultivada en medio AM1m-YE-T-Gly bajo condiciones sin aireación.

CEPA	μ (h ⁻¹)	X _{final} (g _{DCW} /L)	Y _{x/s} * (g _{CEL} /g _{SUS})	q _s ** (g _{SUS} /g _x ·h)	Q _p (g _{AS} /L·h)	Y succinato (mol _{AS} /mol _{SUS})
MG1655 (DE3)	0.34 ±0.006	1.06 ±0.07 En 48 h	0.143 ±0.003	2.371 ±0.09	0.045 ±0.013	0.23 ±0.07

* Y_{x/s} aparente, parámetro global calculado como el incremento en masa celular por fuente de carbono consumida al alcanzar la fase estacionaria.

** q_s, consumo específico calculado en la fase exponencial.

Bajo las condiciones del presente experimento, la velocidad de crecimiento fue de 0.34 h⁻¹, casi 9 veces más que en medio no enriquecido. Cabe mencionar que la fase exponencial inició desde el tiempo 0 hasta las 6 horas de cultivo y la concentración de biomasa máxima alcanzada fue de 1.06 g/L a las 48 h, a diferencia del medio no enriquecido que fue de 0.61 g/L después de 7 días de fermentación, comprobando que el enriquecimiento del medio favorece el crecimiento microbiano.

En cuanto al consumo de la fuente de carbono (10 g/ de glicerol), a las 66 h de cultivo ya se había consumido en su totalidad. Su consumo específico fue el doble (2.37 g_{SUS}/g_x·h) con respecto al medio no enriquecido (1.062 g_{SUS}/g_x·h).

El perfil de metabolitos obtenido difiere al obtenido en el medio no enriquecido (AM1 modificado sin KCl y pH controlado a 6.3). En este experimento se obtiene como producto mayoritario etanol (8.4 g/L), seguido de succinato (2.1 g/L), y acetato y formiato en cantidades mínimas. Mientras que en el experimento sin enriquecer se obtuvieron como productos mayoritarios formiato y etanol, seguido de succinato y acetato en pequeñas concentraciones. En el trabajo de Li *et al.* en 2006, también obtuvieron etanol como producto mayoritario en una cepa de *E. coli* MG1655 a partir de glicerol; sin embargo, igualmente reportaron cantidades significativas de formiato.

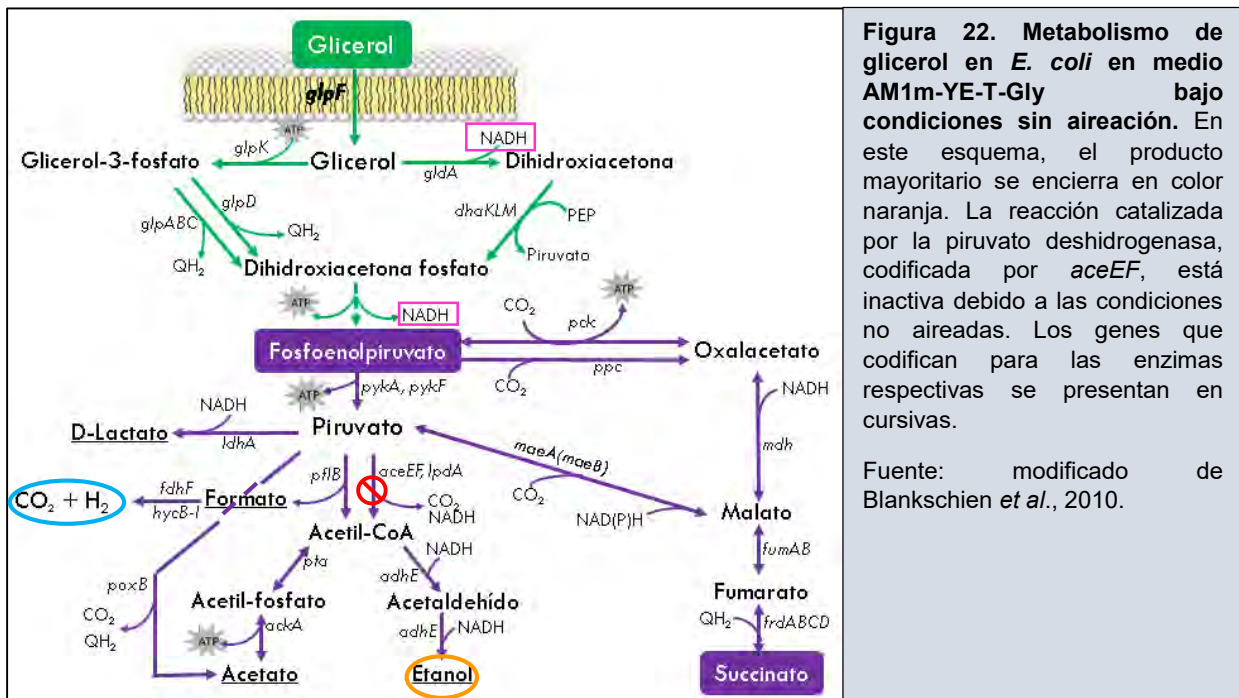


Figura 22. Metabolismo de glicerol en *E. coli* en medio AM1m-YE-T-Gly bajo condiciones sin aireación. En este esquema, el producto mayoritario se encierra en color naranja. La reacción catalizada por la piruvato deshidrogenasa, codificada por *aceEF*, está inactiva debido a las condiciones no aireadas. Los genes que codifican para las enzimas respectivas se presentan en cursivas.

Fuente: modificado de Blankschien *et al.*, 2010.

De acuerdo a los resultados reportados en el gráfico 4 y a la figura 22, se sugiere que el formiato generado se convirtió en CO₂ y H₂, ya que esta vez se produjo más biomasa, lo que demandó más CO₂ para las distintas reacciones del crecimiento (Murarka *et al.*, 2008). Como se verá a continuación, toda la fuente de carbono se destinó para la formación de los productos de fermentación, por lo que para la generación de biomasa las células, además del CO₂ proveniente del formiato, tomaron los componentes del hidrolizado de caseína y del extracto de levadura.

Las cantidades significativas de etanol producido fue gracias a la suficiente generación de NADH, del cual se producen dos moléculas (resaltados en color rosa en la figura 22), una por la enzima GldA (glicerol deshidrogenasa) y otra por GapA (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa). Bajo las condiciones de este experimento, se sugiere que el balance redox del sistema se logró dirigiendo el NADH a la producción de etanol, ya que se ocupan dos moléculas de éstas en su formación, regenerando así el NAD⁺ inicial.

La producción de etanol también sugiere que se formaron cantidades equimolares del alcohol y de formiato (y, posteriormente, de CO₂), debido a que la generación de etanol solo pudo llevarse a cabo a través del Acetil-CoA, formado únicamente por la piruvato formiato liasa (codificada por *pflB*) junto con formiato. Sin embargo, como se comentó anteriormente, el formiato producido se consumió por la FHL (formato hidrógeno liasa) para proveer de CO₂ a reacciones importantes del crecimiento microbiano, por lo que solo se detectaron cantidades despreciables de dicho compuesto.

La producción máxima de succinato fue de 2.1 g/L, muy similar al obtenido en el medio sin enriquecer e idéntico al reportado por Blankschien *et al.* en 2010. Por otro lado, si se realiza un balance de masa entre las cantidades finales de los metabolitos producidos y la fuente de carbono se aprecia una discrepancia. Esto es un consumo de 10 g/L de glicerol y una producción de metabolitos total de 11.2 g/L, además de la formación de biomasa y CO₂. Esto en parte puede deberse a la contribución de carbono de la triptona de caseína (caseína hidrolizada; es decir, una fuente de aminoácidos) y del extracto de levadura (autolisado de células de levaduras; un producto rico en vitaminas, especialmente, del complejo B, aminoácidos y otros factores de crecimiento; Mateos, 2000). Tales aminoácidos, principalmente los que pueden ser metabolizados directamente a piruvato (como alanina) o a metabolitos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, pueden ser considerados como fuente de carbono debido a que generan α -cetoglutarato u oxalacetato, los cuales son precursores de formación de glucosa por gluconeogénesis.

En cuanto a la producción de ácido succínico, en la reacción catalizada por la Ppc (fosfoenolpiruvato carboxilasa) se fija CO₂. Dicho CO₂ pudo provenir de la reacción de la FHL a partir de formiato.

En resumen, en medio AM1m-YE-T-Gly se producen 8.4 g/L de etanol y 2.1 g/L de succinato a partir de aproximadamente 10 g/L de glicerol, donde el resto de los metabolitos y la biomasa probablemente se obtienen a partir de los componentes del extracto de levadura e hidrolizado de caseína.

Hablando en términos energéticos en cuanto a ATP se refiere, el número de moléculas formadas no fue el mismo que de las consumidas. De acuerdo a la fig. 22, se formaron dos moléculas de ATP hasta la formación de piruvato; una por la fosfoglicerato quinasa y otra por la piruvato quinasa, cabe mencionar que parte del PEP (sustrato de la piruvato cinasa) se usó para fosforilar la dihidroxiacetona por la dihidroxiacetona fosfato, por lo que no todo el PEP se empleó para formar ATP en dicha reacción. Las reacciones catalizadas por AckA (acetato cinasa) y Pck (fosfoenolpiruvato carboxicinasa) generan ATP, sin embargo, en este experimento la primera no contribuyó relevantemente porque se formaron menos de 0.5 g/L de acetato y la segunda es una reacción gluconeogénica. En cuanto al consumo de ATP, en este escenario metabólico, solo lo hace la glicerol cinasa, pero no fue relevante debido a que la ruta GlpK-GlpABC es una vía minoritaria bajo las condiciones empleadas (sin aireación). No contar con un balance neutro de moléculas de ATP es desfavorable para alcanzar altos rendimientos de un metabolito de interés. Cualquier exceso de ATP producido en una ruta metabólica se gasta en el crecimiento celular, además de vías de mantenimiento, lo que demanda fuente de carbono y la desvía de la formación del producto de interés, generando así bajos rendimientos (asumiendo que no hay otros metabolitos que también pueden competir por la fuente de carbono) (Stephanopoulos *et al.*, 2011). Cabe mencionar que en este experimento se trabajó con la cepa silvestre, que aún no está diseñada para dirigir la fuente de carbono al succinato.

En esta sección resumimos que la cepa evaluada (silvestre) crece hasta 9 veces más rápido en medio AM1 modificado enriquecido con los componentes del medio LB que en medio AM1 modificado sin enriquecer; generando al mismo tiempo un perfil de metabolitos distinto, produciendo hasta 8.4 g/L de etanol y 2.1 g/L de succinato.

8.3.3 *E. coli* MG1655 (DE3) genera una fermentación ácido-mixta, favoreciendo la producción de acetato en medio mineral enriquecido con glucosa como fuente de carbono.

Como se contaba con la caracterización cinética de la cepa silvestre con glucosa en medio AM1 modificado para fines comparativos, al ser una fuente de carbono preferencial para la bacteria,

también se realizó la caracterización de esta misma cepa (MG1655 (DE3)) en medio AM1 modificado y enriquecido con 10 g/L de triptona de caseína y 10 g/L de extracto de levadura en 10 g/L de glucosa (AM1m-YE-T-Glc, gráfico 5) para ese mismo fin. Los parámetros cinéticos y estequiométricos se muestran en la tabla 14.

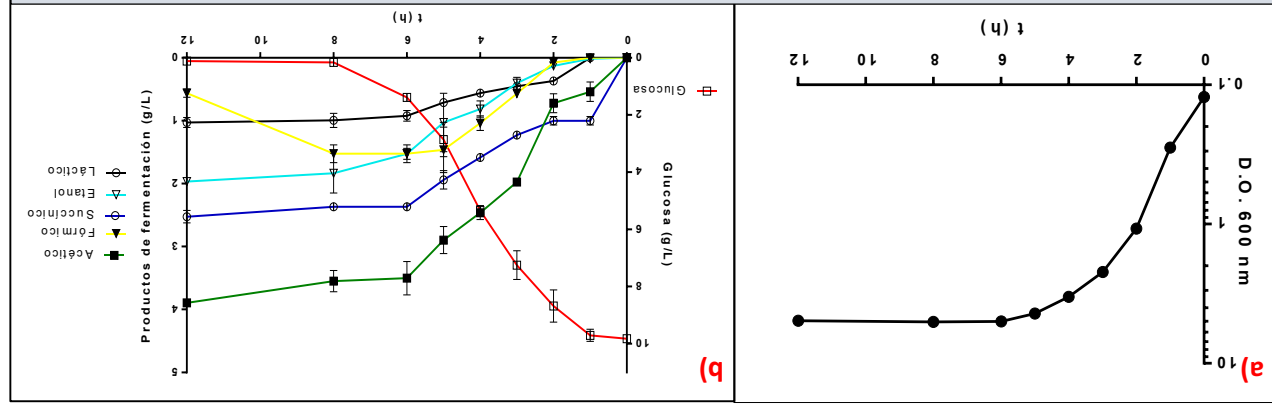


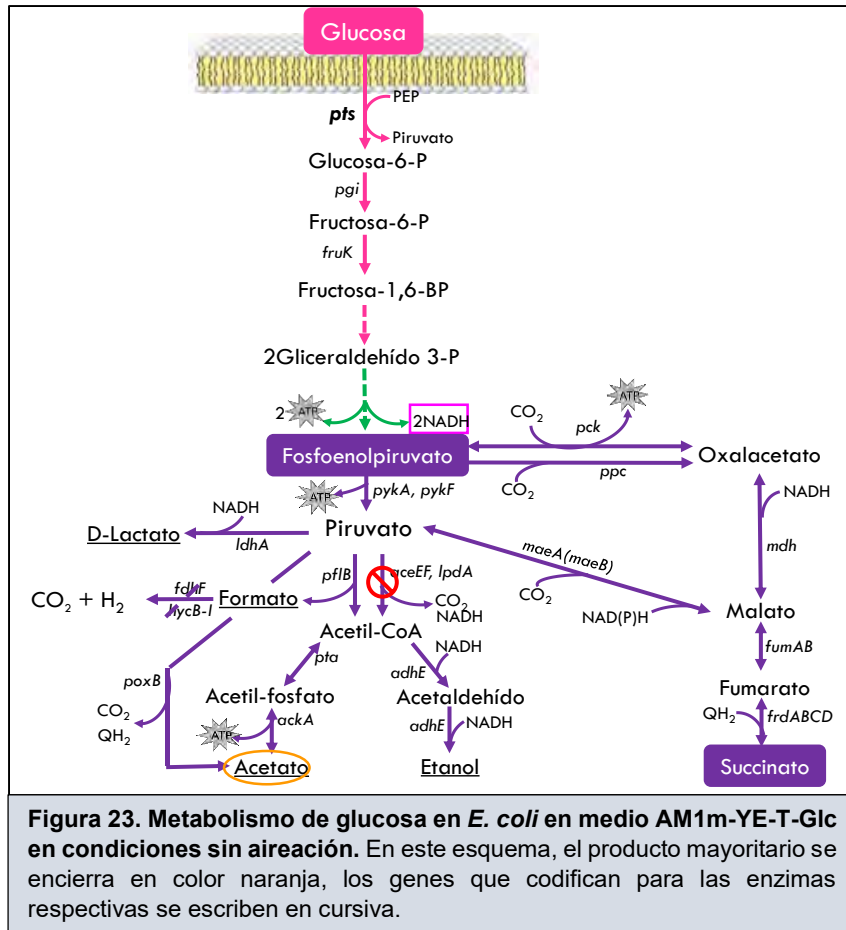
Tabla 14. Parámetros cinéticos y estequiométricos de *E. coli* MG1655 (DE3) en medio AM1m-YE-T-Glc bajo condiciones sin aireación.

CEPA	μ (h ⁻¹)	X_{final} (g _{DCW} /L)	$Y_{x/s}^*$ (g _{CEL} /g _{SUS})	q_{s}^{**} (g _{SUS} /g _X ·h)	Q_p (g _{AS} /L·h)	$Y_{succinato}$ (mol _{AS} /mol _{SUS})
MG1655 (DE3)	0.48 ±0.044	2.15 ±0.13	0.245 ±0.026	2.189 ±0.085	0.108 ±0.007	0.41 ±0.60

* $Y_{x/s}$ aparente, parámetro global calculado como el incremento en masa celular por fuente de carbono consumida al alcanzar la fase estacionaria.
 ** q_s , consumo específico calculado en la fase exponencial.

Se aprecia que los 10 g/L de glucosa se consumieron rápido, ya que a las 8 h de fermentación se había agotado por completo. La velocidad específica de crecimiento fue de 0.48 h⁻¹, 30% mayor que en el experimento similar con glicerol (0.34 h⁻¹). Se alcanzó una biomasa máxima de 2.1 g/L a las 6 h, el doble de la alcanzada usando glicerol en 48 h en ese mismo medio. Estos resultados reflejan que la glucosa es una fuente de carbono preferencial para *E. coli*.

El perfil de metabolitos cambió con respecto a la fermentación en medio AM1 modificado no enriquecido y con glucosa como fuente de carbono, encontrándose acetato como producto mayoritario, seguido de succinato, etanol y láctico. Este cambio puede atribuirse a la contribución de los compuestos carbonados que posee el extracto de levadura e hidrolizado de caseína, los cuales ocasionan una generación y distribución diferente del poder reductor (moléculas de NADH), originando un perfil de metabolitos distinto (fig. 23). Cabe mencionar que en este experimento se observó consumo de formiato una vez agotada la glucosa (produciéndose hidrógeno y CO₂).



En cuanto a moléculas energéticas se refiere, hay dos enzimas que generan ATP hasta la formación de piruvato; éstas son la fosfoglicerato cinasa y la piruvato cinasa. Debido a que se formaron cantidades considerables de acetato por la Ack, también se produjeron moléculas de ATP por esta vía (Figura 23). Este balance energético contribuyó a una mayor generación de biomasa con respecto al experimento con glicerol. Aunque en la entrada de una molécula de glucosa se emplea una molécula de PEP, equivalente a un ATP, su consumo fue más rápido. Como se describió anteriormente, la producción neta de ATP del metabolismo de glicerol fue menor, también existió una desviación de PEP (sustrato de la piruvato cinasa en la formación de ATP) en la fosforilación de la dihidroxiacetona por la dihidroxiacetona fosfato y se produjo menos cantidad de acetato.

Este experimento permite ver que, aun en medio enriquecido, la glucosa es fuente de carbono preferencial para *E. coli* con respecto a glicerol; y que incluso en glucosa, donde *E. coli* no tiene limitado su crecimiento, se genera un perfil de metabolitos distinto solo por la presencia de los componentes del medio LB (en comparación con experimento del gráfico 2), y es que la asimilación de éstos genera una distribución distinta del poder reductor y, por consiguiente, de los productos formados.

8.3.4 La eliminación de la glicerol deshidrogenasa, *GldA*, bajo condiciones no aireadas reduce drásticamente la velocidad volumétrica de consumo de glicerol y genera una producción baja de acetato.

Una vez caracterizada la cepa silvestre en medio AM1 modificado enriquecido y no enriquecido, tanto con glicerol como con glucosa, se llevó a cabo la caracterización cinética de las cepas mutantes obtenidas por el método de transducción por fagos, las cuales se enlistan a continuación.

1. AG01: *E. coli* MG1655 DE3 $\Delta gldA::FRT-Km-FRT$;
2. AG02: *E. coli* MG1655 DE3 $\Delta gldA::FRT, \Delta ppc::FRT-Km-FRT$;
3. AG03: *E. coli* MG1655 DE3 $\Delta gldA::FRT, \Delta ppc::FRT, \Delta pck::FRT-Km-FRT$; y
4. AG04: *E. coli* MG1655 DE3 $\Delta gldA::FRT, \Delta ppc::FRT, \Delta pck::FRT, \Delta pykF::FRT-Km-FRT$.

Tales evaluaciones se realizaron en medio enriquecido y glicerol (AM1m-YE-T-Gly) por duplicado. Solo en glicerol debido a que a partir de este momento el interés se centró en la fuente de carbono a estudiar, ya se contaba con el genotipo $\Delta gldA$, gen involucrado en su consumo. Las cinéticas de crecimiento, consumo de glicerol y perfil de metabolitos generados se presentan en el gráfico 6 y los parámetros cinéticos y estequiométricos en la tabla 15.

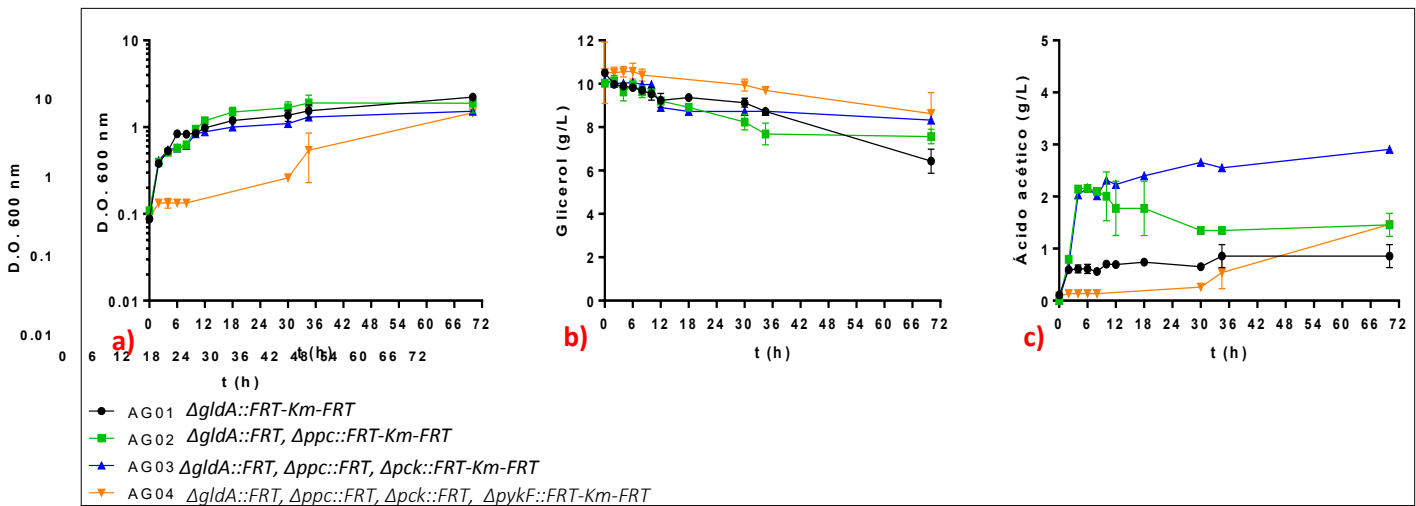


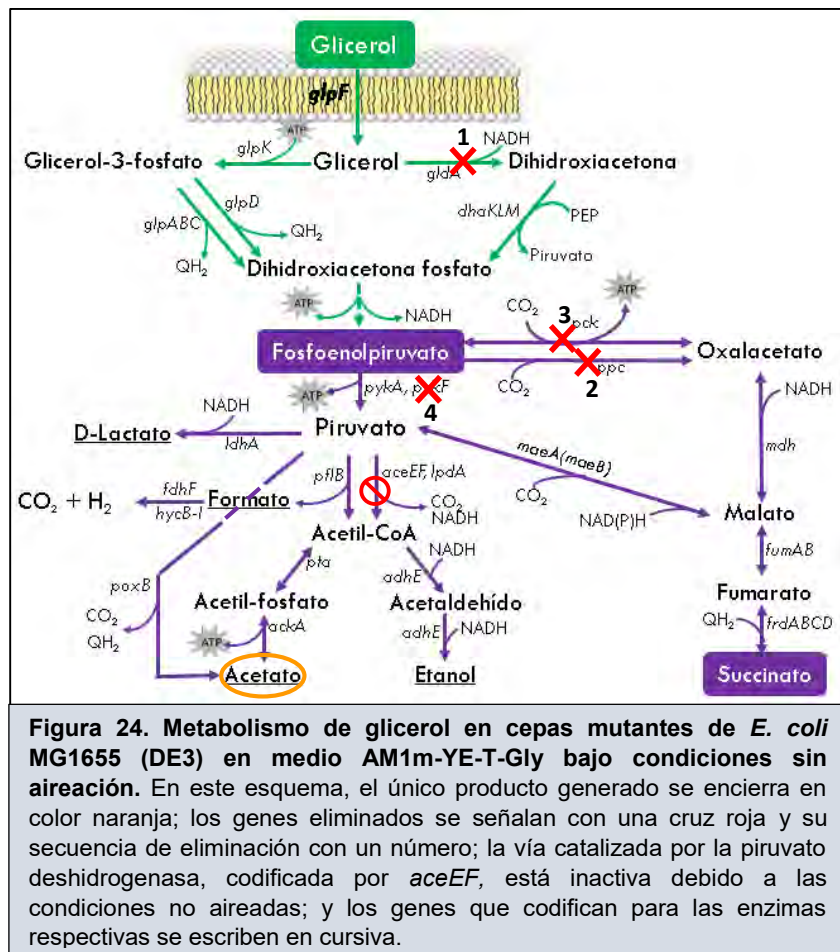
Gráfico 6. Caracterización cinética de cuatro mutantes derivadas de *E. coli* MG1655 (DE3) AM1m-YE-T-Gly bajo condiciones sin aireación. a) Crecimiento de las cepas en unidades de D.O. a 600 nm, b) Consumo de glicerol, c) Producción de acetato.

Tabla 15. Parámetros cinéticos y estequiométricos de cuatro mutantes derivadas de <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) en medio AM1m-YE-T-Gly, bajo condiciones sin aireación.						
CEPA	μ (h ⁻¹)	X _{final} (g _{DCW} /L)	Y _{x/s} * (g _{CEL} /g _{SUS})	q _s ** (g _{SUS} /g _X ·h)	Glicerol consumido (g)	Acetato máximo producido (g)
MG1655 (DE3)	0.34 ±0.006	1.06 ±0.07 En 48 h	0.143 ±0.003	2.371 ±0.09	10 En 66 h	0.7 ±0.12 En 24 h
AG01	0.36 ±0.006	0.96 ±0.011 En 70 h	0.245 ±0.060	1.51 ±0.333	4.1 ±0.530 En 72 h	0.86 ±0.220 En 34 h
AG02	0.262 ±0.009	0.81 ±0.360 En 72 h	0.254 ±0.016	1.03 ±0.016	2.6 ±0.450 En 34 h	2.16 ±0.029 En 6 h
AG03	0.279	0.66 ±0.0 En 72 h	0.34 ±0.0	0.83 ±0.0	1.68 ±0.0 En 72 h	2.9 ±0.0 En 72 h
AG04	0.058 ±0.007	1.18 ±0.034 En 72 h	0.31 ±0.014	0.21 ±0.110	1.88 ±0.430 En 72 h	1.46 ±0.049 En 72 h

* Y_{x/s} aparente, parámetro global calculado como el incremento en masa celular por fuente de carbono consumida al alcanzar la fase estacionaria.

** q_s, consumo específico calculado para a fase exponencial.

Como se observa, evaluadas en condiciones sin aireación las mutantes crecieron lentamente en glicerol, las velocidades de crecimiento fueron disminuyendo a medida que aumentó el número de genes eliminados. La eliminación secuencial de los genes ocasionó cambios metabólicos que se reflejaron en un pobre crecimiento de las cepas. La biomasa máxima alcanzada estuvo en el rango de 0.6-1.0 g/L en 72 h de fermentación para la mayoría de las cepas, aun cuando el medio estaba enriquecido con los componentes del medio LB. Sin embargo, las cepas AG01, AG02 y AG03 presentaron su fase de crecimiento exponencial durante las primeras 6 h de cultivo. Este resultado sugiere que los componentes del extracto de levadura e hidrolizado de caseína se utilizaron en el crecimiento del microorganismo y no el glicerol, debido a que hasta las 6 h de fermentación prácticamente no había sido consumido. Solo hubo formación de acetato en pequeñas cantidades. Se sugiere que los componentes del extracto de levadura e hidrolizado de caseína se destinaron, además de generar biomasa, a la producción de acetato, ya que en las cepas AG01, AG02 y AG03 la formación de acetato ocurrió durante las primeras horas del cultivo, cuando el consumo de glicerol fue prácticamente nulo (gráfico 6c). Probablemente el glicerol consumido (1.6 - 4.1 g/L de glicerol en 72 h) se destinó para generar energía de mantenimiento celular.



Cabe mencionar que estos resultados eran esperados. En cuanto al consumo de glicerol, se esperaba que no se consumiera de manera significativa en todas las cepas, ya que éstas tenían eliminada la *GldA* (glicerol deshidrogenasa), que es la principal enzima de asimilación de glicerol bajo condiciones de fermentación (fig. 24). Probablemente, lo poco que se consumió se debió a la vía minoritaria de asimilación en condiciones no aireadas, mediante *GlpK* y *GlpABC* (figura 24) (Zhang *et al.*, 2010). En cuanto a la producción de metabolitos, no se esperaba formación de succinato debido a que a partir de la cepa AG02 se eliminó la principal enzima de carboxilación de fosfoenilpiruvado, la *Ppc*, que origina oxalacetato (intermediario del succinato). Se sugiere que el piruvato generado se convirtió en Acetil-CoA, el cual, en su mayoría, fue destinado para reacciones de crecimiento basal, p. ej. las de biosíntesis de ácidos grasos, por lo que no hubo producción de lactato, etanol o formiato.

8.3.5 La producción de succinato a partir de glucosa no se vio favorecida en las cepas *E. coli* MG1655 (DE3) y AG03 que poseían el gen *pck_{As}* sintético clonado, en condiciones sin aireación.

Para comparar con glicerol y saber el efecto del gen *pck_{As}* sintético (optimizado para el uso de codones en *E. coli*) en la producción de succinato a partir de glucosa, fuente de carbono preferencial, se evaluaron las cepas *E. coli* MG1655 (DE3) pACYCDuet-1/*pck_{As}* (sintético) y AG03 pACYCDuet-1/*pck_{As}* (sintético) en medio AM1m-YE-T-Glc bajo condiciones sin aireación. Los resultados se muestran en los gráficos 7 y 8, y en la tabla 16.

Cabe mencionar que antes de este experimento se evaluó la cepa AG03 pACYCDuet-1/*pck_{As}*, con *pck* sintético y original (vectores que se tenían hasta el momento) con glicerol, en donde no se encontró efecto positivo de los genes clonados sobre la producción de ácido succínico (anexo 6). Este resultado era esperado, la cepa no consumió eficientemente el glicerol puesto que no tiene el gen *gldA* (que codifica para la enzima principal de asimilación de glicerol en condiciones anaerobias), pero como se requería ver la funcionalidad de *pck* clonado, se evaluaron la cepa silvestre y AG03 en glucosa.

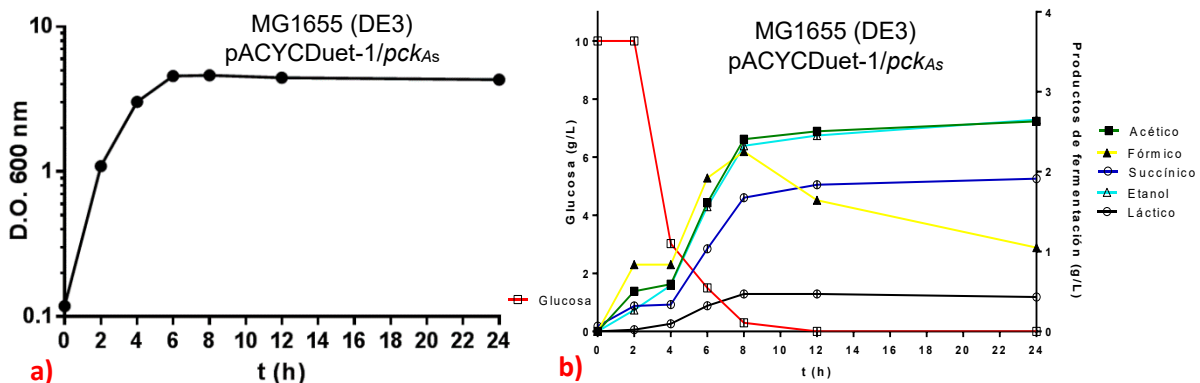


Gráfico 7. Cepa silvestre con el gen *pck_{As}* sintético evaluada en medio AM1m-YE-T-Glc, en condiciones no aireadas. a) Crecimiento de la cepa en 10 g/L de glucosa, los resultados están en unidades de D.O. 600. b) Consumo de glucosa (curva roja) y producción de: acetato (verde), formiato (amarillo), succinato (azul), etanol (celeste) y láctico (café).

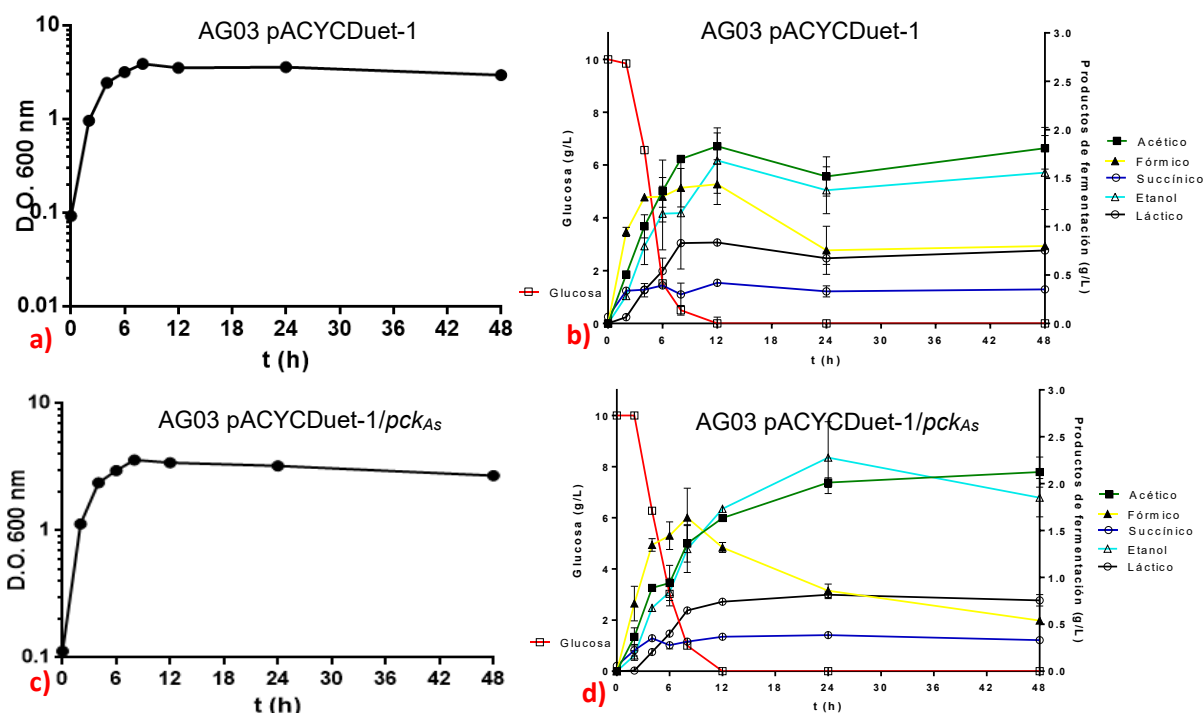


Gráfico 8. Cepas AG03 y AG03 con el gen *pck_{As}* sintético, evaluadas en medio AM1m-YE-T-Glc, en condiciones no aireadas. a, c) Crecimiento de la cepa en 10 g/L de glucosa, los resultados están en unidades de D.O.₆₀₀. b, d) Consumo de glucosa (curva roja) y producción de: acetato (verde), formiato (amarillo), succinato (azul), etanol (celeste) y láctico (café).

Tabla 16. Parámetros cinéticos y estequiométricos cepas *E. coli* MG1655 (DE3) silvestre y triple mutante en medio AM1m-YE-T-Glc bajo condiciones sin aireación.

CEPA	μ (h ⁻¹)	X (g _{DCW} /L)	$Y_{x/s}^*$ (g _{CEL} /g _{SUS})	q_s^{**} (g _{SUS} /g _x ·h)	Q_p (g _{As} /L·h)	Y succinato (mol _{As} /mol _{SUS})
MG1655 (DE3)	0.48±0.044	2.15±0.13 En 6 h	0.245±0.026	2.189±0.085	0.108±0.007	0.41±0.60
MG1655 (DE3) <i>pACYCDuet-1/pck_{As}</i>	0.6±0.00	1.96±0.00 En 6 h	0.23±0.00	2.64±0.00	0.077±0.00	0.33±0.00
MG1655 (DE3) AG03	0.58±0.001	1.67±0.001 En 8 h	0.19±0.001	3.1±0.017	-	-
MG1655 (DE3) AG03 <i>pACYCDuet-1/pck_{As}</i>	0.53±0.00	1.5±0.018 En 8 h	0.18±0.002	2.87±0.022	-	-

* $Y_{x/s}$ aparente, parámetro global calculado como el incremento en masa celular por fuente de carbono consumida al alcanzar la fase estacionaria.

** q_s , consumo específico calculado para a fase exponencial.

- Debido a que no se generó As en estos experimentos, no hay forma de calcular productividad ni rendimiento.

Como se observa, no hay cambios en la producción de ácido succínico en la cepa silvestre y triple mutante conteniendo el vector con el gen *pck_{As}* (sintético) y vector sin el gen (control negativo), aun en glucosa. Para inducir la expresión se usó IPTG 10 μ M, añadiéndose en la fase exponencial del crecimiento.

En cuanto a los otros metabolitos, el perfil es similar para ambas cepas, produciéndose acetato y etanol en cantidades mayoritarias, seguido de succinato. En cuanto al formiato, se observa que para todas las cepas, se empieza a consumir una vez agotada la fuente de carbono. Cabe

mencionar que el formiato es fuente de CO₂, molécula importante para distintas reacciones del crecimiento.

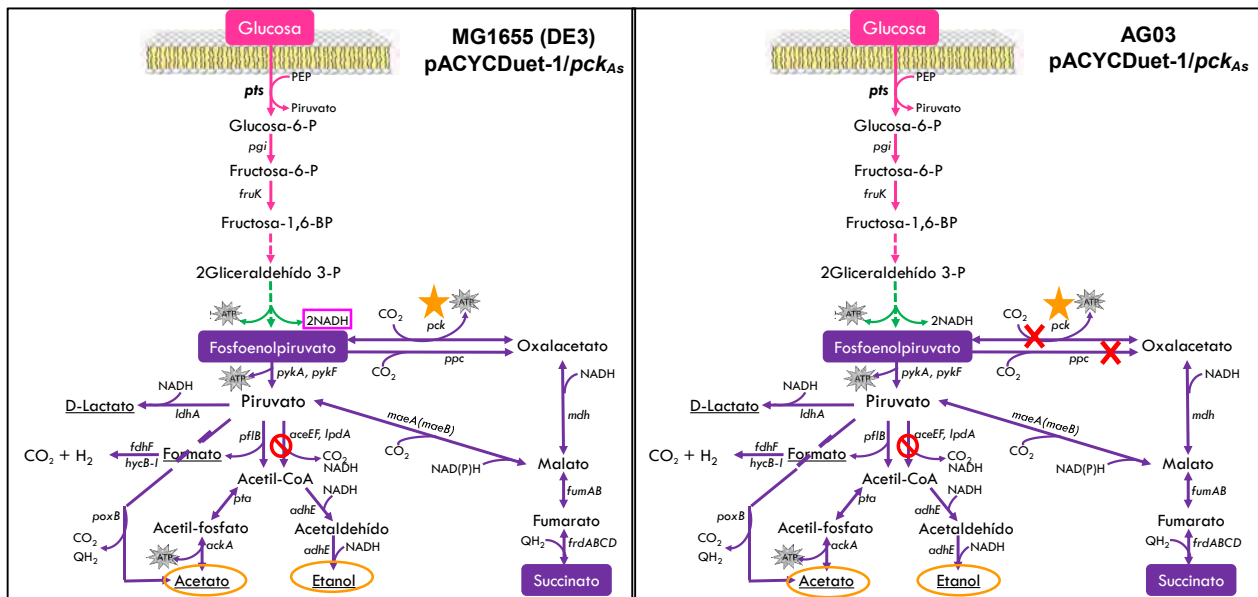


Figura 25. Metabolismo de glucosa en *E. coli* MG1655 (DE3) pACYCDuet-1/*pck*_{As} y AG03 pACYCDuet-1/*pck*_{As} en medio AM1m-YE-T-Glc en condiciones sin aireación. En el esquema de la izquierda se presenta el metabolismo de glucosa de la cepa silvestre y el vector mencionado. En el de la derecha se presenta el metabolismo de glucosa en la cepa mutante. El producto mayoritario se encierra en color naranja, la vía catalizada por la piruvato deshidrogenasa codificada por *aceEF* está inactiva debido a las condiciones no aireadas y los genes a sobreexpresar se señalan con una estrella naranja. Nota: La cepa mutante también tiene el gen *gldA* eliminado, solo que en el esquema no se presenta porque no se muestran las reacciones con glicerol.

En la figura 25 se presenta el escenario metabólico de las cepas evaluadas. Para la cepa silvestre, el poder reductor NADH se dirige a la formación de etanol. Se forman cantidades equimolares de formiato y acetil-CoA, ésta última empleándose para la producción de acetato y etanol, que son los productos mayoritarios. Cabe recordar que, al usar un medio enriquecido con los componentes del medio Luria y que éstos aportan compuestos de carbono, se genera una distribución de poder reductor diferente (en comparación con un medio no enriquecido), por lo que también hay otro producto que emplea moléculas reducidas durante su síntesis como el lactato (en pequeñas cantidades).

En la cepa AG03 transformada con el vector pACYCDuet-1 y pACYCDuet-1/*pck*_{As} sucede un comportamiento similar en cuanto a producción de compuesto de fermentación se refiere. Solamente hay una diferencia marcada en la producción de succinato, ya que en las mutantes se forma menos que en la cepa silvestre. Probablemente, esto se debió a que en la triple mutante ya no está la enzima principal de carboxilación de fosfoenolpiruvato, Ppc, y a que no hubo un efecto positivo del gen clonado.

En estos experimentos se esperaba formación de succinato vía pck_{As} clonado (un aumento para la cepa silvestre y una producción estimable para la triple mutante) debido a que se consumió eficientemente la fuente de carbono, parte del flujo debió dirigirse hacia la generación del metabolito de interés. Sin embargo, los resultados sugieren que el gen clonado no tuvo efecto positivo alguno.

8.3.6 La triple mutante AG03 transformada con pACYCDuet-1 pck_{As} , $glpK_{Ec}$, evaluada bajo condiciones sin aireación en medio mineral – glicerol - enriquecido, crece lentamente y no produce succinato.

Se construyó el plásmido pACYCDuet-1/ pck_{As} , $glpK_{Ec}$, tanto con el gen pck_{As} sintético y con el original, y se transformaron en la cepa AG03. Con estos experimentos se esperaba un mayor consumo de glicerol de las cepas a evaluar debido a que ya se contaba con el gen $glpK$ clonado, y por lo tanto una producción favorecida de succinato. Se probaron distintas concentraciones de IPTG (gráfico 9 y tabla 17); hasta el momento, solo se había usado 10 μM debido a que es una concentración no tóxica para la célula. Como el glicerol no es fuente de carbono preferencial para *E. coli*, no se deseaba generar una carga metabólica a través del IPTG añadido; sin embargo, pudiendo ser esto la razón de que el gen pck clonado no tuviera efecto positivo sobre la producción de succinato, se probaron otras concentraciones.

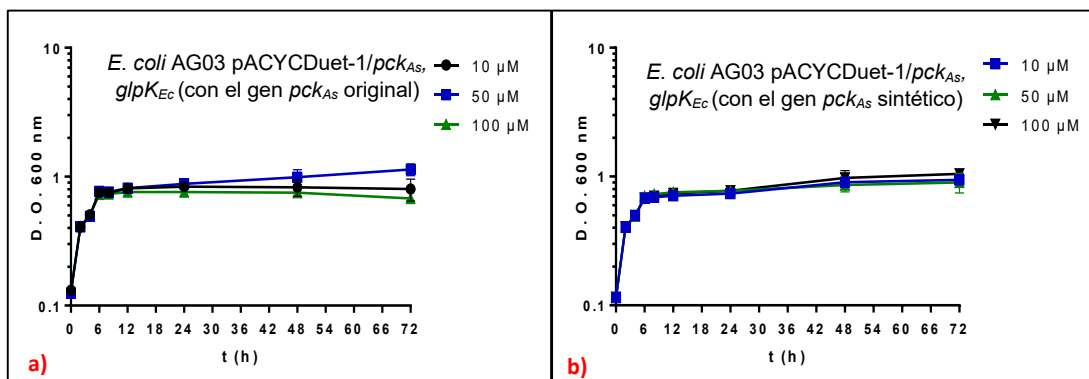


Gráfico 9. Crecimiento de las cepas triples mutantes transformadas con el vector pACYCDuet-1/ pck_{As} , $glpK_{Ec}$, en medio AM1m-YE-T-Gly bajo condiciones no aireadas. En el panel a) se presenta las cinéticas de crecimiento con el gen pck_{As} original y en el b) con el gen sintético, a diferentes concentraciones de IPTG (10, 50 y 100 μM).

Tabla 17. Parámetros cinéticos y estequiométricos *E. coli* AG03 pACYCDuet-1/ pck_{As} , $glpK_{Ec}$ (con el gen pck_{As} original y sintético) en medio AM1m-YE-T-Gly bajo condiciones sin aireación.

IPTG (añadido al inicio del cultivo)	pck_{As} original		pck_{As} sintético	
	μ (h^{-1})	X_{final} ($\text{g}_{\text{DCW}}/\text{L}$)	μ (h^{-1})	X_{final} ($\text{g}_{\text{DCW}}/\text{L}$)
10 μM	0.28 ± 0.01	0.36 ± 0.02 En 36 h	0.28 ± 0.00	0.40 ± 0.00 En 36 h
50 μM	0.28 ± 0.01	0.36 ± 0.05 En 36 h	0.28 ± 0.01	0.37 ± 0.04 En 36 h
100 μM	0.27 ± 0.004	0.33 ± 0.012 En 36 h	0.28 ± 0.004	0.30 ± 0.06 En 48 h

En el gráfico 9 se observa un patrón de crecimiento similar en todas las cepas. Las velocidades de crecimiento y la biomasa máxima alcanzada son prácticamente iguales para cada experimento. Esto fue debido a que no hubo un efecto positivo del gen *glpK* clonado sobre el consumo de glicerol en las condiciones evaluadas.

En cuanto a metabolitos generados, los resultados de HPLC arrojaron solo una producción mínima de acetato (alrededor de 1 g/L) para todos los experimentos, por tal razón no se reportaron en un gráfico. No hubo un efecto positivo del gen *pck* clonado debido a que no se produjo succinato, aun a diferentes concentraciones de IPTG.

Estos resultados (cinéticas y parámetros cinéticos y estequiométricos) son similares a los reportados en la caracterización de la cepa AG03 sin transformar con los plásmidos en mención (*pACYCDuet-1pck_{As}*, *glpK_{Ec}*, con el gen *pck* original o sintético) bajo las mismas condiciones (sección 8.3). Sin embargo, los resultados aquí obtenidos no eran esperados. De acuerdo a la figura 26, a pesar de tener bloqueada la vía de *GldA*, la principal en la asimilación de glicerol en condiciones de fermentación, se contaba con *GlpK* en cromosoma y en plásmido. Por lo que se esperaba que la actividad coordinada de *GlpK* y *Pck* incrementaran el consumo de glicerol y la producción de succinato.

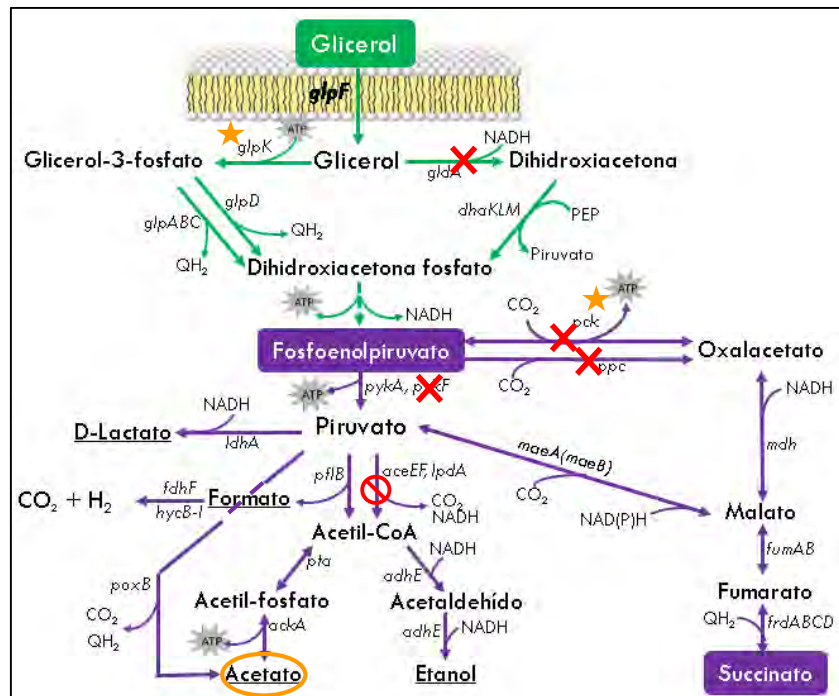


Figura 26. Metabolismo de glicerol en la cepa AG03 *pACYCDuet-1/pck_{As}*, *glpK_{Ec}* en medio AM1m-YE-T-Gly bajo condiciones sin aireación. En este esquema, el único producto generado, en mínimas cantidades, se encierra en color naranja. Los genes eliminados se señalan con una cruz roja; los genes a sobreexpresar se señalan con una estrella naranja; la vía catalizada por la piruvato deshidrogenasa, codificada por *aceEF*, está inactiva debido a las condiciones no aireadas; y los genes que codifican para las enzimas respectivas se escriben en cursiva.

La GlpK cataliza la fosforilación Mg-ATP dependiente del glicerol a glicerol 3-fosfato. Dicha reacción es una etapa limitante en la utilización de glicerol (Zwaig *et al*, 1970), ya que se ha reportado inhibición no competitiva por fructosa-1, 6- bifosfato (FBP). A bajas concentraciones de este compuesto, la enzima puede someterse a una disociación reversible de sus subunidades, entre la forma tetramérica y dimérica; la forma dimérica no se une a la FBP (De riel *et al.*, 1978). Para nuestros experimentos, no tendría que presentarse este problema debido a que no hay glucosa en el medio, a menos que los aminoácidos gluconeogénicos del extracto de levadura e hidrolizado de caseína contribuyan de manera significativa en la formación de glucosa o los intermediarios fosforilados del glicerol se conviertan en FBP (fig. 27). Sin embargo, las cantidades usadas del extracto de levadura y triptona de caseína no son elevadas y no tendría que acumularse FBP si ese fuera el caso, ya que al no haber suficiente fuente de carbono preferencial hace que el microorganismo lo utilice y no lo acumule.

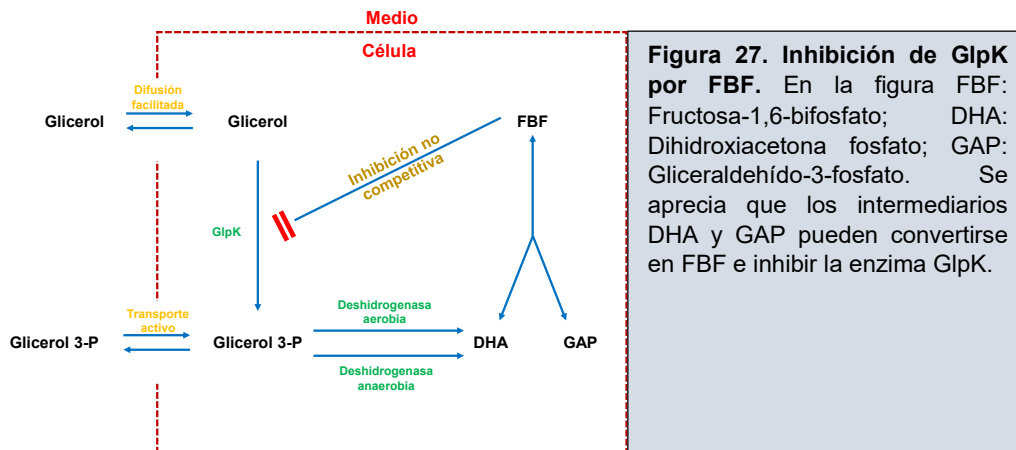
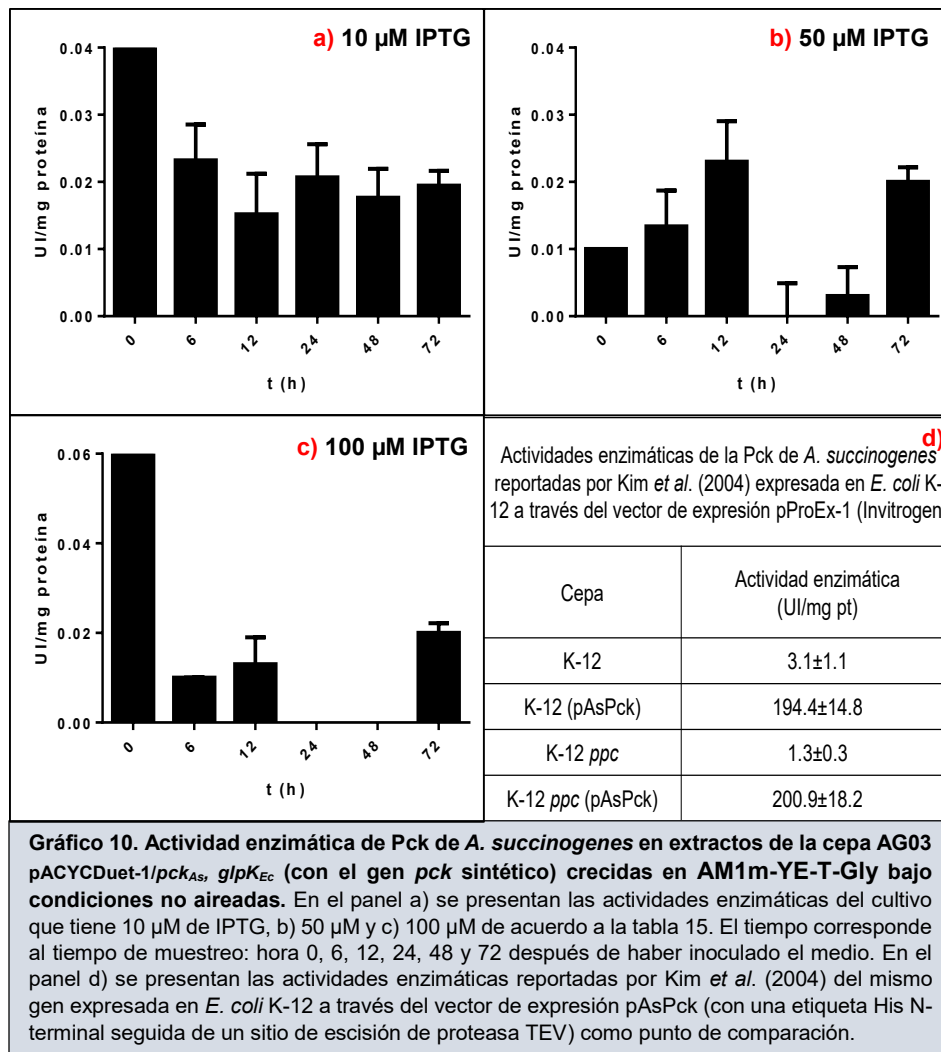


Figura 27. Inhibición de GlpK por FBP. En la figura FBP: Fructosa-1,6-bifosfato; DHA: Dihidroxiacetona fosfato; GAP: Gliceraldehído-3-fosfato. Se aprecia que los intermediarios DHA y GAP pueden convertirse en FBP e inhibir la enzima GlpK.

GlpK, aunque es una vía minoritaria en el consumo de glicerol en condiciones anaerobias, es requerida cuando el glicerol es la única fuente de carbono y energía, por lo que se sugiere que el diseño de la estrategia metabólica en cuanto a la asimilación del sustrato es correcto. Con esto, no se desestima el importante papel de GldA, puesto que es la enzima principal en asimilación de glicerol bajo estas condiciones. Con estrategia de este estudio, no se esperaba que el consumo de glicerol fuera igual que cuando se tiene GldA, pero sí significativo debido al efecto del gen *glpK* clonado.

En cuanto al gen *pck_{As}*, se determinó su actividad enzimática en extractos proteicos provenientes de algunas muestras de los cultivos de AM1m-YE-T-Gly bajo condiciones sin aireación. Se usaron muestras de la cepa AG03 *pACYCDuet-1/pck_{As}, glpK_{Ec}* (con el gen *pck_{As}* sintético) cuando se usó 10, 50 y 100 μ M de IPTG. Se optó por evaluar el gen sintético debido a que, al estar diseñado con el uso optimizado de codones para *E. coli*, podría presentar mayor actividad.



Los resultados del gráfico 10 muestran una actividad enzimática de menos de 0.1 UI/mg de proteína para todas las muestras de los tres experimentos evaluados. Si estos valores se comparan con los reportados por Kim *et al.* en 2004, donde determinaron las actividades enzimáticas de la Pck de *A. succinogenes* (cuyo gen es original, es decir, sin el uso optimizado de codones) expresada en varias cepas de *E. coli* K-12 a través del vector de expresión pProEx-1 (Invitrogen, con resistencia a ampicilina y promotor *trc*), se observa que están por debajo del de la cepa silvestre K-12 (que no posee el vector pAsPck o pProEx-1/Pck), concluyendo que no hay actividad de Pck bajo nuestras condiciones evaluadas. Los resultados obtenidos en esta tesis fueron comparados con los de estos autores debido a que las condiciones de cultivo empleadas son parecidas. Ellos cultivaron las cepas en medio mínimo suplementado con 9 g/L glucosa y 5 g/L de extracto de levadura en viales de suero con tapón de caucho butílico de 125 mL, bajo una atmósfera de CO₂ sin agitación a 37 °C. Las muestras fueron tomadas a las 18 h de cultivo para K-12, K-12 (pAsPck), K-12 *ppc* y a las 22 h para K-12 *ppc* (pAsPck), cuando toda la glucosa se

agotó, antes de que se empezaran a consumir los productos de fermentación. Cabe mencionar que esos cultivos fueron inducidos a una concentración de 0.6 mM de IPTG.

Como resumen de esta sección, la cepa caracterizada con el vector que posee ambos genes clonados, *glpK_{EC}* y *pck_{AS}* (ya sea sintético u original), presenta un metabolismo limitado bajo las condiciones evaluadas. Se reflejó que no hubo un efecto positivo de dichos genes sobre la fuente de carbono y producción del metabolito de interés debido a que no hubo consumo eficiente de glicerol ni generación alguna de succinato.

**8.3.7 Las cepas AG03/pACYCDuet-1

pck_{AS}, *glpK_{EC}* y AG04/pACYCDuet-1

pck_{AS}, *glpK_{EC}* evaluadas bajo condiciones limitantes de oxígeno en medio mineral – glicerol – enriquecido, presentan un crecimiento rápido, aumentan el consumo de glicerol, pero no generan succinato.**

Se evaluó la cepa *E. coli* AG03 pACYCDuet-1/*pck_{AS}*, *glpK_{EC}* (con el gen *pck_{AS}* sintético) en medio AM1m-YE-T-Gly, bajo condiciones limitantes de oxígeno en reactores de 1.0 L. Debido a que bajo condiciones no aireadas no se vio una respuesta positiva del gen *glpK* clonado sobre el consumo de glicerol, se sugirió que la presencia de O₂ en el medio, como aceptor final de electrones (exógeno), era necesaria.

Las “condiciones limitantes de oxígeno” se obtienen cuando la tasa de alimentación de este compuesto se iguala a la tasa de su consumo, de tal forma que no hay oxígeno disponible en el medio de cultivo. Antes de inocular la cepa a caracterizar, el medio de cultivo se saturó con el oxígeno presente en el aire, a una velocidad de aireación constante (0.1 y/o 0.5 vvm) y usando 600 rpm de agitación. Una vez inoculando el microorganismo, el oxígeno inmediatamente comenzó a consumirse hasta agotarse (después de, aproximadamente, 2 horas) generándose así las condiciones limitantes (gráfico 11).

Se evaluaron las cepas AG03 y AG04 transformadas con el vector pACYCDuet-1/*pck_{AS}*, *glpK_{EC}* (que posee el gen *pck_{AS}* sintético). La cepa AG03 ya no posee el gen *ppc* que originalmente usa para dirigir la fuente de carbono a la producción de ácido succínico. La cepa AG04, además de poseer el genotipo para dirigir la fuente de carbono al producto de interés solo a través del gen *pck* clonado (una vez consumida por *glpK*, también clonado), ya no posee el gen *pykF*, lo cual reduciría, hasta cierto punto, la desviación del sustrato a la formación de otros productos de fermentación, tales como el acetato, etanol y/o lactato.

Los resultados obtenidos se presentan en el gráfico 11 y en la tabla 18.

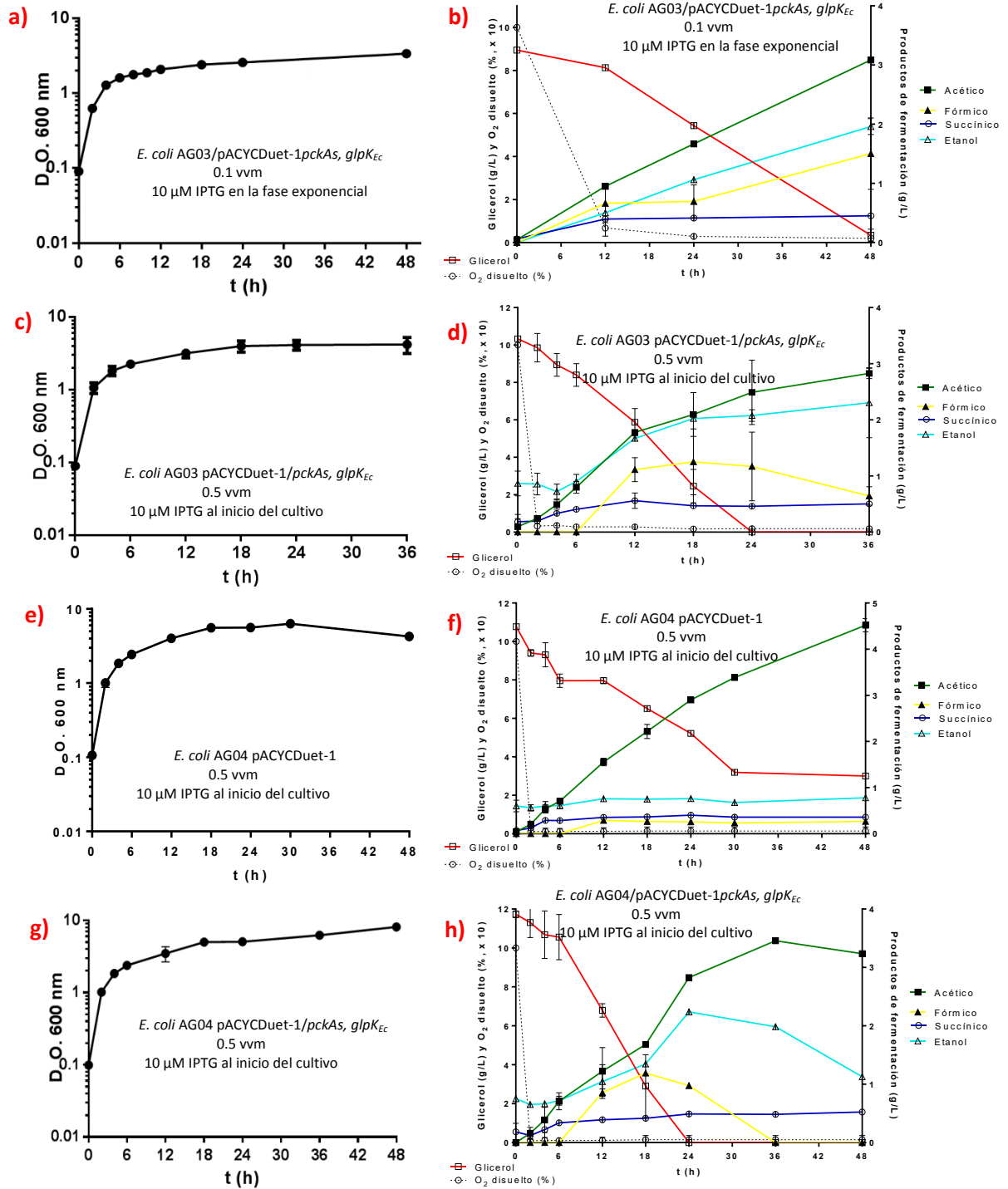


Gráfico 11. Caracterización cinética de las cepas AG03 y AG04 transformadas con el vector pACYCDuet-1/p*k*As, *glpK*_{EC} (con *pck*_{As} sintético en medio AM1m-YE-T-Gly, bajo condiciones limitantes de oxígeno. En los incisos a, c, e, f) se presenta el crecimiento microbiano en unidades de D.O. a 600 nm y en los incisos b, d, f, h) se presentan perfil de metabolitos generados, consumo de glicerol y oxígeno disuelto en el medio de cultivo (en porcentaje). Nota: La escala del oxígeno disuelto es 1:10.

Tabla 18. Crecimiento de las cepas AG03 y AG04 transformadas con el vector pACYCDuet-1/*pckAs*, *glpKEc* (con *pckAs* sintético en medio AM1m-YE-T-Gly, bajo condiciones limitantes de oxígeno).

Cepa/Condición en reactor	μ (h ⁻¹)	X _{máx} (gDCW/L)	Y _{x/s} * (gCEL/gSUS)	q _s ** (gSUS/g _x ·h)
<i>E. coli</i> AG03 pACYCDuet-1/ <i>pckAs</i> , <i>glpKEc</i> 0.1 vvm IPTG 10 μM en la fase exponencial	0.66±0.014	1.45±0.14 En 48 h	0.164±0.02	4.06±0.6
<i>E. coli</i> AG03 pACYCDuet-1/ <i>pckAs</i> , <i>glpKEc</i> 0.5 vvm IPTG 10 μM al inicio del cultivo	0.75±0.028	2.0±0.06 En 24 h	0.182±0.007	4.11±0.006
<i>E. coli</i> AG04 pACYCDuet-1 0.5 vvm IPTG 10 μM al inicio del cultivo	0.714±0.013	2.73±0.03 En 48 h	0.354±0.002	2.041±0.011
<i>E. coli</i> AG04 pACYCDuet-1/ <i>pckAs</i> , <i>glpKEc</i> 0.5 vvm IPTG 10 μM al inicio del cultivo	0.73±0.011	2.17±0.04 En 24 h	0.182±0.003	4.021±0.0

* Y_{x/s} aparente, parámetro global calculado como el incremento en masa celular por fuente de carbono consumida al alcanzar la fase estacionaria.

** q_s, consumo específico calculado para a fase exponencial.

De acuerdo a los resultados, la presencia de O₂ en el medio sí favoreció el crecimiento microbiano. Para la cepa AG03 pACYCDuet-1/*pckAs*, *glpKEc*, a 0.1 vvm, se obtuvo una velocidad de crecimiento de 0.66 h⁻¹, 42% mayor que la obtenida sin aireación. Se generó mayor biomasa (1.45 D.O._{600 nm}) y se consumió toda la fuente de carbono en 48 h de cultivo. Empleando 0.5 vvm, la μ mejoró (0.75 h⁻¹), y se consumió todo el glicerol en la mitad del tiempo (24 h) en comparación con el cultivo a 0.1 vvm. En la tabla 18 se observa que los consumos específicos de la fuente de carbono son similares. Esto se debe a que en el experimento a 0.5 vvm, a pesar que el glicerol se consumió en menos tiempo, se generó más biomasa (2.0 D.O._{600 nm}).

En el perfil de metabolitos generados por la cepa AG03 pACYCDuet-1/*pckAs*, *glpKEc*, no hubo cambios para ambas velocidades de alimentación de oxígeno, ya que se formaron los mismos metabolitos y en aproximadamente las mismas concentraciones. Se generaron mayoritariamente ácido acético y etanol, seguido de formiato y cantidades despreciables de ácido succínico. La única diferencia fue que para la condición de 0.5 vvm, el formiato generado se empezó a consumir una vez agotado el glicerol. El análisis de los metabolitos formados sugiere que no hay respuesta positiva del gen *pckAs* sobre la producción de succinato, por parte del gen *glpK* sobre el consumo de glicerol es posible que sí, ya que éste se agotó por completo. Sin embargo, también es posible que el consumo de la fuente de carbono haya sido solo por causa del gen *glpK* cromosomal, ya que en presencia de O₂ el catabolismo del glicerol depende de la expresión de los genes *glpK* y *glpD* (en el cromosoma) (fig. 28).

Para comprobar lo anterior, que se está teniendo un efecto positivo del *glpK* clonado sobre el consumo de la fuente de carbono, y para promover la formación de succinato evitando la generación de otros metabolitos de fermentación (como ácido acético, etanol y fórmico), se evaluaron las cepas AG04 pACYCDuet-1 (control negativo) y AG04 pACYCDuet-1/*pckAs*,*glpKEc*

bajo las mismas condiciones de cultivo. Estos resultados también se encuentran en el gráfico 11 y tabla 18.

Se observa que la cepa AG04 pACYCDuet-1 consumió lentamente el glicerol, con un consumo específico de 2.0 g_{SUS}/g_x·h, y sin agotarlo después de 48 h. En comparación, la cepa AG04 pACYCDuet-1/pck_{As}, glpK_{Ec} consumió los 10 g/L de glicerol en 24 h, con un consumo específico de 4.0 g_{SUS}/g_x·h. Cabe mencionar que en este experimento, después de agotarse el glicerol, la cepa continuó creciendo y empezó a consumir algunos metabolitos producidos, como etanol y formiato. Esto pudo deberse a dos razones. En el trabajo de James *et al.*, (2018) encontraron que *E. coli* es incapaz de consumir acetato en un ambiente ligeramente ácido, alrededor de pH 6.0 (los cultivos del presente trabajo se llevaron a cabo a pH 6.3), debido a que se reduce la transcripción de genes encargados de su metabolismo, como los del ciclo de Krebs y del glioxilato. También reportaron que la vía Pta-AckA reduce el consumo de acetato a ese pH. La vía de Acs (acetil-coA sintetasa) puede consumir acetato, pero lo hace a concentraciones muy bajas (<7 mM).

En cuanto al perfil de metabolitos, para la cepa AG04 pACYCDuet-1 se formó principalmente acetato y cantidades mínimas de etanol, formiato y succinato. Un perfil de productos similar al de las cepas mutantes evaluadas en la sección 8.3.4 que no poseen ningún vector de expresión. Aunque en dichas mutantes solo se formó acético, con la cepa AG04 pACYCDuet-1 la formación de etanol, formiato y succinato fue despreciable.

Para la cepa AG04 pACYCDuet-1/pck_{As}, glpK_{Ec} se formaron mayoritariamente ácido acético y etanol, seguido de formiato y cantidades despreciables de succinato.

De acuerdo a lo anterior, es evidente que sí hubo una respuesta positiva por parte del gen *glpK_{Ec}* clonado sobre el consumo de glicerol en la cepa AG04 pACYCDuet-1/pck_{As}, glpK_{Ec}, bajo condiciones de limitación de oxígeno. Sin embargo, no se vio un efecto positivo del gen *pck* sobre la producción de ácido succínico, aun cuando esta cepa tiene el gen *pykF* eliminado que, hasta cierto punto evitaría la desviación de la fuente de carbono a la generación de otros metabolitos de fermentación.

Se realizaron ensayos de actividad enzimática de la Pck (fosfoenolpiruvato carboxinasa) para algunos tiempos de muestreo, tanto de las cinéticas con la cepa AG03 pACYCDuet-1/pck_{As}, glpK_{Ec}, como de las realizadas con AG04 pACYCDuet-1 y AG04 pACYCDuet-1/pck_{As}, glpK_{Ec}. Los resultados se presentan en el gráfico 12.

Los resultados reflejan que no hay actividad Pck en las muestras evaluadas, ya que si se comparan con los obtenidos por Kim *et al.* en 2004, quienes determinaron las actividades

enzimáticas de Pck de *A. succinogenes* expresada en varias cepas de *E. coli* K-12 a través del vector de expresión pAsPck, la mayoría está cerca o por debajo del valor de la cepa K-12 (3.1 UI/mg proteína) que no posee dicho vector. Otros valores están muy cercanos a los de la cepa K-12 *ppc* (1.3 UI/mg proteína) que solo posee el gen de la Pck nativo, que en *E. coli* es gluconeogénico.

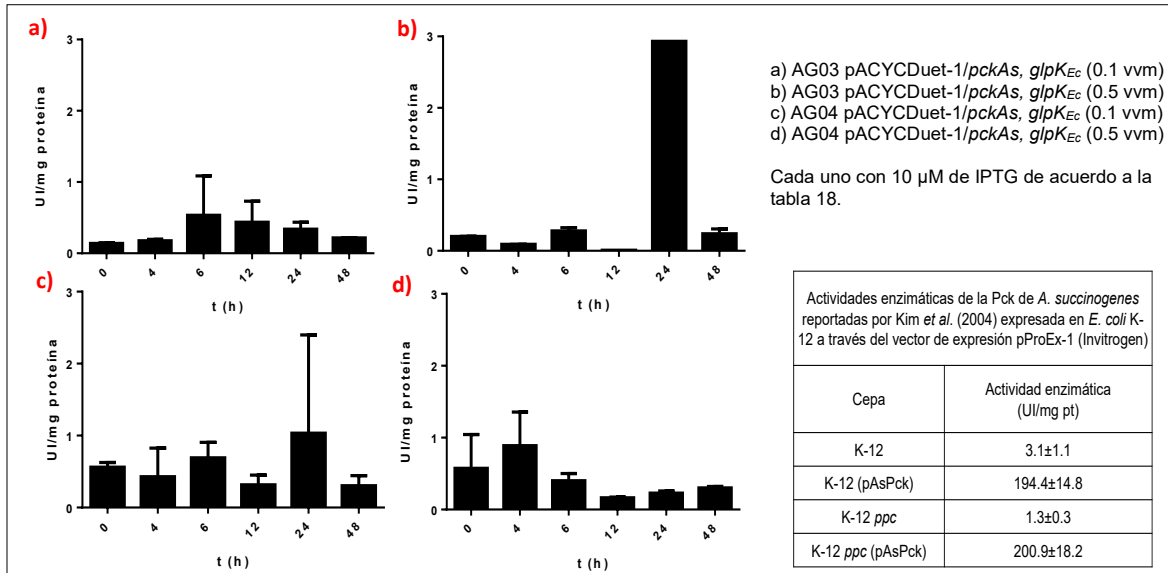
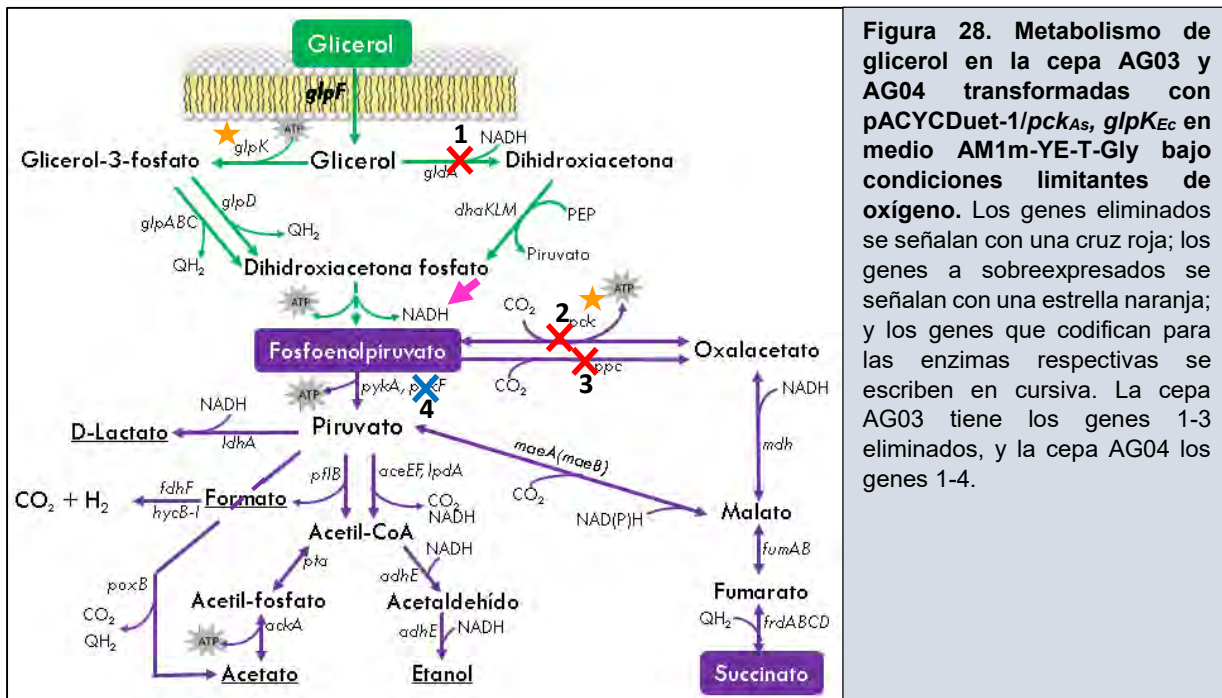


Gráfico 12. Actividad enzimática de Pck de *A. succinogenes* en extractos de la cepa AG03 pACYCDuet-1/*pckAs*, *glpKEc* y AG04 pACYCDuet-1/*pckAs*, *glpKEc* (ambas con el gen *pckAs* sintético) crecidas en medio AM1m-YE-T-Gly, bajo condiciones limitantes de oxígeno. En la tabla que está en la parte inferior derecha se presentan las actividades enzimáticas de Pck de *A. succinogenes* reportadas por Kim *et al.* (2004) expresada en cepas de *E. coli* K-12 a través del vector de expresión pAsPck (con una etiqueta His N-terminal seguida de un sitio de escisión de proteasa TEV) para la comparación de los resultados obtenidos.



De acuerdo a la fig. 28 y centrándonos en la cepa AG03 pACYCDuet-1/*pck*_{As}, *glpK*_{Ec}, se observa que hasta el fosfoenolpiruvato solo se forma una molécula de NADH; sin embargo, durante la formación de etanol se necesitan dos, por lo que este costo no se pudo suplir de la misma forma que la cepa silvestre MG1655 (DE3) lo hizo, cuando generó hasta 8.4 g/L de etanol (en el mismo medio, bajo condiciones sin aireación). Por lo que la fuente de carbono proveniente del acetil-Coa se dividió, formándose también acetato.

Cabe mencionar que el acetato producido no solo se formó vía *pflB-ackA-pta*, sino también por vía *poxB* (piruvato oxidasa) a partir de piruvato, debido a que:

1) Bajo condiciones limitantes de oxígeno el nivel de proteínas PFL es disminuido, por lo que sola esta enzima no pudo soportar la síntesis de todo el acetato generado (Sawers and Clark, 2004).

2) PoxB se considera la vía principal de formación de acetato en fase estacionaria bajo condiciones aerobias. Aunque en este estudio las condiciones fueron microaerobias, esta enzima sí pudo tener alguna participación (Dittrich, 2005).

3) Se formó muy poco formiato (y, posteriormente, etanol), sugiriendo que no se formó suficiente acetil-CoA, precursor de acetato, vía PFL.

3) Si la vía *poxB* no estuviera encendida, el piruvato metabolizado estaría sostenido principalmente por el complejo PDH, generándose poder reductor suficiente para formar más etanol, lo cual no sucedió. Cabe mencionar que el complejo de la piruvato deshidrogenasa (*aceEF*) sí está activo aun en condiciones de limitación de oxígeno, pero contribuyendo de forma mínima en la formación de NADH y acetil-CoA (Cassey *et al.*, 1998; Utrilla *et al.*, 2009).

En el caso de la cepa AG04 pACYCDuet-1/*pck*_{As}, *glpK*_{Ec}, asumiendo que no se tuvo actividad enzimática de Pck clonado, es coherente que el fosfoenolpiruvato formado se haya dirigido a la formación de otros metabolitos de fermentación. Para esta cepa se formó acetato, principalmente, seguido de etanol y formiato. A diferencia del control negativo, la cepa AG04 pACYCDuet-1 no produjo etanol. Al no poseer el gen *glpK* no se consumió de manera eficiente el glicerol, por lo que no hubo suficiente poder reductor para suplir una síntesis significativa de etanol, generándose principalmente acetato.

Con todo lo anterior, hay dos evidencias que muestran que el gen *glpK* clonado sí se expresó bajo condiciones limitantes de oxígeno: 1) por el consumo rápido de glicerol, 2) por el perfil de metabolitos generados.

Por otra parte, en los experimentos bajo limitación de oxígeno se distinguen dos fases durante el cultivo. Una fase aerobia con una disminución constante de la tensión de oxígeno disuelto, que

ocurre muy rápido (entre las 0 a 2 h); y otra fase de limitación de oxígeno, donde la concentración de oxígeno disuelto se mantiene en cero, tal como se reporta en la literatura (Durnin *et al.*, 2009). Por lo que el flujo de la fuente de carbono hacia el ciclo de Krebs es mínimo, así como la fosforilación oxidativa (Jain *et al.*, 2015).

En condiciones de limitación de oxígeno se favorece más la producción de compuestos reducidos debido a que gran parte de la fuente de carbono no se destina al crecimiento o a moléculas de CO₂, como ocurriría en condiciones aerobias donde se pierde una cantidad significativa de carbono en biomasa y CO₂ a través del ciclo de Krebs (Yang *et al.*, 2014; Jain *et al.*, 2015). De acuerdo a esto, se observa que en los experimentos de esta sección sí se favoreció la acumulación de metabolitos reducidos. Entre el 60-85 % de la fuente de carbono se destinó para los productos de fermentación, el resto se fue a biomasa y CO₂. Cabe mencionar que estos porcentajes son aparentes ya que también está la contribución de los compuestos de carbono del extracto de levadura e hidrolizado de caseína.

Con los resultados observados en estos experimentos, se concluye que bajo condiciones limitantes de oxígeno se favorece el metabolismo del glicerol, reflejado no solamente en el consumo específico de las cepas sino también en la velocidad de crecimiento obtenida, en la biomasa generada y en la mezcla de productos de fermentación. Y es que el papel que el oxígeno desempeña como aceptor final de electrones es muy importante, ya que permite mantener el balance redox y obtener la mayor cantidad de energía necesaria para los procesos celulares, principalmente del crecimiento (Wong *et al.*, 2014).

8.3.8 La producción de succinato no se ve favorecida al usar el vector pLoxGentrcpck, cuyo gen *pck* es nativo de *E. coli*, en la cepa AG04; ni cuando se usa este vector o el pACYCDuet-1/*pck*_{As} en la cepa BL21 (DE3), en medio AM1m-YE-T-Gly bajo condiciones limitantes de oxígeno.

Se llevó a cabo la caracterización cinética de las cepas *E. coli* AG04 pLoxGentrcpck, *E. coli* BL21 (DE3) pLoxGentrcpck y *E. coli* BL21 (DE3) pACYCDuet-1/*pck*_{As} (gen sintético) en medio AM1m-YE-T-Gly, bajo condiciones limitantes de oxígeno, en reactor de 1.0 L a 0.5 vvm.

El plásmido pLoxGentrcpck inducible por IPTG, construido por Martínez Valenzuela en 2018, posee el gen *pck* de *E. coli*. En esta sección se probó en la cepa AG04 con el objetivo de favorecer la producción de succinato y comparar los resultados con los obtenidos cuando se usó el gen heterólogo (de *A. succinogenes*).

Los plásmidos pLoxGentrcpck y pACYCDuet-1/*pck*_{As} también se evaluaron en la cepa BL21 (DE3), que posee el gen T7 RNA polimerasa y permite la expresión recombinante de genes bajo el control de promotores T7, con el objetivo de comparar el comportamiento de ambas enzimas

Pck (de *A. succinogenes* y de *E. coli*) sobre la producción de ácido succínico en una cepa distinta a MG1655 (DE3) y corroborar si la falta de actividad tiene que ver el fondo genético o no. Las gráficas de crecimiento, perfil de metabolitos y parámetros cinéticos y estequiométricos se encuentran en el gráfico 13 y tabla 19.

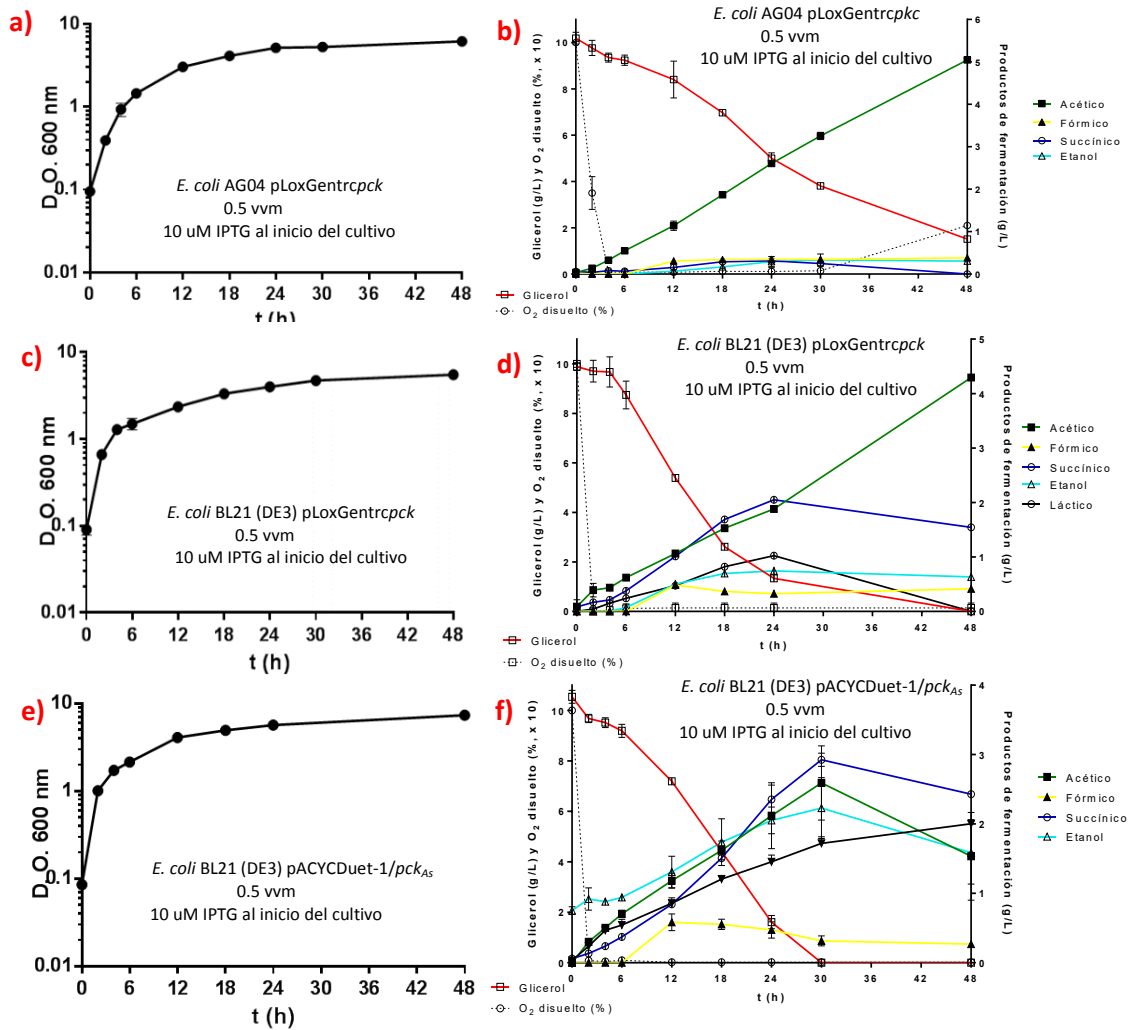


Gráfico 13. Caracterización cinética de las cepas AG04 y BL21 (DE3) transformadas con el vector pLoxGentrcpck y la cepa BL21 (DE3) transformada con el vector pACYCDuet-1/pck_{As} (con pck_{As} sintético) en medio AM1m-YE-T-Gly, bajo condiciones limitantes de oxígeno. En los incisos a, c, e, f) se presenta el crecimiento microbiano en unidades de D.O. a 600 nm y en los incisos b, d, f, h) se presentan perfil de metabolitos generados, consumo de glicerol y oxígeno disuelto en el medio de cultivo (en porcentaje). Nota: La escala del oxígeno disuelto es 1:10.

Tabla 19. Caracterización cinética de las cepas AG04 y BL21 (DE3) transformadas con el vector pLoxGentrcpck y la cepa BL21 (DE3) transformadas con el vector pACYCDuet-1/pck_{As}, (con pck_{As} sintético) en medio AM1m-YE-T-Gly, bajo condiciones limitantes de oxígeno.

Cepa/Condición en reactor	μ (h ⁻¹)	X _{máx} (gDCW/L)	Y _{x/s} * (g _{CEL} /g _{SUS})	q _s ** (g _{SUS} /g _X ·h)
<i>E. coli</i> AG04 pLoxGentrcpck 0.5 vvm 10 uM IPTG al inicio del cultivo	0.57±0.042	2.65±0.003 En 48 h	0.3±0.005	1.89±0.11
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLoxGentrcpck 0.5 vvm 10 uM IPTG al inicio del cultivo	0.74±0.001	3.16±0.0 En 48 h	0.316±0.005	2.36±0.04
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pACYCDuet-1/pck _{As} 0.5 vvm 10 uM IPTG al inicio del cultivo	0.66±0.06	2.03±0.11 En 30 h	0.19±0.016	3.47±0.008

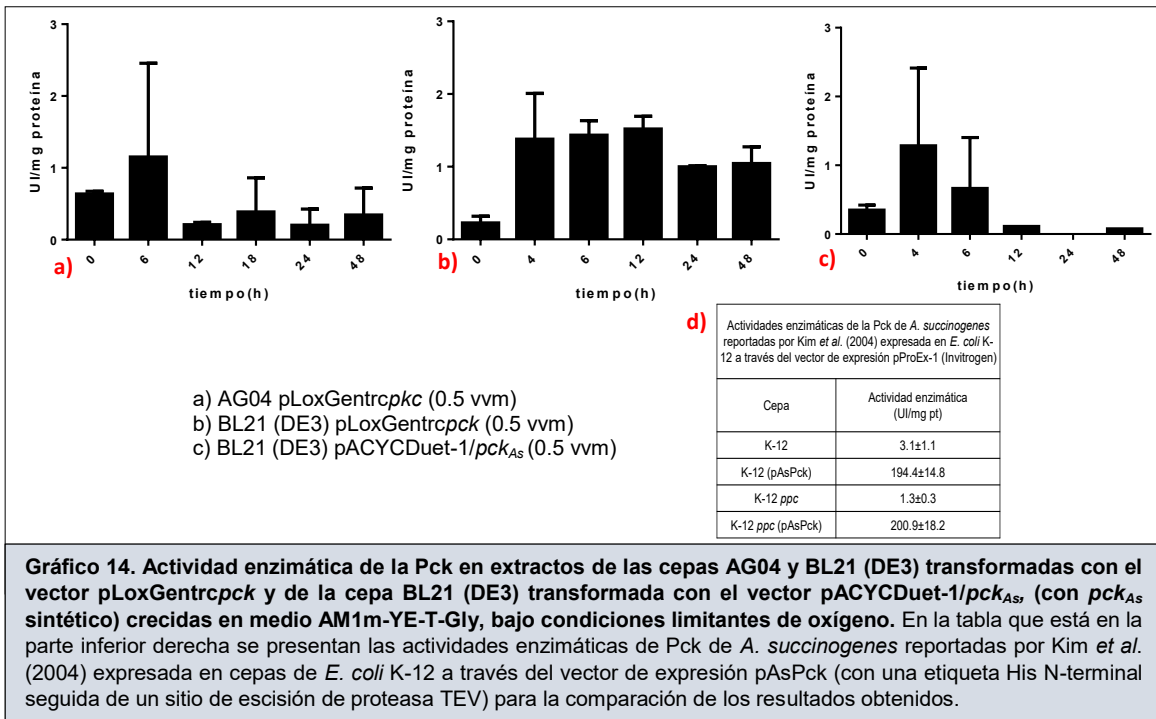
* Y_{x/s} aparente, parámetro global calculado como el incremento en masa celular por fuente de carbono consumida al alcanzar la fase estacionaria.

** q_s, consumo específico calculado para a fase exponencial.

Para la cepa *E. coli* AG04 pLoxGentrcpck se observa que el glicerol no se consumió en su totalidad, lo cual es debido a la falta del gen *glpK_{Ec}* clonado. El consumo específico de esta cepa (1.89 g_{SUS}/g_X·h) y su perfil de metabolitos fue muy similar al de la cepa AG04 pACYCDuet-1 de la sección anterior (gráfico 13, inciso f), 2.0 g_{SUS}/g_X·h, que tampoco posee el gen *glpK_{Ec}* clonado. Se produjeron altas concentraciones de acetato, y cantidades mínimas de etanol, succinato y formiato. Parte del acetato producido, como ya se comentó, fue por la actividad de PoxB que, pese a ser la principal enzima formadora de acetato en fase estacionaria bajo condiciones aerobias, sí tiene participación bajo condiciones limitantes de oxígeno (Dittrich, 2005). Como no se generó suficiente poder reductor, debido a que no hubo una eficiente asimilación de glicerol, no se formaron cantidades considerables de etanol.

A pesar de usar el vector pLoxGentrcpck que posee el gen *pck* nativo, no hubo formación de succinato. Los resultados en el gráfico 14 muestran que tampoco hubo actividad enzimática con esta enzima, ya que los valores obtenidos para algunos tiempos de muestreo siguen estando por debajo de los obtenidos por Kim *et al.* (2004).

En las cepas BL21 (DE3), transformadas ya sea con pLoxGentrcpck o pACYCDuet-1/pck_{As} (gen sintético), sí se produjo succinato (alrededor de 2 g/L), pero en las mismas cantidades de la cepa MG1655 (DE3) en medio AM1 modificado con o sin los componentes del medio LB, bajo condiciones no aireadas. También se determinaron las actividades de ambas enzimas para estas cepas, encontrándose que no hay actividad fosfoenolpiruvato carboxinasa (gráfico 14).



Con respecto al consumo de glicerol de la cepa BL21 (DE3) pACYCDuet-1/pck_{As}, se observa un consumo específico de 3.47 g_{SUS}/g_X·h; la fuente de carbono se agotó a las 30 h de cultivo. Sin embargo, si se compara este consumo con el de las cepas AG03 pACYCDuet-1/pck_{As}, glpK_{Ec} y AG04/pACYCDuet-1pck_{As}, glpK_{Ec} (4.11 y 4.2 g_{SUS}/g_X·h, respectivamente), el de éstas es más eficiente, aun cuando son cepas que tienen tres o cuatro genes eliminados. Se confirma entonces que el gen *glpK* en el vector pACYCDuet-1 sí tuvo un efecto positivo sobre este parámetro.

En cuanto al perfil de productos de fermentación para esta cepa (BL21 (DE3) pACYCDuet-1/pck_{As}), se formaron etanol y acetato, casi en la misma proporción que succinato. Si se compara esta producción con la generada por la cepa silvestre MG1655 (DE3) en medio AM1m-YE-T-Gly, bajo condiciones no aireadas (gráfico 4), sí hay diferencia, en esta última se formó más etanol. El poder reductor generado por la cepa MG1655 (DE3) en condiciones sin aireación no es el mismo que el generado por BL21 (DE3) pACYCDuet-1/pck_{As} bajo condiciones limitantes de oxígeno (fig. 29). En esta última se tuvo menos activa la vía GldA-DhaKLM (donde se forma un NADH), debido a que es una ruta anaerobia. Aunque las condiciones de limitación de oxígeno no apagan por completo a estas enzimas, menos glicerol es metabolizado por ellas. De ahí que no se formara tanto etanol.

Cabe mencionar que por ser una cepa silvestre, en BL21 (DE3) pACYCDuet-1/pck_{As} bajo condiciones limitantes de oxígeno, el consumo de glicerol también se llevó a cabo por la vía GlpK-glpD, es decir, por la ruta aerobia.

En esta sección se empleó el vector pLoxGentrcpck como alternativa para la producción de succinato en la cepa AG04, en vista de que el gen que posee codifica para la Pck nativa. Sin embargo, esta enzima no presentó actividad, por lo que no se favoreció la producción de dicho metabolito. Usando una cepa distinta a MG1655 (DE3), es decir, la cepa BL21 (DE3), se generó el mismo comportamiento, no hubo actividad Pck.

Para elucidar lo que está ocurriendo con la falta de actividad de la enzima Pck de *A. succinogenes* y/o de *E. coli* clonada, bajo las condiciones empleadas, se proponen realizar estudios de transcripción o de expresión proteica, ya que problemas en estos procesos pueden ser la razón de la falta de actividad. Por cuestiones prácticas, se optó por comprobar la funcionalidad de la proteína a través de su actividad enzimática, sin observar su transcripción o expresión.

Cuando se sintetizan genes heterólogos con el uso optimizado de codones para *E. coli*, aún pueden presentarse problemas en la proteína si no hay una armonización de los mismos, es decir, puede ser que la proteína se esté traduciendo rápidamente, pero no plegando adecuadamente, por lo que al final no es funcional. La armonización es muy importante, ya que permite el correcto plegado proteico incorporando codones raros en ciertas regiones que generan pausas estratégicas durante el proceso. Sin embargo, la empresa GENEWIZ, optimiza y armoniza al mismo tiempo los genes que sintetiza, por lo que esta posibilidad se descarta.

Otro factor que pudo contribuir en los resultados obtenidos fue la falta de control en la disponibilidad de CO₂, ya que este sustrato juega un papel importante en la producción de succinato.

Los niveles de CO₂ pueden regular la vía Pck durante la producción de succinato en *A. succinogenes* (Van *et al.*, 1997; Xi *et al.*, 2011). Wang *et al.* en 2009 demostraron que en *E. coli* el uso de HCO₃⁻, en forma de MgCO₃ y NaHCO₃ (hasta en una concentración de 10 g/L en el medio) puede incrementar la actividad de la Pck en la producción de succinato.

Zou *et al.* en 2011 evaluaron el efecto del MgCO₃ como fuente adicional de CO₂ sobre la producción de succinato en *A. succinogenes* ATCC 55618, encontrando que la combinación de una fuente gaseosa de CO₂ en el medio y una concentración elevada de MgCO₃ tiene un efecto positivo sobre la producción del metabolito. Ellos argumentan que la importancia de generar un ambiente óptimo para la Pck recae en que cuando ésta presenta elevada actividad enzimática, inhibe competitivamente a enzimas clave como la piruvato formato liasa, lactato deshidrogenasa y etanol deshidrogenasa. Aunque en la mayoría de los estudios sobre producción de ácido succínico con *E. coli* se emplea NaHCO₃ como fuente de CO₂, sería interesante conocer cómo

afecta el uso de una sal diferente, como MgCO_3 , en su metabolismo bajo las condiciones empleadas en este trabajo.

Cabe mencionar que en este trabajo no se controló la disponibilidad de CO_2 en el medio. Si bien durante el metabolismo de *E. coli* se generó CO_2 a partir del formiato por la hidrogeno formato liasa, éste pudo no ser suficiente para favorecer la actividad de Pck. Y es que muchos estudios se observa el uso de una fuente gaseosa de CO_2 y/o altas concentraciones de NaHCO_3 (de hasta 10 g/L), cuando en el presente solo se empleó una concentración máxima de 4 g/L.

8.3.9 Otras consideraciones en el metabolismo de glicerol para la producción de ácido succínico.

A lo largo de este estudio, queda claro que el metabolismo del glicerol bajo condiciones sin aireación es lento. Se confirma que se requiere la presencia de un aceptor final de electrones como nitrato o fumarato si se quiere trabajar en un ambiente anaerobio o, de lo contrario, hay un crecimiento celular pobre, un bajo título de succinato, así como una baja productividad. Esto debido, principalmente, a un desbalance redox, el cual puede prevalecer aun si el medio de cultivo se suplementa con componentes complejos que ayuden a incrementar el crecimiento celular (Lee *et al.*, 2001). Sin embargo, hay otro problema importante detrás de la fermentación anaerobia de glicerol para la generación de succinato, y es el suministro de energía. Tanto el crecimiento como la exportación de succinato son procesos que demandan de este recurso.

Cuando el succinato generado no puede ser metabolizado, la célula debe excretarlo. A medida que aumenta la producción de succinato, la energía requerida para su exportación es mayor (Yu *et al.*, 2019).

Recientemente se reportó la importancia del suministro de energía cuando se emplea la vía GlpK-GlpABC para dirigir el flujo de carbono a la formación de succinato. A pesar de ser una ruta con balance redox neutro debido a que las moléculas de NADH y QH_2 generadas se consumen en la formación del compuesto, eso no es suficiente para soportar un buen crecimiento celular y una buena producción de succinato, ya que se sabe que por cada molécula de succinato exportado fuera de la célula se exportan dos H^+ para mantener el balance de carga celular, esto a través del acarreador DcuC codificado por el gen *dcuC* (Janausch *et al.*, 2002), y que para esto se requieren 0.5 ATP, es decir, un radio termodinámico H^+/ATP de 4 (Steigmiller *et al.*, 2008). Por lo que la energía producida en forma de NADH usando la vía GlpK-GlpABC puede no ser suficiente para soportar un buen crecimiento y una alta productividad de succinato.

Yu *et al.* en 2019, desarrollaron una estrategia donde generaron una fuerza protón-motriz extra, además de un balance redox y la generación de un ATP por succinato producido, a partir de

glicerol en condiciones anaerobias. Usando la cepa *E. coli* ATCC 8739 y la vía GldA-DhaKLM, optaron por el uso de una enzima dihidroxiacetona cinasa heteróloga (de *Klebsiella pneumoniae* 1033) dependiente de ATP para la fosforilación de dihidroxiacetona. Esto fue con dos objetivos principales: 1) evitar la desviación de la fuente de carbono que ocurría con la enzima DhaK nativa dependiente de PEP y 2) producir dos moléculas de NADH, y no una, durante la metabolización de glicerol, generándose así una fuerza protón motriz adicional, ya que cuando se transfieren los electrones de un NADH a la menaquinona (catalizada por NDH-1) se bombean 4 protones, los cuales son indispensables para procesos metabólicos de crecimiento y exportación. Teniendo así la siguiente ecuación neta: $1 \text{ glicerol} + \text{CO}_2 \rightarrow 1 \text{ succinato} + 1 \text{ ATP} + 4 \text{ H}^+$ (fig. 30).

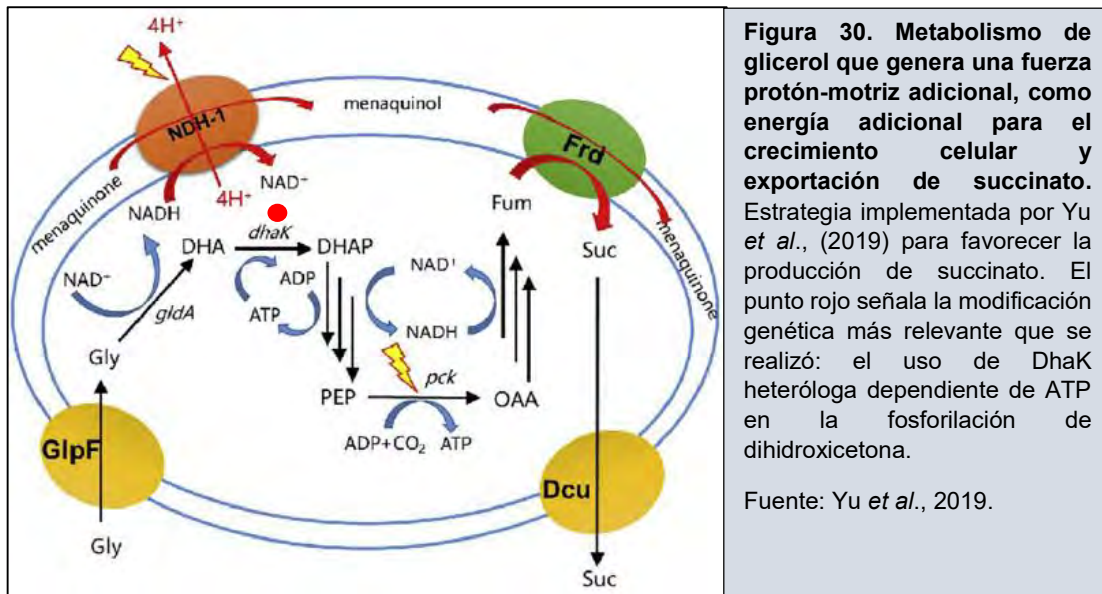


Figura 30. Metabolismo de glicerol que genera una fuerza protón-motriz adicional, como energía adicional para el crecimiento celular y exportación de succinato. Estrategia implementada por Yu *et al.*, (2019) para favorecer la producción de succinato. El punto rojo señala la modificación genética más relevante que se realizó: el uso de DhaK heteróloga dependiente de ATP en la fosforilación de dihidroxiacetona.
Fuente: Yu *et al.*, 2019.

Usaron la cepa YY-GS004 (ATCC 8739 $\Delta ptsI$, ΔdhA , $\Delta pflB$, $Ppck^*$, $\Delta glpK$, $\Delta dhaKLM::M1-93-RBSL-4-dhaK$) que tiene una mutación puntual en el promotor de *pck* (se cambió la G de la posición 64 con respecto al codón de inicio ATG por A) para que éste se use como mecanismo principal de carboxilación de PEP y, como ya se comentó, tiene sustituido el gen *dhaK* nativo por el de *Klebsiella pneumoniae* 1033 cuya enzima dihidroxiacetona cinasa es dependiente de ATP (en la fosforilación de dihidroxiacetona). Bajo condiciones anaerobias en medio mineral AM1 suplementado con 60 g/L de glicerol, 10 g/L de triptona de caseína y 5 g/L de extracto de levadura, 50 mM de NaHCO₃, a 37 °C, pH 7 y 150 rpm, estos autores encontraron un título de 57 g/L de succinato, 282% más de la producida con la cepa Suc-T110 (14.9 g/L), que usa una estrategia similar a la de esta tesis, con un rendimiento de 0.92 mol_{SUC} / mol_{GLY}, y una pequeña formación de acetato. Ellos también encontraron altos contenidos de ATP intracelular en la cepa YY-GS004, el cual se fue consumiendo a medida que la cepa fue creciendo y acumulando succinato, confirmando que un suministro adicional de energía es favorable.

Con lo anterior, se demostró que la falta de suministro de energía puede ser un problema importante durante la fermentación anaerobia de glicerol para la producción de succinato. Normalmente se desea diseñar una estrategia metabólica con balance redox neutro, cuyo número de moléculas reducidas que se generan sean las mismas que se oxidan; sin embargo, no siempre es ventajoso para la célula en la producción de un metabolito de interés.

Por otro lado, se ha visto que en varios trabajos cuyo objetivo es producir succinato a partir de glicerol bajo condiciones anaerobias, los resultados obtenidos dependen de la cepa de *E. coli* silvestre de cual se parte. Por ejemplo, Zhang *et al.* (2010), Yu *et al.* (2014), Jantama *et al.* (2007) y otros más, han usado la cepa *E. coli* ATCC8739 reportando un mejor crecimiento celular y producción de succinato. *E. coli* ATCC8739, con el uso de diversas estrategias de ingeniería metabólica, es la cepa que mayor concentración de succinato ha llegado a producir (hasta 73 g/L) después de 120 h de incubación en medio mineral AM1, suplementado con 100 g/L glucosa, 10 g/L KHCO_3 , en fermentación anaerobia por lote, con pH controlado con 1:1 de KOH 6 M + K_2CO_3 3 M (Jantama *et al.*, 2008); por lo que se ha convertido en una buena candidata para los estudios con glicerol. Se desconoce la razón exacta del por qué, aparentemente, *E. coli* ATCC 8739 podría ser mejor candidata que MG1655 (DE3) para la producción de succinato a partir de glicerol, ya que si se comparan, entre ellas, las secuencias de los genes involucrados en la presente estrategia metabólica (*pck*, *gldA*, *ppc*, *glpK*, *pykF*), éstos poseen un porcentaje de identidad de 99-100% (NCBI, National Center for Biotechnology Information).

También hay otras cepas que se han empleado para ese mismo fin, como *E. coli* AFP111, *E. coli* B (ATCC 11303) (Ma *et al.*, 2015; Dharmadi *et al.*, 2006) o *E. coli* MG1655 (DE3) (Blankschien *et al.*, 2010; Dharmadi *et al.*, 2006), pero cuando se caracterizan en medios minerales con glicerol como fuente única de carbono, éstos no solo se han suplementado con triptona de caseína o extracto de levadura sino también con nitrato, fumarato o selenitos (Hu & Wood, 2010; Durnin *et al.*, 2008). Por lo que se concluye que el fondo genético empleado tiene importancia sobre la fermentación de glicerol y producción de succinato, y determina los componentes del medio de cultivo sobre el cual se llevan a cabo estos procesos.

Es muy claro que la disponibilidad y distribución del poder reductor, así como de la energía en forma de ATP, son muy importantes sobre el crecimiento celular y perfil de metabolitos generados en glicerol. Se ha observado que no siempre se consideran las vías gluconeogénicas, como el de las pentosas fosfatos (PP), para estos propósitos. Solo se trabajan con aquellos genes que están directamente relacionados con la entrada del glicerol a la célula o con la producción del metabolito de interés. Es importante resaltar que valdría la pena considerar un escenario metabólico más amplio. Se habla de la vía PP porque genera compuestos carbonados y poder

reductor para distintos fines, y puede que bajo condiciones anaerobias esté limitada contribuyendo a un metabolismo lento del glicerol. Sin embargo, aumentar el flujo del glicerol a través de ella, para que el microorganismo presente un mejor crecimiento, podría tener desventajas. Una de ellas sería que la fuente de carbono se desvíe de la formación del metabolito de interés. Por otra parte, también se podrían considerar el aumento y distribución de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP), el cual es un intermediario importante en el metabolismo de glicerol y precursor de metabolitos gluconeogénicos como fructosa-6-fosfato, glucosa-6-fosfato y de la vía de PP. En este contexto, las enzimas como fructosa bifosfato aldolasa, fructosa 1,6-bifosfatasa y fosfoglucosa isomerasa pueden ser blancos interesantes en el estudio del catabolismo del glicerol (Romeo & Snoep, 2005; Durnin *et al.*, 2008).

En cuanto a la regulación de los genes involucrados en el consumo del glicerol, al menos bajo las condiciones estudiadas, solo tiene impacto la presencia o ausencia de un aceptor de electrones, que permita regenerar el poder reductor. El catabolismo del glicerol y glicerol 3-fosfato es mediado por los componentes del regulón *glp*. Los genes *glp* están organizados en tres operones principales (Schweizer *et al.*, 1985). El operón *glpK-glpF* codifica para la enzima citoplasmática GlpK (glicerol cinasa) y para la permeasa GlpF, el operón *glpAB-glpT* codifica para la glicerol fosfato deshidrogenasa anaerobia y para el sistema de transporte de glicerol-3-fosfato, y el operón *glpD-glpR* codifica para la glicerol fosfato deshidrogenasa aerobia y para el represor glpR. Cada uno de estos operones está regulado negativamente por GlpR (en ausencia de glicerol, éste se une a los operones), mientras que el inductor para el sistema es el glicerol 3-fosfato o AMP cíclico. Los operones presentan diferente sensibilidad por el represor GlpR, siendo el más sensible el operón *glpD*; sin embargo, éste último, junto con el operón *glpA-glpB* son controlados de manera importante por la presencia o ausencia de oxígeno. Por lo que la presencia de un aceptor final de electrones sí es necesario si se desea un metabolismo rápido de glicerol.

9. CONCLUSIONES

- *E. coli* MG1655 (DE3) presenta un metabolismo lento en glicerol como fuente única de carbono (con una μ de 0.038 h^{-1}) con respecto a glucosa (con una μ de 0.31 h^{-1}) en medio mineral bajo condiciones no aireadas.
- *E. coli* puede fermentar glicerol, una molécula más reducida que glucosa, bajo condiciones no aireadas en medio mínimo de una manera pH-dependiente (a pH 6.3) sin la necesidad de la presencia de un aceptor de electrones exógeno (como fumarato), pero su metabolismo sigue siendo lento.
- En condiciones sin aireación, el uso de KCl en el medio mineral - glicerol, evita la formación de ácido succínico en la cepa MG1655 (DE3), pero permite una elevada producción de etanol con un rendimiento molar de 0.75. Adicionalmente, el crecimiento de la cepa silvestre y la producción de etanol también se ven favorecidos en medio mineral – glicerol – enriquecido.
- La eliminación de la glicerol deshidrogenasa, GldA, principal enzima de asimilación de glicerol en condiciones anaeróbicas, provoca un crecimiento lento y una producción única y minoritaria de acetato en medio mineral – glicerol – enriquecido.
- Bajo condiciones sin aireación y usando glicerol como fuente de carbono, la mutante MG1655 DE3 $\Delta\text{gldA}::\text{FRT}$, $\Delta\text{ppc}::\text{FRT}$, $\Delta\text{pck}::\text{FRT-Km-FRT}$ (AG03), expresando en plásmido los genes que codifican para la glicerol cinasa homóloga (*glpK_{Ec}*) y la fosfoenolpiruvato carboxinasa de *A. succinogenes* (*pck_{As}*), crece muy lento y no produce succinato, aun induciendo con diferentes concentraciones de IPTG (10, 50 y 100 μM).
- Bajo condiciones limitantes de oxígeno, las cepas AG03/pACYCDuet-1*pck_{As}*, *glpK_{Ec}* y AG04/pACYCDuet-1*pck_{As}*, *glpK_{Ec}* (con el gen *pck_{As}* sintético) en medio mineral - glicerol - enriquecido, presentan un crecimiento rápido, aumentan el consumo de glicerol, pero no generan succinato. Estos datos indican que la GlpK es funcional en las condiciones evaluadas, pero, soportado por ensayos *in vitro*, la Pck no lo es, debido a que no se tiene actividad enzimática intracelular de Pck para lograr un metabolismo eficiente de fosfoenolpiruvato a oxalacetato.
- La producción de succinato no se ve favorecida al usar el vector de expresión inducible pLoxGentrcpck, cuyo gen *pck* es nativo, en la cepa AG04 (AG03 ΔpykF); ni cuando se usa este vector o el de pACYCDuet-1/*pck_{As}* (con el gen *pck_{As}* sintético) en una cepa distinta de *E. coli* MG1655 (DE3), BL21 (DE3), en medio mineral - glicerol - enriquecido bajo condiciones limitantes de oxígeno.
- La presencia de oxígeno es importante para el consumo eficiente de glicerol, ya que permite regenerar el poder reductor empleado en las primeras reacciones de su metabolismo y el suministro de energía.

- La hipótesis planteada para este proyecto es rechazada, ya que con la sobreexpresión de los genes *glpK_{Ec}* y *pck_{As}* y la eliminación de los genes *gldA*, *ppc* y *pykF* en *E. coli* MG1655 (DE3) en condiciones sin aireación no se favorece la producción de ácido succínico.

10. PROSPECTIVAS

- De acuerdo a los resultados obtenidos con la cepa silvestre MG1655 (DE3) con glicerol en medio mineral suplementado con KCl, bajo condiciones no aireadas, se sugiere desarrollar estrategias de ingeniería metabólica y de cultivo para evaluar e incrementar el rendimiento de etanol.
- A partir de la cepa MG1655 (DE3) cultivada en medio mineral – glicerol (sin KCl), y en ese mismo medio pero enriquecido con los componentes del medio LB, aprovechar la capacidad que posee en la generación de ácido fórmico para co-producir H₂ y etanol.
- Bloquear las vías de formación de acetato, como *poxB* o *pta-ackA*, para evitar su acumulación y favorecer la producción de succinato o etanol bajo condiciones limitantes de oxígeno.
- Estudiar el metabolismo del glicerol y la producción de ácido succínico en condiciones no aireadas usando otros fondos genéticos de *E. coli*. Una buena candidata sería la cepa ATCC 8739, ya que es la que más succinato ha producido a partir de glucosa y que otros grupos de trabajo han utilizado para estudios en glicerol logrando una mejor producción de succinato en comparación con MG16655.
- Estudiar a fondo el metabolismo del glicerol bajo condiciones sin aireación tomando en cuenta las enzimas que están directamente relacionadas con la distribución de la dihidroxiacetona fosfato, las cuales son gluconeogénicas, debido a que 1) esta molécula es común entre el metabolismo del glicerol y de las pentosas fosfato y 2) porque se sugiere que el metabolismo lento del glicerol puede ser por la falta de moléculas precursoras del crecimiento.
- Desarrollar una estrategia metabólica que permita generar una fuerza protón-motriz extra a través de la producción de NADH, como suministro de energía adicional para soportar tanto el crecimiento y la generación de succinato.
- Generar una estrategia para la producción de succinato bajo condiciones sin aireación aumentando la concentración de NaHCO₃ (de ser posible hacer un barrido de concentraciones) para favorecer la disponibilidad de CO₂, factor importante en la reacción de la fosfoenolpiruvato carboxinasas.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Blankshien, M. D. *et al.* (2010). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of succinate from glycerol. *Metabolic Engineering* 12: 409–419.
2. Cassey, B., Guest, J. R., Attwood, M. M. (1998). Environmental control of pyruvate dehydrogenase complex expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 159(2), 325–329.
3. Centeno, S. G. (2013). Generación de NADPH mediante la vía de EMBDENMEYERHOF-PARNAS y su efecto sobre la síntesis de poli-3-hidroxitirato en *Escherichia coli*. Tesis de doctorado. UNAM-IBt. Departamento de ingeniería celular y biocatálisis.
4. Ciani, M. (2019). Informe de biocombustibles, Abril 2019. Dirección de Bioenergía. Secretaría de Agroindustria Argentina.
5. Clomburg, J. M., & Gonzalez, R. (2013). Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals. *Trends in biotechnology*, 31(1), 20-28.
6. Cunningham, D. S., Liu, Z., Domagalski, N., Koepsel, R. R., Atai, M. M., & Domach, M. M. (2009). Pyruvate kinase-deficient *Escherichia coli* exhibits increased plasmid copy number and cyclic AMP levels. *Journal of bacteriology*, 191(9), 3041-3049.
7. Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 6640-6645.
8. De Riel, J. K., & Paulus, H. (1978). Subunit dissociation in the allosteric regulation of glycerol kinase from *Escherichia coli*. 3. Role in desensitization. *Biochemistry*, 17(24), 5146-5150.
9. Dharmadi, Y., Murarka, A., & Gonzalez, R. (2006). Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. *Biotechnology and bioengineering*, 94(5), 821-829.
10. Díaz, Á. A. E. & Cadierno, V. (2013). "Glycerol: A promising Green Solvent and Reducing Agent for Metal-Catalyzed Transfer Hydrogenation Reactions and Nanoparticles Formation" *Applied Sciences*, vol. 3, no. 1, pp. 55-69.
11. Dittrich, C. R., Vadali, R. V., Bennett, G. N., & San, K. Y. (2005). Redistribution of metabolic fluxes in the central aerobic metabolic pathway of *E. coli* mutant strains with deletion of the *ackA-pta* and *poxB* pathways for the synthesis of isoamyl acetate. *Biotechnology progress*, 21(2), 627-631.
12. Durnin, G., Clomburg, J., Yeates, Z., Alvarez, P. J., Zygorakis, K., Campbell, P., & Gonzalez, R. (2009). Understanding and harnessing the microaerobic metabolism of glycerol in *Escherichia coli*. *Biotechnology and bioengineering*, 103(1), 148-161.

13. Dugar, D., & Stephanopoulos, G. (2011). Relative potential of biosynthetic pathways for biofuels and bio-based products. *Nature biotechnology*, 29(12), 1074-1078.
14. Guettler, M.V., Jain, M.K., Rumler, D. (1996). Method for making succinic acid, bacterial variants for use in the process, and methods of obtaining variants. Patent US 5,573,931.
15. Hayashi, K., Morooka, N., Yamamoto, Y., Fujita, K., Isono, K., Choi, S., ... & Horiuchi, T. (2006). Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Molecular systems biology*, 2(1).
16. Ho Ahn, J. *et al.* *Succinic Acid* en Industrial Biotechnology: Products and processes. Volumen 4. Editado por Christoph Wittmann and James C. Liao (2017).
17. Hu, H., & Wood, T. K. (2010). An evolved *Escherichia coli* strain for producing hydrogen and ethanol from glycerol. *Biochemical and biophysical research communications*, 391(1), 1033-1038.
18. Jain, R., Huang, J., Yuan, Q., Yan, Y. (2015). Engineering microaerobic metabolism of *E. coli* for 1,2-propanediol production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42(7), 1049–1055.
19. Jantama, K., Haupt, M. J., Svoronos, S. A., Zhang, X., Moore, J. C., Shanmugam, K. T., Ingram, L. O. (2008). Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate. *Biotechnology and Bioengineering*, 99(5), 1140–1153.
20. Jantama, K., Zhang, X., Moore, J. C., Shanmugam, K. T., Svoronos, S. A., & Ingram, L. O. (2008). Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C. *Biotechnology and bioengineering*, 101(5), 881-893.
21. Jarboe, L. R., Zhang, X., Wang, X., Moore, J. C., Shanmugam, K. T., Ingram, L. O. (2010). Metabolic engineering for production of biorenewable fuels and chemicals: contributions of synthetic biology. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.
22. Kim, P. *et al.* (2004). Effect of overexpression of *Actinobacillus succinogenes* phosphoenolpyruvate carboxykinase on succinate production in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 70:1238–1241.
23. Kim, N. Y., Kim, S. N., & Kim, O. B. (2018). Long-term adaptation of *Escherichia coli* to methanogenic co-culture enhanced succinate production from crude glycerol. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 45(1), 71-76.
24. Lafuente, G. Glicerol: Síntesis y aplicaciones. Tesis de maestría. UNED. Departamento de química orgánica y bio-orgánica (2017).
25. Leduc, Y. A. *et al.* (2005). Structure of PEP carboxykinase from the succinate-producing *Actinobacillus succinogenes*: a new conserved active-site motif. *Acta Crystallographica* 61:

903–912.

26. Li, Q., Wu, H., Li, Z., & Ye, Q. (2016). Enhanced succinate production from glycerol by engineered *Escherichia coli* strains. *Bioresource technology*, 218, 217-223.
27. Liu, R., Liang, L., Li, F., Wu, M., Chen, K., Ma, J., & Ouyang, P. (2013). Efficient succinic acid production from lignocellulosic biomass by simultaneous utilization of glucose and xylose in engineered *Escherichia coli*. *Bioresource technology*, 149, 84-91.
28. Lynes, S. 2009. An exploding market? Utilizing waste glycerol from the biodiesel production process. April 19th. Disponible en: <http://snrecmitigation.wordpress.com/2009/04/19/an-explodingmarket-utilizing-waste-glycerol-from-the-biodiesel-productionprocess/>
29. Juan David López, J. D., Mariana Cardona, M., Rodríguez, E. (2017). Efecto del ácido fumárico en las características de calidad de *muffins*. *Revista Lasallista de Investigación*, vol. 14, núm. 2, pp. 9-19.
30. Ma, J. F., Wu, M. K., Zhang, C. Q., He, A. Y., Kong, X. P., Li, G. L., ... & Jiang, M. (2016). Coupled ARTP and ALE strategy to improve anaerobic cell growth and succinic acid production by *Escherichia coli*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 91(3), 711-717.
31. Maeda, T., Tran, K. T., Yamasaki, R., & Wood, T. K. (2018). Current state and perspectives in hydrogen production by *Escherichia coli*: roles of hydrogenases in glucose or glycerol metabolism. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(5), 2041-2050.
32. Martínez, A., Grabar, T. B., Shanmugam, K. T., Yomano, L. P., York, S. W., & Ingram, L. O. (2007). Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. *Biotechnology letters*, 29(3), 397-404.
33. Martínez, A., Grabar, T. B., Shanmugam, K. T., Yomano, L. P., York, S. W., & Ingram, L. O. (2007). Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. *Biotechnology letters*, 29(3), 397-404.
34. Martínez-Gómez, K., Flores, N., Castañeda, H.M., Martínez-Batallar, G., Hernández-Chávez, G., Ramírez, O.T., Encarnación, S., Bolívar, F. (2012). New insights into *Escherichia coli* metabolism: carbon scavenging, acetate metabolism and carbón recycling responses during growth on glycerol. *Microbial Cell Factories*, 11, 46.
35. Martínez, V. M. Ingeniería metabólica en una cepa de *Escherichia coli* no fermentativa para la producción de ácido succínico a partir de glucosa. Tesis de maestría. UNAM-IBt. Departamento de ingeniería celular y biocatálisis (2018).
36. Mathews, C.K., Van Holde, K. E. & Ahern, K. G. (2002). "Ciclo del ácido cítrico" en *Bioquímica*. Editorial Pearson, 3ra Edición, págs. 541-556.
37. Meynial-Salles, I., Dorotyn, S., Soucaille, P. (2007). A new process for the continuous

- production of succinic acid from glucose at high yield, titer, and productivity. *Biotechnology and Bioengineering*, 99(1), 129–135.
38. Miller, J. H., 1992. A short Course in Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. Págs. 221-263, 268--- 278.
 39. Murarka, A., Dharmadi, Y., Yazdani, S. S., & Gonzalez, R. (2008). Fermentative utilization of glycerol by *Escherichia coli* and its implications for the production of fuels and chemicals. *Applied and environmental microbiology*, 74(4), 1124-1135.
 40. Nghiem, P. N., *et al.* Succinic Acid: Technology Development and Commercialization. *Fermentation*, 3, 26 (2017).
 41. Okino, S., Inui, M., Yukawa, H. (2005). Production of organic acids by *Corynebacterium glutanicum* under oxygen deprivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(4):475-80.
 42. Oleoline. The independent Oleo Reporter. Crude glycerine market report. Disponible en: <https://www.oleoline.com/>.
 43. Orr, J. S., Christensen, D. G., Wolfe, A. J., & Rao, C. V. (2019). Extracellular acidic pH inhibits acetate consumption by decreasing gene transcription of the tricarboxylic acid cycle and the glyoxylate shunt. *Journal of bacteriology*, 201(2), e00410-18.
 44. Oviedo, R. El glicerol o glicerina de biodiésel en la alimentación de ganado. Sitio argentino de Producción Animal. (2012).
 45. Pertierra, A. G., & Cooper, R. A. (1977). Pyruvate formation during the catabolism of simple hexose sugars by *Escherichia coli*: studies with pyruvate kinase-negative mutants. *Journal of bacteriology*, 129(3), 1208-1214.
 46. Protocolo TB340 Rev. F 0211JN de Novagen ®. Disponible en: www.merck4biosciences.com
 47. Sawers, R. G. (2005). Evidence for novel processing of the anaerobically inducible dicistronic *focA-pfl* mRNA transcript in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 58(5), 1441-1453.
 48. Singhabhandhu, A. & Tezuka, T. (2010). “A perspective on incorporation of glycerin purification process in biodiesel plants using waste cooking oil as feedstock”. *Energy*, vol. 35, no. 6, pp. 2493-2504.
 49. Soellner, S., Rahnert, M., Siemann-Herzberg, M., Takors, R., & Altenbuchner, J. (2013). Evolution of pyruvate kinase-deficient *Escherichia coli* mutants enables glycerol-based cell growth and succinate production. *Journal of applied microbiology*, 115(6), 1368-1378.
 50. Thompson, J. C. & He, B. B. (2006). “Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks”. *Applied Engineering in Agriculture*, vol. 22, no. 2, pp. 261- 265, ISSN 1943-7838.
 51. Trchounian, K., Mirzoyan, S., Poladyan, A., & Trchounian, A. (2017). Hydrogen production by

- Escherichia coli* growing in different nutrient media with glycerol: Effects of formate, pH, production kinetics and hydrogenases involved. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(38), 24026-24034.
52. Ramos, A. M. Valorización biotecnológica de subproductos/residuos industriales: producción de ácido succínico y ácido láctico. Tesis. Universidad de Valladolid. Dpto. Ingeniería Química y Tecnología del medio ambiente (2015).
 53. Romeo, T., & Snoep, J. L. (2005). Glycolysis and Flux Control. *EcoSal Plus*, 1(2).
 54. SAGARPA. Comunicado de prensa: Producción de biocombustibles en México. BCS/054/2017.
 55. Sawers, G. A. R. Y., & Böck, A. (1988). Anaerobic regulation of pyruvate formate-lyase from *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*, 170(11), 5330-5336.
 56. Steigmiller, S., Turina, P., & Gräber, P. (2008). The thermodynamic H⁺/ATP ratios of the H⁺-ATPsynthases from chloroplasts and *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(10), 3745-3750.
 57. Schweizer, H. E. R. B. E. R. T., Boos, W., & Larson, T. J. (1985). Repressor for the sn-glycerol-3-phosphate regulon of *Escherichia coli* K-12: cloning of the glpR gene and identification of its product. *Journal of bacteriology*, 161(2), 563-566.
 58. Tan, H. W. et al. "Glycerol production and its applications as a raw material: A review". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Vol. 27, pp. 118-127, ISSN 1364-0321. (2013).
 59. Utrilla, J., Gosset, G., Martinez, A. (2009). ATP limitation in a pyruvate formate lyase mutant of *Escherichia coli* MG1655 increases glycolytic flux to D-lactate. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(8), 1057–1062.
 60. Van der Werf, M. J., Guettler, M. V., Jain, M. K., & Zeikus, J. G. (1997). Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus* sp. 130Z. *Archives of microbiology*, 167(6), 332-342.
 61. Vemuri, G.N., Eiteman, M.A., Altman, E. (2002). Succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations depends on the time of transition from aerobic to anaerobic conditions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28, 325 –332.
 62. Wang, D., Li, Q., Li, W., Xing, J., & Su, Z. (2009). Improvement of succinate production by overexpression of a cyanobacterial carbonic anhydrase in *Escherichia coli*. *Enzyme and microbial technology*, 45(6-7), 491-497.
 63. Wong, M. S., Li, M., Black, R. W., Le, T. Q., Puthli, S., Campbell, P., & Monticello, D. J. (2014). Microaerobic conversion of glycerol to ethanol in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(10), 3276-3282.
 64. Yang, J., Wang, Z., Zhu, N., Wang, B., Chen, T., Zhao, X. (2014). Metabolic engineering of

- Escherichia coli* and in silico comparing of carboxylation pathways for high succinate productivity under aerobic conditions. *Microbiological Research*, 169(5–6), 432–440.
65. Xi, Y. L., Chen, K. Q., Li, J., Fang, X. J., Zheng, X. Y., Sui, S. S., ... & Wei, P. (2011). Optimization of culture conditions in CO₂ fixation for succinic acid production using *Actinobacillus succinogenes*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 38(9), 1605.
66. Yu, C. *et al.* Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biotechnological production of high-value organic acids and alcohols. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:573–583 (2011).
67. Yu, Y., Zhu, X., Xu, H., & Zhang, X. (2019). Construction of an energy-conserving glycerol utilization pathways for improving anaerobic succinate production in *Escherichia coli*. *Metabolic engineering*, 56, 181-189.
68. Zhang, X. *et al.* Fermentation of Glycerol to Succinate by Metabolically Engineered Strains of *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology* 76: 2397–2401 (2010).
69. Zhao, C. *et al.* Reexamination of the physiological role of PykA in *Escherichia coli* revealed that it negatively regulates the intracellular ATP levels under anaerobic conditions. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 83, no 11, p. e00316-17 (2017).
70. Zwaig, N., Kistler, W. S., & Lin, E. C. C. (1970). Glycerol kinase, the pacemaker for the dissimilation of glycerol in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 102(3), 753-759.

12. ANEXOS

1. SECUENCIAS DEL GEN *pck* de *A. succinogenes* EMPLEADOS PARA SU SÍNTESIS POR GENEWIZ® (www.genewiz.com).

SECUENCIA DEL GEN *pck* ORIGINAL de *A. succinogenes*, obtenido en la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Página web: <https://www.genome.jp/kegg/>

ATGACTGACTTAAACAAACTCGTTAAAGAACTTAATGACTTAGGGCTTACCGATGTTAAGGAAATTGTGTA
TAACCCGAGTTATGAACAACCTTTTCGAGGAAGAAACCAAACCGGGTTTGGAGGGTTTCGATAAAGGGACGT
TAACCACGCTTGGCGCGGTTGCCGTCGATACGGGGATTTTTACCGGTCGTTACCCGAAAGATAAATATATC
GTTTTCGATGAAACTACGAAAGACACCGTTTGGTGGAACAGCGAAGCGGCGAAAAACGATAACAAACCGAT
GACGCAAGAACTTGGAAAAGTTTGGAGAGAATTAGTGCCGAAACAACCTTCCGGTAAACGTTTATTCGTGG
TAGAAGGTTACTGCGGCGCCAGTGAAAAACACCGTATCGGTGTGCGTATGGTTACTGAAGTGGCATGGCAG
GCGCATTTTGTGAAAAACATGTTTATCCGACCGACCGATGAAGAGTTGAAAAATTTCAAAGCGGATTTTAC
CGTGTTAAACGGTGCTAAATGTACTAATCCGAACTGGAAAGAACAAGTTTGAACAGTGAAAACCTTGTTCG
CTTTCAATATTACCGAAGGTATTCAGCTTATCGGCGGTACTTGGTACGGCGGTGAAATGAAAAAAGGTATG
TTCTCAATGATGAACTACTTCCCTGCCGTTAAAAGGTGTGGCTTCCATGCACTGTTCCGCCAACGTAGGTAA
AGACGGTGACGTGGCTATTTTCTTCGGTTTATCCGGTACGGGTAAAACAACGCTTTCGACCGATCCTAAAC
GCCAATTAATCGGTGATGACGAACACGGTTGGGATGAATCCGGCGTATTTAACTTTGAAGGCGGTTGTTAC
GCGAAAACCATTAACCTTATCTCAAGAAAACGAACCGGATATTTACGGCGCAATCCGTCGTGACGCATTATT
AGAAAACGTCGTGGTTTCGTGCAGACGGTTCCGTTGACTTTGACGACGGTTCAAAAAACAGAAAATACCCGTG
TTTCATATCCGATTTACCACATCGACAACATCGTTTCGTCCGGTATCGAAAGCCGGTCATGCAACCAAAGTG
ATTTTCTTAACCGCGGACGCATTTCGGCGTATTGCCGCGGTTTCAAACCTGACTCCGGAACAAACCGAATA
CTACTTCTTATCCGGCTTTACTGCAAAATTAGCGGGTACGGAACCGGCGTAACCGAACCGACTCCGACAT
TCTCGGCCGTGTTTCGGTGCAGCATTTCTAAGCCTGCATCCGATTCAATATGCGGACGTGTTGGTTCGAACGC
ATGAAAGCCTCCGGTGCAGGAAAGCTTATTTGGTGAACACCGGTTGGAACGGCACGGGTAAACGTATTTCAAT
CAAAGATACCCGCGGTATTATCGATGCGATTTTGGACGGTTCAATCGAAAAAGCGGAAATGGGCGAATTGC
CAATCTTTAATTTAGCGATTCTTAAAGCATTACCGGGTGTGATCCTGCTATTTTGGATCCGCGCGATACT
TACGCAGACAAAGCGCAATGGCAAGTTAAAGCGGAAAGATTTGGCAAACCGTTTCGTGAAAAACTTTGTGAA
ATATACGGCGAATCCGGAAGCGGCTAAATTAGTTGGCGCCGGTCCAAAAGCATAA

SECUENCIA DEL GEN *pck* ORIGINAL de *A. succinogenes* con los sitios de corte NcoI y HindIII

CCATGGGATGACTGACTTAAACAAACTCGTTAAAGAACTTAATGACTTAGGGCTTACCGATGTTAAGGAAA
TTGTGTATAACCCGAGTTATGAACAACCTTTTCGAGGAAGAAACCAAACCGGGTTTGGAGGGTTTCGATAAA
GGGACGTTAACCACGCTTGGCGCGGTTGCCGTCGATACGGGGATTTTTACCGGTCGTTACCCGAAAGATAA
ATATATCGTTTTCGATGAAACTACGAAAGACACCGTTTGGTGGAACAGCGAAGCGGCGAAAAACGATAACA
AACCGATGACGCAAGAACTTGGAAAAGTTTGGAGAGAATTAGTGCCGAAACAACCTTCCGGTAAACGTTTA
TTCGTGGTAGAAGGTTACTGCGGCGCCAGTGAAAAACACCGTATCGGTGTGCGTATGGTTACTGAAGTGGC
ATGGCAGGCGCATTTTGTGAAAAACATGTTTATCCGACCGACCGATGAAGAGTTGAAAAATTTCAAAGCGG
ATTTTACCGTGTAAACGGTGCTAAATGTACTAATCCGAACTGGAAAGAACAAGGTTTGAACAGTGAAAAC
TTTGTGCTTTTCAATATTACCGAAGGTATTCAGCTTATCGGCGGTACTTGGTACGGCGGTGAAATGAAAA
AGGTATGTTCTCAATGATGAACTACTTCCCTGCCGTTAAAAGGTGTGGCTTCCATGCACTGTTCCGCCAACG
TAGGTAAAGACGGTGACGTGGCTATTTTCTTCGGTTTATCCGGTACGGGTAAAACAACGCTTTCGACCGAT
CCTAAACGCCAATTAATCGGTGATGACGAACACGGTTGGGATGAATCCGGCGTATTTAACTTTGAAGGCGG
TTGTTACGCGAAAACCATTAACCTTATCTCAAGAAAACGAACCGGATATTTACGGCGCAATCCGTCGTGACG
CATTATTAGAAAACGTCGTGGTTTCGTGCAGACGGTTCCGTTGACTTTGACGACGGTTCAAAAAACAGAAAAT

ACCCGTGTTTCATATCCGATTTACCACATCGACAACATCGTTTCGTCCGGTATCGAAAAGCCGGTCATGCAAC
CAAAGTGATTTTCTTAACCGCGGACGCATTCGGCGTATTGCCGCCGGTTTCAAACACTGACTCCGGAACAAA
CCGAATACTACTTCTTATCCGGCTTTACTGCAAAATTAGCGGGTACGGAACGCGGCGTAACCGAACCGACT
CCGACATTTCTCGGCCTGTTTCGGTGCGGCATTCTTAAGCCTGCATCCGATTC AATATGCGGACGTGTTGGT
CGAACGCATGAAAGCCTCCGGTGC GGAAGCTTATTTGGTGAACACCCGGTTGGAACGGCACGGGTAAACGTA
TTTCAATCAAAGATAACCCGCGGTATTATCGATGCGATTTTGGACGGTTCAATCGAAAAAGCGGAAATGGGC
GAATTGCCAATCTTTAATTTAGCGATTCCCTAAAGCATTACCGGGTGTGATCCTGCTATTTTGGATCCGCG
CGATACTTACGCAGACAAAGCGCAATGGCAAGTTAAAGCGGAAGATTTGGCAAACCGTTTCGTGAAAAACT
TTGTGAAATATACGGCGAATCCGGAAGCGGCTAAATTAGTTGGCGCCGGTCCAAAAGCATAA **AAGCTT**

De donde:

- El sitio 5'NcoI está marcado con amarillo.
- El sitio 3'HindIII está marcado con azul.
- El codón de inicio del gen está marcado con verde.
- Entre el sitio 5'NcoI y el codón de inicio "ATG" del gen se le añadió una base "G", ya que si esto no se hacía la RNA polimerasa tomaría como codón de inicio el "ATG" del sitio NcoI, cambiando el marco de lectura. Se envió a sintetizar con esta instrucción, por lo tanto, esta base está presente en el gen sintético.
- Longitud del gen: 1617 pb

SECUENCIA DEL GEN *pck* SINTÉTICO de *A. succinogenes*, es decir, optimizado con el uso de codones para *E. coli*.

CCATGGGATG ACCGATCTGAACAAACTGGTTAAAGAGCTGAACGATCTGGGTTTAACCGATGTTAAGGAAA
TTGTGTACAATCCGAGCTACGAGCAGCTGTTTCGAGGAAGAAACCAAGCCGGTTTAGAGGGCTTTGATAAA
GGCACACTGACCACACTGGGCGCAGTGGCCGTTGATACCGGCATCTTCACTGGTCGCAGCCCCGAAAGACAA
ATATATTTGTGTGCGATGAGACCACCAAGGACACAGTGTGGTGGAAATAGCGAGGCCGCCAAAAACGACAACA
AGCCGATGACCCAAGAAACATGGAAATCTTTACGCGAGCTGGTTGCAAAGCAGCTGAGTGGCAAGCGTTTA
TTCGTGGTGGAAAGGTTATTGTGGTGC AAGCGAAAAACACCCGCATCCGGTGTGCGTATGGTGACCGAAGTTGC
TTGGCAAGCTCACTTCGTGAAAAACATGTTTCATCCGCCCGACCGATGAAGAGCTGAAAAATTTTAAAGCCG
ACTTTACCGTGCTGAACGGTGC AAAGTGCACCAATCCGAACTGGAAAGAGCAAGGTTTAAATAGCGAAAAT
TTTGTTCCTTTAATATTACAGAAGGTATCCA ACTGATTGGTGGCACTTGGTACGGCCGGTGAGATGAAAA
GGGCATGTTTAGCATGATGAATTATTTTCTGCCGCTGAAGGGTGTGCGCAGCATGCATTGTAGCGCCAACG
TTGGTAAAGACGGTGACGTGGCAATCTTTTTTGGTTTAAAGCGGTACTGGTAAAACCACTTTAAGTACCGAT
CCGAAGCGCCAGCTGATTGGCGACGATGAACACGGCTGGGACGAAAGCGGTGTTTTTAACTTCGAGGGCGG
CTGCTATGCCAAGACCATCAATCTGAGCCAAGAAAATGAACCGGACATCTATGGCGCCATTCGTGCGGATG
CTTTACTGGAGAATGTGGTGGTTTCGCGCCGATGGCAGCGTGGACTTCGATGATGGCAGCAAGACCGAGAAC
ACCCGTGTGAGCTACCCGATTTACCACATCGACAATATCGTGCGCCCCGTTAGCAAAGCCGGCCATGCAAC
CAAGGTGATCTTTCTGACCGCAGATGCCTTCGGCGTTTTACCTCCGGTGAGTAAACTGACCCCGGAGCAGA
CCGAATACTATTTTCTGAGTGGTTTTACAGCCAAGCTGGCTGGTACAGAGCGTGGCGTGACCGAACCGACC
CCTACATTTAGCGCTTGT TTTGGCGCCGCTTTCTGAGTCTGCATCCGATTCAGTATGCCGATGTTCTGGT
GGAGCGCATGAAAGCCAGCGGCGCCGAAGCCTATTTAGTTAAACTGGTTGGAACGGTACCGGTAAGCGCA
TCAGCATCAAAGATAACCCGCGGCATCATCGATGCCATTTTAGACGGTAGCATCGAAAAGGCCGAGATGGGT
GAGCTGCCATTTTTCAATCTGGCCATCCCGAAGGCCTTACCGGGTGTGGATCCGGCCATTCTGGACCCGCG
CGATACTACGCAGATAAAGCCAGTGGCAAGTTAAAGCCGAAGATTTAGCCAATCGTTTCGT TAAAAAAT
TTGTTAAATATACAGCCAACCCGGAAGCAGCCAAACTGGTGGGTGCCGGCCCGAAAGCATAA **AAGCTT**

Datos:

A: 437 pb T: 369 pb C: 378 pb G: 446 pb | GC%: 50.55% | Longitud: 1630 pb

2. ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA Pck (FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXICINASA)

1. Preparación de 50 mL del amortiguador de cosecha y permeabilización Tris HCl 100 mM (pH 7).

Reactivo	Concentración en el amortiguador	Pesar (g)	pH y Aforo
Tris base	0.1 M	0.6057	Ajustar a pH 7.0 con HCl 6N y aforar a 50 mL
DTT	2 mM	0.0154	
EDTA 2H ₂ O	0.1 mM	0.0018	
MnSO ₄ 1H ₂ O	5 mM	0.0423	
KCl	20 mM	0.0746	

2. Preparación de 50 mL amortiguador para ensayo enzimático Tris HCl 100 mM (pH 6.6). Disolver 0.6057 g de tris base, ajustar el pH a 6.6 con HCl 6 N y aforar a 50 mL.
3. Preparación de las soluciones patrón para las reacciones de actividad enzimática. Éstos se disuelven en el amortiguador indicado en el numeral 2.

Reactivo	Concentración	Pesar	Aforar
NaHCO ₃	350 mM	0.294	10 mL
MgCl ₂ 6H ₂ O	160 mM	0.3253	10 mL
NADH	30 mM	0.001	500 µL
DTT	100 mM	0.0077	500 µL
ADP	100 mM	0.0214	500 µL
PEP	500 mM	0.0420	500 µL
MD	100 U	32 µL	1 mL

PEP = fosfoenolpiruvato; MD = malato deshidrogenasa

Los reactivos en rojo se preparan al momento.

4. Mezcla de reacción del ensayo de actividad enzimática.

Reactivo	Concentración inicial	µL a añadir en la celda de 1 mL	Concentración final
NaHCO ₃	350 mM	100	35 mM
MgCl ₂ 6H ₂ O	160 mM	100	16 mM
NADH	30 mM	10	0.3 mM
DTT	100 mM	10	1 mM
ADP	100 mM	100	10 mM
PEP	500 mM	10	5 mM
MD	100 U	100	10 U
Extracto*	100 µL		

*Añadir 470 µL de Tris HCl (pH 6.6) a la mezcla de reacción y al final el extracto enzimático. El ensayo se realiza a 37 °C.

3. CURVA PATRÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD

1. Para realizar una curva patrón con albúmina de suero bovino (BSA) en concentraciones de 0.0-0.01 $\mu\text{g/mL}$ usando el método de Bradford:
2. Agregar 800 μL de cada estándar a cada cubeta de 1 mL.
3. Agitar en Vortex
4. Añadir 200 μL del reactivo a cada estándar (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate). Homogeneizar la mezcla e incubar la reacción a temperatura ambiente durante 15 min.
5. Determinar la absorbancia en el espectrofotómetro utilizando una longitud de onda de 595 nm, ajustando al cero de absorbancia con el blanco. Hacer una regresión lineal, graficando la lectura de absorbancia contra la concentración de proteína.
6. Las muestras se procesaron de la misma forma, de ser necesario hacer diluciones de las muestras.

4. COMPONENTES DEL MEDIO MC USADO EN LA TÉCNICA DE TRANSDUCCIÓN POR FAGOS.

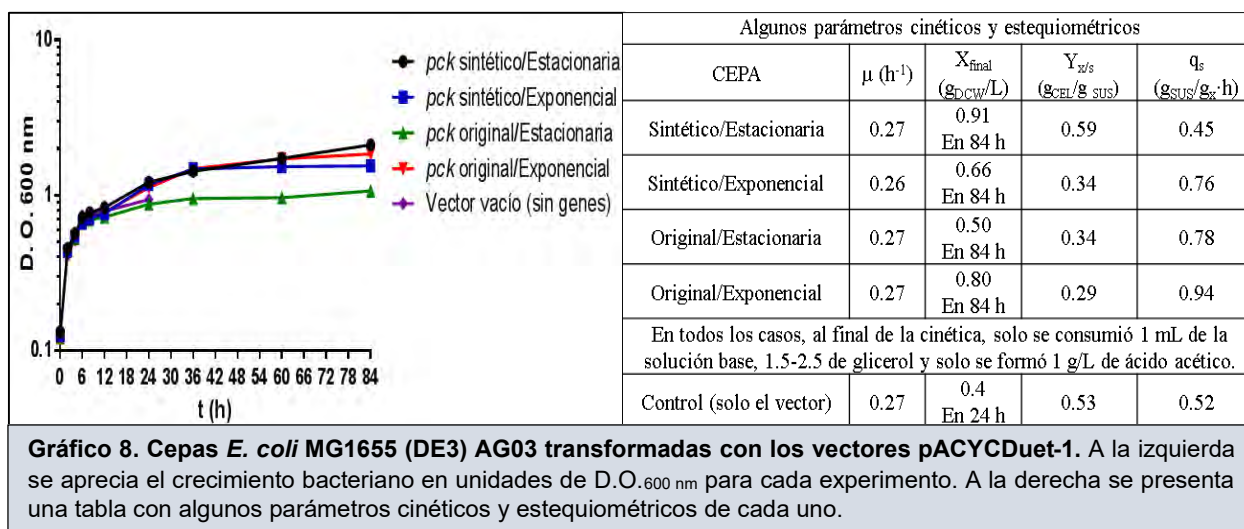
Para preparar 1 mL de la solución MC	
Usar	Concentración final
10 μL del stock MgSO_4 1 M	MgSO_4 10 mM
5 μL del stock CaCl_2 5 1 M	CaCl_2 5 mM
985 μL de agua mQ estéril	-
Preparar este volumen de solución para cada transducción, a partir de soluciones estériles.	

5. COMPONENTES DEL MEDIO AM1 (sin la fuente de carbono)

Componente	Concentración (mmol l^{-1})
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	19.92
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	7.56
KCl	2.00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.50
Betaina	1.00
Elementos traza	
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	8.88
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.26
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.88
ZnCl_2	2.20
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.24
H_3BO_3	1.21
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}_2$	2.50

6. Evaluación de la cepa AG03 pACY-CDuet/*pck*_{AS} (con el gen *pck*_{AS} sintético y original) y AG03 pACYCDuet-1 en AM1m enriquecido con los componentes del medio LB y glicerol (AM1m-YE-T-Glc) bajo condiciones sin aireación, usando IPTG 10 µM en distintas fases del crecimiento microbiano.

Como experimento exploratorio, se realizó la caracterización de la triple mutante MG1655 (DE3) $\Delta gldA::FRT$, $\Delta ppc::FRT$, $\Delta pck::FRT-km-FRT$ (nombrada AG03) con los vectores que se tenían hasta el momento (pACYCDuet-1 y pACY-CDuet/*pck*_{AS}, con el gen original y sintético). Cabe mencionar que esta cepa presenta las eliminaciones necesarias para conducir la fuente de carbono hacia la producción de succinato a través del gen clonado. Para la expresión de *pck* del vector se usó IPTG a una concentración de 10 µM. El IPTG se añadió en la fase exponencial y/o estacionaria del cultivo, obteniéndose los siguientes resultados.



Nota: Y_{g/s}, en estos experimentos, cuyo medio contiene los componentes del medio Luria, es un rendimiento aparente debido a que éstos contribuyen en la formación de biomasa por poseer compuestos carbonados.

En estos resultados se observa que el gen evaluado, ya sea sintético u original, no tiene efecto positivo sobre la producción de ácido succínico, ya que solo se produjo ácido acético, y en pequeñas concentraciones. Tales resultados son esperados, debido a que la cepa no consume eficientemente el glicerol puesto que no tiene el gen *gldA* (que codifica para la enzima principal de asimilación de glicerol en condiciones anaerobias) y el gen *glpK* (cromosomal), corresponde a una vía minoritaria de consumo de glicerol bajo dichas condiciones.