



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Ingeniería de vías metabólicas para la producción de aminoshikimato en cepas de
Escherichia coli PTS⁻

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Rubén Mendoza Flores

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
Dr. Juan Carlos Sigala Alanis
[UAM Unidad Cuajimalpa](#)

Doctor José Utrilla Carreri
[Centro de Ciencias Genómicas, UNAM](#)

Cuernavaca, Mor., Septiembre, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“Todas las personas mayores han sido primero niños, aunque pocas de ellas lo recuerdan”

El principito, Antoine de Saint-Exupéry

A mis padres, por su amor incondicional.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 4 del Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo la tutoría del Dr. Adelfo Escalante Lozada y fue financiado por el proyecto PAPIIT IN209618 “Ingeniería de vías metabólicas para la producción de aminoshikimato en cepas de *Escherichia coli* PTS-“. Para la realización de este trabajo Rubén Mendoza Flores recibió apoyo económico del CONACYT y DGAPA.

Agradecimientos

Al Dr. Adelfo Escalante y a la Dra. Dulce Díaz por su amistad, sus enseñanzas y su paciencia.

A mis padres, por su amor y apoyo incondicional.

A mis amigos Beto, Dany, Joel y Fer. A mis compañeros de generación Ángeles, Fidel y Raúl. A mis roomies Ulises y Ernesto.

A los Doctores Juan Carlos Sigala y José Utrilla por formar parte de mi comité tutorial y por su guía en el desarrollo de este trabajo.

A los Dres. Guillermo Gosset, Alfredo Martínez y Luis Caspeta por sus enriquecedores consejos y observaciones. Al Dr. Francisco Bolívar por permitirme formar parte de su prestigioso grupo.

A los Dres. Enrique Morett, Agustín López, Víctor Bustamante, Corina Ceapa y Dolores Reyes, miembros del jurado de examen, por su revisión crítica a este trabajo.

A la M. en C. Georgina Hernández por su apoyo en HPLC y UPLC. A la Dra. Noemí Flores por el apoyo en RT-qPCR, A la Q.I. Luz María Martínez por sus consejos sobre biología molecular.

Al Ing. Alberto Porras por su apoyo con el UPLC y el sensor de masas. Al personal de la unidad de síntesis y secuenciación del IBt por su apoyo técnico.

A Alan Vázquez y a todos los integrantes de Bujinkan Dojo Morelos por las enseñanzas más allá del posgrado.

A Sra. Aurelia Gonzales, Manuel Saucedo, Rubí Robledo y Antonio Bolaños por su apoyo administrativo.

Finalmente, gracias a todos mis compañeros del Laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas por los invaluable momentos compartidos.

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTOR

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. José Adelfo Escalante Lozada

Instituto de Biotecnología, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dr. Juan Carlos Sigala Alanís

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa

Dr. José Utrilla Carreri

Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

INTEGRANTES DEL JURADO DEL EXAMEN DE GRADO

Dr. Enrique Morett Sánchez-Presidente

Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Agustín López Mungia -Secretario

Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Corina Diana Ceapa

Instituto de Química, UNAM

Dra. Ma. De los Dolores Reyes Duarte

UAM Cuajimalpa

Dr. Víctor Humberto Bustamante

Instituto de Biotecnología, UNAM

Contenido

INDICE DE FIGURAS.....	III
INDICE DE TABLAS	IV
ABREVIATURAS	V
RESUMEN.....	VIII
ABSTRACT	X
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Ingeniería de vías metabólicas	1
1.2 Shikimato	1
1.2.1 Shikimato y su importancia	1
1.2.2 Biosíntesis de shikimato.....	2
1.2.3 Producción de SHK mediante IVM	4
1.3 Aminoshikimato	5
1.3.1 ASA y su importancia.....	5
1.3.2 Ruta del ASA	6
1.3.3 Ruta de biosíntesis de kanosamina.....	8
2. ANTECEDENTES.....	10
2.1 Producción de ASA a partir de Glc	10
2.2 Cepas de <i>E. coli</i> PTS ⁻ para la producción de compuestos aromáticos	11
3 JUSTIFICACIÓN	15
4. HIPÓTESIS.....	16
5. OBJETIVO GENERAL	16
6. OBJETIVOS ESPECIFICOS	16
7. MATERIALES Y MÉTODO.....	17
7.1 Estrategia de producción de ASA.....	17
7.2 Verificación del genotipo y fenotipo de las cepas	18
7.3 Construcción de los plásmidos de expresión.....	19
7.3.1 Plásmidos pTOPOaminoSA1 y pACYCaminoSA1	19
7.3.2 pTrcAro4	20
7.4 Secuenciación de las construcciones	20
7.5 Transformaciones.....	21
7.6 Evaluación de las cepas en cultivos en matraz	22

7.7 Búsqueda de masa molecular del ASA en UPLC acoplado a sensor de masas	24
7.8 Estudio transcripcional mediante RT-qPCR.....	25
8 RESULTADOS	27
8.1 Verificación del genotipo y fenotipo	27
8.2 Secuenciación de la construcción pTOPOaminoSA	28
8.3 Construcción y secuenciación de pACYCaminoSA1	29
8.4 Construcción y secuenciación de pTrc Aro5 y pTrcAro4.....	31
8.5 Cepas.....	32
8.6 Evaluación de las cepas ASR4 y DKLF en cultivos en matraz.....	33
8.7 Evaluación de la cepa ASR45 en matraz.....	34
8.8 Cultivos con las cepas AT1 y DT1	35
8.9 Búsqueda de masas moleculares similares a la del ASA en UPLC acoplado a detector de masas	35
8.10 Estudio transcripcional de los genes heterólogos <i>ntdA</i> , <i>ntdC</i> y <i>rifH</i> mediante RT-qPCR	38
8.11 Estudio de expresión diferencial en el metabolismo de AT1 y ASR4	39
8.12 Generación de la cepa DT1.....	42
8. CONCLUSIONES	44
9. PROSPECTIVAS.....	45
10. REFERENCIAS	47
Anexo 1. Oligonucleótidos usados en este trabajo.....	52
Anexo 2: Plásmidos y cepas usados en este trabajo.....	53
Anexo 3: Expresión relativa de los genes determinados mediante RT-qPCR en la cepa AT1.....	54
Anexo 4: Productos de este trabajo	55

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ácidos shikímico y aminoshikímico.....	1
Figura 2. Ruta del SHK en el contexto del metabolismo central de <i>E. coli</i>	3
Figura 3. Algunos compuestos de relevancia derivados de la vía del ASA.....	6
Figura 4. Primera etapa de la vía del ASA en <i>A. mediterranei</i>	7
Figura 5. Segunda etapa de la vía del ASA en <i>A. mediterranei</i> y vía del SHK en <i>E. coli</i>	8
Figura 6. Síntesis de kanosamina en <i>B. subtilis</i>	9
Figura 7. Síntesis de K6P en <i>A. mediterranei</i> y <i>B. subtilis</i>	9
Figura 8. Estrategia usada por Rodríguez et al en 2014 para sobreproducir SHK en la cepa <i>E. coli</i> AR36.....	14
Figura 9. . Metabolismo de las cepas productoras de ASA propuesta en este trabajo.....	18
Figura 10. Plásmidos pTOPOaminoSA1, pACYCaminoSA y pTrcAro4.....	18
Figura 11. Recuperación por PCR del operón aminoSA1.....	19
Figura 12. Metodología usada para caracterizar a las cepas generadas en este trabajo.....	24
Figura 13. Gel de electroforesis del RNA extraído por triplicado de las cepas ASR4 y AT1.....	26
Figura 14. Prueba de auxotrofia a aminoácidos aromáticos de ASR4 y DKLF.....	27
Figura 15. Verificación por PCR de las inactivaciones en la cepa DKLF.....	28
Figura 16. Mutación en G 886 en el gen <i>ntdA</i> en el operón aminoSA1.....	29
Figura 17. Alineamiento de la secuenciación del inserto en el plásmido pACYCmod con la secuencia de referencia.....	30
Figura 18. Comprobación por PCR de la ligación en pACYCaminoSA1, pTOPOaminoSA1 y un control negativo.....	30
Figura 19. Alineamiento entre los resultados de secuenciación de la región de <i>rifH</i> del plásmido pACYCaminoSA1.....	30
Figura 20. Digestión del plásmido pTrcAro4 extraído de tres candidatas <i>E. coli</i> DH5 α comparadas con pTrcAro5.....	31
Figura 21. Comprobación por PCR de la transformación con el plásmido pTOPOaminoSA1.....	32
Figura 22. Patrón de restricción del plásmido pTrcAro5 recuperado de <i>E. coli</i> ASR45.....	33
Figura 23. Cromatogramas de extracción de ión de m/z igual a 174.22 para medios fermentados con las cepas DT1 y AT1.....	36
Figura 24. Solape de cromatogramas de extracción de ión a 174.17 m/z, entre medios fermentados con las cepas transformantes y parentales y medios frescos.....	37
Figura 25. Espectro de masas del los picos extraído con m/z igual a 174.22.....	37
Figura 26. Deconvolución del espectro de masas del compuesto candidato y en la cepa parental.....	38
Figura 27. Curvas de RT-qPCR de los genes <i>ntdC</i> , <i>ntdA</i> y <i>rifH</i> en tres cultivos independientes de AT1 con respecto a ASR4.....	39
Figura 28. Estudio de expresión diferencial en la cepa AT1 con respecto a la cepa ASR4.....	42
Figura 29. Perfiles de crecimiento de las cepas parentales y transformantes.....	43

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas reportadas para producción de ASA.	11
Tabla 2. Composición del medio de cultivo para producción de SHK.....	23
Tabla 3. Parámetros de calidad de RNA extraído de las cepas ASR4 y AT1.	26
Tabla 4. Comprobación de las inactivaciones en ASR4 mediante qPCR.	28
Tabla 5. Mutaciones presentes en el plásmido pTrcAro5.	32
Tabla 6. Parámetros cinéticos de la cepas ASR4 y DKLF.....	34
Tabla 7. Parámetros cinéticos de la cepa ASR45 cultivada en matraz.....	35

ABREVIATURAS

μ	Tasa específica de crecimiento
3OG6P	3-oxo-D-glucosa-6-fosfato
6PGC	6-fosfogluconolactona
6PGL	6-fosfogluconato
ACE	Acetato
A-CoA	Acetil-coenzima A
ADN	Ácido ribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
aminoDAHP	4-amino-3,4-didesoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato
aminoDHQ	5-amino-5-desoxi-3-deshidroquinato
aminoDHS	5-amino-5-desoxi-3-deshidroquinato
aminoF6P	3-amino-3-desoxi-D-fructosa-6-fosfato
ASA	Aminoshikimato
ARN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
CIT	Citrato
COR	Corismato
Da	Dalton
DO _{600 nm}	Densidad óptica a 600 nm
DAHP	3-deoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato
DHQ	Deshidroquinato
DHS	Deshidrosikimato

E4P	Eritrosa-4-fosfato
EPSP	5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato
F6P	Fructosa-6-fosfato
G3P	Gliceraldehido-3-fosfato
GAL	Galato
Glc	Glucosa
Glu	Glutamato
G6P	Glucosa-6-fosfato
HA	Compuestos hidroaromáticos
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta presión
iminoE4P	Imino-eritrosa-4-fosfato
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
K6P	Kanosamina-6-fosfato
m/z	Relación masa carga
NTD	3-3'-neotreaoladiamina
OAA	Oxalacetato
OSP	Oseltamivir fosfato
Pi	Fosfato inorgánico
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEP	Fosfoenolpiruvato
PLP	Piroxidal fosfato
PMP	Piridoxamina fosfato

PPP	Vía de las pentosas fosfato
PTS	Sistema de fosfotransferasa de glucosa
PYR	Piruvato
q_p	Productividad específica
q_s	Tasa específica de consumo de sustrato
QUIN	Quinato
R5P	Ribosa-5-fosfato
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
S7P	Sedoheptulosa-7-fosfato
SHK	Shikimato
T_A	Temperatura de alineamiento
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
T_m	Temperatura de fusión
UPLC	Cromatografía líquida de ultra alta presión
X	Biomasa
Y	Rendimiento
Y_{PS}	Rendimiento producto sustrato
Y_{XS}	Rendimiento biomasa sustrato
YE	Extracto de levadura

RESUMEN

El aminoshikimato (ASA) es un análogo del shikimato (SHK) que sustituye al grupo hidroxilo del carbono 5 al por un grupo amino. El ASA es un potencial precursor del compuesto oseltamivir (Tamiflu®), un inhibidor de la enzima neuraminidasa de virus de influenza estacionales o pandémico. El ASA también puede ser utilizado para la síntesis de nuevos compuestos bioactivos como antivirales, antibióticos, antiparasitarios, entre otros.

El ASA puede ser biosintetizado a partir de la ruta del mismo nombre, una ruta paralela a la del SHK que involucra la formación en múltiples reacciones de kanosamina-6-fosfato, aminoDAHP y finalmente ASA. Para su producción se han reportado estrategias de ingeniería de vías metabólicas (IVM) en bacterias pero se han obtenido bajos rendimiento, menores al 2 % mol ASA/ mol Glc, debido a la ineficiencia de las cepas para canalizar el carbono a la vía y a la competencia por el sustrato con la vía del SHK.

En este trabajo se reporta una nueva estrategia de producción de ASA a partir de glucosa (Glc) en dos cepas de *Escherichia coli* carentes del sistema PTS, desarrolladas previamente en nuestro grupo de trabajo mediante evolución adaptiva en laboratorio (ALE) para la producción de compuestos aromáticos. La primera cepa, ASR4, carece de los genes *pykF aroK* y *aroL* para promover la acumulación de ASA, la inactivación de las tres isoenzimas de DAHP sintasa *aroF*, *aroG* y *aroH* permite en principio evitar la competencia de sustrato con la vía del SHK, finalmente la inactivación del regulador *lacI*, permite la expresión constitutiva de genes expresados por promotores lac y derivados. La segunda cepa denominada DKLF (*aroK⁻ aroL⁻ pykF⁻*) demostró capacidad de producción de compuestos aromáticos similar a ASR4, pero conserva *lacI* para regular la expresión de los genes heterólogos involucrados

En ambas cepas fue sobreexpresado un operón sintético en el plásmido multicopia pCR®-XL-TOPO® con versiones sintéticas de los genes *ntdC* y *ntdA* de *B. subtilis* y *rifH* de *Amycolaptosis mediterranei* para la generación del precursor aminoDAHP, mientras que las enzimas de la vía del SHK nativas de *E. coli* completan la ruta de síntesis de ASA. Las cepas transformantes fueron denominadas AT1 y DT1, respectivamente.

Sobrenadantes de cultivos de ambas cepas fueron analizados en un sensor de masas ACQUITY QDa acoplado a un sistema WATERS UPLC. En ambos casos se encontró un compuesto con con masa molecular de 173.22 ± 0.20 Da similar a la teórica del ácido

aminoshikímico de 173.17 Da, el cual no estaba presente en el medio fresco ni en sobrenadantes de cultivos con las cepas parentales.

Un estudio de expresión diferencial por RT-qPCR en la cepa AT1 demostró la expresión de los genes heterólogos. En el mismo estudio se observó que el metabolismo del glutamato fue más activo debido posiblemente al consumo de este metabolito en la ruta heteróloga. Sin embargo se observó una baja actividad glucolítica y en la vía de las pentosas fosfato que coincide con una tasa específica de crecimiento 27% más baja. Asimismo, se observaron bajos niveles de expresión de los genes *tktA*, *zwf*, *aroB*, *aroD* y *aroE*, sugiriendo a estos como candidatos a sobreexpresar.

La cepa AT1 presentó varios inconvenientes como fondo genético de producción, por lo que se generó a la cepa DT1, que demostró un desempeño similar. Por otro lado, se construyó el plásmido pTrcAro4, que contiene los genes *tktA*, *aroB*, *aroD* y *aroE* en un operón regulado por un promotor *trc*, que puede ser posteriormente usado para evitar posibles cuellos de botella en algunas reacciones involucradas en la síntesis del ASA.

ABSTRACT

Aminoshikimic acid (ASA) is an analog of shikimic acid (SHK) that replaces the hydroxyl group on carbon 5 with an amino group. ASA is a potential precursor to the oseltamivir (Tamiflu®), an inhibitor of the neuraminidase enzyme of seasonal or pandemic influenza viruses. ASA can also be used for the synthesis of new bioactive compounds such as antivirals, antibiotics, antiparasitics, among others.

ASA can be biosynthesized from the pathway of the same name, a parallel pathway to SHK pathway that involves the formation in multiple reactions of kanosamine-6-phosphate, aminoDAHP, and finally ASA. Metabolic engineering strategies in bacteria have been reported for its production, but low yields have been obtained, less than 2% mol ASA/mol Glc, due to the inefficiency of the strains to channel carbon to the pathway and to the competition for the substrate with the SHK pathway.

In this work, a new strategy for the production of ASA from glucose (Glc) is reported in two strains of *Escherichia coli* lacking the PTS system, previously developed in our working group through adaptive evolution in the laboratory (ALE) for the production of compounds. aromatic. The first strain, ASR4, lacks the *pykF aroK* and *aroL* genes to promote the accumulation of ASA, the inactivation of the three DAHP synthase isoenzymes *aroF*, *aroG* and *aroH* allows in principle to avoid substrate competition with the SHK pathway, the inactivation of the *lacI* regulator allows the constitutive expression of genes expressed by lac promoters and derivatives. The second strain called DKLF (*aroK⁻ aroL⁻ pykF*) demonstrated the capacity to produce aromatic compounds similar to ASR4, but conserves *lacI* to regulate the expression of the heterologous genes involved.

In both strains, a synthetic operon was overexpressed in the multicopy plasmid pCR®-XL-TOPO® with synthetic versions of the *ntdC* and *ntdA* genes of *B. subtilis* and *rifH* of *Amycolaptosis mediterranei* for the generation of the aminoDAHP precursor, while the enzymes of the SHK pathways native to *E. coli* complete the ASA synthesis pathway. The transforming strains were named AT1 and DT1, respectively.

Culture supernatants of both strains were analyzed in a ACQUITY QDa mass sensor coupled to a WATERS UPLC system. In both cases, a compound with a molecular mass of 173.22 ± 0.20 Da similar to the theoretical one for aminoshikimic acid of 173.17 Da was found, which was not present in the fresh medium or in culture supernatants with the parental strains.

A study of differential expression by RT-qPCR in the AT1 strain demonstrated the expression of the heterologous genes. In the same study, it was observed that glutamate

metabolism was more active, possibly due to the consumption of this metabolite in the heterologous route. However, low glycolytic activity and in the pentose phosphate pathway were observed, which coincides with a 27% lower specific growth rate. Likewise, low levels of expression of the *tktA*, *zwf*, *aroB*, *aroD* and *aroE* genes were observed, suggesting these as candidates for overexpression.

The AT1 strain presented several drawbacks as a genetic background for production, which is why the DT1 strain was generated, which showed similar performance. On the other hand, the plasmid pTrcAro4 was built, which contains the genes *tktA*, *aroB*, *aroD*, and *aroE* in an operon regulated by a *trc* promoter, which can later be used to avoid possible bottlenecks in some reactions involved in the synthesis of ASA.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Ingeniería de vías metabólicas

Históricamente los microorganismos han sido aprovechados para la generación de productos de utilidad como alimentos fermentados y antibióticos. Actualmente la ingeniería genética, las ciencias ómicas, la bioinformática y la ingeniería de bioprocesos se usan de forma integral para manipular el metabolismo de los microorganismos y así potenciar su capacidad de producción de compuestos de interés; esta área del conocimiento es llamada ingeniería de vías metabólicas (IVM) y es una alternativa sostenible a las tecnologías de producción tradicionales como la síntesis química (Yang et al., 2017).

En la IVM se suele modificar la expresión de enzimas (nativas o heterólogas) con el fin de transformar eficientemente un sustrato a un producto deseado, con la finalidad de desarrollar o mejorar los procesos de producción. Para ese fin se pueden eliminar o sobreexpresar genes, así como adicionar o eliminar regiones reguladoras e incluso mejorar de las actividades enzimáticas mediante ingeniería de proteínas (Choi et al., 2019).

Diversos microorganismos son usados como modelos de producción; sin embargo, el más usado es *Escherichia coli* por las siguientes razones: su genoma y su fisiología han sido ampliamente estudiado, las técnicas de biología molecular para su manipulación están bien establecidas y su tecnología de cultivo se encuentra muy desarrollada. Sin embargo, *E. coli* tiene la desventaja de que algunos metabolitos le pueden resultar tóxicos en alta concentración, por ejemplo, combustibles y compuestos fenólicos (Pontrelli et al., 2018).

1.2 Shikimato

1.2.1 Shikimato y su importancia

El SHK (ácido (3R,4S,5R)-3,4,5-trihidroxi-1-ciclohexen-1-carboxílico) es un ciclohexeno unido a un grupo ácido carboxílico en el carbono 1 y tres grupos hidroxilo unidos a los carbonos 3, 4 y 5 en configuración 3R, 4S, 5R respectivamente (figura 1).

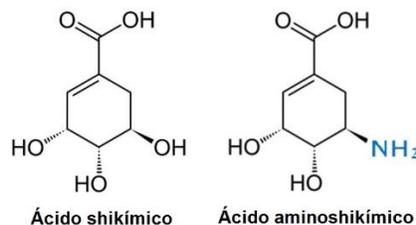


Figura 1. Ácidos shikímico y aminoshikímico.

El SHK es un intermediario en la vía del mismo nombre, cuyo producto, el corismato (COR), es precursor en la síntesis de los tres aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina). La ruta del SHK está presente en bacterias, hongos, plantas y parásitos del grupo apicomplexa, pero no en mamíferos (Díaz Quiroz et al., 2014).

El interés en el SHK se debe a que es un compuesto versátil, precursor de varias moléculas comerciales como anticancerígenos, antitrombóticos, antioxidantes y antibacterianos. También es un atractivo núcleo para ser usado como andamio en el desarrollo de bibliotecas químicas para la generación de nuevos compuestos bioactivos.

El SHK es usado principalmente como precursor en la síntesis de compuestos inhibidores de la neuraminidasa del virus de la influenza, específicamente para la producción del oseltamivir fosfato (OSP o Tamiflu®), compuesto que al día de hoy es una de las pocas opciones disponibles para el tratamiento de la influenza del tipo estacional y pandémicas (Kumar et al., 2020). El OSP actúa deteniendo el ciclo lítico del virus mediante la inhibición de la enzima neuraminidasa, presente en la cápside de los viriones que son sintetizados dentro de la células infectadas. La neuraminidasa escinde la unión entre la hemaglutinina de la cápside viriones y el ácido siálico de los receptores de membrana en la célula infectada, lo que permite a los viriones continuar con su ciclo lítico (Ward et al., 2005).

El SHK es obtenido principalmente por extracción del anís estrella chino, un fruto del árbol *Illicium verum* (Singh et al., 2020). Aproximadamente el 90% de la producción de SHK es usada para la síntesis del OSP. En la década pasada la alta demanda de OSP y por lo tanto de SHK, generó escasez en el mercado mundial, por lo que se han explorado alternativas para su producción (Díaz Quiroz et al., 2014). Dado que el SHK es producido de forma natural por varios microorganismos incluido *E. coli*, su producción biotecnológica usando IVM fue una atractiva alternativa, por lo que varios grupos de investigación desarrollaron cepas sobreproductoras de este compuesto (Martínez et al., 2015). Hoy en día la permanencia y aparición de nuevas variedades de este virus son un riesgo latente, por lo que es necesario disponer de materia prima para la producción de este fármaco y de nuevos análogos con potencial de comercialización (Singh et al., 2020).

1.2.2 Biosíntesis de shikimato

En *E. coli* la ruta del SHK parte de la condensación de fosfoenolpiruvato con eritrosa-4-fosfato (E4P) para generar deshidro-D-arabino-heptulonato-7-fosfato (DAHP), reacción catalizada por las tres isoenzimas de DAHP sintasa (*aroF*, *aroG* y *aroH*), (cuyas actividades

son reguladas por retroalimentación positiva por los aminoácidos Tyr, Trp y Phe, respectivamente) (figura 2). Posteriormente el DAHP es transformado a 3-deshidroquinato (DHQ), seguido de una deshidratación a 3-deshidros hikimato (DHS) y su posterior reducción a SHK, reacciones catalizadas por las enzimas DHQ sintasa (*aroB*), DHQ deshidratasa (*aroD*) y SHK deshidrogenasa (*aroE*), respectivamente. Posteriormente, el SHK es fosforilado a shikimato-3-fosfato (S3P) por las enzimas SHK cinasa I y II (*aroK*, *aroL*), el S3P reacciona con PEP para generar 3-fosfo-5-enolpiruvilshikimato (EPSP) por la enzima EPSP sintasa (*aroA*). Finalmente la enzima corismato sintasa (*aroC*) genera COR desfosforilando al EPSP. El COR se incorpora a las rutas de biosíntesis de específicas de los tres aminoácidos aromáticos.

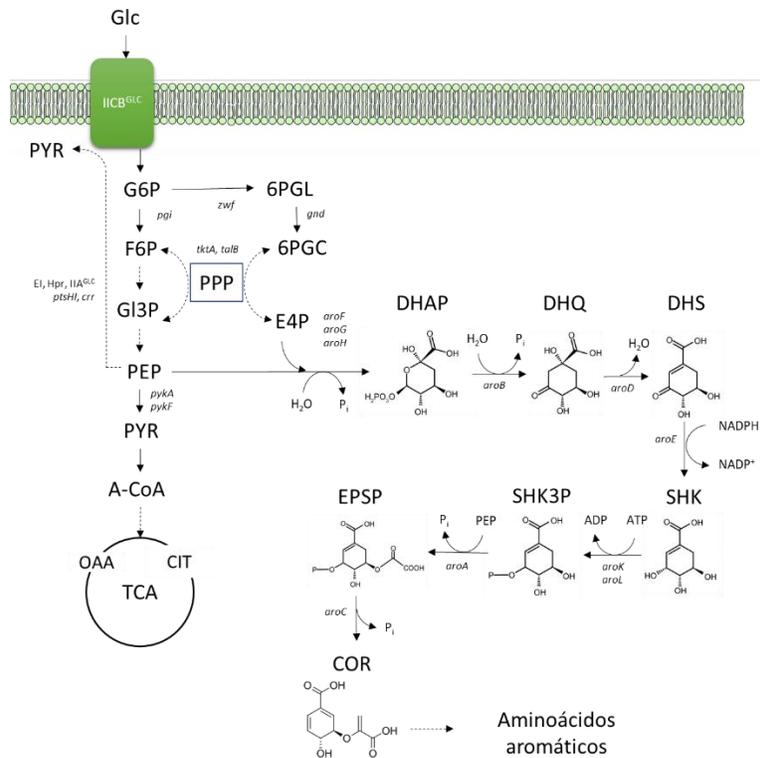


Figura 2. Ruta del SHK en el contexto del metabolismo central de *E. coli* (Adaptado de Escalante et al., 2010). Las líneas punteadas señalan múltiples reacciones enzimáticas; Glc, glucosa; G6P, glucosa-6-fosfato; F6P, fructosa-6-fosfato; G3P, Gliceraldehído-3-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; PYR, piruvato; A-CoA, Acetil coenzima A; OAA, oxalacetato; CIT, citrato; PPP, ruta de las pentosas fosfato; 6PGL, 6-fosfogluconato; 6PGC, 6-fosfogluconolactona; E4P, eritrosa-4-fosfato; DHAP, 3-deoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato; DQH, deshidroquinato; DHS, deshidros hikimato; SHK, shikimato; SHK3P, shikimato-3-fosfato; EPSP, 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato; COR, corismato.

1.2.3 Producción de SHK mediante IVM

Varios grupos de investigación se han enfocado al desarrollo de cepas microbianas capaces de sobreproducir SHK mediante IVM, principalmente en *E. coli* y con Glc como fuente de carbono. Las principales estrategias implementadas se mencionan a continuación:

- Sobreexpresión de las enzimas de la ruta de las pentosas-fosfato (PPP), como la transcetolasa (*tktA*) y la aldolasa (*talB*) para aumentar la disponibilidad de E4P y del cofactor NADPH (Bilal et al., 2018, Rodríguez et al., 2017).
- Se han generado mutantes de *E. coli* con el sistema de fosfotransferasa de Glc dependiente de PEP (PTS) inactivo. Este es el principal sistema de transporte de Glc, mediante la fosforilación y translocación de Glc a partir de PEP generando PYR, esto permite en principio, duplicar la disponibilidad de PEP a expensas de reducir la tasa específica de crecimiento μ (Carmona et al., 2015).
- Para evitar la disminución de la μ en cepas PTS⁻ se han sobreexpresado transportadores de Glc, como la galactosa permeasa (*galP*), el transportador ABC de galactosa MglABC (*mglBAC*) y transportadores heterólogos, como el facilitador de Glc (*glf*) de *Z. mobilis* (Chandran et al, 2003). Asimismo se ha usado evolución adaptativa en laboratorio para obtener cepas mutantes capaces de catabolizar glucosa por otros transportadores, estas cepas han recuperado parcialmente su capacidad de crecimiento (Alva et al., 2020).
- Inactivación de las enzimas que canalizan el PEP hacia el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), como la enzima PEP carboxilasa (*ppC*) y las isoenzimas piruvato cinasa (*pykA*, *pykF*) para aumentar la disponibilidad de PEP (Martínez et al, 2020).
- inactivación de una o ambas isoenzimas de SHK cinasa (*aroK*, *aroL*) para evitar la fosforilación del SHK, con la desventaja de generar auxotrofia a aminoácidos aromáticos (Chandran et al, 2002; Escalante et al, 2010).
- Sobreexpresión de las enzimas de la ruta del SHK para evitar la acumulación de intermediarios (*aroB*, *aroD*, *aroE*) (Rodríguez et al., 2013; Cortes-Totalpa et al, 2014).

- Uso de isoenzimas de DAHP sintasa insensibles a regulación por retroalimentación (Martínez et al., 2015; Rodríguez et al., 2017).
- Optimización de medios de cultivo y condiciones de operación de las fermentaciones (Chandran et al, 2003; Martínez et al, 2019).

El rendimiento más alto de SHK reportado en *E. coli*, se obtuvo con la cepa AR36 con 42% mol SHK/mol Glc (el máximo teórico es de 86% mol/mol) y con títulos de hasta 43 g/L en cultivos en lote y 60 g/L en cultivos en lote alimentado (Martínez et al., 2018) alcanzado productividades de 1.43 y 2.45 g SHK/ L h respectivamente. Mientras que el título más alto reportado es de 83 g/L con un rendimiento de 33% mol SHK/mol Glc en la cepa SP1.1pts/pSC6.090B (Chandran et al., 2003). En 2016 se reportó una cepa de *Corynebacterium glutamicum* desarrollada mediante IVM capaz de producir hasta 141 g/L de SHK con rendimiento del 51% mol SHK/mol Glc en cultivos con células arrestadas, siendo estos los títulos y rendimientos más altos reportados a la fecha (Kogure et al., 2016).

1.3 Aminoshikimato

1.3.1 ASA y su importancia

El ASA [ácido (3R,4S,5R)-5-amino-3,4-dihidroxiciclohex-1-enocarboxílico] es un análogo del SHK, con la diferencia de que en el carbono 5 se sustituye al grupo hidroxilo por un grupo amino (figura 1) (Guo & Frost, 2004). El ASA es un compuesto con gran potencial de aplicación en la investigación e industria, tiene tres centros estereogénicos que pueden ser aprovechados para el desarrollo de bibliotecas de nuevos compuestos bioactivos; por ejemplo, para el desarrollo de inhibidores de la vía del SHK, como la SHK deshidrogenasa o la ESPS sintasa, pues al no estar presente en mamíferos es un blanco atractivo para el desarrollo de antibióticos, antiparasitarios (como *Plasmodium falciparum* causante de la malaria) y de moléculas para control biológico de plagas en agricultura (Hu et al., 2019; Kumar et al., 2020; Pansegrau et al., 1991; Prado et al., 2016; Široký et al., 2020). En la síntesis química del OSP y otros inhibidores de la neuraminidasa, es necesario incorporar un grupo amino en el carbono 5 del SHK, lo que suele requerir de 4 o más etapas de síntesis química y uso de azidas explosiva y tóxicas, por lo que sustituir al SHK por ASA permitiría usar procesos de síntesis de OSP más cortos y más seguros al evitar el uso de azidas (Díaz-Quiroz et al., 2014; Guo & Frost, 2004).

A pesar de la relevancia del ASA, su producción ha sido poco explorada (Mendoza-Flores et al., 2020). El ASA puede ser biosintetizado a partir de la ruta metabólica del mismo

nombre. La ruta del ASA fue elucidada inicialmente en la actinobacteria *Amycolatopsis mediterranei*, aunque es posible que esté presente otras bacterias del género *Amycolatopsis* y *Streptomyces* (Peek & Christendat, 2015). El producto de esta ruta es el aminoHBA (figura 4), un precursor de metabolitos secundarios de las familias de las ansamicinas, mitocinas y salinicetales (Arakawa et al., 2002; Floss et al., 2011). La kanosamina y aminoHBA son otros intermediarios de la vía del ASA y también son compuestos de relevancia pues son precursores de antibióticos y anticancerígenos, por lo que las estrategias de IVM para la producción de ASA también podrían implementarse a la producción de otros compuestos derivados de esta ruta (figura 3).

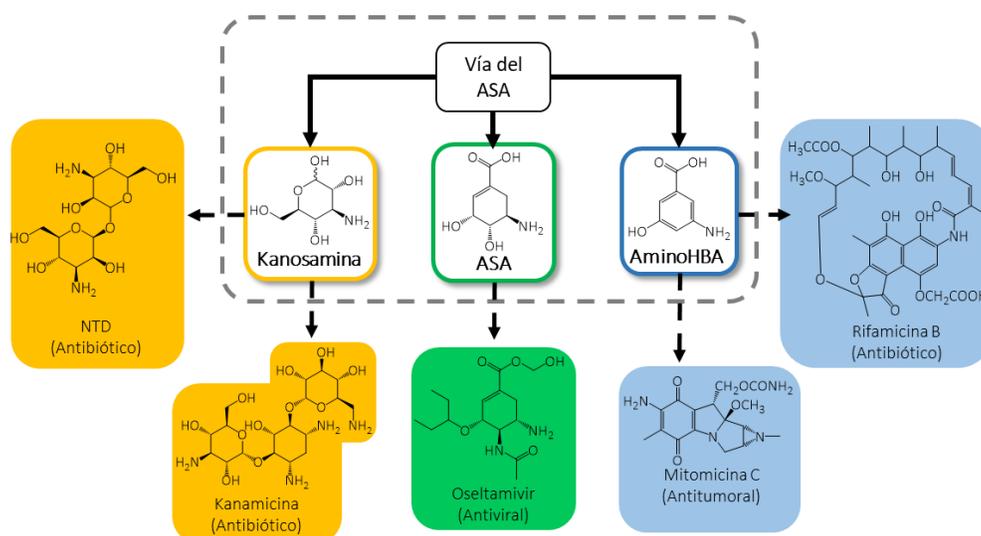


Figura 3. Algunos compuestos de relevancia derivados de la vía del ASA, (Tomada de Mendoza-Flores et al., 2020).

1.3.2 Ruta del ASA

La ruta del ASA en *A. mediterranei* se divide en dos etapas (Arakawa et al., 2002; Floss et al., 2011; Guo & Frost, 2002a, 2002b; Yu et al., 2001). La primera implica la generación de kanosamina a partir de UDP-glucosa y su posterior conversión a 1-imino-eritrosa-4-fosfato (iminoE4P) (figura 4). La segunda etapa comprende la biosíntesis de aminoHBA a partir de iminoE4P con PEP, seguida de una serie de reacciones similares a las de la vía del SHK (figura 5). La dos etapas de la ruta del ASA en *A. mediterranei* se describen a continuación:

- **Etapas de síntesis de iminoE4P.** UDP-glucosa es reducida a UDP-3-ceto-D-glucosa (UDPCG) por acción de una UDP-D-glucosa deshidrogenasa (*rifL*) en una reacción dependiente de NAD^+ , seguida de una transformación a UDP-kanosamina en una reacción catalizada por una UDP-ceto-D-glucosa aminotransferasa (*rifK*) generando

UDP-kanosamina. En esta reacción el grupo amino es cedido por una molécula de glutamina; el grupo UDP es hidrolizado por una UDP-kanosamina fosfatasa (*rifM*) formando kanosamina. La kanosamina es fosforilada por la kanosamina cinasa (*rifN*) rindiendo kanosamina-6-fosfato (K6P) que se isomeriza a 3-amino-3-desoxi-D-fructosa-6-fosfato (aminoF6P) por acción una fosfokanosamina isomerasa; la aminoF6P junto a ribosa-5-fosfato son convertidas a imino-eritrosa-4-fosfato (iminoE4P) y sedoheptulosa-7-Fosfato (S7P) por acción de una transcetolasa (*orf15*).

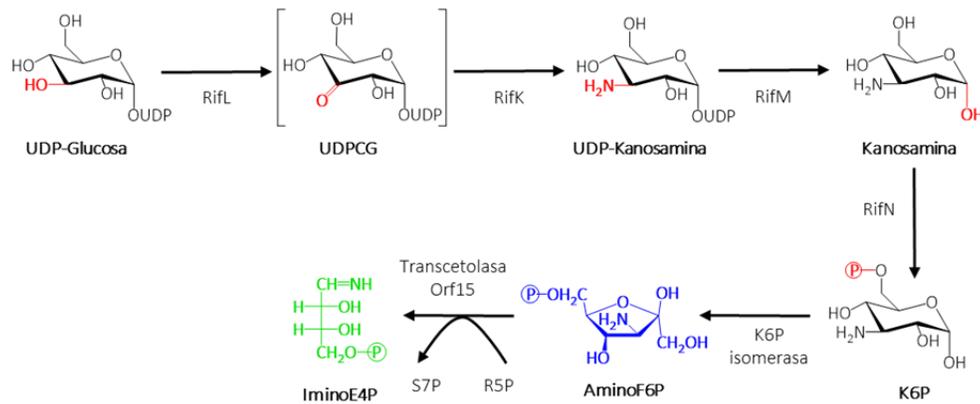


Figura 4. Primera etapa de la vía del ASA en *A. mediterranei*. (Tomada de Mendoza-Flores et al., 2020).

- Etapa de síntesis de aminoHBA.** La iminoE4P es condensada con PEP para formar 4-amino-3,4-didesoxi-D-arabinoheptuloso-7-fosfato (aminoDAHP) en una reacción catalizada por una aminoDAHP sintasa (*rifH*). Posteriormente el aminoDAHP es transformado a 5-amino-5-desoxi-3-deshidroquinato (aminoDHQ) por la aminoDHQ sintasa (*rifG*); el aminoDHQ es deshidratado a 5-amino-5-desoxi-3-deshidroshikimato (aminoDHS) por la enzima aminoDHQ deshidratasa (*rifJ*). Finalmente el aminoDHS es transformado a aminoHBA por la aminoHBA sintasa (*rifK*). En *A. mediterranei* el aminoHBA se incorpora a la ruta de síntesis de la rifamicina B, un antibiótico de la familia de las ansamicinas (Floss et al, 2011).

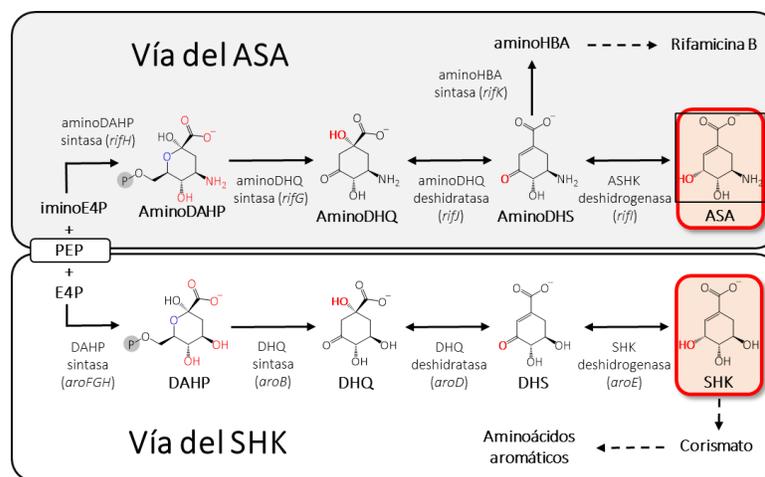


Figura 5. Segunda etapa de la vía del ASA en *A. mediterranei* (abajo) y vía del SHK en *E. coli* (arriba).

El ASA fue originalmente propuesto como un intermediario en la biosíntesis del aminoHBA, aunque después se demostró que el aminoDHS es aromatizado directamente a aminoHBA (Floss, 1997). Actualmente no existe evidencia de que el ASA sea biosintetizado en la naturaleza, aunque sí puede ser obtenido por síntesis química a partir de SHK (Pandresau, 1991). Gou y Frost (2004, 2007) han propuesto varias estrategias para su biosíntesis en bacterias recombinantes aprovechando enzimas de la ruta del ASA, la ruta del SHK y la ruta de producción de producción de kanosamina (sección 2).

En el genoma de *A. mediterranei* los genes que codifican a las enzimas de la ruta del ASA se encuentran en un clúster denominado *rif*. El gen *rifJ* codifica para una enzima con actividad ASA deshidrogenasa que puede reducir aminoDHS a ASA en una reacción dependiente de NADPH (Floss et al., 2011; Guo & Frost, 2004). Sin embargo, su papel en el metabolismo no es conocido, pues no participa en la ruta de biosíntesis de ansamicinas; se ha propuesto que esta enzima pueda ser una aminoquinato deshidrogenasa, una SHK deshidrogenasa o que su papel sea limitar el flujo de carbono hacia la ruta de biosíntesis de ansamicinas compitiendo con la síntesis de aminoHBA (Yu et al., 2001).

1.3.3 Ruta de biosíntesis de kanosamina

La kanosamina (3-amino-3-desoxi-D-glucosa) es un antibiótico glucosídico débil, es producida naturalmente por algunos microorganismos de los géneros *Bacillus* y *Streptomyces*. La ruta de la kanosamina fue elucidada en *B. pumillus* y *A. mediterranei* (Arakawa et al., 2002; Milner et al., 1996). Recientemente se ha reportado en *Bacillus subtilis* una ruta de producción alternativa, en la que la kanosamina aparece como un

intermediario en la ruta de producción del antibiótico 3,3'-neotrehalosdiamina (NTD) (Vetter et al., 2013).

En la ruta del NTD la glucosa-6-fosfato es oxidada a 3-ceto-3-desoxi-D-glucosa-6-fosfato (3CG6P) por acción de la enzima 3CG6P deshidrogenasa (*ntdC*) en una reacción dependiente de NAD⁺. La 3CG6P es posteriormente transformada a kanosamina-6-fosfato (K6P) por acción de 3CG6P aminotransferasa (*ntdA*). En esta reacción el grupo amino es cedido por el L-glutamato que es transformado a 2-oxoglutarato en una reacción de aminotransferencia. La K6P es posteriormente transformada a kanosamina por la kanosamina sintasa (*ntdB*), para continuar la ruta de producción de NTD (figura 6).

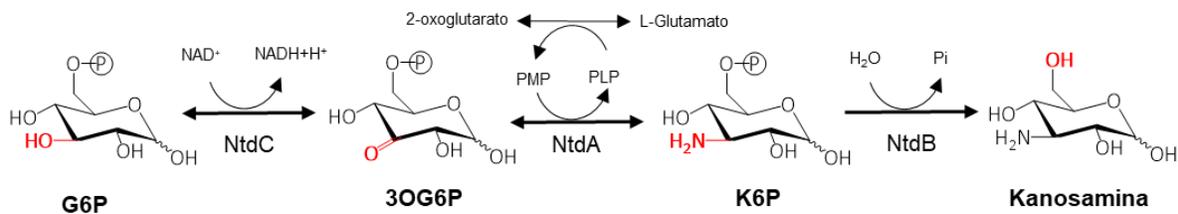


Figura 6. Síntesis de kanosamina en *B. subtilis* (van Straaten et al., 2013).

Con fines de producción de ASA, la ruta de *B. subtilis* resulta más atractiva de usarse en un hospedero heterólogo pues sólo son necesarias dos enzimas para generar K6P (*ntdC* y *ntdA*) y no requiere de UDP-glucosa, cuya síntesis requiere reacciones enzimáticas adicionales (figura 7).

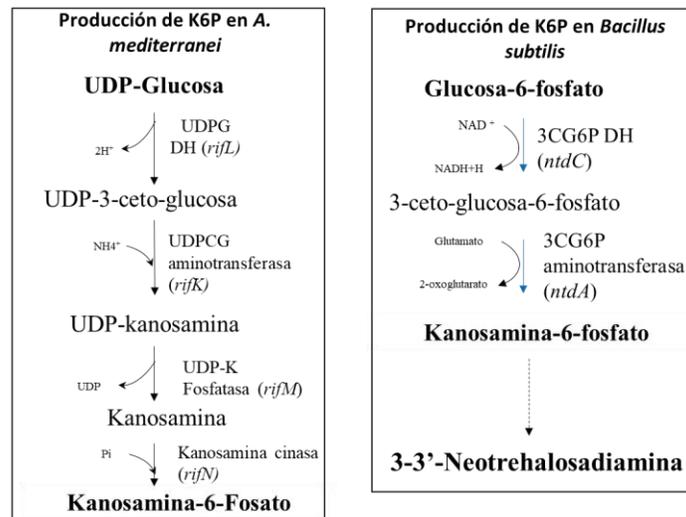


Figura 7. Síntesis de K6P en *A. mediterranei* y *B. subtilis* (Guo & Frost, 2002a, 2002b; Vetter et al., 2013).

2. ANTECEDENTES

2.1 Producción de ASA a partir de Glc

Gou y Frost han biosintetizado ASA a partir de Glc en microorganismos. En un primer reporte obtuvieron 0.04 g/L de ASA en *A. mediterranei* mediante la sobreexpresión en plásmido del gen *rifI* con un rendimiento de 0.4% mol ASA/mol Glc y 1.4 g/L de rifamicina B (Guo & Frost, 2004).

En el mismo trabajo los autores reportaron una segunda estrategia mediante un cultivo en dos etapas. En la primera se utiliza una cepa silvestre de *B. pumillus* como productora de kanosamina, después la cepa recombinante *E. coli* SP1.1/ pTS.166A la transforma a ASA. Esta cepa tiene las isoenzimas de SHK cinasa inactivadas (*aroKL*⁻), además sobreexpresa los genes que codifican para SHK deshidrogenasa (*aroE*), transcetolasa (*tktA*) y aminoDAHP sintasa (*rifH*) en el plásmido pTS.166A y el gen de Glc cinasa (*glk*) en el plásmido pJG6.181B (usado para fosforilar a la kanosamina). Con esta estrategia se produjeron 1.1 g/L de ASA, con un rendimiento global de 5% y de 3.4 g/L de SHK (tabla 1). Esta estrategia demuestra que no todas las enzimas heterólogas son necesarias para la síntesis de este compuesto, pudiendo sustituirlas por las de la vía del SHK, específicamente las que catalizan las siguientes reacciones: conversión de K6P a iminoE4P por acción de la transcetolasa (*tktA*), conversión de aminoDAHP a aminoDHQ por la enzima DHQ sintasa (*aroB*), conversión de la aminoDHQ a aminoDHS por la enzima DHQ deshidratasa (*aroD*) y conversión de aminoDHS a ASA por la SHK deshidrogenasa (*aroE*).

Un proceso de producción en varias etapas requiere de operaciones intermedias de separación, por lo que es deseable generar este compuesto en una sola fermentación. Gou y Frost en 2007 desarrollaron la cepa recombinante *E. coli* SP1.1/ pJG11.233 capaz de producir ASA en una sola etapa. Esta cepa contiene el plásmido pJG11.233 con los genes *rifH*, *aroE*, *serA* y *tktA*, además de los genes de producción de kanosamina de *B. subtilis*: *ntdC*, que codifica para 3CG6P deshidrogenasa y *ntdA*, que codifica para 3CG6P aminotransferasa, para generar K6P [*ntdC* y *ntdA* fueron llamadas inicialmente *yhjJ* y *nyhjL* (Inakota et al, 2003)]. La K6P que es convertida en iminoE4P por la Glc-6-fosfato isomerasa (*pgi*) y transcetolasa (*tktA*) nativas de *E. coli*. Una aminoDAHP (*rifH*) heteróloga condensa la iminoE4P con PEP para generar aminoDAHP que es transformado a ASA aprovechando los genes nativos de *E. coli* de la ruta del SHK. Con esta estrategia se produjeron 0.06 g/L de ASA y 3.10 g/L de SHK (tabla 1).

En 2018, Nisthala, sobreexpresó los genes *ntdC*, *ntdB* y *ntdA* de *B. subtilis* en la cepa *E. coli* SP1.1/pSN1.292 obteniendo 8 g/L de kanosamina y 10.8 g/L de SHK sin ASA. Se sabe que la kanosamina es transformada a iminoE4P que tiende a hidrolizarse rápidamente a E4P, el cual después es convertido a DAHP. Lo que nos lleva a pensar que para la producción en *E. coli* de ASA sobreexpresar una aminoDAHP sintasa evitaría la hidrólisis de la iminoE4P y así canalizarla hacia la producción de ASA, mientras que inactivar las isoenzimas de DAHP sintasa evitaría la síntesis de DAHP e intermediarios de la vía del SHK.

Tabla 1. Cepas reportadas para la producción de ASA.

Cepa	Genotipo	Condiciones de cultivo	Título	Rendimiento	Referencia
			(g/L)	% (mol ASA/mol Glc)	
<i>A. mediterranei</i> ATCC 21789/pJG8.219 A	ATCC 21789 amy/ <i>rifI</i>	Cultivo en fermentador en medio adicionado con 32 g/L de harina de soya y 7.5 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄	0.2	0.04	Gou & Frost., 2004
<i>E. coli</i> SP1.1/pJG6.181 B	RB791 <i>serA::aroB</i> <i>aroL::Tn10</i> <i>aroK::CmR tac/ rifH</i> <i>aroE serA tktA glK</i>	Cultivo lote alimentado en medio mínimo con Glc y kanosamina	1.1	0.19	Gou & Frost., 2004
<i>E. coli</i> SP1.1/pJG11.26 5	RB791 <i>serA::aroB</i> <i>aroL::Tn10</i> <i>aroK::CmR tac/</i> <i>yhjJ yhjL rifH aroE</i> <i>serA tktA</i>	Medio mínimo en fermentador con 10 g/l de (NH ₄) ₂ SO ₄	0.06	NR	Gou & Frost., 2007

2.2 Cepas de *E. coli* PTS⁻ para la producción de compuestos aromáticos

Los compuestos aromáticos son de gran relevancia para las industrias química, de alimentos, polímeros, farmacéutica, entre otras y su producción mediante IVM en bacterias es una atractiva alternativa a las tecnologías actuales basadas en derivados del petróleo (Huccetogullari et al., 2019; Rodríguez et al., 2014). En nuestro grupo de investigación, liderado por el Dr. Francisco Bolívar, se han desarrollado cepas de *E. coli* sobreproductoras de compuestos aromáticos cuya principal característica es que tienen inactivado el PTS y transportan a este azúcar a través de otros sistemas de transporte alternativos, Estas cepas denominadas PTS⁻ Glc⁺ han sido obtenidas por ALE (Alva et al., 2020).

El PTS transporta y fosforila simultáneamente una molécula de Glc a expensas de una molécula de PEP como donador de P_i, generando G6P y piruvato, con lo cual consume una de las dos moléculas de PEP generadas por el catabolismo de una molécula de Glc en las

glucolisis. Teóricamente la inactivación del PTS permitiría disponer de dos moléculas de PEP que podrían ser canalizadas a la ruta del SHK. En la practica, la inactivación del sistema PTS disminuye la μ en más del 85% pues es el principal sistema de transporte de Glc (Alva et al, 2020).

En nuestro grupo se desarrolló la cepa *E. coli* PB12 (PTS⁻ Glc⁺) mediante la inactivación cromosomal del operón *ptsHlcr* a la cepa silvestre JM101 ($\mu=0.70$ h⁻¹), resultando en la cepa PB11 ($\mu=0.10$ h⁻¹), esta cepa fue sometida a ALE usando un cultivo tipo lote-quimiostato usando Glc como sustrato y la tasa de dilución como presión de selección. A la 120 horas de cultivo se aisló la cepa PB12, que mostró una μ de 0.40 h⁻¹ (Aguilar et al., 2012).

La secuenciación del genoma de PB12 demostró que, entre otras mutaciones, se perdió una región cromosomal de 10.3 kb que incluye los genes *rppH*, *mutH* y *galR*. Los estudios de expresión diferencial demostraron que la ausencia del regulador GalR (codificado por *galR*) desregula a la permeasa de galactosa (GalP, codificado por *galP*) que actúa como principal transportador de Glc. De forma adicional RppH, codificado por *rppH* (mRNA pirofosfodihidrolasas) inicia la degradación de mRNA de genes glucolíticos, por lo que su eliminación aumenta el tiempo de vida medio de sus transcritos, siendo estas las razones de la recuperación parcial de la μ de la PB12 (N. Flores et al., 2005) . El gen *mutH* codifica para una endonucleasa del sistema MutHLS involucrada en la reparación de mutaciones, por lo que se piensa que su pérdida genera una alta tasa de mutaciones en la cepa PB12 (Carmona et al, 2020; Aguilar et al., 2018).

La cepa PB12 se ha usado para la producción de aminoácidos aromáticos y otros compuestos aromáticos (Carmona et al., 2012). También fue usada como fondo genético para el posterior desarrollo de una serie de cepas productoras de SHK, concluyendo con la cepa AR36 (figura 8) (Escalante et al., 2010; Rodríguez et al, 2013). Para el desarrollo de AR36 se realizaron las siguientes modificaciones genéticas en PB12:

- Inactivación de *aroK* y *aroL*. La inactivación de las isoenzimas SHK cinasa I y II evitan la fosforilación de SHK a S3P, promoviendo la acumulación del primero pero generar auxotrofia a aminoácidos aromáticos. El uso de extracto de levadura (YE) en cultivos con las mutantes soluciona esta desventaja y les permite conservar su μ (Rodríguez et al., 2017).

- La inactivación de la isoenzima piruvato cinasa II (*pykF*) permite canalizar más carbono a la vía del SHK a partir de PEP (Escalante et al., 2010).
- Inactivación del represor *lacI*. Este gen codifica para LacI, el represor del operón de lactosa, su inactivación permite la expresión constitutiva de genes regulados por el promotor *trc*.

La cepa resultante de las inactivaciones descritas fue denominada como AR3, la cual fue posteriormente transformada con el plásmido pTrcAro6 que posee un operón denominado “aro6” que incluye los genes *tktA*, *zwf*, *aroG^{fbr}*, *aroE*, *aroB* y *aroD*, regulado por un promotor *trc*. La cepa resultante fue denominada AR36. Los genes sobreexpresados promueven la síntesis de SHK:

- *tktA*. Codifica para la transcetolasa I, que permite canalizar más carbono hacia la síntesis de E4P en la PPP.
- *zwf*. Codifica para la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que aumenta el flujo de carbono hacia la ruta de las pentosas fosfato, lo que permite mayor generación de E4P; además promueve la generación de NADPH, que es aprovechada en la conversión de DHS a SHK.
- *aroG^{fbr}*. Codifica para la enzima DAHP sintasa insensible a inhibición por retroalimentación y permite la sobreproducción de DAHP en presencia de aminoácidos aromáticos.
- Los genes *aroE*, *aroB*, *aroD* codifican para las enzimas SHK deshidrogenasa, DHQ sintasa y DHQ deshidratasa, respectivamente, evitando cuellos de botella en las reacciones de la vía del SHK.

La cepa AR36 produjo 43 g/L de SHK con un rendimiento de 0.42 mol/mol en un cultivo en lote de 1 L durante fermentaciones de 30 horas, usando 100 g/L de Glc como fuente de carbono y 30 g/L de YE. En cultivos en lote alimentado se han alcanzado hasta 60 g/L manteniendo el rendimiento (Martínez et al., 2018).

Dos cepas PTS⁻ Glc⁺ fueron usadas en este trabajo: ASR4 y DKLF; la primera es resultado de la inactivación de las tres isoenzimas de DAHP sintasa en la cepa AR3; la segunda, DKLF, deriva de la cepa SB24 que fue obtenida en un experimento de ALE distinto al de PB12. DKLF mostró un fenotipo de crecimiento en Glc similar a PB12 pero con menor tasa de mutaciones (Carmona et al., 2020). Para evaluar su capacidad de producción de SHK

se le han realizado modificaciones similares a las AR36, a excepción de la inactivación de *lacI*, resultando en la cepa DKLF con genotipo *aroKL⁻ pykF⁻*. Su posterior transformación con el plásmido pTrcAro6 le permitió obtener casi 10 g/L de SHK, con un rendimiento de 0.47 mol/mol, 12% más alto al reportado previamente con la cepa AR36 en condiciones de fermentación similares (Rodríguez, Daniel, 2020).

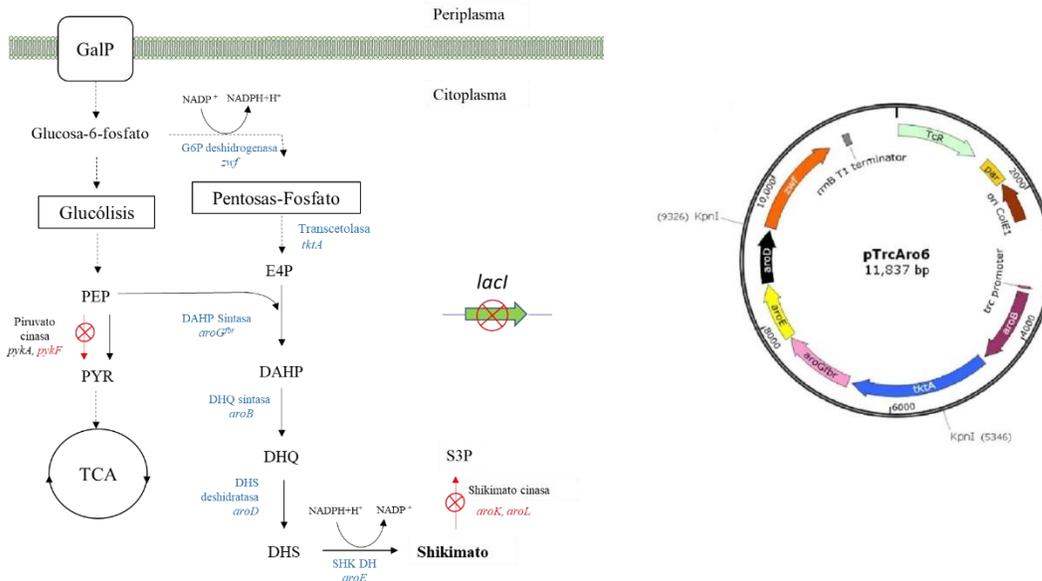


Figura 8. Estrategia usada por Rodríguez et al en 2014 para sobreproducir SHK en la cepa *E. coli* AR36 (izquierda). Mapa del plásmido pTrcAro6 (derecha). Los genes marcados en azul fueron sobreexpresados, mientras que los genes marcados rojo fueron inactivados. PEP, fosfoenolpiruvato; PYR, piruvato; E4P, eritrosa-4-fosfato; DHAP, 3-deoxi-D-arabinoheptulosa-7-fosfato; DHQ, deshidroquinato; DHS, deshidroshikimato; SHK3P, shikimato-3-fosfato.

3. JUSTIFICACIÓN

El OSP es uno de los pocos antivirales para el tratamiento de la influenza disponibles actualmente. Los procesos actuales de producción de OSP parten de SHK y suelen requerir de 10 o más etapas de síntesis; 4 de estos pasos son necesarios para incorporación de un grupo amino en el carbono 5 de la molécula e involucran el uso de azidas explosivas (Gou & Frost, 2007). El ASA es un análogo del SHK que incorpora al grupo amino en el carbono 5, por lo que es un potencial precursor del OSP.

Las estrategias de biosíntesis de ASA reportadas a la fecha han reportado bajos títulos y rendimientos (hasta 1.1 g/L de ASA, con un rendimiento global de 5% mol ASA/mol Glc) así como producción indeseada de compuestos de la vía del SHK. En nuestro grupo de trabajo se han desarrollado cepas de *E. coli* PTS⁻ productoras de compuestos aromáticos que son fondos genéticos con potencial de producción de ASA.

En este documento se presenta una nueva estrategia de biosíntesis de ASA que consiste en sobreexpresar las enzimas codificadas por los genes *ntdC* y *ntdA* de *B. subtilis* y *rifH* de *A. mediterranei*, que codifican para las enzimas gluocosa-6-fosfato-3 deshidrogenasa, 3-oxo-gluocosa-6-fosfato:glutamato aminotransferasa y aminoDAHP sintasa, respectivamente, por primera vez en cepas de *E. coli* PTS⁻ de nuestro laboratorio.

4. HIPÓTESIS

La expresión en plásmido de los genes sintéticos *ntdC*, *ntdA* y *rifH* en cepas de *E. coli* PTS⁻ Glc⁺ productoras de compuestos aromáticos permitirá la biosíntesis de ASA en sistemas de fermentación.

5. OBJETIVO GENERAL

Producir, identificar y cuantificar ASA en cepas de *E. coli* PTS⁻ Glc⁺ a partir de la expresión en plásmidos de los genes sintéticos *ntdC*, *ntdA* y *rifH*.

6. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obtención y verificación de los fondos genéticos de *E. coli* ASR4 y DKLF.
- Construir los plásmidos de expresión pTOPOaminoSA1, pACYCaminoSA1 y pTrcAro4 y secuenciar las construcciones.
- Transformar a las cepas ASR4 y DKLF con el plásmido pTOPOaminoSA1 y evaluar su capacidad de producción de ASA y compuestos aromáticos en sistemas de fermentación.
- Desarrollar un método para la identificación y cuantificación de ASA usando en UPLC acoplado a sensor de masas.
- Verificar la expresión de los genes heterólogos *ntdC*, *ntdA* y *rifH* mediante RT-qPCR y realizar un estudio de expresión diferencial en genes del metabolismo central mediante la misma técnica.
- Transformar a las cepas productoras de ASA con el plásmido pTrcAro4 y evaluar su efecto sobre la producción del compuesto de interés.
- Evaluar la capacidad de producción de ASA de todas las cepas generadas en cultivos en matraz.

7. MATERIALES Y MÉTODO

7.1 Estrategia de producción de ASA

Se propuso originalmente sobreexpresar en la cepa ASR4 los genes *ntdC* y *ntdA* de *B. subtilis* para la síntesis de K6P y el gen *rifH* de *A. mediterranei*, para aminoDAHP, además de los genes *tktA*, *aroB*, *aroD* y *aroE* nativos de *E. coli* para completar la ruta heteróloga y evitar cuellos de botella en el vía de síntesis. A continuación se detalla la ruta heteróloga de biosíntesis de ASA propuesta en este trabajo (figuras 9 y 10):

- Etapa de síntesis de iminoE4P: La glucosa-6-fosfato es transformada a 3CG6P por la enzima 3CG6P deshidrogenasa de *B. subtilis* (*ntdC*) y después convertida a K6P por la enzima 3CG6P aminotransferasa (*ntdA*). Posteriormente la K6P se isomeriza a aminoF6P por la glucosa-6-fosfato isomerasa nativa de *E. coli* (*pgi*), para ser convertida a iminoE4P por la transcetolasa nativa de *E. coli* (*tktA*), transformando también ribosa-5-fosfato en sedoheptulosa-7-Fosfato.
- Etapa de síntesis de ASA. La iminoE4P y PEP son condensados a aminoDAHP por la enzima aminoDAHP sintasa de *A. mediterranei* (*rifH*),. Posteriormente el resto de los genes de la vía del SHK de *E. coli* *aroB*, *aroD* y *aroE* catalizan la síntesis de ASA a partir de aminoDAHP:

Se planteó colocar los genes *ntdC*, *ntdA* y *rifH* en un operón sintético para su expresión en el plásmido. pACYCmod. Derivado de pACYC184a con la región del promotor, sitio múltiple de clonación y terminador de pTrc99A (figura 10). También se propuso la expresión de un segundo plásmido llamado pTrcAro4 con los genes *tktA*, *aroD*, *aroB* y *aroE* en un operón llamado aro4 clonado en un plásmido pTrc99A carente de *lacI* (figura 10).

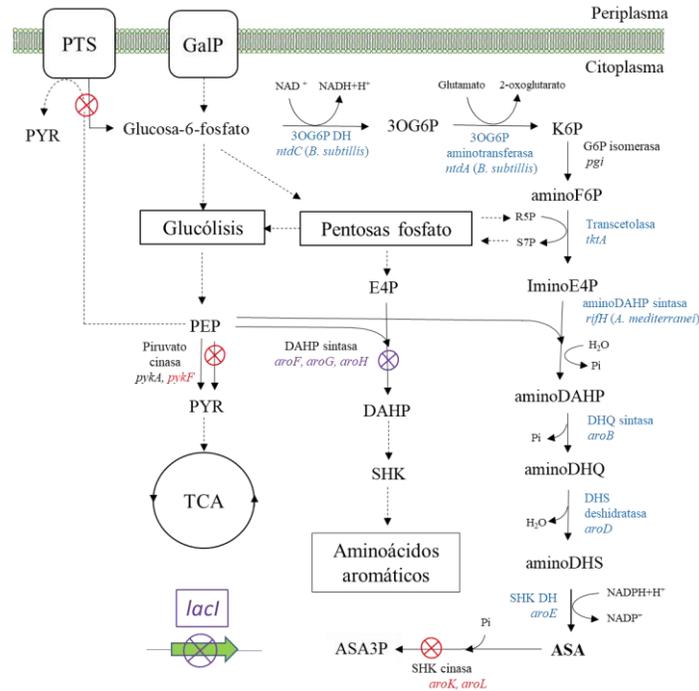


Figura 9. Metabolismo de las cepas productoras de ASA de acuerdo con la estrategia original propuesta en este trabajo. E4P, eritrosa-4-fosfato, DAHP, 3,4-didesoxi-D-arabinoheptulose-7-fosfato; SHK, shikimato; TCA, ciclo de los ácidos tricarbóxicos; PEP, fosfoenolpiruvato, PYR, piruvato, 3OG6P, 3-oxoglucosa-6-fosfato; K6P, kanosamina-6-fosfato, aminoF6P, aminofruktosa-6-fosfato; iminoE4P, iminoeritrosa-4-fosfato; aminoDAHP, 4-amino-3,4-didesoxi-D-arabinoheptulose-7-fosfato; aminoDHQ, aminodeshidroquinato; aminoDHS, aminodeshidroshikmato, ASA, aminoshikimato.

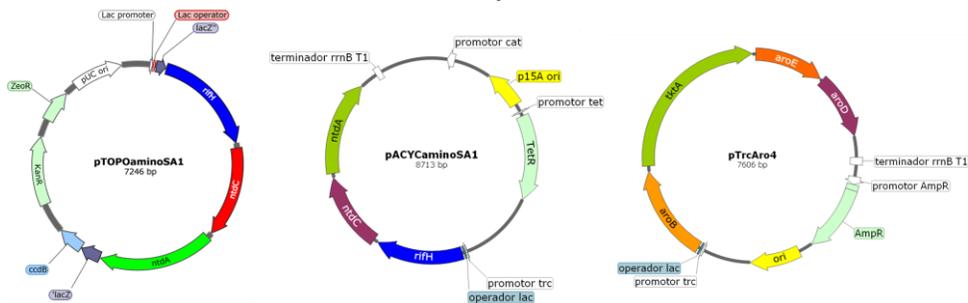


Figura 10. Plásmidos pTOPOaminoSA1 (izquierda), pACYCaminoSA (centro) y pTrcAro4 (derecha).

7.2 Verificación del genotipo y fenotipo de las cepas

Se verificó la auxotrofia a aminoácidos aromáticos de las cepas monitoreando el crecimiento de las cepas hasta las 24 horas, en medio mínimo M9 y en medio rico LB partiendo de una DO_{600nm} igual a 0.1.

Las inactivaciones genéticas en *E. coli* ASR4 fueron verificadas por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) usando oligonucleótidos internos previamente diseñados

en nuestro grupo (Rodríguez et al., 2013). Las inactivaciones en DKLF fueron verificadas por PCR punto final usando los oligonucleótidos previamente reportados por Rodríguez en 2020. Para ver una lista de oligonucleótidos usados en este trabajo ver el anexo 2.

7.3 Construcción de los plásmidos de expresión

7.3.1 Plásmidos pTOPOaminoSA1 y pACYCaminoSA1

Previo a este trabajo, se ordenó a la compañía DNA 2.0 (ahora ATUM; www.atum.bio) la síntesis de un operón sintético con los genes necesarios para la producción de ASA. Este operón, nombrado “aminoSA”, incluye los siguientes genes: *ntdC* (3CG6P deshidrogenasa), *ntdA* (3CG6P aminotransferasa), *tktA* (trancetolasa), *rifH* (aminoDAHPS sintasa), *aroD* (DHQ sintasa), *aroB* (DHQ deshidratasa) y *aroE* (SHK deshidrogenasa). El operón de 8.7 kb fue clonado en el sitio múltiple de clonación del plásmido pTrc327par de 4.5 kb, resultando en una construcción de 13.06 kb que no fue se pudo transformar en ninguna cepa de *E. coli* de nuestro laboratorio, debido posiblemente al alto peso molecular. Se recuperó por PCR la región del operón con los genes heterólogos (*rifH*, *ntdC* y *ntdA*) y se clonó en el plásmido pCR®-XL-TOPO® generando una construcción llamada pTOPOaminoSA1 (figura 11).

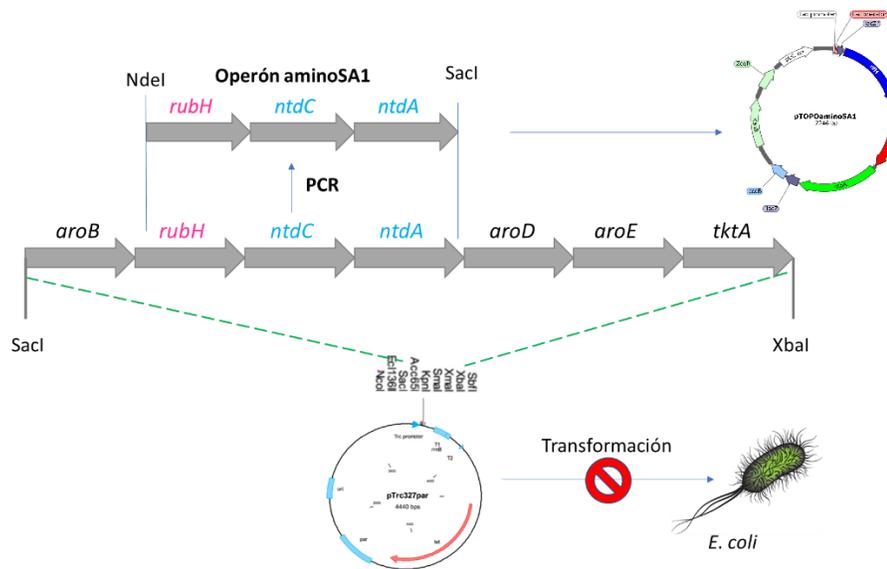


Figura 11. Recuperación por PCR del operón aminoSA1

El operón aminoSA1 fue amplificado por PCR, se clonó en un plásmido pCR-XL-TOPO y se transformó en cepas DH5α para su posterior almacenamiento en ultracongelación. Posteriormente el operón aminoSA1 fue amplificado por PCR usando oligonucleótidos que

tiene sitios de restricción en los extremos para la enzimas NdeI y SacI, así como regiones espaciadoras para permitir la posterior ligación en el plásmido pACYCmod. Para la ligación se usó una proporción 3:1 de operón (Inserto) con respecto a plásmido (vector). La mezcla se incubó durante 1 hora a 22°C con ADN ligasa T4. El producto de ligación fue usado para transformar, por electroporación a células de *E. coli* DH5α que posteriormente fue cultivada en placa durante 12 h usando medio LB adicionado con el antibiótico tetraciclina como marcador de selección. Se seleccionaron colonias candidatas y se inocularon en medio líquido LB con tetraciclina, se incubó por 12 horas. Se realizó miniprep y restricción con las enzimas NdeI y SacI para verificar el resultado de ligación. Se recuperaron 500 µL de los cultivo saturados y se almacenaron en glicerol 40% en ultracongelación (-70°C).

7.3.2 pTrcAro4

Para la construcción del plásmido pTrcAro4 (*aroB*, *tktA*, *aroE* y *aroD*) fue necesario eliminar la enzima *aroG^{Fbr}* del plásmido pTrcAro5 (*aroB*, *tktA*, *aroG^{Fbr}*, *aroE* y *aroD*), el cual fue anteriormente construido en nuestro grupo con fines de producción de SHK. Se diseñaron y sintetizaron dos oligonucleótidos que permitiesen amplificar por PCR al plásmido pTrcAro5 pero dejando fuera al gen *aroG^{Fbr}*. A estos oligonucleótidos se le agregaron sitios de restricción XhoI en los extremos 5' y 3' para facilitar la posterior recircularización del producto con la ADN ligasa T4, se eligió a la enzima XhoI cuyo sitio de restricción sólo está presente el gen *aroG^{Fbr}* pero no en el resto del plásmido pTrAro5. A los oligonucleótidos se agregaron regiones espaciadoras en 5' para facilitar la unión de la enzima de restricción. Para la amplificación se utilizó la ADN polimerasa Phusion® High-Fidelity usando una T_A igual a 72°C (PCR de dos etapas). El producto de PCR fue separado por electroforesis en gel de agarosa al 1%, posteriormente fue recuperado usando el kit de purificación desde banda QIAquick Gel Extraction Kit, fue digerido con la enzima XhoI y recircularizado con la enzima ADN ligasa T4 incubando a 22°C por una hora. El producto de ligación se usó para transformar por electroporación a una cepa de *E. coli* DH5α y se almacenó en glicerol 40% en ultracongelación (-70°C).

7.4 Secuenciación de las construcciones

La integridad de los todos los operones y las mutaciones cromosomales en las fondos genéticos fueron verificadas mediante secuenciación tipo Sanger en un equipo 3730 DNA Analyser Perkin-Elmer Applied Biosystems que genera lecturas de entre 600 y 900 pb. Para esto se sintetizaron una serie de pares de oligonucleótidos que permitieran secuenciar la región deseada en su totalidad, considerando que en promedio se pueden secuenciar 700

pb y dejando una región de homología de entre 50 y 100 pb para posteriormente realizar un ensamble de las lecturas. Se diseñaron y sintetizaron pares de oligonucleótidos necesarios para generar amplicones de aproximadamente 1.4 kb que cubrían toda la región a secuenciar, se dejaron regiones de solape de entre 50 a 100 pb de bases, los productos de PCR fueron secuenciados en dirección 3' (Fw) y 5' (Rv) con los mismos oligonucleótidos. Finalmente las lecturas resultantes fueron ensambladas para reconstruir la secuencia.

Se amplificaron productos de PCR usando cada uno de los pares de oligonucleótidos, obteniendo productos de PCR de entre 1.3 y 1.6 kb, los productos fueron cortados del gel y recuperados con el kit GeneJET Gel Extaction. Para la secuenciación se tomaron de 80 a 120 ng de cada producto de PCR y se agregaron 10 ng de oligonucleótido Fw o Rv y se aforó en un volumen final de 16 µl de agua libre de nucleasas.

La secuenciación fue realizada por la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBt-UNAM. Los resultados de la secuenciación fueron generados como archivos con extensión.ab1 que incluyen el electroferograma, la secuencia y valores de calidad. La calidad se verificó considerando valores mayores a 25. El ensamble se realizó manualmente aprovechando la región de solape entre las lecturas. Las secuencias resultantes fueron comparadas por alineamiento con la secuencia de referencia usando el software en línea MUSCLE. Para la visualización se usó el programa SnapGene® 1.1.3.

7.5 Transformaciones

Todas las transformaciones se realizaron por electroporación. El primer paso consistió en la preparación de células electrocompetentes. Para esto se tomó una asada de la cepa parental criopreservada y se cultivó en medio YENB o LB hasta la saturación (entre 12 y 18 horas aproximadamente). Posteriormente se realizó un cultivo en matraz de 50 ml en medio YENB o LB y cuando el cultivo se encontró en fase exponencial temprana (0.4 a 0.8 DO_{600nm}) se realizaron tres lavados sucesivos con agua mili-Q y un lavado con una solución de glicerol en agua al 10%, se centrifugaron las células suspendidas por 5 minutos a 8 000 rpm, y se decantó el medio y se resuspendieron las células entre cada lavado, las células fueron almacenadas en ultracongelación hasta la transformación.

Las células electrocompetentes fueron transferidas a una celda de electroporación junto a 3 µL del extracto plasmidico deseado. Las células fueron electroporadas a 2500 mV y después transferidas a un tubo con 1 ml de medio SOC o medio de producción de SHK (tabla 2), para su recuperación a 37°C en un tiempo de entre 1 a 4 horas. Posteriormente las células fueron inoculadas con perlas en placas con medio rico (LB o medio de

producción) e incubadas por 18 horas. Después se seleccionaron colonias y fueron transferidas a medio líquido para su posterior por entre 18 o 12 horas. Finalmente las transformaciones fueron verificadas mediante reacciones de restricción, PCR y secuenciación.

Las cepas ATA y DTA se construyeron transformando a las cepas ASR4 y DKLF con el plásmido pTOPOaminoSA1 (anexo 2). Todas las transformaciones se realizaron por electroporación. La comprobación se realizó por digestión con enzimas de restricción y por PCR. Se construyó la cepa *E. coli* ASR45 transformando a la cepa *E. coli* ASR4 con el plásmido pTrcAro5 mediante la misma metodología.

7.6 Evaluación de las cepas en cultivos en matraz

Se realizaron cultivos en matraz con las cepas ASR4, ASR45, DKLF, AT1 y DT1, todos los cultivos se realizaron en un medio base mineral, usando como sustrato 20 g/L de Glc y 15 g/L de extracto de levadura, suplementado con metales traza, vitamina B1 y los antibióticos correspondientes (tabla 2, figura 12). Este medio ha sido usado previamente para la producción de SHK en nuestro grupo (Cortés-Tolalpa et al., 2014).

Todos los cultivos se realizaron al menos por triplicado. Las condiciones de operación en matraz fueron las siguientes: $T=37^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}_{\text{inicial}}=7$, $\Omega=300$ rpm, $t=50$ horas, $V=50$ mL.

Para realizar los cultivos se tomó una asada del vial criopreservado de la cepa y se depositó en un tubo de ensayo con 3 mL de medio de producción adicionado con los antibióticos correspondientes y se incubó hasta la saturación (12 h para DKLF y ASR4; 18 h para ASR45, AT1 y DT1). Del cultivo saturado se obtuvo un inóculo depositando 1 mL del cultivo saturado en un matraz bafleado de 250 mL con 50 mL del medio de producción, se incubó hasta que el cultivo alcanza una fase exponencial temprana ($\text{DO}_{600\text{ nm}}$ entre 3 y 5). En esta etapa, se inocula al reactor el volumen de cultivo necesario para iniciar el cultivo con una DO igual a 0.1.

Se tomaron muestras para determinar el perfil de biomasa y metabolitos durante la fermentación (sólo en las cepas ASR4, DKLF y ASR45), cada 1 o 2 horas, desde el inicio hasta el final de la fermentación a las 50 horas. La concentración de biomasa se determinó midiendo la densidad óptica, usando diluciones en agua 1:10 y 1:20. Para transformar las unidades de densidad óptica a unidades de concentración de peso seco de biomasa (g DWC L^{-1}) se multiplicó por un factor igual $0.37\text{ g DWC L}^{-1}\text{ DO}^{-1}$ (Cortés-Tolalpa et al., 2014).

Tabla 2. Composición del medio de cultivo para producción de SHK.

Sustrato	Fórmula	Concentración
Glucosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	20 g/L
Extracto de levadura	-	15 g/L
Medio mineral	Fórmula	Concentración
Fosfato dipotásico	K ₂ HPO ₄	7.5 g/L
Fosfato monopotásico	KH ₂ PO ₄	7.5 g/L
Ácido cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	2.1 g/L
Citrato de amonio férrico	C ₆ H ₁₁ FeNO ₇	0.3 g/L
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	1.2 mL/L
Suplementos	Fórmula	Concentración
Cloruro de calcio	CaCl ₂	14.2 mg/L
Sulfato de magnesio	MgSO ₄	246.5 mg/L
Vitamina B1	C ₁₂ H ₁₇ N ₄ OS ⁺	1 mg/L
Antibióticos	-	1 µL/mL
Metales traza	Fórmula	Concentración
heptamolibdato de amonio	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	3.7 mg/L
Sulfato de Zinc heptahidratado	ZnSO ₄ 7H ₂ O	2.9 mg/L
Sulfato de Cobre (II) pentahidratado	CuSO ₄ 5H ₂ O	24.7 mg/L
Cloruro de manganeso (II)	MnCl ₂ 4H ₂ O	2.5 mg/L
Ácido trioxibórico (III)	H ₃ BO ₃	24.7 mg/L

En cultivos con las cepas ASR4, DKLF y ASR45 se cuantificaron los siguientes metabolitos en HPLC: Glc, ACE, SHK, DHQ, DHS, QUIN y GAL. Se usó una columna Aminex HPX-87HF, utilizando una fase móvil acuosa de H₂SO₄ 5mM, con un tiempo de corrida de 30 min a flujo constante de 0.5 mL/min y una temperatura de columna de 60°C, se usaron sensores de arreglo de fotodiodos e índice de refracción. Para la determinación de la concentración y tiempo de retención se usaron estándares comerciales. Las muestras fueron centrifugadas para eliminar la biomasa y fueron almacenadas a -20°C hasta ser analizadas. Las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente y después fueron filtradas (tamaño de poro 0.45 nm). Finalmente se diluyeron en fase móvil en proporción 1:20 para su inyección al equipo.

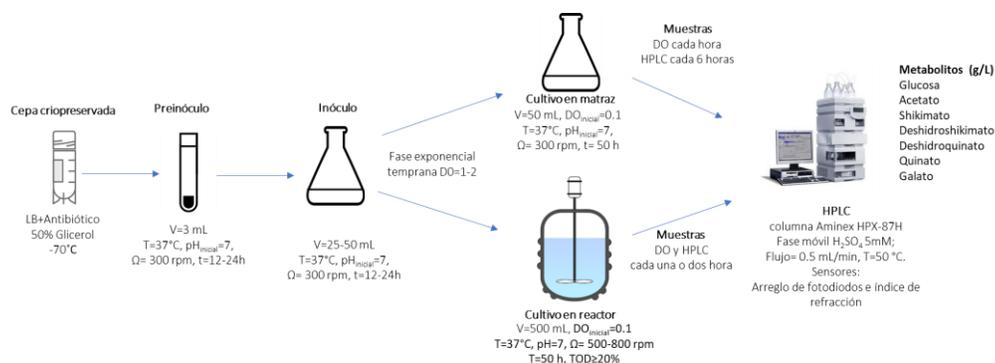


Figura 12. Metodología usada para caracterizar a las cepas generadas en este trabajo.

7.7 Búsqueda de masa molecular del ASA en UPLC acoplado a sensor de masas

Dado que no existen estándares comerciales de los intermediarios de interés de la vía del ASA, se desarrolló un método de cromatografía de fase reversa para identificar al compuesto de interés usando cromatografía líquida de ultra alta presión (UPLC™ WATERS) acoplada a sensor de masas (QDA WATERS™).

Se usó una columna BEH C18 con un flujo de 0.3 mL/min, como fase móvil se utilizó una mezcla de agua con acetonitrilo y ácido fórmico (0.5%). Se prepararon las soluciones A y B, la primera consta de agua, la segunda consta de acetonitrilo, ambas con 0.5% de ácido fórmico. Se utilizó un gradiente partiendo de 2% de B hasta llegar al 20% en 10 minutos, después subiendo hasta 50% en 2 minutos, mantenido esta proporción por dos minutos, para bajar B a 2% en 0.1 minutos, manteniendo esa proporción por 4 minutos, después de un aumento de flujo a 0.5 mL/min por 5 minutos para equilibrar la columna antes de inyectar la siguiente muestra.

El detector ACQUITY QDa™ de masas se operó usando una diferencia de potencial eléctrico de capilar de 1 kV, y una diferencia de potencial de cono de 10V, se inyectaron al equipo 10 µl de muestra concentrada.

Como el pH de la fase móvil es menor a 3, se esperaba una carga positiva en la carga del ASA, por la presencia de los grupos amino protonados, Por lo que se extrajeron iones que presentaran relaciones masas cargas (m/z) similares a la del ASA protonado $m/Z_{ASHK}=174.17$.

Se corrieron muestras de tiempos iniciales, tiempo de estado estacionario, tiempo final, para la cepa AT1 y DT1, usando como controles a las cepas ASR4, DKLF, medio de cultivo fresco y fase móvil.

7.8 Estudio transcripcional mediante RT-qPCR

Dado que no se cuenta con un método para identificar al ASA se decidió evaluar la expresión del operón heterólogo como evidencia indirecta de la funcionalidad del plásmido y de la vía. También se realizó un estudio de expresión diferencial sobre 23 genes selectos del metabolismo central de la cepa AT1. La evaluación se realizó a mitad de crecimiento exponencial usando como control a la cepa ASR4, Los genes estudiados han demostrado cambios de expresión significativos en estudios previos (Carmona et al., 2020; N. Flores et al., 2007; S. Flores et al., 2004a; Rodríguez et al., 2013).

Se tomaron muestras de cultivos en matraz bajo las condiciones descritas en la sección 6.5 a mitad de fase exponencial (DO de 4.5 aproximadamente). Los cultivos se realizaron al menos por triplicado Las muestras fueron almacenadas con RNA later en ultracongelación hasta la extracción. El RNA fue extraído mediante el método de fenol caliente (Carmona et al., 2020). La integridad del DNA fue verificada por electroforesis (figura 13). La calidad y concentración se verificó mediante espectrofotometría usando un equipo Nanodrop™ 2000 (tabla 3). La síntesis de cDNA se realizó con el kit RevertAid H First strand cDNA Synthesis, En la síntesis de cDNA y en la reacción de PCR se usó una mezcla de oligonucleótidos específicos a los genes deseados previamente reportados por Carmona et al en 2020, Excepto para los genes heterólogos, en cuyo caso fueron diseñados y sintetizados oligonucleótidos específicos (anexo 3). Las reacciones de qPCR fueron realizadas en un termociclador ABI Prism 7300 Real Time PCR de Applied Biosystem usando el kit Maxima SYBRgreen PCR Master Mix de Thermofisher, cada reacción fue realizada al menos por triplicado, la cuantificación se realizó mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Se usó como blanco al gen *ihfB* pues se ha reportado que su expresión no cambia en distintas condiciones (Flores et al., 2005). Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo a los lineamientos de la guía MIQE (Bustin et al., 2009). Cabe mencionar que no se determinaron los niveles de expresión relativa de los genes heterólogos, pues el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ requiere que los niveles de transcritos se comparen en dos condiciones distintas, y al tratarse de genes sintéticos no presentes en la cepa parental no existe una condición con la cual comparar a la cepa transformante (Livak & Schmittgen, 2001).

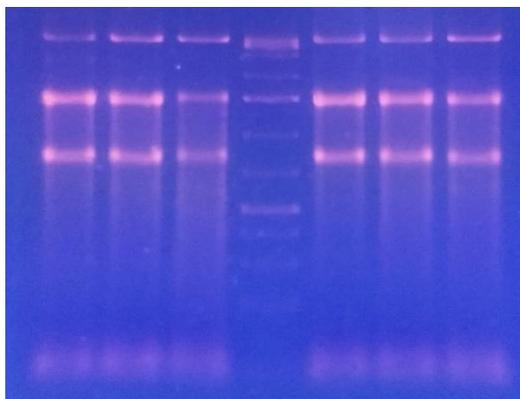


Figura 13. Gel de electroforesis del RNA extraído por triplicado de las cepas ASR4 (izquierda) y AT1 (derecha).

Tabla 3. Parámetros de calidad de RNA extraído de las cepas ASR4 y AT1.

Muestra	[RNA] ng/ μ l	Relación 260/280	Relación 260/230
ASR4 1	610.1	2.15	2.39
ASR4 2	577.8	2.15	2.38
ASR4 3	492.5	2.09	2.40
AT1 1	569.4	2.15	2.38
AT1 2	604.1	2.13	2.40
AT1 3	462.9	2.11	2.41

8 RESULTADOS

8.1 Verificación del genotipo y fenotipo

Las cepas ASR4 y DKLF son auxótrofas a aminoácidos aromáticos debido a la inactivación de las SHK cinasa 1 y 2 (*aroK* *aroL*⁻), a diferencia de las cepas parentales, éstas no deberían crecer en medios mínimos. para corroborar esto, se realizó un ensayo de crecimiento en medio rico LB y mínimo M9 con ambas cepas. Se partió de una DO igual a 0.1. En medio LB, las cepas alcanzaron un crecimiento de alrededor de 2.50 DO. En medio M9 ambas cepas no mostraron crecimiento durante todo el cultivo (figura 14).

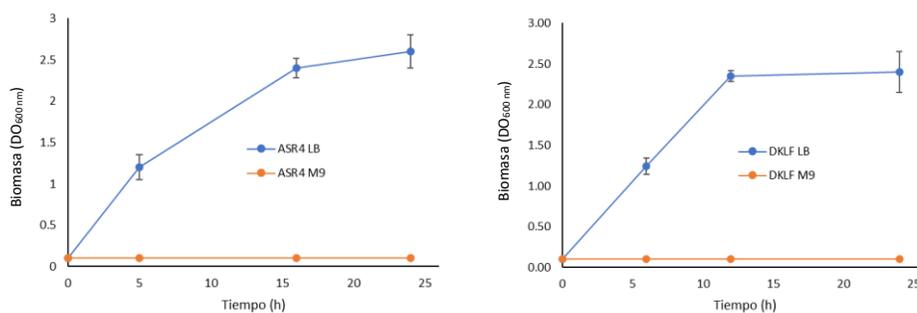


Figura 14. Prueba de auxotrofia a aminoácidos aromáticos de ASR4 (izquierda) y DKLF (derecha).

La tabla 4 muestra la verificación por qPCR en la cepa ASR4, todas las inactivaciones fueron confirmadas, con excepción de *pykF* y *lacI*, que muestran falsos positivos. En el caso de *pykF* se realizó una inserción de un casete de resistencia al antibiótico gentamicina en una región interna del gen (*pykF::gm^R*) en la cepa *E. coli* PB28. Posteriormente la región *pykF::gm^R* fue usada para inactivar por transducción a *pykF* de *E. coli* PB12 [*pykF::(pykF::gm^R)*], la secuencia de inserción interrumpe el marco de lectura abierto de *pykF*, provocando su inactivación (Rodríguez et al, 2013). En el caso de *lacI* la inactivación se realizó usando el método de productos de PCR (Datsenko & Wanner, 2000), tomando como sitios de recombinación regiones internas del gen *lacI*. La qPCR sólo nos permite saber si la secuencia está presente o no, por lo que únicamente resulta útil para evaluar inactivaciones en la que una secuencia es sustituida por otra, por lo que no es posible verificar la inactivación de *pykF* y *lacI* con esta técnica.

Tabla 4. Comprobación de las inactivaciones en ASR4 mediante qPCR.

Gen	Cepa				Método de inactivación	Referencia
	PB12	AF3	ASR4	ASR4 (esperado)		
<i>gm^R</i>	No	S	S	S	-	Ponce <i>et al</i> , 1995; Rodríguez <i>et al</i> , 2013
<i>aroF</i>	S	S	No	No	Producto de PCR	Ceparío y oligario Andrea Sabido
<i>aroG</i>	S	S	No	No	Producto de PCR	Ceparío y oligario de Andrea Sabido, 2017
<i>aroH</i>	S	S	No	No	Transducción	Ceparío y oligario de Andrea Sabido, 2017
<i>aroL</i>	S	No	No	No	Producto de PCR	Rodríguez <i>et al</i> , 2013
<i>aroK</i>	S	No	No	No	Producto de PCR	Rodríguez <i>et al</i> , 2013
<i>cm^R</i>	S	No	No	No	-	Ceparío y oligario de Andrea Sabido, 2017
<i>km^R</i>	S	No	S	S	-	Ceparío y oligario de Andrea Sabido, 2017
<i>lacI</i>	S	S	S	No	Producto de PCR	Rodríguez <i>et al</i> , 2013
<i>pTSH</i>	No	No	No	No	Transducción	Aguilar <i>et al</i> , 2012
<i>rppH</i>	No	No	No	No	Transducción	Aguilar <i>et al</i> , 2012
<i>pykA</i>	S	S	S	S	-	Rodríguez <i>et al</i> , 2013
<i>pykF</i>	S	S	S	No	Inserción y transducción	Ponce <i>et al</i> , 1995; Rodríguez <i>et al</i> , 2013

Las inactivaciones en la cepa DKLF (*aroKL⁻ pykF⁻*) fueron realizadas por el método de productos de PCR (Datsenko & Wanner, 2000) por Daniel Rodríguez en 2020. Las inactivaciones fueron verificadas por PCR punto final, usando oligonucleótidos externos (anexo 2). Comparando el peso molecular de los amplicones generados a partir DNA cromosomal de las cepa parental ASR4, la cepa intermedia que conserva el casete de resistencia al antibiótico *cm* y la cepa DKLF que sólo conserva las regiones FRT, demostrando que la cepa efectivamente tiene las inactivaciones esperadas (figura 15).

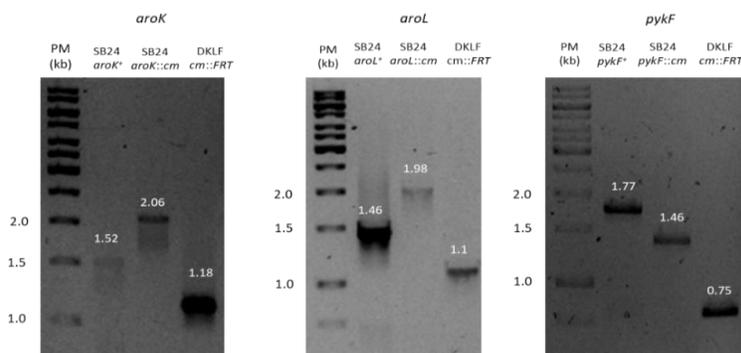


Figura 15. Verificación por PCR de las inactivaciones en la cepa DKLF (*aroKL⁻, pykF⁻*). En los tres casos, del carril izquierdo al derecho se muestran amplicones correspondientes al gen silvestre, el casete *cm^R* y la región FRT respectivamente.

8.2 Secuenciación de la construcción pTOPOaminoSA

Se verificó por secuenciación que el operón aminoSA1 se encontrase clonado en el plásmido pCR-XL-TOPO. Se encontró una mutación en el nucleótido G 886 del gen *ntdA* (figura 16). Esta mutación genera un cambio de ácido aspártico 296 por asparagina, se sabe que este aminoácido no se encuentra dentro del sitio activo ni cerca del sitio de unión al cofactor. Este aminoácido está en una región de horquilla en la proteína y posiblemente

esté involucrado en la formación del homodímero, que es la forma en la que la proteína se encuentra activa (van Straaten et al., 2013). Para la formación de este dímero son necesarios múltiples aminoácidos, por lo que la mutación no debería tener un efecto negativo en la actividad (van Straaten et al., 2013). La aparición de esta mutación es muy probablemente producto de los múltiples pasos de PCR y de la longitud del operón.

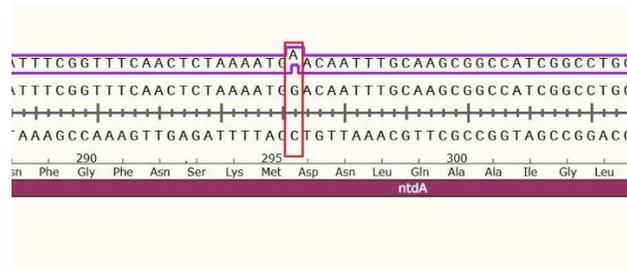


Figura 16. Mutación en G 886 en el gen *ntdA* en el operón aminoSA1 que genera un cambio del aminoácido Asp por Asn.

8.3 Construcción y secuenciación de pACYCaminoSA1

La construcción del plásmido pACYCaminoSA1 no exitosa; después de múltiples intentos de clonación, se lograron obtener dos candidatas: En el primer caso la secuenciación demostró que el fragmento clonado no corresponde al operón aminoSA1; un análisis BLAST demostró que la secuencia insertada era una región cromosomal de *E. coli*, curiosamente esta región tiene un peso molecular similar al del operón aminoSA1 (3.7 kb) y sitios de restricción NdeI y SacI en los extremos (figura 17). Se sabe que el extracto de ADN plasmídico obtenido con el método usado en laboratorio suele tener trazas de DNA cromosomal, por lo que es posible que después de realizar la reacción de restricción se tuviera una mezcla del operón aminoSA1 y del fragmento cromosomal y por un evento aleatorio se clonara la región cromosomal en lugar del operón aminoSA1 en el plásmido pACYCaminoSA1.

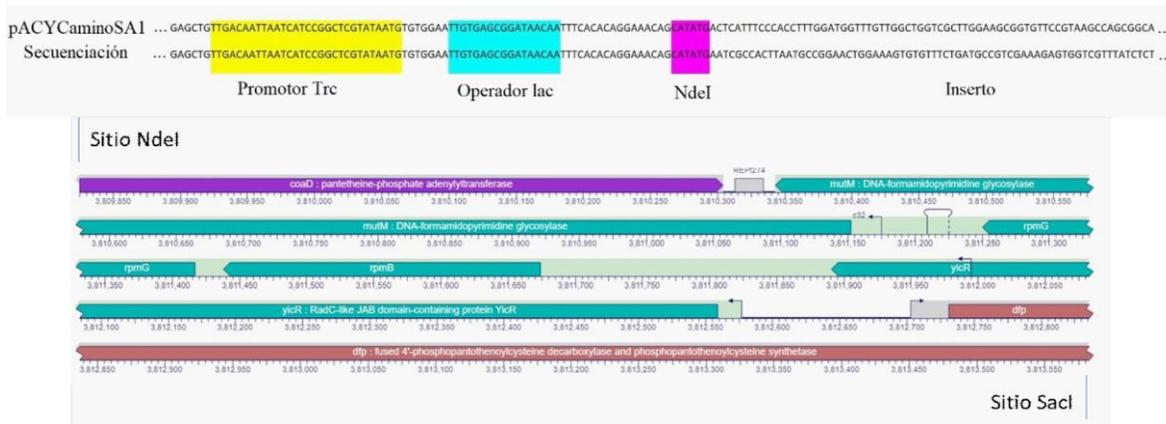


Figura 17. Alineamiento de los resultados de secuenciación del inserto en el plásmido pACYCmod con la secuencia de referencia (arriba). Mapa de la región cromosomal clonada en pACYCmod (abajo).

Al transformar la cepa ASR4 con una segunda construcción de pACYCminoSA1 se encontró la presencia de una secuencia de inserción de aproximadamente 1.3 kb interrumpiendo al gen *rifH* (figura 18). El análisis por BLAST demostró que la secuencia de inserción puede corresponder a las familias de transposones Tn10 y Tn4. Por lo que se descartó realizar experimentos con este plásmido (figura 19).

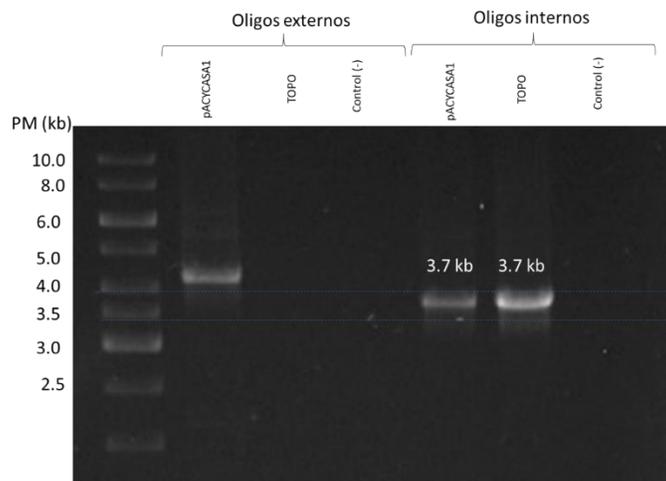


Figura 18. Comprobación por PCR de la ligación en pACYCminoSA1, pTOPOminoSA1 y un control negativo usando oligonucleótidos internos (carriles 1,2 y 3) y externos (carriles 4, 5 y 6).



Figura 19. Alineamiento entre los resultados de secuenciación de la región de *rifH* del operón pACYCminoSA1, el gen *rifH* está interrumpido por una secuencia de inserción.

La dificultad de obtener este plásmido y la obtención de falsos positivos hace creer que esta construcción pueda ser tóxica para la cepa. Se propone que esto es ocasionado por el uso del promotor de expresión fuerte *trc*: En ASR4 el operón se estaría expresando fuerte y constitutivamente, promoviendo la acumulación de intermediarios tóxicos como la K6P (Iwai et al, 1977). Por otro lado, la secuenciación del plásmido pTOPOaminoSA1 demostró solamente una mutación puntual en el gen *ntdC* que no afecta su funcionalidad (van Straaten et al, 2013). Estos hallazgos nos llevaron a proponer usar el plásmido pTOPOaminoSA1 directamente como vector de expresión en la cepa ASR4. Debido al tiempo consumido en esta construcción se decidió dejar como prospectiva la transformación con el plásmido pTrcAro4.

8.4 Construcción y secuenciación de pTrcAro5 y pTrcAro4

El plásmido pTrcAro4 se construyó amplificando por PCR a todo el plásmido pTrcAro5 pero dejando fuera al gen *aroG^{fbr}*, se agregaron a los extremos sitios de restricción XhoI, después mediante reacciones de restricción y ligación se recircularizó. Se obtuvieron 4 candidatas. El patrón de restricción muestra que al menos las candidatas 3 y 4 tienen la construcción (figura 20). Se seleccionó y secuenció la candidata 4; no se encontraron mutaciones adicionales a las heredadas por pTrcAro5.

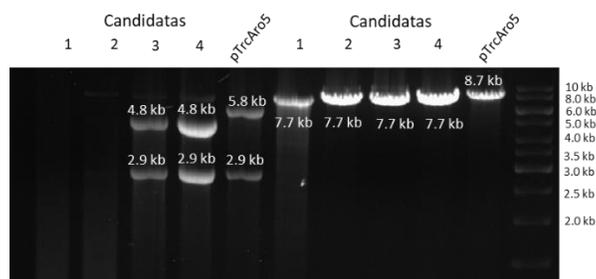


Figura 20. Digestión del plásmido pTrcAro4 extraído de tres candidatas *E. coli* DH5α comparadas con pTrcAro5.

En la secuenciación del plásmido pTrcAro5 se encontró que el operón tenía 7 mutaciones en distintas regiones (tabla 5). Se encontraron dos mutaciones en una región no codificante río arriba del promotor *trc*. Estas mutaciones no tienen ningún efecto en la funcionalidad del plásmido. Se encontró un cambio de A por G en el nucleótido 780 en el gen *aroB*, lo cual genera un cambio de Thr por Ala. No existen reportes estructurales de *aroB* y un BLAST demostró que no existen ortólogos de este gen, por lo que no se conoce el efecto de esta mutación. En el nucleótido 3342 de *tktA* se encontró una mutación puntual que cambia una

C por G (base 3342) generando un cambio de Ala por Gly. Se realizó un BLAST con la secuencia generada y se encontró que ambas versiones de la enzima existen y son funcionales. Finalmente se encontraron tres mutaciones silenciosas en distintas regiones del gen *aroD*, dado que no cambia el codón codificante no debería existir un efecto negativo en la actividad de la enzima.

Tabla 5. Mutaciones presentes en el plásmido pTrcAro5.

Posición	Base	Mutación	Comentario
8533	G	T	Región no codificante
8642	G	A	
780	A	G	Thr por Ala en <i>aroB</i>
3342	C	G	Ala por Gly en <i>tktA</i>
5439	C	T	Mutaciones silenciosas en <i>aroD</i>
5517	C	T	
6096	T	C	

Para evaluar la funcionalidad del plásmido pTrcAro5, este fue usado para transformar a la cepa ASR4, generando a la cepa ASR45. Ambas cepas fueron evaluadas en matraz. La cepa ASR4 no fue capaz de producir intermediarios de la vía del SHK, la cepa transformante produjo SHK, con rendimiento de 0.45 mol SHK/mol Glc, similar a lo reportados por Rodríguez y colaboradores en 2013 (tabla 6, sección 8.7).

8.5 Cepas

Las cepas ASR4 y DKLF fueron transformadas con el plásmido pTOPOaminoSA1, usando zeocina (25 µg/mL) como marcador de selección. Las transformaciones fueron comprobadas por restricción y por PCR con oligonucleótidos externos (figura 21). Las cepas resultantes fueron llamadas AT1 y DT1, respectivamente.

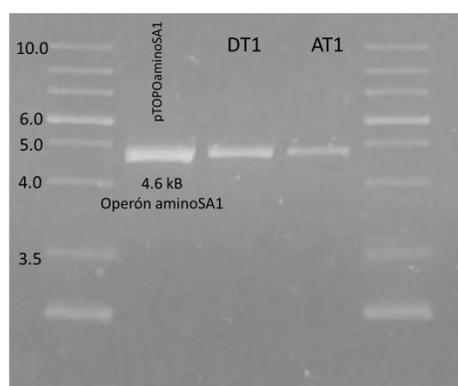


Figura 21. Comprobación por PCR de la transformación con el plásmido pTOPOaminoSA1.

La cepa *E. coli* ASR45 fue construida transformando a ASR4 con el plásmido pTrcAro5, con la finalidad de verificar la funcionalidad de este plásmido y utilizarla con fines comparativos

con las cepas productoras de ASA. La transformación se verificó mediante reacciones de restricción de extracto plasmídico con las enzimas NcoI y SacI (figura 22).

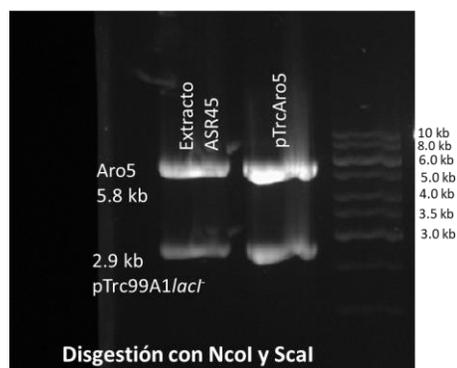


Figura 22. Patrón de restricción del plásmido pTrcAro5 recuperado por miniprep de *E. coli* ASR45.

8.6 Evaluación de la cepa ASR4 y DKLF en cultivos en matraz

En cultivos con la cepa ASR4 en matraz en medio de producción se observó una $\mu = 0.52 \text{ h}^{-1}$ alcanzando aproximadamente una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 9 a las 10 horas. No se observó producción de compuestos aromáticos, resultado de la inactivación de las isoenzimas de DAHP sintasa. Por otro lado, se produjeron $8.25 \pm 0.15 \text{ g/L}$ de ACE con un rendimiento molar global de $1.49 \pm 0.07 \text{ mol ACE / mol Glc}$, esto se debe a que la ausencia de la vía del SHK genera un sobreflujo metabólico en la formación de PEP, canalizando el carbono a la generación de ACE, resultados similares fueron obtenidos por Rodríguez *et al*, (2013) en la cepa AR3; cuando esta cepa no sobreexpresa los genes de pTrcAro6 canaliza el carbono hacia la generación de ACE. Debido a que esta cepa no produce metabolitos de la vía del SHK se decidió no evaluarla en biorreactor. El resto de los parámetros obtenidos se muestra en la tabla 7. De los cultivos con la cepa DKLF se observó un comportamiento similar al de la cepa ASR4, produce niveles altos de ACE; sin embargo, acumuló casi 1.5 g/L de compuestos aromáticos sin sobreexpresión adicional de genes de la vía del SHK, tiene una μ más alta ($0.57 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$) y acumula más biomasa y ACE, lo que resulta en una mayor capacidad de producción de aromáticos (tabla 6).

Tabla 6. Parámetros cinéticos de la cepas ASR4 y DKLF.

Parámetro	ASR4	DKLF
μ (h^{-1})	0.52 \pm 0.03	0.57 \pm 0.00
q_{SHK} (g SHK g DCW $^{-1}$ h $^{-1}$)	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
q_{Glc} (g SHK g DCW $^{-1}$ h $^{-1}$)	-2.17 \pm 0.27	-1.71 \pm 0.14
$Y_{\text{SHK Glc}}$ (mol SHK mol Glc $^{-1}$)	0.00 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00
$Y_{\text{X Glc}}$ (g DCW g Glc $^{-1}$)	0.24 \pm 0.27	0.20 \pm 0.02
$Y_{\text{ACE Glc}}$ (mol ACE mol Glc $^{-1}$)	1.49 \pm 0.07	1.63 \pm 0.07
X_{max} (DO)	10.50 \pm 0.29	11.27 \pm 0.27
[SHK] (g L $^{-1}$)	0.00 \pm 0.00	0.18 \pm 0.00
[HA] (g L $^{-1}$)	0.00 \pm 0.00	1.48 \pm 0.19
[ACE] (g L $^{-1}$)	8.15 \pm 0.15	9.00 \pm 0.06

8.7 Evaluación de la cepa ASR45 en matraz

La cepa *E. coli* ASR45 fue construida para comparar la producción de SHK con respecto a una cepa productora de ASA y para evaluar la funcionalidad del plásmido pTrcAro5. La cepa ASR45 fue evaluada en matraz en donde mostró tasas específicas de crecimiento variables, comenzando con una μ_{max} igual a 0.52 h $^{-1}$ pero que decrece rápidamente hasta 0.20 h $^{-1}$ sin embargo alcanzó un título de SHK de 8.15 \pm 0.82 g/L con un rendimiento de 0.45 \pm 0.09 mol/mol y sin ACE al final del cultivo (tabla 7). La reducción drástica en la tasa específica de crecimiento puede deberse a que el plásmido pTrcAro5 representa una alta carga metabólica, además de que la reacción de reducción de DHS a SHK consume una cantidad considerable del NADPH que la célula requiere para la generación de biomasa. Rodríguez *et al.* (2017) sugieren que la sobreexpresión de *zwf* en el pTrcAro6 permite mayor generación de NADPH que la cepa AR36 aprovecha para mejorar la capacidad de crecimiento y de producción de compuestos aromáticos, por lo que la ausencia de *zwf* en pTrcAro5 explicaría el efecto negativo observado en este reporte.

Tabla 7. Parámetros cinéticos de la cepa ASR45 cultivada en matraz.

Parámetro	ASR45
μ (h ⁻¹)	0.36 ±0.02
$Y_{\text{SHK Glc}}$ (mol SHK mol Glc ⁻¹)	0.45 ±0.01
$Y_{\text{X Glc}}$ (g DCW g Glc ⁻¹)	0.20 ±0.00
$Y_{\text{ACE Glc}}$ (mol ACE mol Glc ⁻¹)	0.00 ±0.00
X_{max} (DO)	9.82 ±0.10
[SHK] (g L ⁻¹)	8.15 ±0.41
[H] (g L ⁻¹)	12.87 ±1.20
[ACE] (g L ⁻¹)	0.00 ±0.00

8.8 Cultivos con las cepas AT1 y DT1

Se realizaron cultivos en matraz con las cepas AT1 y DT1 usando medio de producción de SHK. Como caracterización preliminar se determinó la μ en ambas cepas. La cepa DT1 mostró una μ de 0.57 ± 0.02 h⁻¹ y la cepa AT1 de 0.42 ± 0.02 h⁻¹: la cepa AT1 alcanzó una DO_{600nm} de alrededor de 9 mientras que la cepa alcanzó aproximadamente 11. En ambas cepas parece que la presencia del plásmido tiene un efecto negativo mínimo sobre la capacidad de crecimiento, puesto que la DO y las tasas específicas de crecimiento resultan poco más bajas comparadas con las observadas en las de las cepas parentales.

8.9 Búsqueda de masas moleculares similares a la del ASA en UPLC acoplado a detector de masas

La identificación y cuantificación de ASA presenta varias complicaciones, a la fecha no existen estándares comerciales de este compuesto, por lo que el uso de métodos de separación como HPLC no son útiles, pues requieren de un estándar. Gou y Frost (2004, 2007) recurrieron al uso de una columna DOWEX 50 de intercambio catiónico para fraccionar el medio de cultivo y posteriormente identificar y cuantificar al ASA por resonancia magnética nuclear. En nuestros experimentos el medio rico utilizado en nuestros cultivos limita el uso de columnas de intercambio iónico y de métodos de cuantificación de aminoácidos como el de la ninhidrina, por lo que se usó un equipo WATERS UPLC acoplado a detector de masas ACQUITY QDA, para separar y buscar masas moleculares que pudiesen corresponder al ASA.

Se analizaron sobrenadantes de cultivos con las cepas productoras AT1 y DT1 ASI COMO en las parentales ASR4 y DKLF. El ASA tiene un peso molecular de 173.17, debería

encontrarse como un catión (grupo amino protonado) debido al bajo pH de la fase móvil, por lo que se esperaría un ion principal con relación masa carga (m/z) de 174.17.

Se encontraron masas de 174.22 con tiempos de retención de 7 y 9 minutos en los sobrenadantes de cultivos de AT1 y DT1, La figura 23 muestra ambos cromatogramas de extracción de ion. En el primero se observa un pico significativo con tiempo de retención en 7 minutos y en el segundo a los 9. Debido a una columna no equilibrada, pudiéndose solucionar aumentando el tiempo de lavado entre cada corrida. Picos similares no fueron encontrados en sobrenadantes de cultivos con ASR4 y DKLF ni en la fase móvil fresca (figura 24).

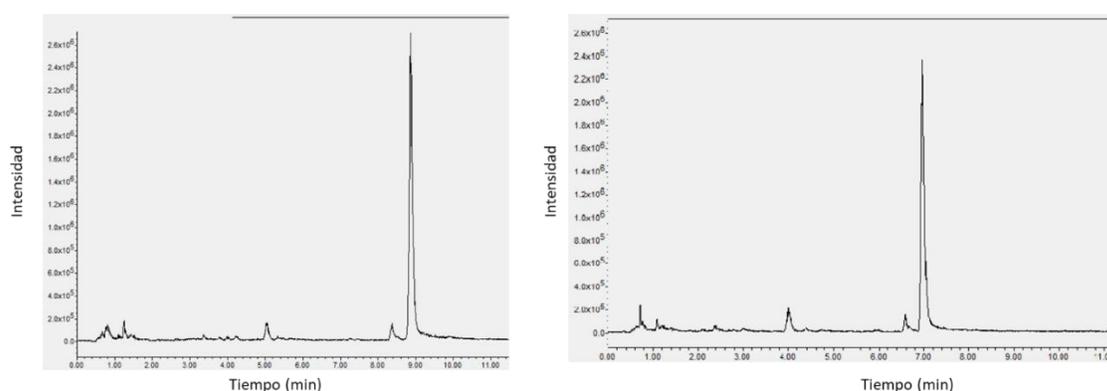


Figura 23. Cromatogramas de extracción de ión de m/z igual a 174.22 para sobrenadantes de cultivos con las cepas DT1 (izquierda) y AT1 (derecha).

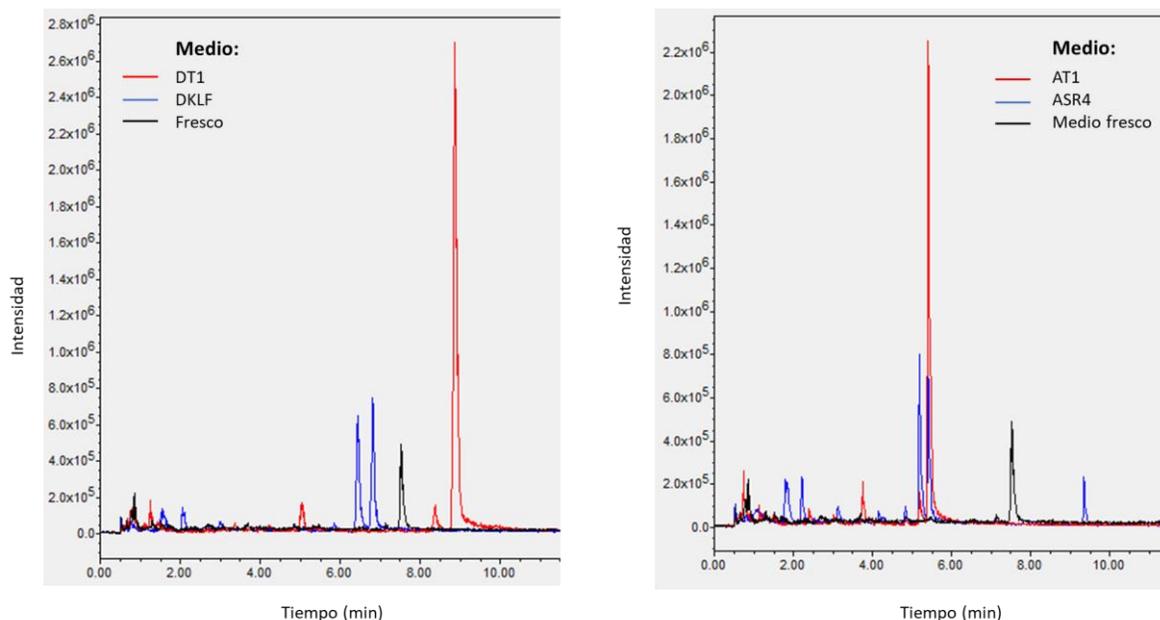


Figura 24. Solape de cromatogramas de extracción de ión a 174.17 m/z, entre sobrenadantes de cultivos con las cepas transformantes y parentales y medio de cultivo fresco.

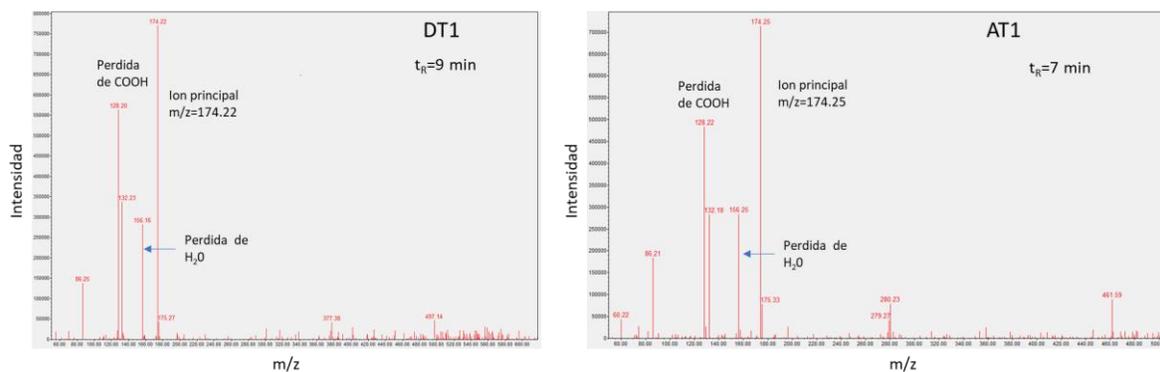


Figura 25. Espectro de masas del los picos extraídos con m/z igual a 174.22.

El espectro de masas del pico (figura 25) muestra varias masas. Sin embargo el ion principal de 174.22 podría corresponder a la del ASA, también se observan varios iones que pudieran corresponder a la fragmentación de los siguientes grupos del compuesto principal.

- Ion con m/z igual a 156.12, correspondiente a la pérdida de 18.01 unidades, debido a la liberación de una molécula de agua.
- Ion con m/z igual a 128.14, correspondiente a la pérdida de 46.05, debido a la liberación del grupo COOH.

Como se muestra en la figura 25, medios fermentados con las cepas ASR4 y DKLF presentan dos picos de tamaño similar con unos tiempos de retención que difieren por pocos segundos, los cuales no están presentes en el medio fresco. Los compuestos responsables de este pico coeluyen con el compuesto candidato, para que compuesto candidato fuese producido por las cepas parentales o que el ion principal fuera un fragmento de otro compuesto con masa molecular mayor se realizó una deconvolución usando Magtran (figura 26) (Zhang & Marshall, 1998). Se encontró que efectivamente las cepas productoras sintetizan un compuesto con masas molecular de 173.22 que las cepas parentales no. En las cepas productoras se observa también un compuesto de masa molecular de más de 3500 Da que coeluye con el candidato, que por el peso molecular es posible que sea un péptido. Para mejorar la separación se propone aumentar el tiempo de gradiente de fase A y B.

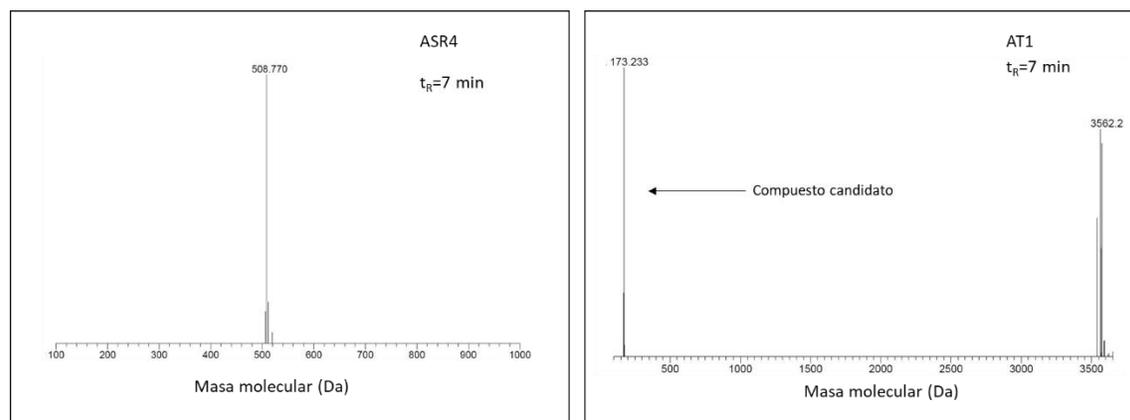


Figura 26. Deconvolución del espectro de masas del compuesto candidato (derecha) y en la cepa parental.

8.10 Estudio transcripcional de los genes heterólogos *ntdA*, *ntdC* y *rifH* mediante RT-qPCR

Antes de realizar una purificación del compuesto candidato se decidió corroborar que los genes que integran al operón aminoSA1 fueran transcritos durante la fermentación, por lo que se realizó un estudio transcripcional mediante RT-qPCR, además se llevó a cabo un estudio de expresión diferencial sobre genes selectos del metabolismo central de carbono de la cepas ASR4 y AT1 con la finalidad de inferir el efecto del plásmido en el metabolismo de la cepa.

El análisis por RT-qPCR confirmó la transcripción de los genes *ntdC*, *ntdA* y *rifH*. En la figura 27 se observa que durante la PCR con la cepa transformante se alcanzan umbrales de fluorescencia relativa entre los 12 y 20 ciclos, mientras que en la cepa parental y los

controles negativos se observan umbrales de fluorescencia después de los 30 ciclos, correspondientes a la dimerización de los oligonucleótidos.

Sin embargo, también se observa que los niveles detectados de los transcritos son bastante variables entre cada replica, lo cual puede deberse a que el antibiótico zeocina es bastante inestable, sensible a la luz y a medios ricos en sales (Invitrogen, 2012), condiciones presentes en el cultivo de AT1. Se propone cuantificar el número de copias del plásmido en la cepa o buscar un vector o presión de selección más estable para corregir este inconveniente. Por otro lado, se sabe que las cepas derivadas de PB12 tienen una alta tasa de mutaciones, pudiendo afectar la reproducibilidad de los experimentos (Carmona et al., 2020; Aguilar et al., 2012,2015).

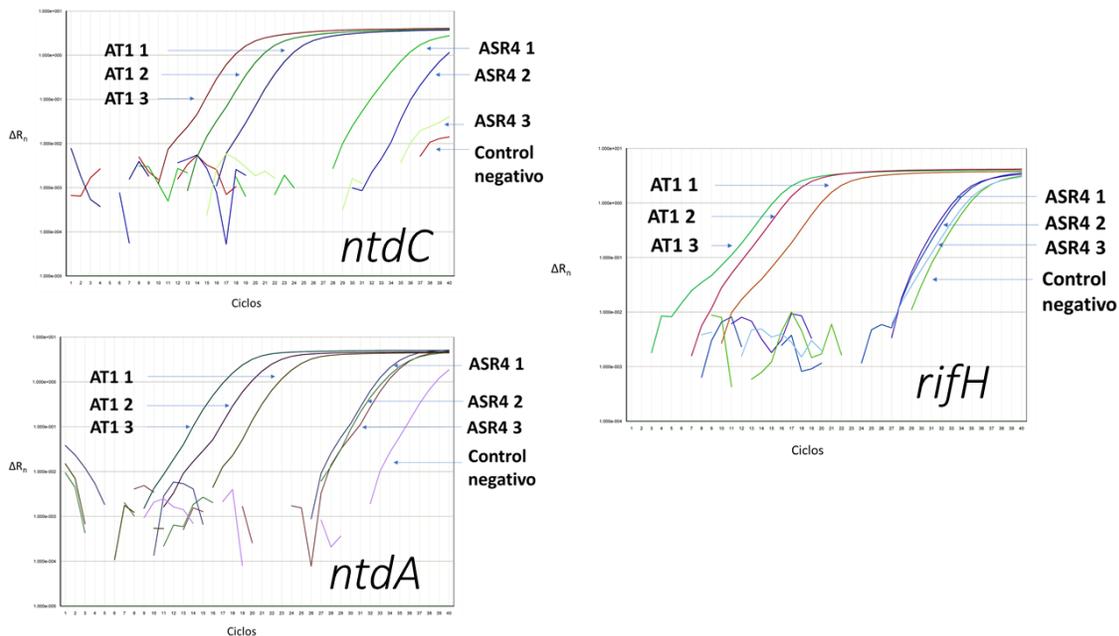


Figura 27. Curvas de RT-qPCR de los genes *ntdC* (izquierda arriba), *ntdA* (izquierda abajo) y *rifH* (derecha) en tres cultivos independientes de AT1 con respecto a ASR4.

8.11 Estudio de expresión diferencial en el metabolismo de AT1 con respecto a ASR4

Se realizó un estudio de expresión diferencial de 23 genes del metabolismo central de la cepa AT1 con respecto a ASR4 a mitad de fase exponencial (figura 28, anexo 2). Cabe mencionar que no se determinaron los niveles de expresión relativa de los genes heterólogos, pues el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ requiere que los niveles de transcritos se comparen en dos condiciones distintas, y al tratarse de genes sintéticos no presentes en la cepa parental, no existe una condición con la cual comparar a la cepa transformante (Livak & Schmittgen, 2001).

En genes glucolíticos, el simportador de galactosa (*galP*) presentó niveles de transcripción 12 veces más altos que en la cepa parental, mientras que la glucocinasa (*glk*) no mostró cambios, lo cual contrasta con reportes previos en donde se observa que *galP* y *glk* son sobreexpresados simultáneamente para el transporte y fosforilación de la Glc (Flores et al, 2007; Rodríguez et al, 2013). La fosfoglucosa isomerasa (*pgi*) redujo sus niveles de expresión más del 50%; como esta enzima es compartida entre la glucólisis y la ruta heteróloga, estos bajos niveles de transcritos podría ser una limitante tanto para el crecimiento como en la producción de ASA por lo que es un posible blanco de sobreexpresión. La piruvato cinasa I (*pykA*) aumentó sus niveles de expresión 3 veces, resultado diferente a lo observado en cepas sobreproductoras de SHK, en donde no se ha observado cambios en la expresión del gen y que también contrasta con los bajos niveles de transcritos de *glk* y *pgi* (Rodríguez et al, 2013), es posible que la sobreexpresión de *pykA* sea una respuesta a la inactivación de las DAHPS.

En la vía de las pentosas fosfato (PPP), la Glc deshidrogenasa (*zwf*) no presentó cambios considerables en su expresión, situación que concuerda con lo observado en trabajos previos, en donde se ha sobreexpresado *zwf* y se han tenido efectos positivos en la capacidad de crecimiento y de producción de compuestos aromáticos (Flores et al, 2004; Rodríguez et al, 2013). La transcetolasa (*tktA*) presentó un 60% de aumento en su expresión posiblemente debido a que estaría siendo compartida entre la vía del ASA y la PPP generando mayor requerimiento de la enzima, por lo que esta enzima es un blanco de sobreexpresión.

Los genes de la vía del SHK *aroB* (DHQ sintasa) y *aroD* (DHQ deshidratasa) muestran ligeros incrementos en su expresión, mientras que *aroE* (SHK deshidrogenasa) tuvo una reducción en su expresión de aproximadamente 30%, por lo que estos tres genes son candidatos a ser sobreexpresados. Este resultado concuerda con trabajos previos en donde estos genes han sido reportados como blancos a sobreexpresar para incrementar la producción de SHK (Rodríguez et al, 2017). Cabe mencionar que estos genes ya se encuentran clonados en plásmido pTrcAro4, pero se debe tomar en cuenta que puede existir una limitación de sustrato desde la glucólisis o PPP.

Los genes involucrados en el metabolismo del ACE; *ackA* (ACE cinasa), *pta* (fosfato acetil transferasa) y su transportador *actP* (importador de ACE) duplicaron su expresión; *poxB* (piruvato oxidasa) redujo su expresión en casi 30%, mientras que se observó un aumento en la expresión de la A-coA sintasa (*acs*). Esto puede significar que el consumo de ACE es

mucho más activo que su síntesis a partir de PYR, lo que refuerza la idea de un metabolismo glucolítico poco activo. La lipoamida deshidrogenasa (*lpd*) que forma parte del complejo piruvato deshidrogenasa muestra transcritos 30% más bajo. Estos resultados sugieren un flujo bajo de sustrato de PYR hacia el TCA, pero un flujo más activo de ACE hacia A-coA, cuyo destino sería el TCA. Para sustentar estas observaciones será necesario monitorear ACE durante el cultivo.

En el TCA, *gltA* (citrato sintasa) mostró más de 50% de sobreexpresión, lo que contrasta con los bajos niveles de expresión de genes glucolíticos; es probable que los aminoácidos presentes en el extracto de levadura se estén usando como sustrato y se incorporen al TCA en un metabolismo gluconeogénico, posibilidad que ya ha sido planteada en la cepa AR36 (Rodríguez et al, 2017; Martínez et al, 2018). Se ha reportado que en la cepa PB12 coexiste un metabolismo gluconeogénico cuando la cepa usa varias fuentes de carbono (Sigala et al, 2009), por lo que un análisis transcripcional más completo de los genes gluconeogénicos, anapleróticos y del TCA podría corroborar esta observación y permitirá identificar posibles genes a sobreexpresar.

El glutamato (Glu) actúa como donador del grupo amino en la síntesis de ASA y genera α -cetoglutarato (α CG) como subproducto, por lo que el estudio transcripcional abarcó genes involucrados en el transporte y metabolismo de estos compuestos. En una vía biosintética de ASA funcional, esperaríamos sobreproducción de α CG y su posterior incorporación al TCA. El simportador de glutamato (*gltP*) mostró niveles de sobreexpresión cercanos al 50%, lo cual podría ser una respuesta al consumo de Glu en la ruta heteróloga, El α CG se incorporaría directamente al TCA o podría ser reciclado a glutamato a través de la glutamato sintasa (*gltB*) y glutamato deshidrogenasa (*gdhA*) y se incorporaría al TCA como fumarato a través de la aspartato amonio liasa (*aspA*) y aspartato aminotransferasa (*aspC*) (Marcus & Halpern, 1968). Todos estos genes mostraron sobreexpresión significativa en la cepa transformante, a excepción de *gltB*. Mientras que los genes *icdA* (isocitrato deshidrogenasa) y *sucA* (α CG descarboxilasa) involucrados en el metabolismo de α CG en el TCA duplicaron su expresión. En resumen, estos niveles de transcripción elevados correlacionan con una vía biosintética de ASA funcional.

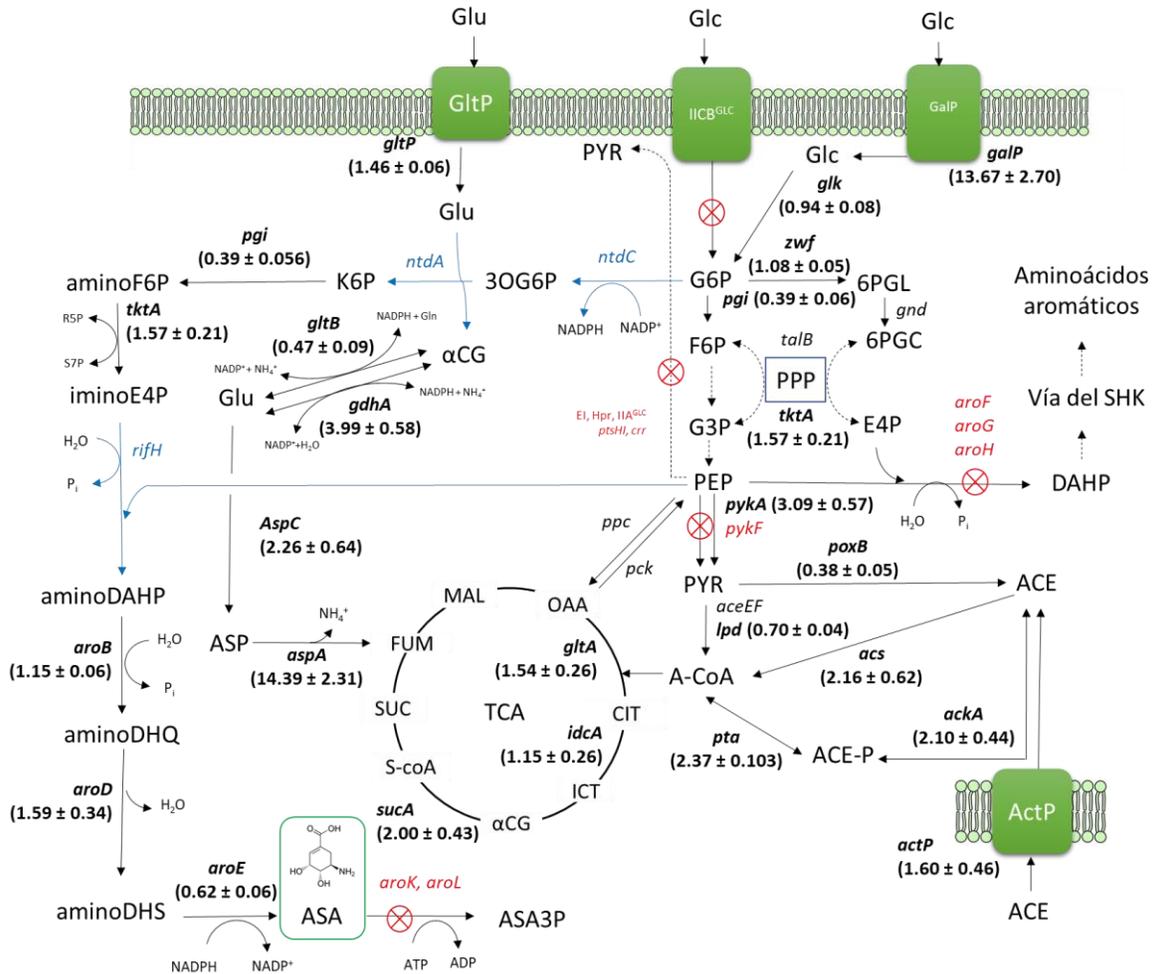


Figura 28. Estudio de expresión diferencial en la cepa AT1 con respecto a la cepa ASR4. Las reacciones heterólogas son señaladas en azul, los niveles de expresión relativa de los genes analizados son mostrados entre paréntesis (En el anexo 1 se indican los nombres de los genes y en la sección de abreviaturas los nombres de los compuestos).

Finalmente se analizaron los niveles de transcripción de los genes de resistencia a antibióticos usados como presión de selección *km^R* (resistencia a km en el plásmido) y de *aaaC1* (resistencia a gm en cromosoma). El primero mostró niveles de transcripción 3.5 veces más altos pero con desviaciones de casi el 30% lo cual podría deberse a la baja estabilidad segregacional del plásmido; por otro lado los niveles de *aaaC1* bajan casi 50%. Teniendo en cuenta la carga generada por el plásmido, la presencia de dos antibióticos adicionales Zc y km y de la ruta heteróloga podríamos esperar que la capacidad de respuesta de la cepa se vea limitada, lo cual se reflejaría en un bajo desempeño de la cepa.

8.12 Generación de la cepa DT1

Como se ha discutido en los apartados previos, la cepa AT1 presenta varios inconvenientes para usarse como fondo genético de producción de ASA:

- Es probable que la expresión fuerte constitutiva del operón aminoSA1 le resulte tóxico a la cepa, debido al uso de un promotor *trc* en una cepa *lacI*, teniendo como consecuencia que la inactivación del plásmido. Un fondo genético *lacI⁺* y un promotor mas *lac* débil permitiría expresar al operón aminoSA1.
- El estudio de RT-qPCR sugiere que la cepa tiene una actividad glucolítica baja, que se refleja en una μ baja, lo cual podría limitar su capacidad de canalizar el carbono a la vía heteróloga.
- Los niveles de expresión de los genes heterólogos no fueron reproducibles en cultivos distintos, esto se puede atribuir al uso del antibiótico zeocina poco estable como marcador de selección o a la alta tasa de mutaciones de la cepa.

Estos motivos nos llevaron a proponer a la cepa DKLF como alternativa, pues se ha demostrado que esta cepa tiene mayor capacidad de producción de compuestos aromáticos (tabla 6), mayor capacidad de crecimiento (figura 29), conserva *lacI* y presenta menor tasa de mutaciones que las derivadas de PB12 (Carmona et al, 2020). La transformación de la cepa con el plásmido pTOPOaminoSA1 generó a la cepa DT1. En un estudio preliminar esta cepa mostró una capacidad de crecimiento similar a la cepa parental (figura 29), y fue capaz de producir al compuesto candidato previamente observado en ASR4 (figuras 23, 24 y 25). Lo que sugiere que DT1 es una alternativa viable a la cepa AT1.

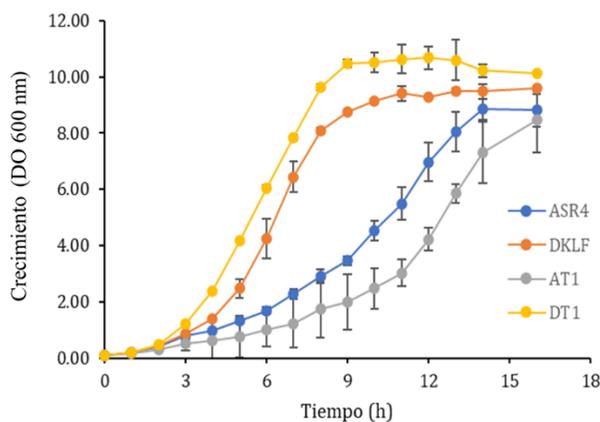


Figura 29. Perfiles de crecimiento de las cepas parentales y transformantes.

8. CONCLUSIONES

Se construyeron los plásmidos de expresión pTOPOaminoSA1 y pACYCaminoSA1 que contienen los genes sintéticos *ntdC*, *ntdA* y *rifH* necesarios para la síntesis de ASA. El plásmido pACYCaminoSA1 no fue funcional en la cepa ASR4, por lo que fue sustituido por pTOPOaminoSA1 como vector de expresión. También se generó el plásmido pTrcAro4 con los genes *tktA*, *aroD*, *aroB* y *aroE* para canalizar una mayor cantidad de sustrato a la ruta heteróloga. La secuenciación de pTrcAro4 y pTOPOaminoSA1 demostró que no tenían mutaciones que comprometieran su funcionalidad.

Al transformar la cepa *E. coli* AT1 con el plásmido pTOPOaminoSA1 se encontró en cultivos en medio rico un compuesto con peso molecular de 173.22 ± 0.10 Da similar al del ASA, que la cepa parental no produce. Un estudio de RT-qPCR demostró que los genes sintéticos fueron expresados y sugiere un metabolismo del glutamato más activo, observaciones que correlacionan con una vía heteróloga funcional. evidencia de la biosíntesis de ASA.

Los estudios presentados en este trabajo sugieren que la cepa AT1 tiene varios inconvenientes como fondo genético de producción de ASA, por lo que se generó una segunda cepa denominada DT1 que demostró capacidad de crecimiento similar y también pudo sintetizar al compuesto candidato.

La hipótesis original de este proyecto fue corroborada, sin embargo, no se logró cuantificar los niveles de ASA ni determinar parámetros cinéticos de las fermentaciones, debido a circunstancias que no fueron consideradas durante el diseño de este proyecto. Se invirtió demasiado tiempo en la construcción del plásmido pACYCaminoSA1 que no fue funcional, lo cual obligó a replantear la estrategia original. La falta de estándares comerciales de ASA hizo que se recurriera al UPLC acoplado a sensor de masas y RT-qPCR para tener evidencia indirecta de la producción del compuesto. El desarrollo y montaje de los métodos y equipos consumió tiempo que tampoco se tenía considerado originalmente. Finalmente, la actual pandemia de COVID-19 obligó a nuestro laboratorio y a nuestros colaboradores a disminuir actividades experimentales. Todas estas situaciones nos llevaron a limitar el proyecto a la demostración de la síntesis del compuesto.

La mayor parte de los objetivos específicos fueron cubiertos. Se construyeron y evaluaron los plásmidos de producción propuestos y se demostró que el plásmido pACYCaminoSA1 no es funcional en ASR4, mientras que el plásmido pTOPOaminoSA1 sí lo es. Se desarrolló el método de UPLC propuesto con el confirmó la síntesis de ASA. Los estudios realizados mediante RT-qPCR fueron imperativos para corroborar de la transcripción de los genes

heterólogos y para inferir el comportamiento metabólico de la cepa AT1. De esta forma la cuantificación de ASA y la caracterización de las cepas en fermentador quedan como prospectivas.

Cabe mencionar que este trabajo es el segundo en reportar biosíntesis heteróloga de ASA en una sola etapa, y el primero en donde se usan cepas PTS⁻ desarrolladas para producción de compuestos aromáticos, también es el primero en usar un operón con genes sintéticos funcionales. además se reporta por primera vez un método cromatográfico para la separación e identificación de ASA con relativa facilidad,. También es la primera vez que se realiza un estudio de expresión diferencial en el metabolismo central de una cepa productora de este compuesto.

9. PROSPECTIVAS

Si bien se cuenta con evidencia de que se ha logrado producir ASA, será necesario purificar el compuesto candidato y realizar un análisis estructural mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear. Para la purificación se propone transferir el método cromatográfico a una columna preparativa en donde se pueda recuperar cantidad suficiente para el análisis. A la fecha se está trabajando en la purificación de este compuesto.

Apartemente el plásmido pTOPOaminoSA1 no es segregacionalmente estable, probablemente por la inestabilidad del antibiótico Zc, por lo que valdría la pena sustituir el gen de resistencia por otro antibiótico o subclonar el operón en un plásmido con otro marcador de selección.

Será necesario cuantificar la producción de ASA por lo que se debe contar con un estándar que pueda ser utilizado para generar una curva patrón en UPLC. A la fecha se está colaborando con el grupo del Dr. Mario Ordoñez del Centro de Investigaciones Químicas de la UAEM para la obtención de esta molécula mediante síntesis química.

Se propone realizar una caracterización cinética de la cepa AT1, monitoreando durante la fermentación consumo de Glc, producción de ACE y de intermediarios de la vía del SHK, extender el análisis transcripcional a otros genes del metabolismo glucolítico, gluconeogénico y del TCA. Un análisis similar deberá ser realizado en la cepa DT1, con el fin de comparar el metabolismo y capacidad de producción de ambas cepas.

Finalmente se plantea transformar a las cepas con el plásmido pTrcAro4 y evaluar su efecto sobre la capacidad de producción de este compuesto, sin embargo, se debe considerar que

en la cepa AT1 hay baja actividad en la glucólisis y PPP por lo que es posible que genes involucrados en estas rutas también deban ser sobreexpresados.

10. REFERENCIAS

- Aguilar, C., Escalante, A., Flores, N., de Anda, R., Riveros-McKay, F., Gosset, G., Morett, E., & Bolívar, F. (2012). Genetic changes during a laboratory adaptive evolution process that allowed fast growth in glucose to an *Escherichia coli* strain lacking the major glucose transport system. *BMC Genomics*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-385>
- Aguilar, C., Martínez-Batallar, G., Flores, N., Moreno-Avitia, F., Encarnación, S., Escalante, A., & Bolívar, F. (2018). Analysis of differentially upregulated proteins in *ptsHlccr* – and *rppH* – mutants in *Escherichia coli* during an adaptive laboratory evolution experiment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(23), 10193–10208. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9397-3>
- Alva, A., Sabido-Ramos, A., Escalante, A., & Bolívar, F. (2020). New insights into transport capability of sugars and its impact on growth from novel mutants of *Escherichia coli*. In *Applied Microbiology and Biotechnology*. 104(4), 1463–1479. Springer. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10335-x>
- Amann, E., Ochs, B., & Abel, K.-J. (1988). Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene*. 69(2), 301-305. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90440-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90440-4)
- Arakawa, K., Müller, R., Mahmud, T., Yu, T. W., & Floss, H. G. (2002). Characterization of the early stage aminoshikimate pathway in the formation of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid: The RifN protein specifically converts kanosamine into kanosamine 6-phosphate. *Journal of the American Chemical Society*, 124(36), 10644–10645. <https://doi.org/10.1021/ja0206339>
- Bilal, M., Wang, S., Iqbal, H. M. N., Zhao, Y., Hu, H., Wang, W., & Zhang, X. (2018). Metabolic engineering strategies for enhanced shikimate biosynthesis: current scenario and future developments. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102(18) 7759–7773. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9222-z>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Carmona, S. B., Flores, N., Martínez-Romero, E., Gosset, G., Bolívar, F., & Escalante, A. (2020). Evolution of an *Escherichia coli* PTS⁻ strain: a study of reproducibility and dynamics of an adaptive evolutive process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(21), 9309–9325. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10885-5>
- Carmona, S. B., Moreno, F., Bolívar, F., Gosset, G., & Escalante, A. (2015). Inactivation of the PTS as a Strategy to engineer the production of aromatic metabolites in *Escherichia coli*. In *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 25(2–3) 195–208. S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000380854>
- Chandran, S. S., Yi, J., Draths, K. M., von Daeniken, R., Weber, W., & Frost, J. W. (2003). Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. *Biotechnology Progress*, 19(3), 808–814. <https://doi.org/10.1021/bp025769p>

Chang, A. C. Y., & Cohen, S. N. (1978). Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *Journal of bacteriology*, 34(3). DOI: 10.1128/jb.134.3.1141-1156.1978.

Choi, K. R., Jang, W. D., Yang, D., Cho, J. S., Park, D., & Lee, S. Y. (2019). Systems metabolic engineering strategies: integrating systems and synthetic biology with metabolic engineering. *Trends in Biotechnology*, 37(8), 817–837. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.01.003>

Cortés-Tolalpa, L., Gutiérrez-Ríos, R. M., Martínez, L. M., de Anda, R., Gosset, G., Bolívar, F., & Escalante, A. (2014). Global transcriptomic analysis of an engineered *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: Carbohydrate phosphotransferase system during shikimic acid production in rich culture medium. *Microbial Cell Factories*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-28>

Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS*, 97(12), 6640-6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>

Diaz Quiroz, D. C., Carmona, S. B., Escalante, A. & Bolivar, F. (2014). Current perspectives on applications of shikimic and aminoshikimic acids in pharmaceutical chemistry. *Research and Reports in Medicinal Chemistry*, 2014(4), 35–46. <https://doi.org/10.2147/RRMC.S46560>

Flores, N., Flores, S., Escalante, A., de Anda, R., Leal, L., Malpica, R., Georgellis, D., Gosset, G., & Bolívar, F. (2005). Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system. *Metabolic Engineering*, 7(2), 70–87. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2004.10.002>

Flores, N., Leal, L., Sigala, J. C., de Anda, R., Escalante, A., Martínez, A., Ramírez, O. T., Gosset, G., & Bolivar, F. (2007). Growth recovery on glucose under aerobic conditions of an *Escherichia coli* strain carrying a phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system deletion by inactivating *arcA* and overexpressing the genes coding for glucokinase and galactose permease. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13(1–3), 105–116. <https://doi.org/10.1159/000103602>

Flores, S., de Anda-Herrera, R., Gosset, G., & Bolívar, F. G. (2004a). Growth-rate recovery of *Escherichia coli* cultures carrying a multicopy plasmid, by engineering of the pentose-phosphate pathway. *Biotechnology and Bioengineering*, 87(4), 485–494. <https://doi.org/10.1002/bit.20137>

Floss, H. G. (1997). Natural products derived from unusual variants of the shikimate pathway. *Natural Product Reports*, 14, 433-452. DOI: 10.1039/NP9971400433

Floss, H. G., Yu, T. W., & Arakawa, K. (2011). The biosynthesis of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid (AHBA), the precursor of mC 7 N units in ansamycin and mitomycin antibiotics: A review. In *Journal of Antibiotics*, 64(1), 35–44. <https://doi.org/10.1038/ja.2010.139>

Frost, J. W. & Gou J. (2011). Synthesis of intermediates of oseltamivir carboxylates. Patent No. US 7,977,077 B2. U.S.

- Guo, J., & Frost, J. W. (2002a). Biosynthesis of 1-deoxy-l-imino-D-erythrose 4-phosphate: A defining metabolite in the aminoshikimate pathway. *Journal of the American Chemical Society*, 124(4), 528–529. <https://doi.org/10.1021/ja016963v>
- Guo, J., & Frost, J. W. (2002b). Kanosamine biosynthesis: A likely source of the aminoshikimate pathway's nitrogen atom. *Journal of the American Chemical Society*, 124(36), 10642–10643. <https://doi.org/10.1021/ja026628m>
- Guo, J., & Frost, J. W. (2004). Synthesis of aminoshikimic acid. *Organic Letters*, 6(10), 1585–1588. <https://doi.org/10.1021/ol049666e>
- Hanahan D, Jessee J, Bloom FR. (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria, *Methods in Enzymology*. 204, 63-113. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)04006-A](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)04006-A).
- Hu, Y., Chen, B., Lei, Z., Zhao, H., Zhu, H., Quan, P., & Tian, Y. (2019). Synthesis and biological evaluation of NH₂-sulfonyl oseltamivir analogues as influenza neuraminidase inhibitors. *Molecules*, 24(11). <https://doi.org/10.3390/molecules24112176>
- Hucetogullari, D., Luo, Z. W., & Lee, S. Y. (2019). Metabolic engineering of microorganisms for production of aromatic compounds. *Microbial Cell Factories*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1090-4>
- Inaoka T., Takahashi K., Yada H., Yoshida M., Ochi K. (2004) RNA polymerase mutation activates the production of a dormant antibiotic 3,3'-neotrehalosadiamine via an autoinduction mechanism in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*. 279(5). 3885-92. doi: 10.1074/jbc.M309925200
- Invitrogen. (2012). *TOPO ® XL PCR Cloning Kit*.
- Kogure, T., Kubota, T., Suda, M., Hiraga, K., & Inui, M. (2016). Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for shikimate overproduction by growth-arrested cell reaction. *Metabolic Engineering*, 38, 204–216. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.08.005>
- Kumar, S., Goicoechea, S., Kumar, S., Pearce, C. M., Durvasula, R., Kempaiah, P., Rathi, B., & Poonam. (2020). Oseltamivir analogs with potent anti-influenza virus activity. *Drug Discovery Today*. 25(8). 1389-1402. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.06.004>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Marcus, M., & Halpern, Y. S. (1969). The metabolic pathway of glutamate in *Escherichia coli* K-12. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 177(2). 314-320. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(69\)90141-X](https://doi.org/10.1016/0304-4165(69)90141-X)
- Martínez, Juan A., Rodríguez, A., Moreno, F., Flores, N., Lara, A. R., Ramírez, O. T., Gosset, G., & Bolívar, F. (2018). Metabolic modeling and response surface analysis of an *Escherichia coli* strain engineered for shikimic acid production. *BMC Systems Biology*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s12918-018-0632-4>
- Martínez, Juan Andrés, Bolívar, F., & Escalante, A. (2015). Shikimic acid production in *Escherichia coli*: From classical metabolic engineering strategies to omics applied to

improve its production. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 3 (SEP). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00145>

Mendoza-Flores, R., Díaz-Quiroz, D., Sabido-Ramos, A., Bolívar, F., & Escalante, A. (2020). Ingeniería de vías metabólicas para la producción de metabolitos de interés industrial derivados de la vía del aminoshikimato. *BioTecnología*, 24(1).

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

Milner, J. L., Silo-Suh, L., Lee, J. C., He, H., Clardy, J., & Handelsman, J. O. (1996). Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Applied and environmental microbiology*. 62(8). 3061-3065 DOI: 10.1128/aem.62.8.3061-3065 Pansegrau, P. D., Anderson La, K. S., Widlanskilhs, T., Ream, J. E., Sammons, R. D., Sikorski, J. A., & Knowlest, J. R. (1991). Synthesis and evaluation of two new inhibitors of EPSP synthase. *Tetrahedron Letters*, 32(23), 2589-2592. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)78792-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)78792-2)

Peek, J., & Christendat, D. (2015). The shikimate dehydrogenase family: Functional diversity within a conserved structural and mechanistic framework. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 566(85–99). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.12.006>

Pontrelli, S., Chiu, T. Y., Lan, E. I., Chen, F. Y. H., Chang, P., & Liao, J. C. (2018). *Escherichia coli* as a host for metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, 50, 16–46. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.008>.

Prado, V., Lence, E., Thompson, P., Hawkins, A. R., & González-Bello, C. (2016). Freezing the dynamic gap for selectivity: motion-based design of inhibitors of the shikimate kinase enzyme. *Chemistry - A European Journal*, 22(50), 17988–18000. <https://doi.org/10.1002/chem.201602923>

Rodríguez, A., Martínez, J. A., Millard, P., Gosset, G., Portais, J.-C., Etisse, F. L., & Bolivar, F. (2017). Plasmid-encoded biosynthetic genes alleviate metabolic disadvantages while increasing glucose conversion to shikimate in an engineered *Escherichia coli* strain. *Biotechnology and Bioengineering*, 114, 1319–1330. <https://doi.org/10.1002/bit.26264>.

Rodríguez, A., Martínez, J. A., Báez-Viveros, J. L., Flores, N., Hernández-Chávez, G., Ramírez, O. T., Gosset, G., & Bolivar, F. (2013). Constitutive expression of selected genes from the pentose phosphate and aromatic pathways increases the shikimic acid yield in high-glucose batch cultures of an *Escherichia coli* strain lacking PTS and *pykF*. *Microbial Cell Factories*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-86>

Rodríguez, A., Martínez, J. A., Flores, N., Escalante, A., Gosset, G., & Bolivar, F. (2014). Engineering *Escherichia coli* to overproduce aromatic amino acids and derived compounds. *Microbial Cell Factories*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0126-z>.

Singh P, Gupta, E., Neha Mishra, & Mishra, P. (2020). Shikimic acid as intermediary model for the production of drugs effective against influenza virus. *Phytochemicals as Lead Compounds for New Drug Discovery*, 245–256. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817890-4.00016-0>

Sigala, J. C., Flores, S., Flores, N., Aguilar, C., de Anda, R., Gosset, G., & Bolívar, F. (2009). Acetate metabolism in *Escherichia coli* strains lacking phosphoenolpyruvate: Carbohydrate phosphotransferase system; evidence of carbon recycling strategies and futile cycles.

Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 16(3–4), 224–235.
<https://doi.org/10.1159/000151219>

Široký, M., Gonda, J., Martinková, M., Jacková, D., Vilková, M., Bindzár, V., Kuchár, J., & Šesták, S. (2020). Synthesis and mannosidase inhibitory profile of a small library of aminocyclitols from shikimic acid-derived scaffolds. *Carbohydrate Research*, 493.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108027>

Valle, F., Mejia, N., & Alan Berry. (2005). Application of glucose transport mutants for production of aromatic compounds. Patent No. WO/1996/034961. U.S. Patents document.

van Straaten, K. E., Ko, J. B., Jagdhane, R., Anjum, S., Palmer, D. R. J., & Sanders, D. A. R. (2013). The structure of NtdA, a sugar aminotransferase involved in the kanosamine biosynthetic pathway in *Bacillus subtilis*, reveals a new subclass of aminotransferases. *Journal of Biological Chemistry*, 288(47), 34121–34130.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.500637>

Vetter, N. D., Langill, D. M., Anjum, S., Boisvert-Martel, J., Jagdhane, R. C., Omene, E., Zheng, H., van Straaten, K. E., Asiamah, I., Krol, E. S., Sanders, D. A. R., & Palmer, D. R. J. (2013). A previously unrecognized kanosamine biosynthesis pathway in *Bacillus subtilis*. *Journal of the American Chemical Society*, 135(16), 5970–5973.
<https://doi.org/10.1021/ja4010255>

Ward, P., Small, I., Smith, J., Suter, P., & Dutkowski, R. (2005). Oseltamivir (Tamiflu®) and its potential for use in the event of an influenza pandemic. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1093/jac/dki018>

Yang, D., Cho, J. S., Choi, K. R., Kim, H. U., & Lee, S. Y. (2017). Systems metabolic engineering as an enabling technology in accomplishing sustainable development goals. *Microbial Biotechnology*, 10(5), 1254–1258. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12766>

Yu, T. W., Müller, R., Müller, M., Zhang, X., Draeger, G., Kim, C. G., Leistner, E., & Floss, H. G. (2001). Mutational Analysis and Reconstituted Expression of the Biosynthetic Genes Involved in the Formation of 3-Amino-5-hydroxybenzoic Acid, the Starter Unit of Rifamycin Biosynthesis in *Amycolatopsis mediterranei* S699. *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), 12546–12555. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009667200>

Zhang, Z., & Marshall, A. G. (1998). A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 9(3), 225–33. [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(97\)00284-5](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(97)00284-5).

Zurita, M., Bolivar, F., & Soberon, X. (1984). Construction and characterization of new cloning vehicles VII. Construction of plasmid pBR327par, a completely sequenced, stable derivative of pBR327 containing the par locus of pS101. *Gene*, 28(1), 119–122.
[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(84\)90094-5](https://doi.org/10.1016/0378-1119(84)90094-5).

ANEXO 1. OLIGONUCLEÓTIDOS USADOS EN ESTE TRABAJO

Nombre	Secuencia	Descripción
OASA Fw	CAC ACA GGA AAC AGC ATA TGA CTC ATT TCC CAC CTT TG	Amplificación del operón aminoSA1 y adición de sitios NdeI
OASA Rv	CGG GTA CCG AGC TCT TAA CCG ATT TCT TGC TTG AT	
ASHK 1 Rv	GTC GTC GCC GGT CAT TTC CAC ATG C	Secuenciación de operón aminoSA1
ASHK 2 Fw	CGA CGC CGG AAC AGG CAG TTG AAT	
ASHK 2 Rv	AGT GTT CAT TTT GGC ACG GAC GCT CTC	
ASHK 3 Fw	CGC CGC AAG AAG TTT ACC TGG CGT	
ASHK 3 Rv	ACG TTT GCG GAT TGA TGT CGA CGT	
ASHK 4 Fw	GTA CGG ACG CGA TCA TGA TCG GTC T	
TOPO FW	CAG GAA ACA GCT ATG ACC	Secuenciación de insertos en pCR®-XL-TOPO®
TOPO RV	GTA AAA CGA CGG CCA GTG	
Aro4 1	GCG CCG CTC GAG TTA CAG CAG TTC TTT TGC TTT CGC AAC AAC	Construcción del plásmido pTrcAro4 a partir de pTrcAro5, adición de extremos XhoI
Aro4 2	TAT AAT ACT CGA GGT CGA GGG GGG GCC CAG GAG	
Aro5 Seq Rv	GTT TCA CTT CTG AGT TCG GCA T	Secuenciación de insertos en el MCS de pTrc99A y derivados, incluido pACYCmod
Rv Bam	TAC CGC CTT TGA GTG AGC TG	
aroK'5	CAT TCC CTG GTT CGG GCA AT	Verificación de inactivación de <i>aroK</i>
aroK'3	GGG ATG GTT GAC CGC AGT TT	
aroL'5	TTG TCC GGC AGT GTG AAG CG	Verificación de inactivación de <i>aroL</i>
aroL'3	TTA CCG GGC AAG TGT GAA GC	
PykFFw	TGT AGA ACT CAA CGA CTC AAA AAC A	Verificación de inactivación de <i>pykF</i>
PykFRv	AAA ATT GAG AGA AAA CAG GAT GCT T	
Fwd Bam	GCA TCT CTC CCG CAA GGA CT	Secuenciación de las regiones internas de los operones Aro5 y Aro4
Rv sec3	CTC AAG CGG GCT GGG TTA CC	
Rv sec2	CTA CGG TGT TCG CGA GTT CG	
Fw sec3	CAT CAG GAA GGT GGA GGT GT	
Rv sec1	AGG GCT GAT TAA CGA TCC GC	
Fw sec2	GCT CAT CAG GTC AGC GAG AT	
Rv Xba	CCA CTC CTT TCC CTG GAC TG	
Fw sec1	CTG ATG CCA CTG GAT GTT GC	

ANEXO 2: PLÁSMIDOS Y CEPAS USADOS EN ESTE TRABAJO

Plásmido	Características	Referencia
pTrc327par	Derivado de pBR322 con la región <i>par</i> que proporciona estabilidad segregacional	Zurita et al., 1984
pACYC184	Vector de clonación con ori p15A compatible con plásmidos derivados de pBR322	Chang & Coen, 1978
pTrc99A	Vector con ori de pBR322 con promotor <i>trc</i>	Amann et al., 1988
pACYCmod	Derivado de pACYC184 con el MCS de pTrc99A y promotor <i>trc</i>	No publicado
pTrc99A <i>lacI</i> ⁻¹	Derivado de pTrc99A carente de <i>lacI</i> y sitio de restricción NdeI frente al promotor <i>trc</i>	No publicado
pCR-XL-TOPO	Vector para clonación de insertos romos frente al promotor <i>lac</i>	Invitrogen, 2012
pTrcAro6	pTrc327par/ <i>trc aroB tktA aroG^{tblr} aroE aroD zwf</i>	Rodríguez et al., 2013
pTrcAro5	pTrc99A/ <i>lacI</i> ⁻¹ / <i>trc aroB tktA aroG^{tblr} aroE aroD</i>	No publicado
pTrcAro4	pTrc99A/ <i>lacI</i> ⁻¹ / <i>trc aroB tktA aroE aroD</i>	Este trabajo
pTrcAminoSA	pTrc327par/ <i>trc aroB rrfH ntdC ntdA tktA aroE aroD</i>	Este trabajo
pACYCaminoSA1	pACYCmod/ <i>trc rrfH ntdC ntdA</i>	Este trabajo
pTOPOaminoSA1	pCR-XL-TOPO/ <i>lac rrfH ntdC ntdA</i>	Este trabajo
Cepa	Fenotipo	Referencia
JM101	<i>F⁻ traD36 proA + proB + lacIq lacZΔM15/supE thi Δ(lac-proAB) rpoS(33 am)</i>	Messing, 1979
PB11	JM101 $\Delta(ptsHIcrr)::km^R$ (PTS ⁻)	Flores et al., 2005
PB12	PB11 PTS ⁻ Glc ⁺ Evolucionada en laboratorio	Flores et al., 2005
SB24	PB11 PTS ⁻ Glc ⁺ Evolucionada en laboratorio	Carmona et al., 2020
DKLF	SB24 <i>aroKL⁻ pykF⁻</i>	Rodríguez, 2020
AR3	PB12 <i>aroKL⁻ pykF⁻ lacI⁻</i>	Rodríguez et al., 2013
ASR4	AR3 <i>aroFGH⁻</i>	Este trabajo
AR36	AR3 + pTrcAro6	Rodríguez et al., 2013
ASR45	ASR4 + pTrcAro5	Este trabajo
AT1	ASR4 + pTOPOaminoSA1	Este trabajo
DT1	DKLF + pTOPOaminoSA1	Este trabajo
DH5 α	<i>F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80d/lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻m_K⁺), λ⁻</i>	Hanahan et al., 1991

ANEXO 3: EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES DETERMINADOS MEDIANTE RT-QPCR EN LA CEPA AT1

No	Gen	Expresión relativa	Enzima	Metabolismo
1	<i>galP</i>	13.67 ± 2.70	Simportador de galactosa:protón	Glucólisis
2	<i>glk</i>	0.94 ± 0.076	Glucocinasa	
3	<i>pgi</i>	0.39 ± 0.056	fosfoglucosa isomerasa	
4	<i>pykA</i>	3.09 ± 0.574	Piruvato cinasa	
5	<i>tktA</i>	1.57 ± 0.212	transcetolasa	FFP
6	<i>zwf</i>	1.08 ± 0.052	glucosa deshidrogenasa	Glutamato
7	<i>aspA</i>	14.39 ± 2.310	aspartato amonio liasa	
8	<i>aspC</i>	2.26 ± 0.638	aspartato aminotransferasa	
9	<i>gdhA</i>	3.99 ± 0.585	Glutamato DH (NADPH)	
10	<i>gltB</i>	0.47 ± 0.095	Glutamato sintasa (NADPH)	
11	<i>gltP</i>	1.46 ± 0.061	Simportador de Glutamato:Protón	ACE
12	<i>ackA</i>	2.10 ± 0.445	Acetato cinasa	
13	<i>acs</i>	2.16 ± 0.624	A-coA sintasa	
14	<i>actP (yjcG)</i>	1.60 ± 0.461	Simportador de acetato:glicolato	
15	<i>poxB</i>	0.38 ± 0.054	Piruvato oxidasa	SHK
16	<i>pta</i>	2.37 ± 0.103	Fosfato acetil transferasa	
17	<i>aroB</i>	1.15 ± 0.067	DHQ sintasa	
18	<i>aroD</i>	1.59 ± 0.345	DHQ deshidratasa	TCA
19	<i>aroE</i>	0.62 ± 0.056	SHKDH	
20	<i>gltA</i>	1.54 ± 0.262	Citrato sintasa	TCA
21	<i>icdA</i>	1.15 ± 0.258	Isocitrato deshidrogenasa	
22	<i>lpdA</i>	0.70 ± 0.044	2-oxoglutarato descarboxilasa	
23	<i>sucA</i>	2.00 ± 0.433	2-oxoglutarato descarboxilasa	Antibiotico
24	<i>aacC1</i>	0.51±0.092	Resistencia a gm	
25	<i>kmR *</i>	3.66 ± 0.761	Resistencia a km	

ANEXO 4: PRODUCTOS DE ESTE TRABAJO

- El protocolo de esta tesis ganó en 2019 el premio “Sergio Sánchez Esquivel” al mejor protocolo de tesis de maestría otorgado por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. y Applikon Biotechnology Inc.
- Se publicaron dos artículos de revisión:
 1. Adelfo Escalante, **Rubén Mendoza-Flores**, Guillermo Gosset, Francisco Bolívar. 2021. The aminoshikimic acid pathway in bacteria as source of precursors for the synthesis of antibacterial and antiviral compounds. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. kuab053.
 2. **Rubén Mendoza-Flores**, Dulce Díaz-Quiroz, Andrea Sabido-Ramos, Francisco Bolívar, Adelfo Escalante. 2020. Ingeniería de vías metabólicas en bacterias para la producción de intermediarios de interés industrial de la vía del aminoshikimato. *BioTecnología*, Año 2020, Vol. 24 No. 1
- Se apoyó al Biol. Daniel Rodríguez Delgadillo en la realización de su tesis de licenciatura titulada “Evaluación de la capacidad de producción de shikimato en la cepa SB24 de *Escherichia coli* PTS⁻ evolucionada”
- Se presentó el cartel en el XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería León 2019:
 - **Rubén Mendoza-Flores**, Dulce Díaz-Quiroz, Andrea Sabido-Ramos, Francisco Bolívar, Adelfo Escalante. 2019. Complementación funcional de una cepa de *Escherichia coli* DAHPS⁻ con un plásmido de producción de shikimato que incluye el gen *aroG*^{Fbr}. XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería León 2019
- Se impartió en dos ocasiones la plática “Ingeniería de vías metabólicas para la producción de shikimato y aminoshikimato en cepas de *Escherichia coli* PTS⁻” a alumnos de la Licenciatura en Ingeniería Biológica de la UAM Cuajimalpa.