



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAestrÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE FLUJOS DE CARBONO EN UNA CEPA DE *Escherichia coli* PRODUCTORA DE ÁCIDO SHIKÍMICO.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A

Q.A. Susy Beatriz Carmona Contreras

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. J. Adelfo Escalante Lozada (IBT- UNAM)

INTEGRANTES DE COMITÉ TUTOR:

Dra. Rosa María Gutiérrez Ríos (IBT- UNAM)

Dr. Edmundo Castillo Rosales (IBT- UNAM)

CUERNAVACA, MORELOS

AGOSTO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Dr.	Lorenzo Segovia Forcella
Secretario	Dra.	Liliana Pardo López
Vocal	Dra.	Alicia González Manjarres
Vocal	Dr.	Víctor Humberto Bustamante Santillán
Vocal	Dr.	Gerardo Corzo Burguete

Este trabajo fue realizado en el departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología, UNAM.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	16
EL ÁCIDO SHIKÍMICO	2
ANÁLISIS DE FLUJOS METABÓLICOS	4
LOS DIFERENTES ENFOQUES PARA EL ANÁLISIS DE FLUJOS.	6
ANÁLISIS DE FLUJOS METABÓLICOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS).	8
METODOLOGÍA DEL ANÁLISIS POR GC-MS.....	10
ANÁLISIS MATEMÁTICO	12
OPENFLUX.	13
ANTECEDENTES	16
INGENIERÍA DE VÍAS METABÓLICAS: OBTENCIÓN DE UNA CEPA SOBREPDUCTORA DE SA	16
ESTUDIOS PREVIOS EN CEPAS PRODUCTORAS DE SA Y CEPAS PARENTALES	230
JUSTIFICACIÓN	23
OBJETIVOS	23
GENERAL	23
PARTICULARES	23
PARTE I.	
Crecimiento de las cepas PB12 y PB12.SA12 en medio mínimo.	
SECCIÓN A. IMPLEMENTACIÓN DE LA ESTRATEGIA DE CULTIVO	3225
METODOLOGÍA	25
CONSTRUCCIÓN DE LA CEPA DE <i>E. COLI</i> PB.12.SA12 PRODUCTORA DE SA	25
CEPAS Y PLÁSMIDOS.	25
TRANSFORMACIÓN DE LA CEPA PB12. SA1 CON LOS PLÁSMIDOS P _{JLBAROG^{FBR}TKTA} Y TOPOAROEAROB.	25
CRECIMIENTO DE LA CEPAS PB12 Y PB12.SA12 EN MEDIO MÍNIMO	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
CONSTRUCCIÓN DE LA CEPA PB12.SA12	27
CRECIMIENTO DE LA CEPAS PB12 Y PB12.SA12 EN MEDIO MÍNIMO	28

SECCIÓN B. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS PB12 Y PB12.SA12.	32
METODOLOGÍA.	32
MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO	32
CUANTIFICACIÓN DE ANALITOS PRODUCIDOS EN LA FERMENTACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL ESTADO ESTACIONARIO.	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO	33
CUANTIFICACIÓN DE ANALITOS PRODUCIDOS EN LA FERMENTACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL ESTADO ESTACIONARIO.....	35

PARTE II.

Estandarización de los pasos de preparación de la muestra para el análisis por GC-MS

METODOLOGÍA	38
PREPARACIÓN DE LA MUESTRAS PARA EL AFM.....	38
QUENCHING E HIDRÓLISIS ÁCIDA.....	38
DERIVATIZACIÓN.....	38
GC-MS.....	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
PREPARACIÓN DE LA MUESTRAS PARA EL AFM.....	39

PARTE III.

Obtención de datos para el análisis de flujos metabólicos.

METODOLOGÍA	55
CULTIVOS CON GLUCOSA MARCADA.....	55
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
CULTIVOS CON GLUCOSA MARCADA.....	55
PROCESAMIENTO DE LOS DATOS.....	57
CONCLUSIONES	68
PERSPECTIVAS	689

BIBLIOGRAFÍA.....	69
APÉNDICES.	74
APÉNDICE 1 -TRANSICIONES ATÓMICAS-.....	74
APÉNDICE 2. CRECIMIENTO EN MEDIO MÍNIMO DE LA CEPA PB12.SA22	76
APÉNDICE 3 -METODOLOGÍAS-	81
EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO -MINIPREP ALCALINA-.....	81
ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA.....	81
PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	82
ELECTROTRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	82
CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE BRADFORD	82
ENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE 3-D-ARABINO HEPTULOSONATO 7P (DAHP).....	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vía del ácido shikímico en <i>E. coli</i>	3
Figura 2. Esquema del procedimiento para la obtención del mapa de flujos metabólicos a partir de experimentos con marcación seguidos de integración in silico de los datos experimentales.....	5
Figura. 3 Los diferentes estratos celulares y sus interacciones.....	5
Figura 4. Etapas del análisis de flujos metabólicos: cultivo con sustrato marcado, medición del enriquecimiento isotópico y otros flujos extracelulares e integración de los datos experimentales en un modelo matemático.....	7
Figura 5. Relación entre la distribución de isotopómeros de aminoácidos, la distribución de isotopómeros de metabolitos y el estado de flujo del sistema biológico.....	8
Figura 6. Relación entre los átomos de los aminoácidos proteínogénicos y sus metabolitos precursores	10
Figura 7. Derivados generados en reacciones de derivatización por sililación de un alcohol y amina primarios.....	11
Figura 8. Mecanismo NS2. Transcurre por la formación de un complejo activado en el que el nucleófilo (Y) y el grupo saliente (L) están parcialmente unidos al átomo de silicio.....	12
Figura 9. Componentes del software OpenFLUX.....	13
Figura 10. La unidad de metabolito elemental está definida como un distinto subgrupo de los átomos de un compuesto, existiendo así 7 EMUs para un compuesto de 3 átomos de carbonos.....	14

Figura 11. Ejemplo de red metabólica, se ilustra la descomposición de los metabolitos en sus respectivos átomos y las transiciones atómicas que ocurren en la red.....	15
Figura 12. Descomposición de la red de EMUs, basada en el tamaño de EMU y su conectividad.....	16
Figura 13. IVM en el metabolismo central de carbono y vía del shikimato en cepas de <i>E. coli</i> PTS– Glc+ para la generación de la cepa PB12.SA22 sobreproductora de SA.....	19
Figura 14 IVM en el metabolismo central de carbono y vía del shikimato en cepas de <i>E. coli</i> PTS– Glc+ para la generación de la cepa PB12.SA12 sobreproductora de SA.....	22
Figura 15. Digestión de los plásmidos presentes en la cepa PB12.SA12.....	28
Fig. 16 Placas de medio M9 y medio ARO de la cepa PB12.SA12 tras tres días de incubación.....	29
Figura 17. Protocolo para el análisis de flujos.....	34
Figura 18. Cultivos de la cepa PB12 y PB12.SA12 en medio M9.....	34
Figura 19. La correlación lineal entre crecimiento y consumos de glucosa indica un estado estacionario metabólico durante la etapa de crecimiento exponencial del cultivo.....	36
Figura 20. Estructura del compuesto Bis-N-(trimetilsilil) acetamida.....	40
Figura 21. Cromatograma obtenido del análisis de una muestra de 10 mg de proteína celular hidrolizada de la cepa PB12 derivatizada con BSA en cloroformo como solvente.....	40
Figura 22. Cromatograma de la mezcla de aminoácidos Pro, Phe, Met, Arg e His en AcN.....	43
Figura 23. Estructura del compuestos N-Metil-N-(terbutildimetilsilil)-trifluoroacetamida (MTBSTFA).....	46
Figura 24. Reacción de sililación con MTBSTFA para la generación de TBDMS derivados.....	46
Figura 25. Cromatograma de una mezcla de Lys, Leu, Val y Met, derivatizada con MTBSTFA y acetonitrilo con 0.06% TFA	47
Figura 26. Cromatograma obtenido del análisis de una muestra de 10 mg de proteína celular hidrolizada de la cepa PB12 derivatizada con MTBSTFA en acetonitrilo como solvente	49
Figura 27. Cromatograma correspondiente al estándar de aminoácidos.....	50
Figura 28. Cromatograma correspondiente a arginina en AcN con TFA 0.06%.....	51
Figura 29. Cromatograma obtenido de hidrolizado celular.....	51
Figura 30. Espectro de masas del aminoácido isoleucina.....	52
Figura 31. Fragmentación característica de los derivados TBDMS de aminoácidos.....	53

Figura 32. Espectro de masas del aminoácido isoleucina donde se observa la intensidad de la abundancia natural de isótopos.....	53
Figura 33. Patrón de fragmentación del aminoácido histidina proveniente de un cultivo con $1\text{-}^{13}\text{C}$ glucosa como sustrato.....	56
Figura 34. Patrón de fragmentación del aminoácido histidina proveniente de un cultivo con glucosa sin marcar como sustrato.....	57
Figura 35. Representación de la distribución de masa de isotopómeros, para a) cultivo con marcación natural y b) cultivo con sustrato marcado con ^{13}C	58
Figura 36. Establecimiento del estado estacionario en la marcación en cultivos alimentados con $1\text{-}^{13}\text{C}$ Glucosa de la cepa PB12.....	61
Figura 37. Establecimiento del estado estacionario en la marcación en cultivos alimentados con $\text{U-}^{13}\text{C}$ Glucosa-Glucosa naturalmente marcada de la cepa PB12.....	61
Figura 38. Perfil de crecimiento, consumo de glucosa y producción de SA de la cepa PB12.SA22.....	77
Figura 39. Cinéticas de crecimiento de la cepa PB12.SA22 en el medio mineral empleado en la producción de SA suplementado con corismato y aminoácidos aromáticos.....	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción y rendimiento de SA y compuestos aromáticos totales en la cepa PB12 y derivadas.....	18
Tabla 2. Características de las cepas y plásmidos empleados.....	25
Tabla 3. Elementos que componen los medios empleados.....	27
Tabla 4. Crecimiento en medios sólidos de las cepas PB12 y PB12.SA12.....	28
Tabla 5. Crecimiento en medio sólido, segunda resiembra.....	29
Tabla 6. Composición de los medios de cultivo empleados.....	30
Tabla 7. Crecimiento en medios líquidos de la cepa PB12.SA12.....	31
Tabla 8. Velocidad específica de crecimiento (μ) de las cepas PB12 y PB12.SA12.....	35
Tabla 9. Producción de metabolitos de las cepas PB12 y PB12.SA12.....	35
Tabla 10. Escala de hidrofobicidad de los 20 aminoácidos esenciales.....	42
Tabla 11. Resultados del análisis por GC-MS para la mezcla de aa con distintos solventes.....	42
Tabla 12. Pruebas de solubilidad de la leucina en diferentes solventes.....	44
Tabla 13. Solubilidad de algunos aminoácidos en acetonitrilo 0.06% de TFA.....	45
Tabla 14. Aminoácidos identificados con cloroformo y acetonitrilo en MTBSTFA. Se remarcan en negro los aminoácidos que se descomponen en el proceso de hidrólisis.....	48

Tabla 15. Distribución de masa de isotopómeros para el fragmento M-57 de los aminoácidos proteínogénicos de la cepa PB12.SA12 en medio mínimo M9 con ¹³ Cglucosa como fuente de carbono.....	58
Tabla 16. Radios de intensidad derivados de cultivos con glucosa naturalmente marcados (exp) y muestra de aminoácidos estándar (calc).....	60
Tabla 17. Distribución de masa de isotopómeros para el fragmento M-57 de los aminoácidos proteínogénicos de las cepas PB12 y PB12.SA12 en medio mínimo M9 con diferentes sustratos marcados.....	62
Tabla 18. Radios de intensidad calculados para el fragmento M-57 de los aminoácidos proteínogénicos de las cepas PB12 y PB12.SA12 en medio mínimo M9 con diferentes sustratos marcados	65
Tabla 19. Transiciones atómicas en las distintas reacciones del metabolismo central y síntesis de aminoácidos	74
Tabla 20. Medio de producción empleado por Li <i>et al.</i> (1999), para la producción de DHS y empleado para la producción de SA con la cepa PB12.SA22.....	76
Tabla 21. Pruebas de crecimiento para la cepa PB12.SA22 en medio líquido mínimo suplementado	78

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFM	Análisis de flujos metabólicos
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Bis-N-(trimetilsilil) acetamida
CHA	Corismato
D.O.	Densidad óptica
DAHP	3- Deoxi-D-arabino-heptulosa-7-fosfato
DHB	2,3-Ácido dihidroxibenzoico
DHQ	3-Dehidroquinato
DHS	3-Dehidrosikimato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E4P	Eritrosa-4-P
ED	Entner-Doudoroff
EM	Emben-Meyerhof
EMU	Unidad de metabolito elemental
EPSP	5-Enolpiruvilshikimato 3-fosfato
GC	Cromatografía de gases
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
Glc	Glucosa
IVM	Ingeniería de vías metabólicas

IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
Km	Kanamicina
LB	Luria Bertani
MS	Espectrometría de masas
MTBSTFA	N-Metil-N-(terbutildimetilsilil)-trifluoroacetamida
OSF	Oseltamivir fosfato
PABA	Ácido p-aminobenzóico
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PEP	Fosfoenolpiruvato
PHB	Ácido p-hidroxibenzoico
PP	Pentosas fosfato
PTS	Sistema de fosfotransferasa (por las siglas en inglés Phosphotransferase Systems)
RMN	Resonancia magnética nuclear
S3P	Skikimato-3-fosfato
SA	Ácido shikímico
T	Temperatura
TBTMS	Ter-butildimetilsilil
Tc	Tetraciclina
TktA	Transcetolasa I
TMS	Trimetilsili
VSA	Vía del ácido shikímico
YE	Extracto de levadura
Zn	Zeocina

Tabla de unidades

Prefijos y sufijos

Magnitud	Unidad	Símbolo	10^3	kilo (k)
Volumen	Litro	L	10^2	hecto (h)
Temperatura	Grados centígrados	°C	10^1	deca (h)
Tiempo	Hora	h	10^0	UNIDAD
	Minuto	min	10^{-1}	deci (d)
	Segundo	s	10^{-2}	centi (c)
Masa	Gramo	g	10^{-3}	mili (m)
Cantidad de sustancia	Mol	mol	10^{-6}	micro (μ)
Velocidad centrífuga	Revoluciones por minuto	rpm	10^{-6}	micro (μ)
			10^{-9}	nano (n)



RESUMEN

La determinación del fluxoma a través del análisis de flujos metabólicos (AFM) que consiste en la cuantificación de las tasas individuales a través de las reacciones bioquímicas en una red metabólica [Fischer *et al.*, 2004], se ha convertido en una de las herramientas más relevantes en el análisis global de la fisiología de organismos de importancia biotecnológica.

La cepa PB12.SA22 (PB12 *aroG^{fbr} tktA aroB aroE ΔaroK ΔaroL*) construida en nuestro grupo de trabajo, constituye un ejemplo de microorganismo de interés biotecnológico ya que es capaz de alcanzar en sistemas de fermentación en lote en reactores de 1 L, con 500 mL de medio mineral suplementado con 25 g/L de glucosa y 15 g/L de extracto de levadura, un título de 7.1 g /L de ácido shikímico (SA) con un rendimiento de 0.29 mol SA/mol de glucosa [Escalante *et al.*, 2010],

El SA es un intermediario de la vía común de biosíntesis de compuestos aromáticos, y es un compuesto de suma importancia ya que se utiliza como precursor en la síntesis de una amplia variedad de compuestos, entre los que destaca el inhibidor de la neuraminidasa de virus influenza: oseltamivir fosfato (OSF) [Draths *et al.*, 1999; Krämer *et al.*, 2003]; el cual, comercializado bajo el nombre de Tamiflu® y producido por Roche Pharmaceuticals, se emplea para el tratamiento influenza estacional, de la gripe aviar H5N1 y más recientemente en el tratamiento de la influenza humana A/H1N1.

La obtención de SA a partir de un microorganismo modificado genéticamente representa una alternativa al proceso de obtención tradicional el cual se realiza a partir del anís estrella chino de las especies *Illicium anisatum* o *Illicium verum* y que no representa una producción suficiente para cubrir su demanda para la síntesis del OSF en el caso de presentarse una pandemia de influenza [Ghosh *et al.*, 2012].

La modificación de una sola función celular implica cambios a nivel molecular y celular que no pueden ser predichos con exactitud, de tal forma que una cepa con múltiples modificaciones, como es el caso de la cepa PB12.SA22, involucra cambios mucho más complejos. El preciso monitoreo de la respuesta de los flujos metabólicos a modificaciones genéticas, ofrece significativas ideas acerca del fenotipo de un organismo, así como información importante para estrategias racionales de ingeniería genética [Dauner y Sauer, 2000], ya que permite un mayor entendimiento de las interacciones entre los componentes de los sistemas vivos, y por consiguiente, de sus procesos biológicos.

Con el presente trabajo se establece una metodología para el AFM en una cepa productora de SA, que implica tanto el establecimiento de las condiciones de crecimiento adecuadas para las cepas empleadas, así como la obtención de datos experimentales necesarios para ser integrados en un modelo matemático.

INTRODUCCIÓN

EL ÁCIDO SHIKÍMICO

El SA es un intermediario importante en la vía de compuestos aromáticos, la cual dirige hacia la síntesis de una amplia gama de metabolitos tanto primarios como secundarios: aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano), vitaminas aromáticas (ácido fólico y vitamina K), ubiquinona, naftoquinonas, enteroquelina, alcaloides, compuestos fenólicos y fenilpropanoides, folatos, coenzimas y fenazinas [Herrmann y Weaver, 1999]; debido a la importancia de este compuesto, esta vía es también llamada vía del ácido shikímico (VSA).

La VSA vincula el metabolismo de los hidratos de carbono con la biosíntesis de los compuestos aromáticos en organismos como plantas, bacterias, hongos ascomicetos y ciertos parásitos apicomplexa. En el tronco principal de la vía, los precursores exógenos: fosfoenolpiruvato (PEP) y eritrosa-4-P (E4P) provenientes de la vía glucolítica de Emben-Meyerhof (EM) y de la vía de las pentosas fosfato (PP) respectivamente, se convierten a través de 7 reacciones enzimáticas que terminan en la síntesis de corismato (CHA) (fig. 1), el cual es el precursor común para la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos, además de los metabolitos antes mencionados [Herrmann y Weaver, 1999].

El SA representa un compuesto de alto valor comercial por la alta funcionalidad de su molécula: anillo de 6 carbonos con tres centros asimétricos y un grupo funcional ácido carboxílico; se considera como un atractivo bloque de construcción en la síntesis de varios compuestos tales como: aditivos en alimentos, alimento para animales, inyectables, entre otros [Rawat y Tripathi, 2013]; recientemente ha ganado mayor importancia por ser el compuesto base para la síntesis del antiviral OSF, inhibidor de la neuraminidasa del virus de la influenza, el cual es producido por Roche Pharmaceuticals bajo el nombre comercial de Tamiflu® para el tratamiento contra el virus de la influenza común tipo A y B, así como para los casos de infección por los virus H5N1, H3N2 y más recientemente para el tratamiento de influenza humana A/H1N1.

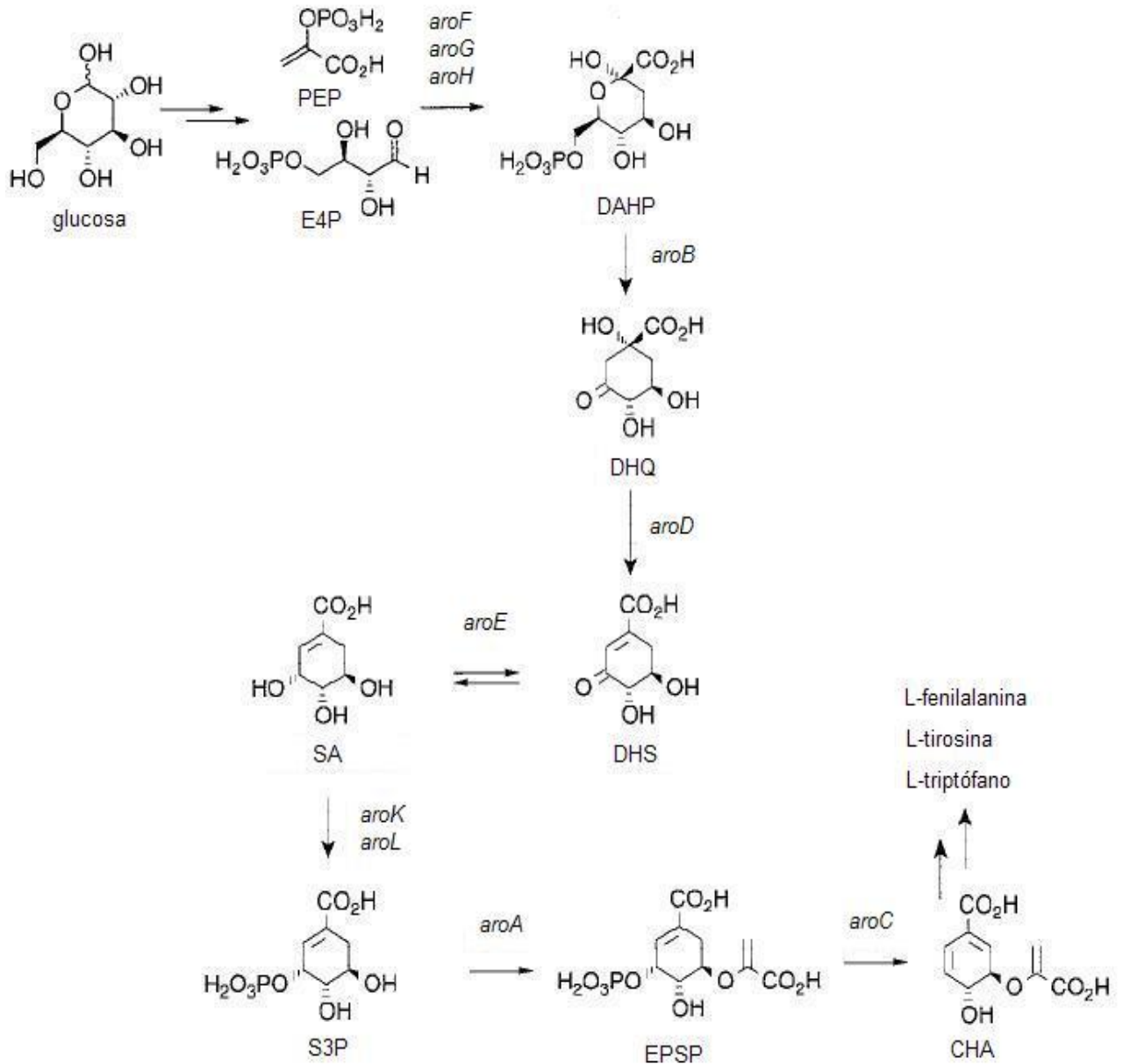


Figura 1. Vía del ácido shikímico en *E. coli*. Se indica cada uno de los intermediarios, así como los genes que codifican para las correspondientes enzimas de cada paso de la vía. *aroF*, *aroG*, *aroH*: isoenzimas DAHP sintasa AroF, AroG y AroH, respectivamente; *aroB*: DHQ sintasa; *aroD*: DHQ deshidratasa, *aroE*: shikimato deshidrogenasa; *aroK*, *aroL*: shikimato cinasa I/II, *aroA*: EPSP sintasa; *aroC*: corismato sintasa; PEP: fosfoenolpiruvato; E4P: eritrosa-4-fosfato; DAHP: 3- deoxi-D-arabino-heptulusonato-7-fosfato; DHQ: 3-dehidroquinato; DHS: 3-dehidroshikimato; SA: shikimato; S3P: shikimato-3-fosfato; EPSP: 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato; CHA: corismato (modificado de Kai *et al.*, 1999 y Knop *et al.*, 2001).

El SA actualmente se extrae de los frutos de la planta anís estrella *chino Illicium anisatum* y *I. verum* [Ghosh *et al.*, 2012], siendo este proceso costoso y que no permite altas producciones. Con el fin de mejorar la disponibilidad del SA, una

alternativa a este método es la producción por sistemas de fermentación a partir de un microorganismo modificado genéticamente.

ANÁLISIS DE FLUJOS METABÓLICOS.

El mejoramiento de la capacidad de producción de un metabolito de interés, es uno de los pasos críticos en el desarrollo racional de bioprocesos destinados a la obtención de compuestos de importancia industrial [Iwatani *et al.*, 2008]. El desarrollo de cepas industriales actualmente se ha desplazado hacia el uso de sistemas de ingeniería metabólica con la introducción racional y benéfica de modificaciones genéticas basadas en un entendimiento amplio del metabolismo fundamental y redes de regulación [Kohlstedt *et al.*, 2010], aplicándose cada vez más, herramientas de análisis global que permitan el estudio del microorganismo productor a varios niveles de información: genómico, transcriptómico, proteómico, fluxómico y metabolómico (herramientas ómicas).

El entendimiento del metabolismo de un microorganismo y en nuestro caso particular de una cepa productora de SA, en un alto nivel de la funcionalidad del sistema entero, se puede lograr mediante el AFM o el análisis de su fluxoma; de este modo, por medio de la aplicación de dicho enfoque es posible determinar la distribución del carbono a través de las diferentes vías de la red metabólica, para elucidar el estado metabólico de la célula y poder ser aplicado a bioprocesos [Iwatani *et al.*, 2008], ya que además de tratarse de una herramienta de gran importancia para el análisis fisiológico [Kohlstedt *et al.*, 2009], surge la posibilidad de identificar reacciones clave para la obtención de uno o varios metabolitos y su posible modificación posterior [Nikel, 2009].

Teniendo como objetivo la cuantificación detallada de todos los flujos metabólicos en el metabolismo de un organismo, el AFM da como resultado final un mapa de reacciones bioquímicas que muestra la distribución de los flujos anabólicos y catabólicos en el contexto de una red de reacciones bioquímicas (fig. 2), que corresponde con el fenotipo final de un organismo, ya que todos los eventos celulares culminan en el flujo llevado a cabo en cada conversión bioquímica en la célula: transcripción, traducción, procesos post-transcripcionales y mecanismos regulatorios (fig. 3).

De este modo, a diferencia de otras herramientas ómicas que solo brindan información acerca de un solo estrato del sistema celular (genoma, transcriptoma, proteoma, metaboloma) y que no muestran la interacción entre estos, los flujos metabólicos reflejan estrechamente el estado metabólico fundamental de una célula, lo que resulta esencial para comprender las propiedades del sistema [Kohlstedt *et al.*, 2010], de esta forma el fluxoma es de central importancia para el entendimiento del mismo.

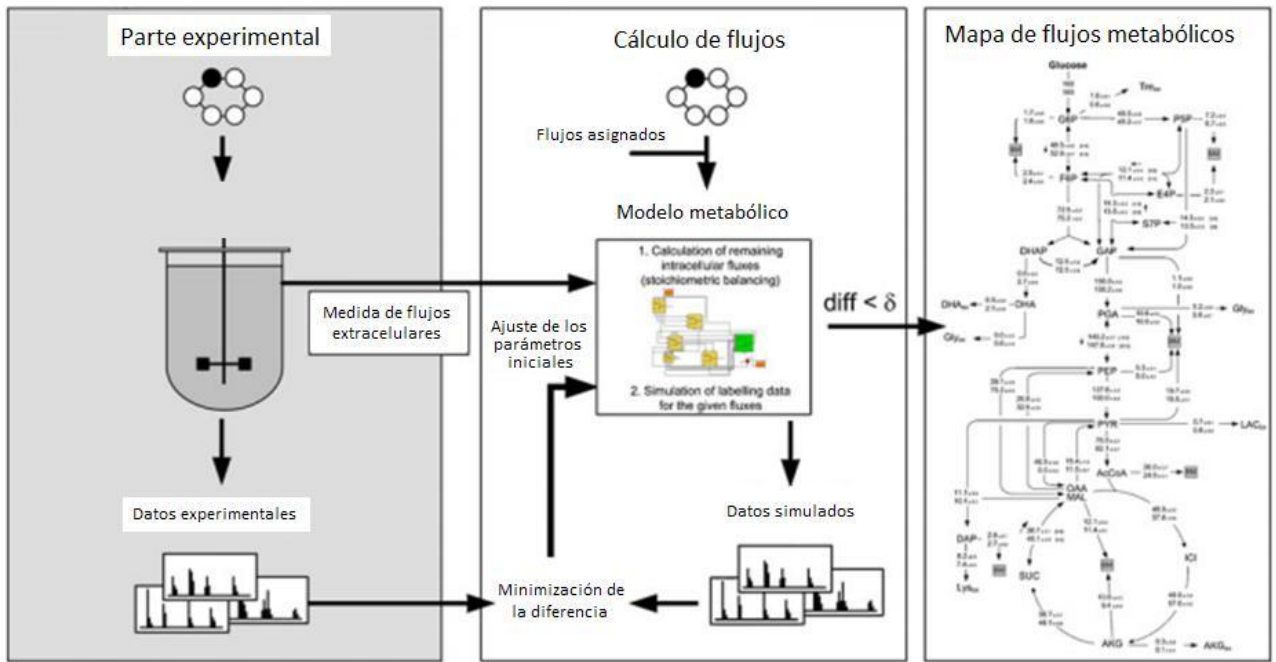


Figura. 2 Esquema del procedimiento para la obtención del mapa de flujos metabólicos a partir de experimentos con marcación seguidos de integración *in silico* de los datos experimentales (modificado de Kohlstedt *et al.*, 2010).

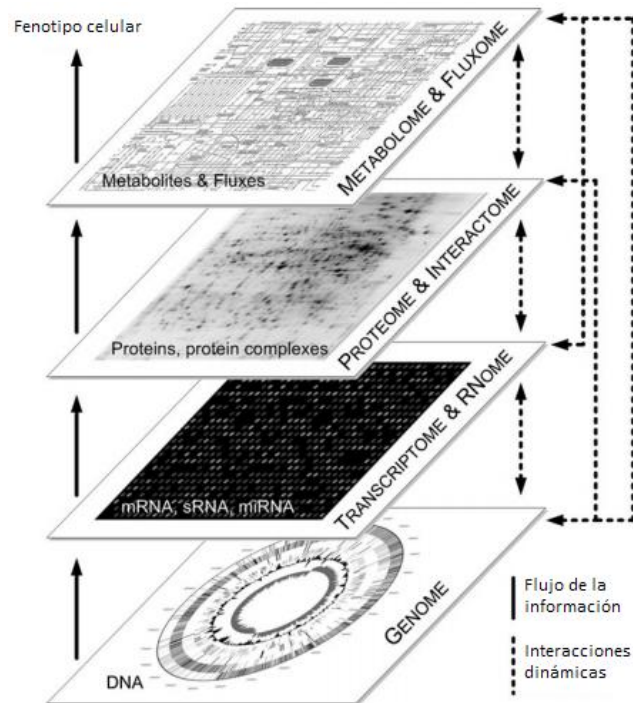


Figura 3. Los diferentes estratos celulares y sus interacciones (modificado de Kohlstedt *et al.*, 2010).

Los diferentes enfoques para el análisis de flujos.

En principio, el AFM se basa en la conservación de la masa de metabolitos clave: se asume que la suma de los flujos de entrada para cada metabolito iguala la suma de los flujos de salida, no existiendo en teoría acumulación de los mismos; de este modo, los flujos intracelulares se pueden calcular mediante la aplicación de balances de masa y ecuaciones estequiométricas.

El número de flujos extracelulares es limitado en la práctica y las restricciones estequiométricas conducen a menudo a sistemas algebraicos indeterminados, por lo que en sus inicios, el AFM se basaba solamente en balances de metabolitos haciendo muchas suposiciones no tan válidas. Esta metodología estequiométrica establecida por Varma y Palsson en los años 1990's para la interpretación del metabolismo central de *E. coli* [Varma y Palsson, 1994], hace uso del conocimiento de la estequiometría en cada una de las reacciones de una red metabólica determinada.

Debido a que el metabolismo central de carbono en *E. coli* o de cualquier organismo contiene reacciones tanto anabólicas como catabólicas, proporcionando cofactores, bloques de construcción a otras vías, así como ATP para la generación de energía, existen numerosas limitaciones para la interpretación estrictamente estequiométrica de los flujos metabólicos en un microorganismo [Matsuoka y Shimizu, 2010]. Algunas de ellas son:

- a) existencia de vías metabólicas paralelas, que conducen al mismo metabolito pero utilizando isoenzimas e intermediarios diferentes,
- b) presencia de ciclos metabólicos en los cuales no se puede medir directamente al menos un flujo interno en el ciclo,
- c) existencia de vías metabólicas bidireccionales que operan al mismo tiempo en ambos sentidos. Este es el caso para la enorme mayoría de las reacciones bioquímicas de una célula; de hecho, solamente pueden considerarse como unidireccionales aquellas reacciones cuya reversibilidad esté fuertemente impedida desde el punto de vista termodinámico. Un ejemplo particular de esta situación es el caso de las reacciones altamente reversibles catalizadas por las enzimas transaldolasa y transcetolasa en la vía de pentosas fosfato, y
- d) dificultades en el balance de cofactores. En una red metabólica típica, que normalmente consta de la vía de EM, vía de PP, ciclo de ácidos tricarboxílicos (TCA), y reacciones anapleróticas, solamente se pueden determinar estequiométricamente los flujos asumiendo que la síntesis y el consumo de metabolitos asociados al balance energético y balance redox (p.e. ATP, ADP, NADH, NAD⁺, etc.), se encuentran perfectamente balanceados. Sin embargo, la evidencia experimental sugiere que existen numerosos ciclos fútiles, y que la conversión energética de equivalentes de reducción, como NADH y NADPH, a ATP no es constante incluso para el mismo microorganismo en condiciones de cultivo similares [Neijssel y Teixeira, 1994].

Estas limitaciones son parcialmente eliminadas por medio del AFM basado en el uso de un sustrato isotópicamente marcado, por ejemplo con ¹³C [Wittmann y Heinze,

1998]. Así, los flujos netos a través de las redes metabólicas pueden ser deducidos de la información de los experimentos con ^{13}C cuando se combina con balances de materia dentro de un modelo estequiométrico. Esto requiere de medidas adicionales como flujos extracelulares y composición de la biomasa.

La conversión metabólica del sustrato isotópicamente marcado, genera moléculas con distintos patrones de marcación: los isótopos isómeros (isotopómeros), que pueden ser detectados por espectrometría de masas (MS) o espectroscopia por resonancia magnética nuclear (RMN) [Antoniewicz *et al.*, 2007].

Los experimentos con un trazador isotópico, permite la identificación de cada uno de los metabolitos en la red y evita la mayoría de las complicaciones asociadas al análisis puramente estequiométrico dado que se conoce el destino de las moléculas marcadas y se puede seguir su 'trayectoria' intra y extracelular.

La aplicación del AFM con marcación isotópica requiere de la combinación de datos experimentales con un modelo matemático y es posible dividirlo en tres etapas clave: cultivo, medida de metabolitos y cálculo de los flujos (fig. 4) [Riascos *et al.*, 2005].

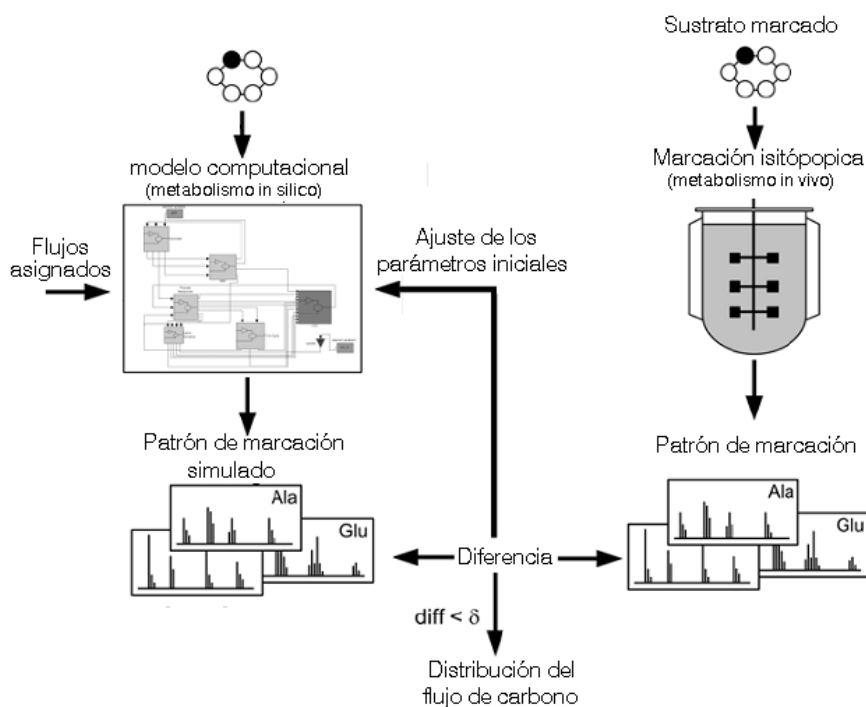


Figura 4. Etapas del análisis de flujos metabólicos: cultivo con sustrato marcado, medición del enriquecimiento isotópico y otros flujos extracelulares e integración de los datos experimentales en un modelo matemático (modificado de Wittmann, 2007).

En la primera parte, el sistema biológico se alimenta con el sustrato marcado, y los átomos de éste se distribuyen entre los metabolitos de la red bioquímica hasta llegar a un equilibrio estacionario de los átomos ^{13}C donde las células son colectadas. En este estado estacionario, la composición de isotopómeros de los intermediarios metabólicos es única y completamente determinada por el estado de los flujos

celulares y el marcador isotópico suministrado [Antoniewicz *et al.*, 2007]; el supuesto de estacionariedad es válido para cultivos continuos, la fase de crecimiento exponencial de los cultivos en lote y lote alimentado donde la tasa de dilución es baja [Noh *et al.*, 2006].

El enriquecimiento isotópico en la red, se determina en una segunda etapa empleando técnicas que distinguen entre los diferentes patrones de marcación de isótopos, por ejemplo RMN o MS [Wittmann, 2007].

La resolución de los flujos intracelulares depende de forma importante de la estrategia de marcación; el uso de mezclas de [U-¹³C]glucosa y glucosa sin marcar son particularmente útiles para resolver flujos corriente debajo de PEP y algunos flujos que resultan del rompimiento de enlaces C-C. El uso exclusivo de [1-¹³C]glucosa es importante para resolver la parte superior del metabolismo, glucólisis y en particular la vía oxidativa de las PP y Entner-Doudoroff (ED) [Fischer *et al.*, 2004].

Análisis de flujos metabólicos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Como se mencionó previamente, el enriquecimiento isotópico se puede determinar por GC-MS o bien por RMN.

El análisis por GC-MS, que proporciona la distribución de masas, involucra además de una sencilla manipulación de la muestra, una alta sensibilidad, pudiendo detectar concentraciones en un rango de hasta 10⁻⁷ M, mientras que por RMN no se pueden detectar concentraciones por debajo de 10⁻⁴M [Matsuoka y Shimizu, 2010], permitiendo con el empleo de GC-MS la miniaturización del análisis [Dauner y Sauer, 2000], así como el análisis de cultivos donde se alcanza poca concentración de biomasa.

La composición de isotopómeros de los intermediarios metabólicos es una función del estado de flujos celular y depende de la red de reacciones, el marcador administrado y el estado metabólico del sistema [Dauner y Sauer, 2000] (fig. 5).

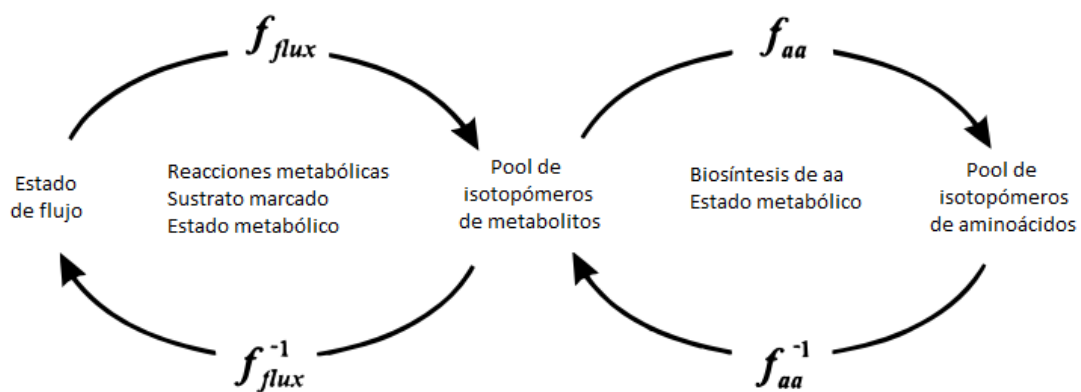


Figura 5. Relación entre la distribución de isotopómeros de aminoácidos, la distribución de isotopómeros de metabolitos y el estado de flujo del sistema biológico (modificado de Dauner y Sauer, 2000).

Actualmente, la técnica de GC-MS en combinación con la medida directa de flujos extracelulares, se considera un eficiente método para obtener la distribución intracelular de flujos metabólicos. Los flujos extracelulares incluyen la concentración de biomasa, consumo de sustrato y producción de metabolitos extracelulares [Riascos *et al.*, 2005].

Las altas velocidades de intercambio de los metabolitos y sus bajas concentraciones presentan un problema para el análisis de isotopómeros de los intermediarios de las vías centrales. Para evitar este problema la composición de isotopómeros en las vías centrales de carbono es a menudo analizado por aminoácidos, los cuales son sintetizados a partir de dichos metabolitos y están disponibles en altas concentraciones en la proteína celular. Así las vías biosintéticas de aminoácidos y su estado metabólico son parámetros fundamentales si la función inversa es buscada por balance de metabolitos con datos de aminoácidos.

De este modo, las biomoléculas que proveen información acerca del estado isotópico de intermediarios metabólicos (isotopómeros), son más comúnmente los aminoácidos proteinogénicos, pudiendo emplear también otros polímeros como carbohidratos o bien ácidos orgánicos [Christensen y Nielsen, 1999, Wittmann, 2007].

La biosíntesis de aminoácidos se realiza a partir de precursores derivados del metabolismo central (fig. 6): ribulosa-5-fosfato, E4P, 3-fosfoglicerato, acetil CoA, PEP, oxalacetato y α -cetoglutarato, a partir de esta información es posible determinar la relación entre dichos precursores y los aminoácidos (Apéndice 1).

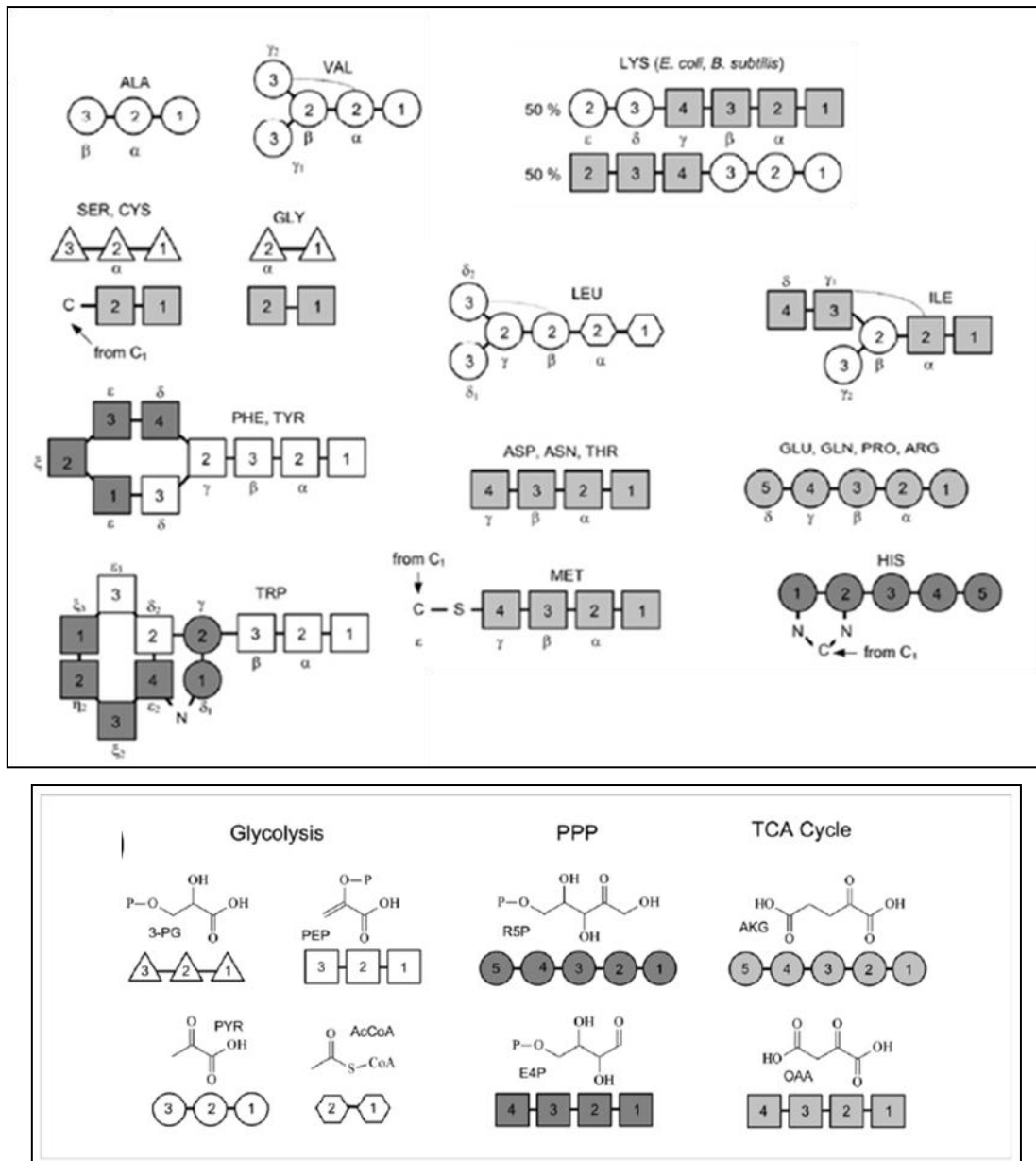


Figura 6. Relación entre los átomos de los aminoácidos proteínogénicos en el panel superior y sus metabolitos precursores en el panel inferior (modificado de Wittmann 2007).

Metodología del análisis por GC-MS

El uso de los aminoácidos proteínogénicos, implica que después de someter la biomasa a hidrólisis ácida completa, los aminoácidos componentes de la misma deben ser derivatizados con el fin de convertirlos en moléculas volátiles y permitir su separación por CG [Dauner y Sauner, 2000].

Por medio de la derivatización se modifican las características químicas de un compuesto confiriéndole propiedades cromatográficas adecuadas. En el análisis por cromatografía de gases, moléculas con grupos funcionales como -COOH, -OH, -NH y -SH con la habilidad de formar puentes de hidrógeno son difíciles de separar y

detectar por su baja volatilidad, inestabilidad térmica e incluso por la interacción con componentes de la columna cromatográfica [Schummer *et al.*, 2009]. En el proceso de derivatización se sustituyen los hidrógenos lábiles de los grupos antes mencionados por un residuo no polar, reduciendo las interacciones entre ellos y aumentando su volatilidad.

Las reacciones de derivatización más comunes son la alquilación, acilación y sililación.

En la reacción de sililación los hidrógenos reactivos de ácidos, alcoholes, tioles, aminas, amidas, aldehidos y cetonas enolizables, son sustituidos por grupos silil. Existe una gran variedad de reactivos para llevar a cabo dicho proceso, destacando los que generan trimetilsilil (TMS) derivados y más recientemente compuestos que generan derivados ter-butildimetilsilil (TBDMS) (fig. 7), los cuáles poseen mejores características cromatográficas y mayor estabilidad [Halket *et al.*, 2004].

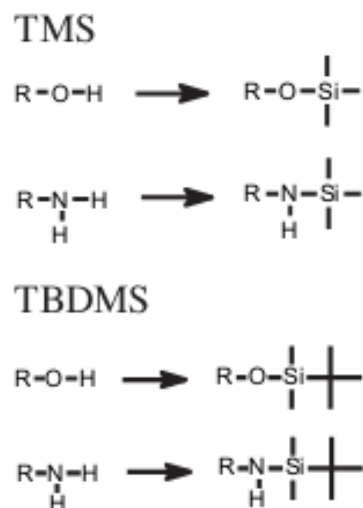


Figura 7. Derivados generados en reacciones de derivatización por sililación de un alcohol y amina primarios [Halket *et al.*, 2004].

La facilidad con la que se sustituyen los hidrógenos de los diferentes grupos funcionales sigue el orden:

alcoholes > ácidos carboxílicos > aminas > tioles > amidas

Las reacciones de sililación ocurren a través de un mecanismo de sustitución nucleofílica NS₂ por lo que la presencia de un buen grupo saliente en el reactivo derivatizante mejora el rendimiento de la reacción; un buen grupo saliente tiene baja basicidad y estabiliza las cargas en el estado de transición por el que pasa la reacción (fig. 8). Los productos generados además de ser más volátiles son más estables a temperatura e hidrólisis [Hulshoff y Lingeman, 1984].

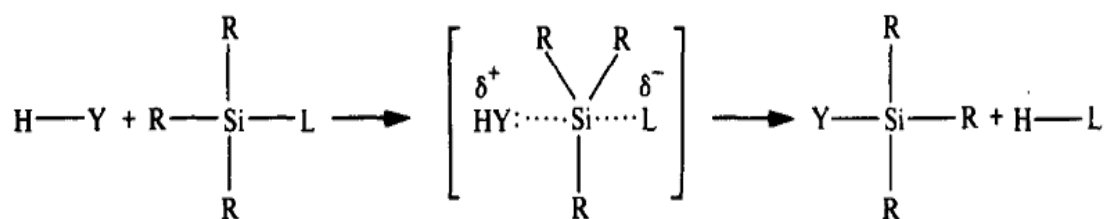


Figura 8. Mecanismo NS2. Transcurre por la formación de un complejo activado en el que el nucleófilo (Y) y el grupo saliente (L) están parcialmente unidos al átomo de silicio [Hulshoff y Lingeman, 1984].

La sililación a diferencia de la acilación y alquilación tiene la ventaja de realizarse en un solo paso y no hay necesidad de purificar los compuestos generados para inyectarlos en el cromatógrafo de gases.

En el análisis por GC-MS, los compuestos que se eluyen de la columna cromatográfica son ionizados, lo cual genera fragmentos con diferentes relaciones masa/carga (m/z). Esta técnica es particularmente importante dado que no solamente puede determinarse la masa de los isotopómeros del ión molecular sino que además se analiza el espectro de masas de diferentes fragmentos del mismo isotopómero, lo cual aumenta y diversifica la información disponible acerca del metabolito analizado.

Es importante mencionar y tener en cuenta que la cisteína y el triptófano pueden ser destruidos durante el proceso de hidrólisis y la asparagina y glutamina desaminadas a aspartato y glutamato, respectivamente.

Los flujos netos a través de las redes metabólicas pueden ser deducidos en una tercera etapa, de la información de los experimentos con ^{13}C cuando se combina con balances de materia dentro de un modelo matemático.

ANÁLISIS MATEMÁTICO

La interpretación cuantitativa de los datos de isotopómeros, requiere del uso de un modelo metabólico que describa la relación entre los flujos metabólicos y las abundancias de isotopómeros observadas.

Los modelos matemáticos se basan en una amplia cantidad de información disponible de la estequiometría de las conversiones bioquímicas en la célula y se caracteriza tanto por balances de metabolitos como por balances de isotopómeros de cada metabolito. Los balances de metabolitos incluyen la estequiometría de todas las reacciones en la red metabólica, mientras que el balance de los isotopómeros incluye todas las transiciones entre los átomos de carbono que ocurren dentro de la misma red metabólica (Apéndice 1) [Riascos *et al.*, 2005].

La integración de los datos experimentales en un modelo metabólico *in silico* consiste en simulaciones matemáticas. A partir de un conjunto limitado de flujos libres (a los cuales se les asigna un valor arbitrario) y de la composición isotópica del sustrato carbonado se puede reconstruir la distribución de isotopómeros de cada metabolito en

el estado de equilibrio estacionario. Para ello, el modelo matemático utiliza para correlacionar la distribución de isotopómeros y los flujos intracelulares ecuaciones no lineales normalmente [Quek *et al.*, 2009]. En general, los programas informáticos utilizados para el análisis *in silico* de flujos metabólicos se basan en operaciones algebraicas con matrices [Young *et al.*, 2007].

Al comparar los datos experimentales con el modelo, se busca minimizar la diferencia entre las medidas experimentales y las predicciones del modelo en un proceso iterativo hasta que es alcanzada una diferencia mínima que sea válida estadísticamente. El conjunto de flujos correspondiente a esta diferencia aceptada se considera como la solución al problema de cálculo de flujos [Riascos *et al.*, 2005].

Se han desarrollado varios modelos para el AFM, siendo los más utilizados FiatFlux y ¹³C-FLUX; el primero de estos está pre-configurado para introducir datos de experimentos con [1-¹³C]glucosa y [U-¹³C]glucosa y maneja radios de flujos, mientras que el segundo requiere de flujos libres específicos y cada ronda de optimización requiere ser realizada manualmente lo que lo hace incómodo. Existen softwares más amigables para el usuario, tal es el caso de Open FLUX.

OpenFLUX.

El programa OpenFLUX es un software de fácil uso que consiste en dos partes (fig. 9). La primera parte es la generación del modelo por medio de balances de metabolitos e isotopómeros, mientras que la segunda consiste en la integración de los datos experimentales al modelo por medio de un algoritmo; realiza además un análisis estadístico [Quek *et al.*, 2009].

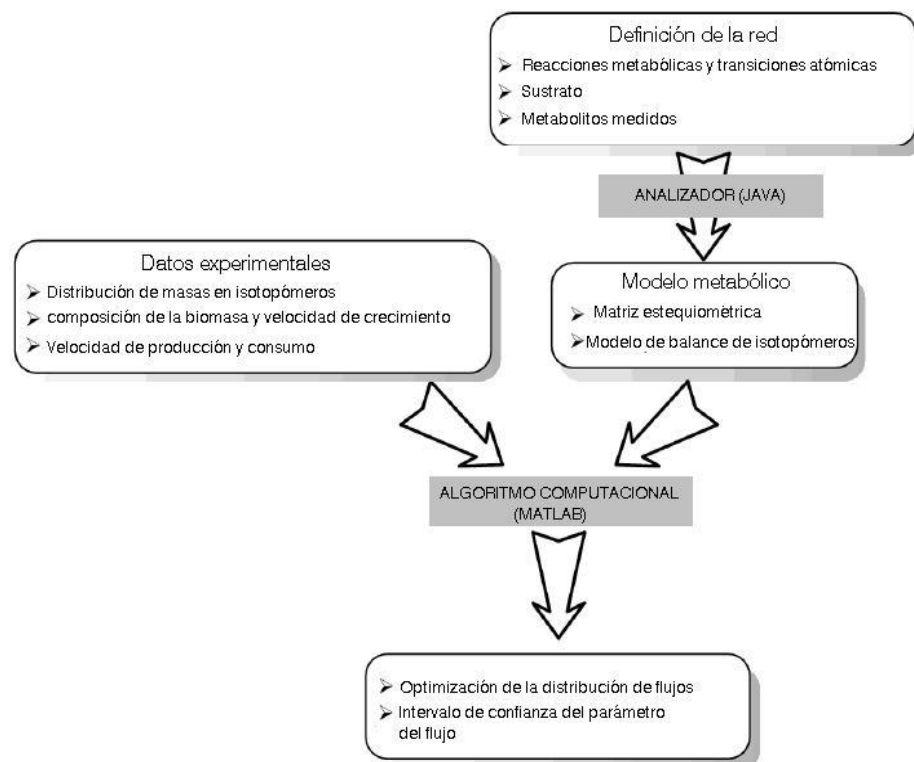


Figura 9. Componentes del software OpenFLUX. Modificado de Quek *et al.*, (2009).

La generación de los balances de isotómeros se realiza en base a la unidad funcional: unidad de metabolito elemental (EMU), la cual se define como un distinto subgrupo de los átomos de un metabolito y se basa en un método altamente eficiente de descomposición que identifica la cantidad mínima de información necesaria para simular un patrón de marcación [Antoniewicz *et al.*, 2007], reduciendo el número de variables del sistema, sin pérdida de información.

Retomando la definición de EMU de un distinto subgrupo de los átomos de un compuesto; estas pueden existir en una variedad de masa dependiendo de su composición isotópica; la EMU de más baja masa es referida como M+0, mientras que la EMU que contiene un unidad adicional de masa atómica, por ejemplo debido a la presencia de un átomo ^{13}C en lugar de un ^{12}C , es referida como M+1.

Considerando por ejemplo un compuesto A, de tres átomos, una EMU es cada subgrupo que incluya alguno de estos tres átomos, el tamaño de una EMU es el número de átomos que se incluyen en ella (fig. 10) [Antoniewicz *et al.*, 2007].

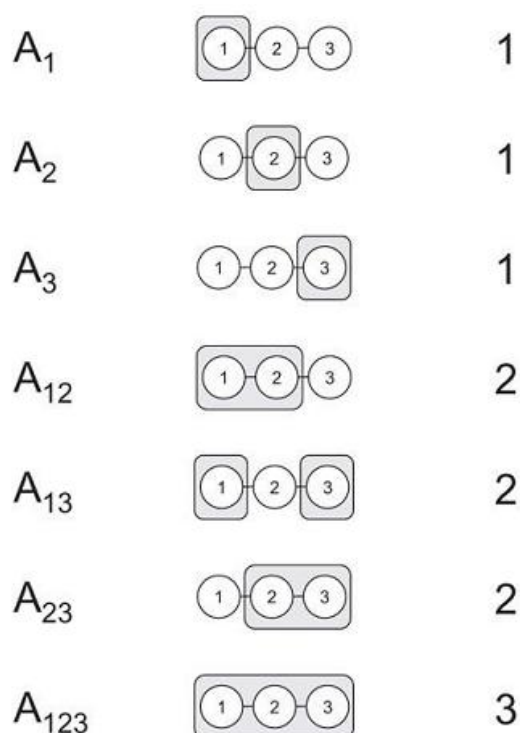


Figura 10. La unidad de metabolito elemental está definida como un distinto subgrupo de los átomos de un compuesto, existiendo así 7 EMUs para un compuesto de 3 átomos de C; el subíndice en la primera columna y los átomos en los cuadros grises indican los átomos incluidos en la EMU, la tercera columna indica el tamaño de la EMU.

Las EMUs de los metabolitos en una red común de reacciones, pueden ser ensamblados en redes de EMUs análogas, donde una determinada EMU río-arriba, afecta una EMU río-abajo, esto se hace basándose en el conocimiento de las transiciones atómicas que ocurren en las reacciones de la red. Suponiendo la red metabólica de la fig. 11 y su respectiva descomposición en átomos; la red puede desacoplarse en subredes de EMUs basándose en i) el tamaño de la EMU y ii) la conectividad de estas subredes como se observa en la fig. 12 [Young *et al.*, 2007]. Con este programa se disminuyen las ecuaciones planteadas en los modelos basados en puros balances de isotopómeros, así como en los basados en cucómeros, agilizando con ello la parte computacional del análisis de flujos.

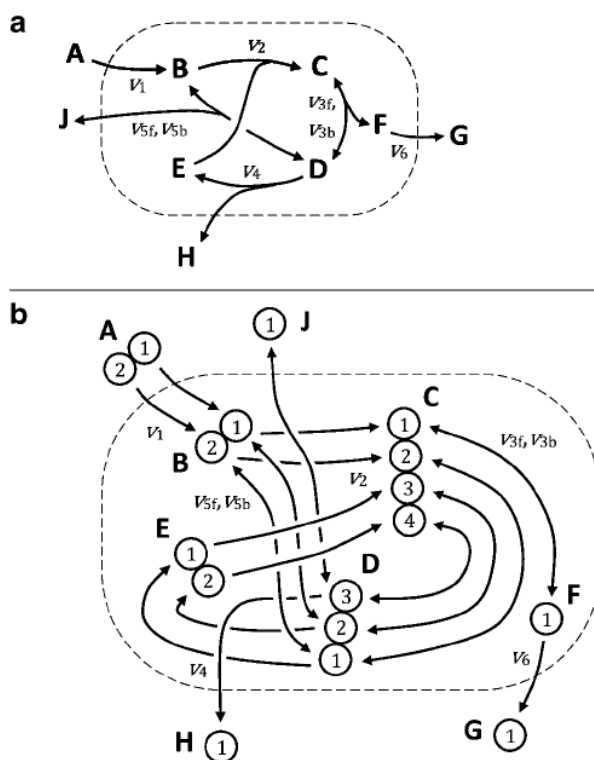


Figura 11. Ejemplo de red metabólica, se ilustra la descomposición de los metabolitos en sus respectivos átomos y las transiciones atómicas que ocurren en la red (tomado de Young *et al.*, 2007).

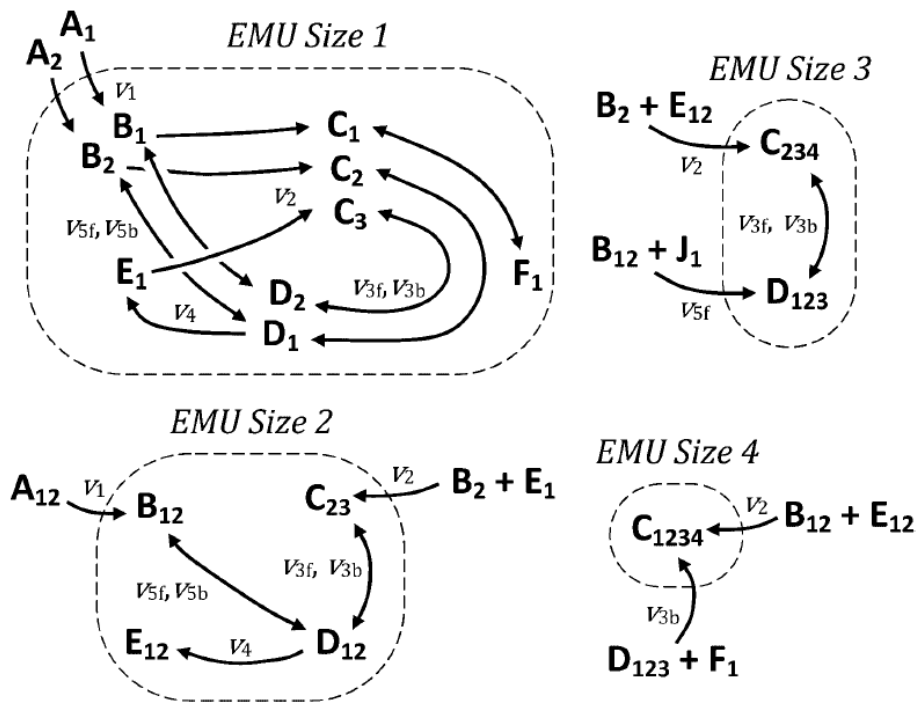


Figura 12. Descomposición de la red de EMUs, basada en el tamaño de EMU y su conectividad (tomado de Young et al., 2007).

ANTECEDENTES

INGENIERÍA DE VÍAS METABÓLICAS: OBTENCIÓN DE UNA CEPA SOBREPDUCTORA DE SA.

E. coli ha sido utilizada como sistema modelo para la sobreproducción de diversos metabolitos de interés comercial, entre ellos el SA, a través de la aplicación de estrategias de IVM, la cual se define como el mejoramiento de las actividades celulares a través de la manipulación de funciones enzimáticas, de transporte y regulación celular, utilizando la tecnología del ADN recombinante [Kern *et al.*, 2007], con el objetivo de tener un producto específico.

En la obtención de cepas sobreproductoras de SA, diversos grupos han empleado técnicas que involucran ingeniería de los circuitos regulatorios, de los transportadores que participan en la toma de carbono del medio, de las vías de EM, de las PP y de la VAS [Ghosh *et al.*, 2012; Rawat y Tripathi, 2013].

En el grupo de investigación del Dr. Francisco Bolívar Zapata (Instituto de Biotecnología, UNAM), se ha trabajado en la obtención por IVM cepas de *E. coli* sobreproductoras de SA [Escalante *et al.*, 2010]. Las estrategias aplicadas para la obtención de estas cepas fueron:

- i) la inactivación del sistema fosfotransferasa de transporte de carbohidratos dependiente de PEP (PTS), mediante la delección del operón *ptsHlcr* en la cepa

silvestre JM101, aumentando con ello la disponibilidad de PEP [Flores *et al.*, 1996], ya que dicho sistema ocupa el 50% del PEP procedente del catabolismo de la glucosa [Gosset, 2005],

- ii) la sobreexpresión del gen *tktA* codificante para una de las isoenzimas transcetolasa I (TktA) de la vía de las PP buscando el incremento en la disponibilidad de E4P [Balderas *et al.*, 2009],
- iii) la clonación del gen que codifica para una versión insensible a inhibición alostérica de la enzima DAHPS AroG (*aroG^{fbr}*, feedback resistant) [Balderas *et al.*, 2009], para evitar la inhibición de esta enzima por el aminoácido aromático fenilalanina,
- iv) la sobreexpresión de los genes *aroB* y *aroE*, que codifican para las enzimas DHQ sintasa y shikimato deshidrogenasa respectivamente [Escalante *et al.*, 2010],
- v) la inactivación de las enzimas shikimato cinasas isoenzimas I y II por interrupción de los genes *aroK* y *aroL*, respectivamente con el fin de lograr la acumulación de SA [Escalante *et al.*, 2010].

Debido a que la delección del operón *ptsHI-crr* para la generación de una cepa PTS-afecta de manera importante el consumo de glucosa y por tanto la velocidad específica de crecimiento, se sometió la cepa de *E. coli* PB11 PTS-Glc- (derivada de la cepa silvestre JM101), a un proceso de evolución adaptativa, en el cual se obtuvo la cepa PB12 (PTS- Glc+), que recuperó la capacidad de crecimiento en glucosa y cuyo fenotipo fue el resultado de la selección del transportador galactosa permeasa, GalP/H+, sistema que no requiere de PEP y es dependiente de ATP (fig. 7). Posterior a esto se aplicaron las estrategias mencionadas en los puntos ii-v [Aguilar *et al.*, 2012; Flores *et al.*, 1996; Flores *et al.*, 2005].

Como se observa en la tabla 1, la cepa PB12.SA22 (fig. 2) alcanza el mayor título de SA de las cepas generadas, por lo que ha sido objeto de mayor estudio. Se han realizado análisis transcriptómicos de esta cepa así como de las cepas parentales PB12 y JM101 con el fin de lograr un mejor entendimiento de los procesos celulares que dirigen hacia la producción de SA.

Si bien el nivel de expresión de ciertos genes o la concentración intracelular de proteínas y metabolitos proveen información importante acerca del comportamiento del metabolismo de una cepa en estudio, existen limitaciones inherentes a estas metodologías para la descripción del fenotipo celular debido a la falta de información que integre estos parámetros y los correlacione para una comprensión holística del metabolismo.

Tabla 1. Producción y rendimiento de SA y compuestos aromáticos totales en la cepa PB12 y derivadas (modificado de Escalante *et al.*, 2010). Los títulos y rendimientos reportados fueron obtenidos a partir de cultivos en lote con 25 g/L de glucosa y 15 g/L de extracto de levadura.

Cepa	Características relevantes	SA (g/L)	Rendimiento SA (mol SA/ mol glc)	Rendimiento total de aromáticos (mol aromáticos/ mol glc)
PB12	JM101 $\Delta(ptsH-l-crr)::kan$ glc ⁺	ND	---	0
PB12.SA11	PB12 Δ aroL pJLBaroG ^{tblr} tktA pTOPOaroB	2.8±0.01	0.1±0.00	0.28
PB12.SA21	PB12 Δ aroL Δ aroK::cm pJLBaroG ^{tblr} tktA* pTOPOaroB*	5.1±0.00	0.2±0.00	0.33
PB12.SA22	PB12 Δ aroL Δ aroK::cm pJLBaroG ^{tblr} tktA pTOPOaroBaroE	7.1±0.06	0.29±0.00	0.37
PB12.SA31	PB12 Δ aroL Δ aroK::cm Δ pykF::gen pJLBaroG ^{tblr} tktA pTOPOaroBaroE	4.4±0.57	0.22±0.04	0.50
PB12.SA41	PB12 Δ aroL Δ aroK::cm Δ pykA::gen pJLBaroG ^{tblr} tktA pTOPOaroBaroE	1.0±0.36	0.03±0.02	0.07

* **pJLBaroG^{tblr}tktA** pJLBaroG^{tblr} (*aroG^{tblr}* bajo el control del promotor lacUV5, los genes *lacI^d* y *tet* y origen de replicación pACYC184) conteniendo el gen *tktA* con su promotor nativo. Balderas *et al.*, 2009. **pTOPOaroBaroE** pCR[®]-Blunt II-TOPO[®][Invitrogen[™], 3.5Kb, gen letal *ccdB*, región operadora/promotora *lac*, Km^R, Zn^R, origen pUC] conteniendo los genes *aroB* y *aroE*. Escalante *et al.*, 2010.

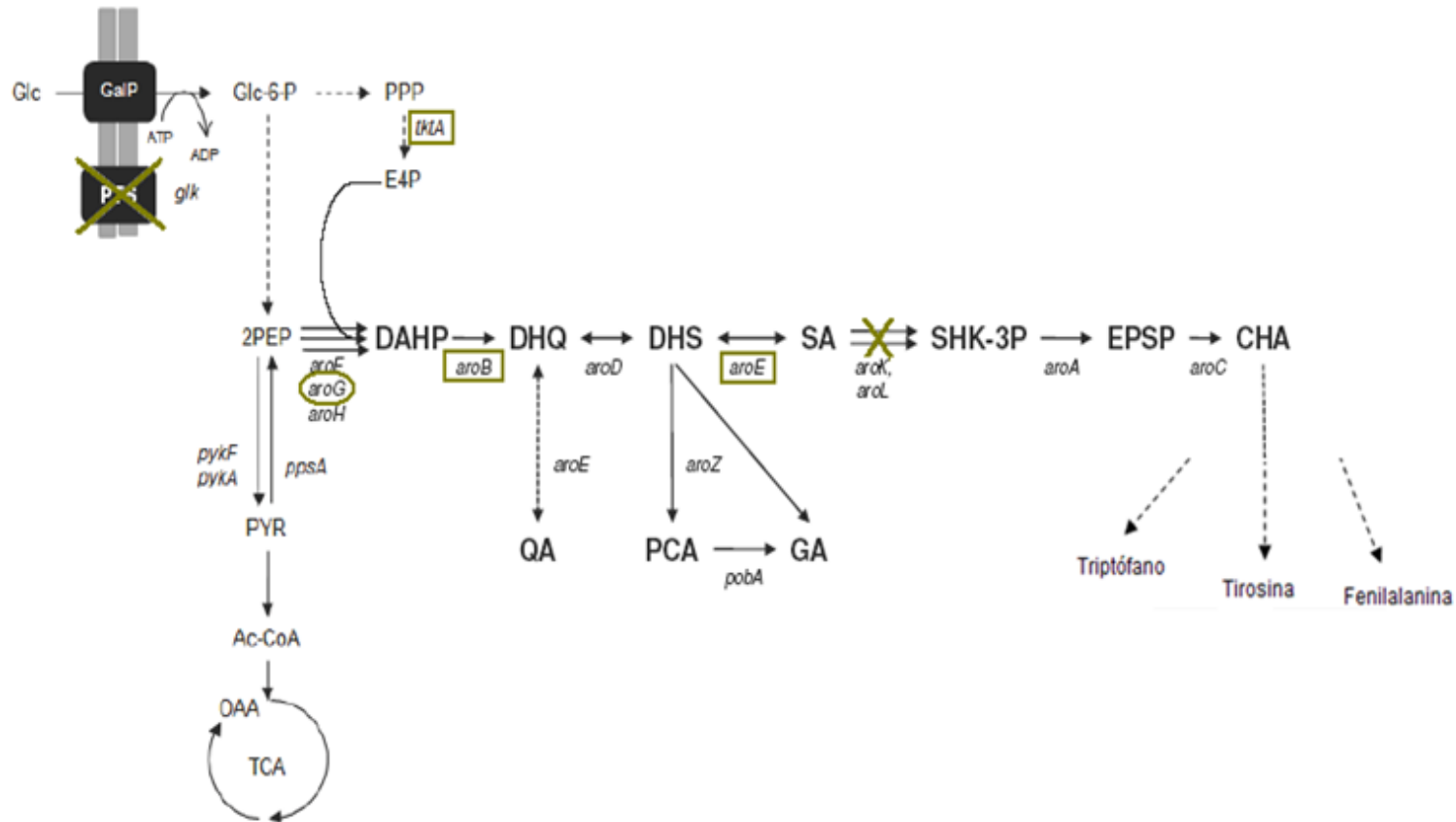


Figura. 2 IVM en el metabolismo central de carbono y vía del shikimato en cepas de *E. coli* PTS- Glc+ para la generación de la cepa PB12.SA22 sobreproductora de SA. Las X indican inactivación de reacciones por delección de genes; □ representa sobre-expresión del gen; ○ resalta genes insensibles a inhibición alostérica; Las flechas punteadas representan dos o más reacciones. *glk*: glucocinasa; *tktA*: transcetolasa; *aroF*, *aroG*, *aroH*: isoenzimas DAHP sintasa; *aroB*: DHQ sintasa; *aroD*: DHQ deshidratasa, *aroE*: shikimato deshidrogenasa; *aroK*, *aroL*: shikimato cinasa I/II, *aroA*: EPSP sintasa; *aroC*: corismato sintasa Glc: glucosa; GalP: permeasa de galactosa; PTS: sistema fofotransferasa de transporte de carbohidratos; Glc-6-P: glucosa 6 fosfato; PPP: vía de las pentosas fosfato; PEP: fosfoenolpiruvato; PYR: piruvato; Ac-CoA: acetil coenzima A; TCA: Ciclo de los ácidos tricarbóxicos; OAA: oxaloacetato; DAHP: 3-deoxi-D arabinoheptulosonato-7-P; DHQ: 3-dehidroquinato; DHS: 3-dehidroshikimato; SA: shikimato; SHK-3P: shikimato 3 fosfato; EPSP: 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato; CHA: corismato (modificado de Escalante *et al.*, 2010)

ESTUDIOS PREVIOS EN CEPAS PRODUCTORAS DE SA Y CEPAS PARENTALES.

La cepa de *E. coli* PB12.SA22 que es capaz de alcanzar un título de 7.1 g SA/L con un rendimiento de 0.29 mol SA/mol glucosa creciendo en fermentador en medio rico suplementado con 25 g/L de glucosa y 15 g/L de extracto de levadura (YE), junto con las cepas parentales JM101 y PB12 han sido objeto de estudios a nivel de genoma, transcriptoma y de flujos de carbono dentro de nuestro grupo de trabajo [Aguilar *et al.*, 2012; Cortés, 2012; Flores S. *et al.*, 2002; Flores N. *et al.* 2005; Martínez K. *et al.*, 2008].

En el caso de la cepa PB12.SA22, el bajo rendimiento alcanzado de SA y datos obtenidos del análisis del perfil transcriptómico global de la cepa [Cortés, 2012], donde se observa un alto nivel de transcripción de genes correspondientes a reacciones que no contribuyen con la producción de SA e incluso parecen no ser necesarias para la célula, proporcionan un indicativo de que el flujo de carbono no se está direccionando de la forma deseada.

En un estudio de AFM llevado a cabo con la cepa silvestre JM101, la cepa PTS-PB11, y las cepas PTS- Glc+ PB12 y PB13 [Flores *et al.*, 2002], en el que se buscó conocer el efecto de la delección del operón *ptsHI-crr* sobre la cepa JM101, así como el efecto de la evolución adaptativa de la cepa PB11, se observó un incremento en el flujo a través de la enzima glucocinasa para las cepas PTS- y un incremento en el flujo glucolítico y a través de las enzimas málicas en las derivadas PTS- Glc+, en estas mismas cepas hay una disminución en el flujo de carbono a través de la enzima fofoenolpiruvato carboxinasa. Existe en las cepas PTS- Glc+ una disminución en el flujo a través de PP en comparación con la cepa silvestre, sin embargo las cepas JM101 y PB12 mantienen activas tanto la parte oxidativa como la no oxidativa de esta vía. No existe sin embargo, un análisis de este tipo para las cepas productoras de SA. Continuando con estudios de este tipo y con el fin de establecer una relación más clara entre el metabolismo celular y la producción de SA se busca la implementación de una metodología que permita obtener los datos experimentales necesarios para un posterior AFM.

Para la realización de este estudio es importante tener en cuenta dos consideraciones:

- a) los estudios realizados en la cepa PB12.SA22 han sido en medio rico igual al reportado para la producción de SA [Cortés, 2012]; ya que los experimentos de AFM se realizan con fuentes de carbono definidas se presenta una limitación del método debido a la presencia de una fuente compleja en el medio como lo es el extracto de levadura. Ya se ha reportado en la literatura que los experimentos de determinación de flujos usualmente requieren condiciones de proceso diferentes a las condiciones de producción [Noh *et al.*, 2006], no representando un problema en la aplicación de los resultados el hecho de emplear un medio mineral distinto al medio rico empleado en producción;

b) la cepa PB12.SA22 como resultado de las inactivaciones de los genes *aroK* y *aroL*, que cortan la vía de biosíntesis de compuestos aromáticos, es auxótrofa a tales compuestos, entre los que se encuentran además de los aminoácidos aromáticos, ubiquinonas (necesarias para las reacciones de transporte de electrones) y tetrahidrofolato (cofactor de algunas enzimas). Al crecer esta cepa en medio rico con extracto de levadura es probable que elementos presentes en el mismo sean utilizados por la célula para producir los compuestos antes mencionados; al eliminar el extracto de levadura del medio y suplementar con los aminoácidos y vitaminas aromáticas, a partir de los cuales la célula pudiera producir ubiquinona y tetrahidrofolato, se espera observar un buen crecimiento del mismo modo que en el medio con la fuente compleja, sin embargo esto no sucede (Apéndice 2). Con el fin de lograr el estudio de la distribución de carbono en una cepa productora de SA, el mejor acercamiento consiste en el empleo de la cepa PB12.SA1 (PB12 Δ *aroL* *tktA* *aroG*^{*fbr*} *aroB* *aroE*) (fig 14). El gen *aroL* codifica para la principal enzima shikimato cinasa II (AroL), el mantenimiento de la enzima shikimato cinasa I (AroK) permitirá un flujo a través de la vía por lo que la adición de vitaminas y aminoácidos aromáticos ya no es necesario, encargándose la misma célula de formar los compuestos necesarios para crecer [Johansson *et al.*, 2005].

Existe un estudio reportado en la literatura de AFM para una cepa productora de SA [Lequeux G. *et al.*, 2006], en este trabajo se buscó evaluar el efecto de la limitación de carbono y fosfato sobre la producción de SA, más que conocer el estado metabólico que da como resultado la producción de dicho compuesto, que es el objetivo último del presente estudio.

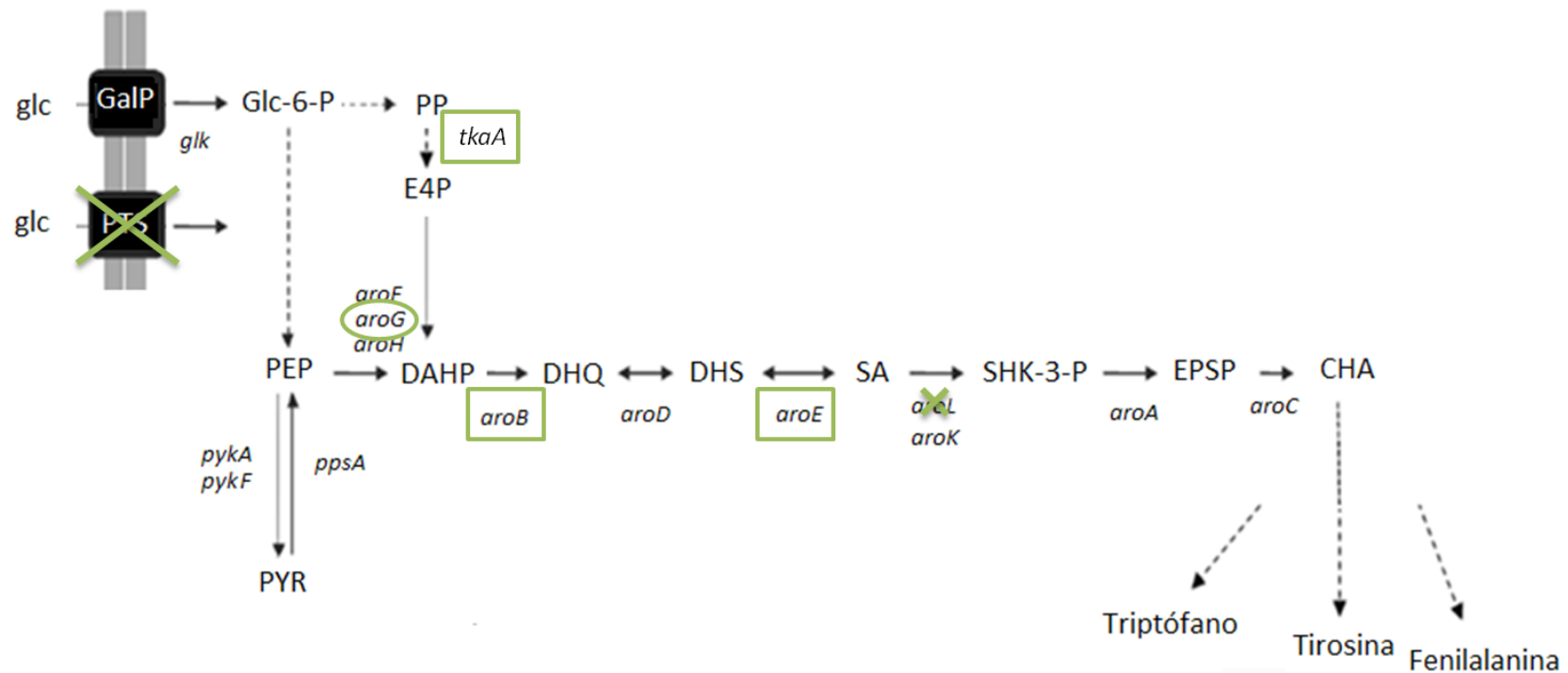


Figura 14 IVM en el metabolismo central de carbono y vía del shikimato en cepas de *E. coli* PTS- Glc+ para la generación de la cepa PB12.SA12 sobreproductora de SA. Las X indican inactivación de reacciones por delección de genes; □ representa sobre-expresión del gen; ○ resalta genes insensibles a inhibición alostérica; Las flechas punteadas representan dos o más reacciones. *glk*: glucocinasa; *tkaA*: transcetolasa; *aroF*, *aroG*, *aroH*: isoenzimas DAHP sintasa; *aroB*: DHQ sintasa; *aroD*: DHQ deshidratasa, *aroE*: shikimato deshidrogenasa; *aroK*, *aroL*: shikimato cinasa I/II, *aroA*: EPSP sintasa; *aroC*: corismato sintasa Glc: glucosa; GalP: permeasa de galactosa; PTS: sistema fofotransferasa de transporte de carbohidratos; Glc-6-P: glucosa 6 fosfato; PPP: vía de las pentosas fosfato; PEP: fosfoenolpiruvato; PYR: piruvato; Ac-CoA: acetil coenzima A; TCA: Ciclo de los ácidos tricarbóxicos; OAA: oxaloacetato; DAHP: 3-deoxi-D arabinoheptulosonato-7-P; DHQ: 3-dehidroquinato; DHS: 3-dehidroshikimato; SA: shikimato; SHK-3P: shikimato 3 fosfato; EPSP: 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato; CHA: corismato (modificado de Escalante *et al.*, 2010).

JUSTIFICACIÓN

El conocimiento de la redistribución del carbono en el MCC y en la vía VSA en una cepa de *E. coli* sobreproductora de SA como resultado de las modificaciones genéticas realizadas en la misma, permitirá identificar reacciones limitantes hacia la síntesis de éste compuesto.

Por lo anterior, el establecimiento de una metodología que nos permita obtener la información experimental necesaria para la obtención de un mapa de flujos, es de suma importancia.

OBJETIVOS.

GENERAL.

Establecer una metodología de cultivo y optimizar los pasos de preparación de muestra para el análisis por GC-MS con el fin de obtener los datos requeridos por un modelo matemático (abundancia relativa de isotopómeros) para un posterior AFM en una cepa de *Escherichia coli* productora de SA y su cepa parental.

PARTICULARES.

- Construcción y caracterización de la cepa productora de SA de *E. coli* PB12.SA1 (JM101 $\Delta(ptsHIcrr)::kan\ glc^+\Delta aroL$) en medio mínimo.
- Estandarización de la técnica de preparación de la muestra a analizar.
- Realizar fermentaciones en matraz con ^{13}C -glucosa como fuente de carbono de las cepas PB12.SA12 y PB12 en medio mineral.
- Determinación del destino metabólico del ^{13}C por GC-MS, en los aminoácidos proteínogénicos presentes en la proteína celular.
- Obtención de los datos experimentales necesarios para la incorporación en un modelo matemático.

Con el fin de presentar claramente los experimentos realizados y los resultados obtenidos en las distintas etapas del proyecto, se presentan a continuación tres apartados, cada uno con su respectiva metodología y sus respectivos resultados y discusión.

PARTE I.

**Crecimiento de las cepas PB12 y PB12.SA12
en medio mínimo.**

SECCIÓN A. IMPLEMENTACIÓN DE LA ESTRATEGIA DE CULTIVO

METODOLOGÍA.

CONSTRUCCIÓN DE LA CEPA de *E. coli* PB12.SA12 productora de SA.

Cepas y plásmidos.

Las cepas y los plásmidos utilizados en este trabajo se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Características de las cepas y plásmidos empleados.

Cepas	Características relevantes	Referencia
<i>E. coli</i> PB12	JM101 $\Delta(ptsHIcrr)::kan$ glc^+	Flores <i>et al.</i> , 1996
PB12.SA1	PB12 Δ <i>aroL</i>	Escalante <i>et al.</i> , 2010
PB12.SA12	PB12.SA1 pJLBaroG ^{fb} <i>tkatA</i> pTOPOaroBaroE	Este trabajo
Plásmidos		
pTOPOaroBaroE	pCR [®] -Blunt II-TOPO [®] [Invitrogen [™] , 3.5Kb, gen letal <i>ccdB</i> , región operadora/promotora <i>lac</i> , Km ^R , Zn ^R , origen pUC] conteniendo los genes <i>aroB</i> y <i>aroE</i>	Escalante <i>et al.</i> , 2010
pJLBaroG ^{fb} <i>tkatA</i>	pJLBaroG ^{fb} (<i>aroG^{fb}</i> bajo el control del promotor <i>lacUV5</i> , los genes <i>lacI^q</i> y <i>tet</i> y origen de replicación pACYC184) conteniendo el gen <i>tkatA</i> con su promotor nativo.	Balderas <i>et al.</i> , 2009

Transformación de la cepa PB12. SA1 con los plásmidos P_{JL}BaroG^{fb}*tkatA* y TOPOaroEaroB.

Se prepararon células competentes de la cepa PB12.SA1, y se transformó con los plásmidos p_{JL}BaroG^{fb}*tkatA* (alto número de copias) y TOPOaroBaroE (mediano número de copias) por electroporación en un electroporador BioRad Gene Pulser; las células transformadas fueron recuperadas en medio SOC con glucosa e incubadas por 1 h a 37 °C a 300 rpm, finalmente se seleccionaron colonias en placas de medio LB con los siguientes antibióticos: kanamicina (Km) (30 µg/mL), tetraciclina (Tc) (30 µg/mL) y zeocina (Zn) (25 µg/mL), se incubó a 37 °C por 24 horas (los mismos antibióticos fueron utilizados en la misma concentración para los diversos experimentos realizados y presentados en este trabajo). De las colonias que se desarrollaron, se eligieron algunas para verificar en ellas la presencia de los plásmidos por tamaño en un gel de agarosa, empleando para la

digestión la enzima *Kpn* I que tiene un sitio de corte en el plásmido pJLBaroG^{fbr}tkatA y dos en el plásmido pTOPOaroBaroE.

La mezcla de reacción para la digestión se incubó a 37 °C por 1 h y estuvo conformada por los siguientes componentes:

	Volumen (μL)
ADN	4
Buffer 1* (Biolabs)*	2
Enzima (Biolabs) 10 U**	1
BSA*** 100X (Biolabs)	0.2
H ₂ O	12.8
Total	20

*La enzima *Kpn* I, de acuerdo con el manual de enzimas de Biolabs, muestra un 100% de eficiencia de corte en este buffer. **Unidad de actividad enzimática (U): cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato por minuto. ***Albúmina bovina sérica.

Se seleccionó e inoculó en LB una de las colonias positivas, cuando el medio llegó a la saturación se tomó una alícuota y se almacenó a -70 °C en glicerol al 50%, en una relación 1:1 Vol/Vol. La cepa seleccionada fue llamada en este trabajo PB12.SA12 (PB12.SA1 pJLBaroG^{fbr}tkatA pTOPOaroBaroE).

CRECIMIENTO DE LA CEPAS PB12 Y PB12.SA12 EN MEDIO MÍNIMO.

Con la finalidad de seleccionar el medio mínimo que permita el crecimiento de las cepas, se realizaron pruebas de crecimiento en diferentes medios tanto sólidos como líquidos.

Se recuperaron colonias de las cepas PB12 y PB12.SA12 en cajas con medio rico LB, y se sembraron en placas de medio ARO y medio M9. Debido a que la metodología para el AFM requiere de cultivos consecutivos, a partir del medio en el que se observó crecimiento, se seleccionaron colonias y se hizo una segunda resiembra en los mismos medios (ARO y M9).

Respecto a las pruebas en medio líquido; a partir de colonias recuperadas en placas de medio LB, así como de colonias desarrolladas en las placas de medio ARO de la primera resiembra, se inocularon por duplicado, matraces de 125 mL con 20 mL de los medios ARO, M9 y la base mineral del medio de producción de SA empleado en el laboratorio.

Los componentes que incluye cada uno de los medios se muestran en la tabla 3.

Las pruebas de crecimiento mencionadas, se realizaron incubando a 37 °C, a distintos tiempos, en el caso de las pruebas en medio líquido, se sometió a una agitación de 300 rpm.

Tabla 3. Elementos que componen los medios empleados.

Componente	Medio LB	Medio de producción de SA	Medio ARO*	Medio M9
K ₂ HPO ₄		+	+	
KH ₂ PO ₄		+	+	+
Citrato de amonio férrico (III)		+	+	
NaCl	+		+	+
Na ₂ HPO ₄				+
NH ₄ SO ₂			+	
NH ₄ Cl				+
Ácido cítrico		+		
H ₂ SO ₄		+		
MgSO ₄		+	+	+
CaCl ₂		+		+
Tiamina		+	+	+
Elementos traza**		+		
Extracto de levadura	+	***		
Triptona	+			

*Se suplementa con las vitaminas aromáticas (ácido p-aminobenzóico (PABA), ácido p-hidroxibenzoico (PHB) y 2,3-ácido dihidroxibenzoico (DHB)). ** (NH₄)₆(Mo₇O₂₄)*4H₂O, ZnSO₄*7H₂O, H₃BO₃, CuSO₄*5H₂O, MnCl₂*4H₂O, ***En el presente trabajo no se emplea este componente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CONSTRUCCIÓN DE LA CEPA PB12.SA12.

Para comprobar la presencia de los plásmidos pJLBaroG^{fbr}tktA y pTOPOaroBaroE en la cepa PB12.SA12, se digirió una alícuota de ADN plasmídico de esta cepa. La digestión con la enzima *Kpn* I, la cual tiene un sitio de corte en el plásmido pJLBaroG^{fbr}tktA y dos en el pTOPOaroBaroE da como resultado tres fragmentos (fig. 15). Se observa una banda cercana a los 10,000 pares de bases que corresponde al plásmido pJLBaroG^{fbr}tktA que tiene un tamaño de 9,745 pb. Se observan también dos bandas correspondientes al plásmido pTOPOaroEaroB a la altura de las bandas de 3,500 pb y 2,500 pb del marcador, que suman un tamaño aproximado al tamaño del plásmido de 6,175 pb.

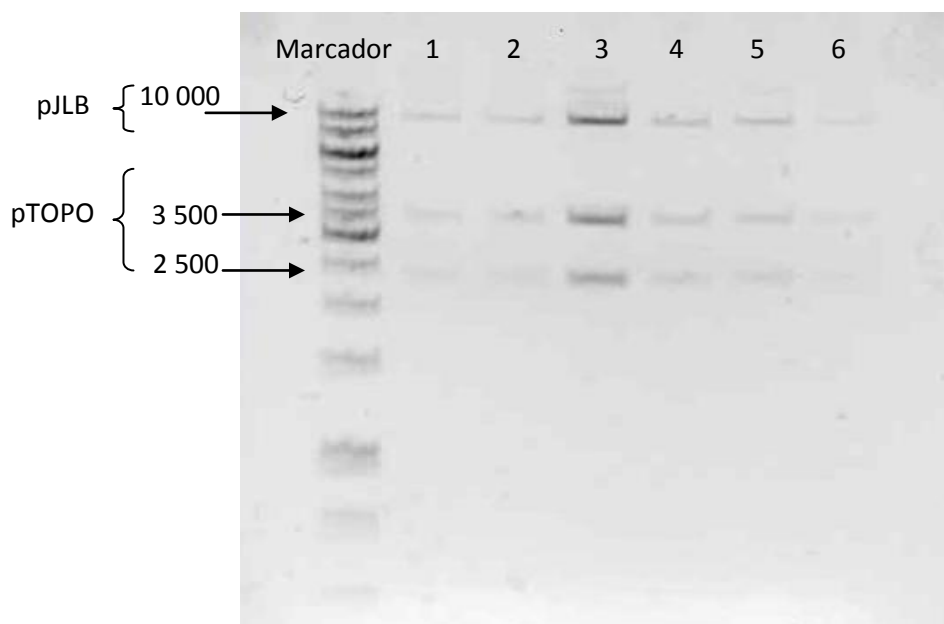


Figura 15. Digestión de los plásmidos presentes en la cepa PB12.SA12 de 6 colonias candidatas (1-6). El plásmido pJLBaroG^{fbr}tktA tiene un tamaño de 9,445 pb y pTOParoBaroE de 6,175 pb.

CRECIMIENTO DE LA CEPAS PB12 Y PB12.SA12 EN MEDIO MÍNIMO.

Partiendo de colonias aisladas en placas de medio rico LB, se procedió a resembrar en placas de agar de medio mínimo M9 y medio ARO.

La cepa PB12 presenta crecimiento en ambos medios desde el día 1 de incubación como se observa en la tabla 4; en cambio, la cepa PB12.SA12 no presenta crecimiento en el medio M9 dentro de los primeros cuatro días, mientras que en el medio ARO se comienzan a presentar colonias a partir del día 3.

Tabla 4. Crecimiento en medios sólidos de las cepas PB12 y PB12.SA12.

Cepa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	ARO	M9	ARO	M9	ARO	M9	ARO	M9
PB12	+	+	++	++				
PB12.SA12	-	-	-	-	+	-	++	-

La cepa PB12.SA12 tiene inactivado solamente el gen que codifica para la enzima shikimato cinasa II, por lo que se esperaría que con el remanente de actividad proporcionada por la shikimato cinasa I, que corresponde al 10% de la actividad total [Eli y Pittard, 1979], esta pudiera suplir los compuestos aromáticos necesarios para su crecimiento; sin embargo, observamos que esto no es así, ya que sólo se presenta crecimiento en el medio suplementado con compuestos aromáticos.

Este fenómeno puede deberse a que al provenir las células de un medio rico (LB), el medio ARO si bien es mínimo, al estar suplementado con las vitaminas aromáticas PABA, PHB y DHB, le proporciona a la cepa un cambio menos estresante, a diferencia del cultivo en el medio M9, que no tiene ningún tipo de complementación (tabla 3). El hecho de que las colonias tarden en desarrollarse coincide con reportes en la literatura donde cepas de *E. coli* deletadas en genes de la vía de aromáticos, al crecerlas en medio mineral (la composición del medio empleado en este reporte contiene elementos similares al medio ARO: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl, K_2SO_4 , NH_4 -lactato, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y citrato de sodio) suplementado con los aminoácidos y vitaminas aromáticas tardan hasta 5 días en desarrollar colonias [Davis, 1952].

Dado que la cepa PB12 crece en todos los medios empleados, las pruebas siguientes se realizaron solo con la cepa PB12.SA12.

Al resembrar las colonias que se desarrollaron en medio ARO, en los mismos medios sólidos (M9 y ARO), se observa un amplio crecimiento en el medio M9, desde el primer día mientras que en el medio ARO se observa crecimiento a partir del segundo día (tabla 5 y figura 16).

Tabla 5. Crecimiento en medio sólido, segunda resiembra.

Cepa	Día 1		Día 2		Día 3	
	ARO	M9	ARO	M9	ARO	M9
SA12	-	+	+	++	++	+++



Fig. 16 Placas de medio M9 (izquierda) y medio ARO (derecha), de la cepa PB12.SA12 después de tres días de incubación.

Al parecer, la primera siembra en medio ARO adapta un poco a las cepas a un medio con pocos nutrientes y, le proporciona lo necesario para que produzca compuestos que le permitan crecer; una vez que lo ha logrado, el medio M9 proporciona algún elemento que le permite a la cepa crecer más rápido.

En la tabla 6 se puede observar la composición de los medios ARO y M9; destaca la alta concentración de potasio, así como la presencia de citrato amonio fierro en el medio ARO; el potasio está reportado como un elemento importante en el crecimiento de inóculos pequeños (Tempest *et al.*, 1966), como puede ser el caso de una colonia, favorece el crecimiento debido a que forma parte de los ribosomas y con ello se ve implicado en la síntesis de proteína; por otra parte, el citrato es un compuesto que ayuda a la captación de Fe^{2+} (Frost y Rosenberg, 1973), probablemente en medio M9 al no estar complementado con compuestos de la vía de aromáticos, la cepa no produce suficiente enteroquelina, sideróforo que le permitiría captar el Fe^{2+} presente en el medio y al no tener el compuesto citrato de amonio férrico (III), no le es posible captar el Fe^{2+} que necesita para crecer; de este modo el potasio y el citrato, además de las vitaminas aromáticas, pueden ser elementos que le permiten a la cepa a crecer mejor en el medio ARO en la primer siembra.

Una vez que la célula ha comenzado a sintetizar sus propios aminoácidos aromáticos, es posible que le sea más fácil crecer en un medio mínimo, de este modo en la segunda resiembra disminuye el número de días en que se desarrollan colonias en ambos medios, el medio M9 con una mayor cantidad de glucosa puede estar favoreciendo un mejor crecimiento de la cepa.

Tabla 6. Composición de los medios de cultivo empleados.

Componente	Medio ARO*(g/L)	Medio M9(g/L)
Glucosa	1	2
K_2HPO_4	7	
KH_2PO_4	2	3
Citrato de amonio férrico (III)	0.32	
NaCl	0.5	0.5
Na_2HPO_4		6
NH_4SO_2	0.5	
NH_4Cl		1
$MgSO_4$	0.24	0.49
$CaCl_2$		0.015
Tiamina	0.01	0.01

*Se suplementa con las vitaminas aromáticas PABA, PHB y DHB.

En cuanto a las pruebas de crecimiento en medio líquido; a partir de colonias obtenidas de placas de medio LB y de placas de medio ARO, se sembró en medio ARO, M9 y la base mineral del medio de producción de SA. Se observó que colonias provenientes de medio LB no son capaces de crecer en estos medios minerales (tabla 7), al menos en un lapso de 2 días, probablemente por el tamaño tan pequeño de inóculo. Colonias provenientes del medio ARO, presentan crecimiento en medio líquido M9 después de 24 horas de incubación, mientras que en la base mineral del medio de producción no se presenta crecimiento en un lapso de 2 días.

Tabla 7. Crecimiento en medios líquidos de la cepa PB12.SA12.

Medio de procedencia de la colonia	Medio M9	Medio de producción	ARO
LB	-	-	-
ARO	+	-	nd

El medio LB es un medio muy rico de donde la cepa toma la mayoría de los compuestos necesarios para su crecimiento. Al pasar directamente a un medio mínimo sin suplementación de compuestos aromáticos, es probable que el metabolismo se desajuste y no le sea posible recuperarse. El medio ARO además de proporcionar a la cepa compuestos aromáticos necesarios para el crecimiento que probablemente en el medio LB estuvieran presentes también, puede estar permitiéndole sintetizar algún compuesto útil para poder crecer después en otro medio más simple o incluso, como se ha mencionado, proporciona compuestos que le favorecen para crecer mejor como el K y el citrato; por otro lado el medio M9 le puede estar proporcionando elementos que le ayudan a recuperar el rápido crecimiento, como la mayor concentración de glucosa y magnesio. Al sembrar una colonia proveniente de medio LB en medio líquido ARO, después de 4 días de cultivo no se sobrepasa 0.1 D.O._{600nm}. Este fenómeno se refleja en las placas del mismo medio con la presencia de muy pocas colonias, sin embargo en el último caso, estas son suficientes para llevar a cabo los cultivos.

De acuerdo a los resultados anteriores se implementó el siguiente protocolo para el cultivo de las cepas PB12.SA12 y PB12 para su AFM: 1.- recuperación: la cepa almacenada en glicerol se siembra en placas de medio rico LB, 2.- adaptación: una colonia proveniente del medio LB se siembra en placas de medio mínimo ARO, 3.- cultivos para el AFM: a partir de una colonia desarrollada en medio ARO, se inocula en medio M9 líquido, donde la cepa PB12.SA12 presenta el mejor crecimiento.

SECCIÓN B. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS PB12 y PB12.SA12.

METODOLOGÍA

MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se realizaron fermentaciones por triplicado de las cepas PB12 y PB12.SA12, para ello se siguió la siguiente metodología:

Partiendo de las cepas almacenadas en glicerol a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, se estriaron cajas de medio LB con los antibióticos requeridos (como se describe previamente): para la cepa PB12.SA12 Km, Tc y Zn y para la cepa PB12 solo Km, y se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 12 h. A partir de colonias aisladas, se resembró en placas de medio ARO con antibióticos y se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 24 h en el caso de la cepa PB12 y 72 h (tiempo necesario para obtener colonias) para la cepa PB12.SA12. Una colonia aislada en este medio se inoculó en un matraz Klett de 125 mL con 20 mL de medio M9 más los antibióticos requeridos, incubando a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 300 rpm. Al alcanzar este cultivo 1 D.O._{600nm} dentro de la etapa de crecimiento exponencial, se tomó una alícuota necesaria para inocular un segundo cultivo bajo las mismas condiciones, e iniciar a una D.O._{600nm} de 0.1 (medida en un espectrofotómetro Beckman DU@-70); dicha alícuota empleada para inocular, se centrifugó a 13,200 rpm por 3 minutos, las células se lavaron con medio M9 dos veces. Cuando este segundo cultivo llegó a 1 D.O._{600nm} dentro de la etapa de crecimiento exponencial se tomó un volumen necesario para inocular un tercer cultivo en las mismas condiciones a una D.O._{600nm} inicial = 0.005. La alícuota tomada para inocular el tercer matraz, se centrifugó a 13,200 rpm por 3 minutos y las células se lavaron con medio M9 sin glucosa dos veces.

En el tercer cultivo se empleó isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) como inductor a una concentración de 0.1 mM.

CUANTIFICACIÓN DE ANALITOS PRODUCIDOS EN LA FERMENTACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL ESTADO ESTACIONARIO.

A partir del tercer cultivo en M9 para cada una de las cepas, se tomaron alícuotas de 200 μL cada hora desde que la cepa comienza a crecer y hasta que deja de hacerlo, se centrifugó a 13,200 rpm por 3 minutos para separar las células del sobrenadante; a partir de los cuales se determinó el crecimiento y glucosa consumida, respectivamente.

La glucosa contenida en cada una de las muestras se determinó en el sistema de cuantificación de glucosa Biochemistry Analyser YSI 2700 Select.

Para la determinación del estado estacionario, se graficó la glucosa consumida contra la biomasa producida.

Se midió en el sobrenadante recuperado, DHQ, DHS, SA, GA, ácido acético y DAHP. La cuantificación de los 5 primeros compuestos se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en un sistema Waters, Miliford, MA, el cual cuenta con una bomba 600E, inyector automático 717, un índice de refracción de 2410 y un detector de arreglo de diodos (996). Las muestras se corrieron en una columna Aminex HPX-87H (300x 7.8mm; 9µm) Bio – Rad, Hércules, CA, utilizando una fase móvil 5mM de H₂SO₄, un flujo de 0.5 mL/min y una temperatura de 50 °C.

El DAHP presente en las muestras se determinó por el ensayo colorimétrico del ácido tiobarbitúrico [Weissbach y Hurwitz, 1958].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO

Como se ha mencionado en la metodología, se realizan tres cultivos en M9, esto fue por las siguientes razones: en el primer cultivo en M9, antes de llegar a la fase exponencial se da una fase lag que depende en cierta medida del tamaño de la colonia tomada para inocular, sirviendo esta etapa para homogenizar los cultivos y en el cultivo subsiguiente se inicie con una concentración de células conocida de 0.1 D.O._{.600nm}.

Cuando el segundo cultivo ha llegado a 1 D.O._{.600nm} se toma una alícuota del mismo para inocular un tercer matraz. Para los experimentos de AFM en este último cultivo se emplea sustrato marcado con ¹³C, por lo que dicha alícuota debe ser pequeña con el fin de eliminar la interferencia por la glucosa que pueda quedar remanente en el medio a pesar de lavar las células con medio M9 sin glucosa.

Como se observa en la figura 17, la D.O._{.600nm} inicial en el tercer matraz debe ser menor al 0.5% de la concentración final a la que se realizarán los ensayos para el AFM, con el fin de garantizar que en ese punto del cultivo, la mayor parte de la glucosa ha sido incorporada.

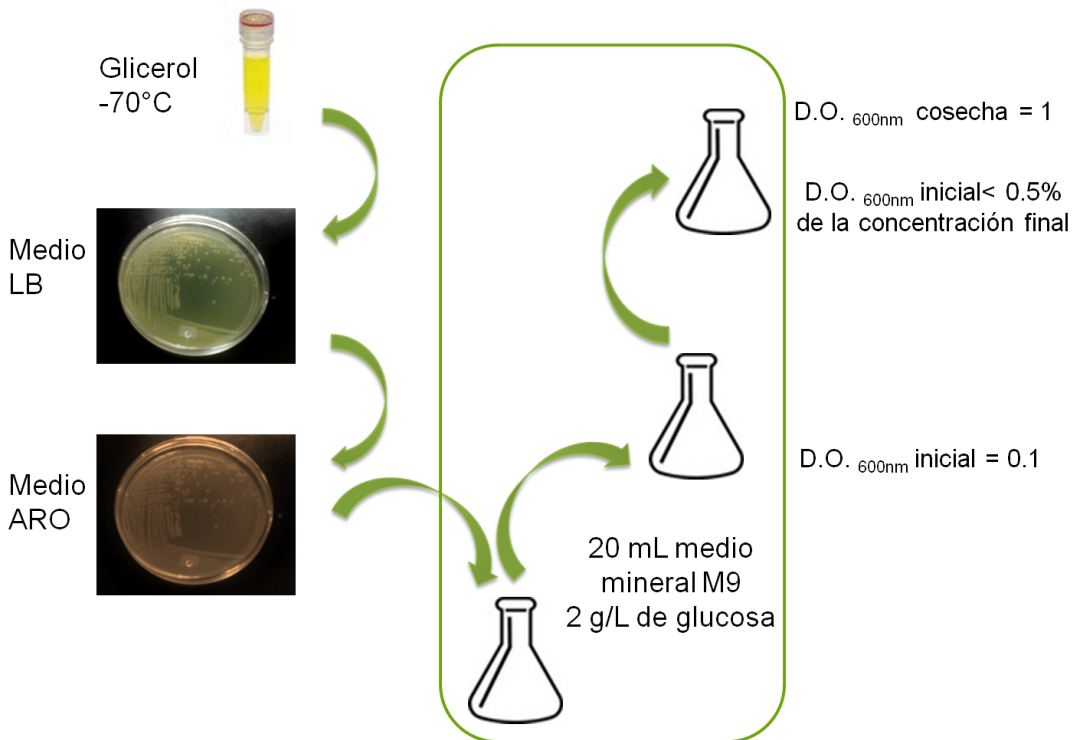


Figura 17. Protocolo para el desarrollo del cultivo de la cepa PB12.SA12 para el análisis de flujos.

Las cinéticas de crecimiento correspondientes al cultivo del tercer matraz, para cada una de las cepas se muestran a continuación (fig. 18).

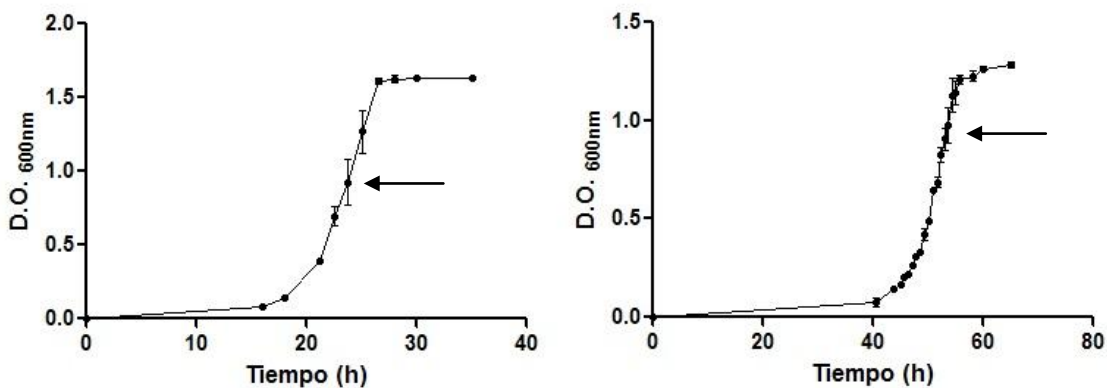


Figura 18. Cultivos de la cepa PB12 (izquierda) y PB12.SA12 (derecha) en medio M9. Se indica con la flecha, el momento en el que se cosechan las células en el cultivo final.

Bajo las condiciones de cultivo con 2 g/L de glucosa, la cepa PB12.SA12 alcanza solamente un valor de $D.O._{600} = 1.3$ aproximadamente, por lo que se eligió el punto de la etapa exponencial tardía cuando llega a 1 $D.O._{600nm}$, para cosechar las células, de este

modo, se asegura que una gran parte de la glucosa ha sido incorporada. La cepa PB12 entra a etapa estacionaria al haber alcanzado una D.O._{600nm} de 1.5 aproximadamente, por lo que se decidió tomar el mismo punto de 1 D.O._{600nm} con el fin de realizar la comparación entre las dos cepas. Como se ha mencionado antes, en cultivos en lote, durante la etapa de crecimiento exponencial existe un estado estacionario, indispensable para la realización del AFM, el punto de 1 D.O._{600nm} se encuentra dentro de esta etapa de crecimiento para ambas cepas, como se puede observar claramente en la figura 18. Para ambas cepas fue calculada la velocidad específica de crecimiento (μ), a partir del último cultivo de la serie en el cual se cosechan las células y como era de esperar se obtuvo un valor de μ menor para la cepa PB12.SA12 como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Velocidad específica de crecimiento (μ) de las cepas PB12 y PB12.SA12.

Cepa	μ (h ⁻¹)
PB12	0.26
PB12.SA12	0.19

CUANTIFICACIÓN DE ANALITOS PRODUCIDOS EN LA FERMENTACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL ESTADO ESTACIONARIO.

Como se puede observar en la tabla 9, la cepa PB12 no acumula SA, la cepa PB12.SA12 aunque tiene inactivada solo una de las shikimato cinasas, lo acumula al igual que el resto de los intermediarios, esto es indicativo que la actividad remanente proporcionada por la cinasa AroK (II), no es suficiente para convertir todo el SA formado en los productos siguientes, sin embargo le permite crecer en medio mínimo, lo que no ocurre con la cepa PB12.SA22 que tiene las dos cinasas inactivadas.

Tabla 9. Producción de metabolitos de las cepas PB12 y PB12.SA12.

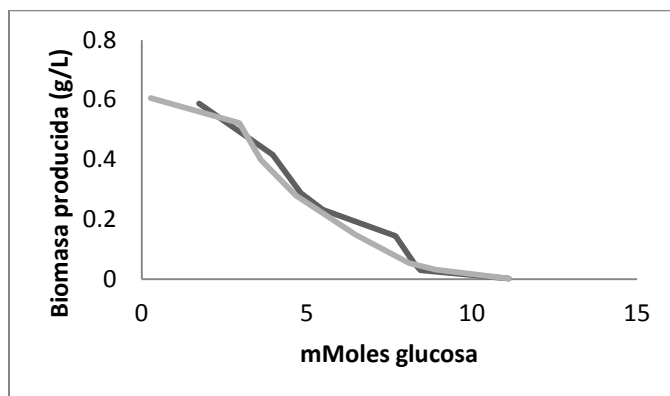
	SA (g/L)	DAHP (g/L)	DHQ (g/L)	DHS (g/L)	Acético (g/L)
PB12		0.01±0.00			0.02±0.00
PB12.SA12	0.13±0.05	0.07±0.00	0.17±0.03	0.05±0.01	

Se observa en la cepa PB12.SA12 como se ha visto anteriormente [Carmona, 2011], una mala distribución del carbono en la vía de aromáticos desde el punto de vista que el carbono no está llegando hasta los productos finales de la vía, si no que existe una acumulación de los distintos intermediarios de la VSA, lo que indica que la sobreexpresión de los genes implicados en estas reacciones, no es suficiente para contener con la reversibilidad de las mismas. La cepa PB12.SA12 consume más

glucosa que la cepa parental PB12 (en el medio quedan remanentes 0.49 ± 0.10 g/L y 0.61 ± 0.05 respectivamente), lo que hace sentido con el fenómeno de acumulación de SA, ya que esta alcanza una menor D.O._{600nm} que la parental.

La presencia en el cultivo de ambas cepas de un estado estacionario se demuestra con la existencia de una relación lineal entre la biomasa producida y el consumo de glucosa (fig. 19), en un intervalo de la etapa de crecimiento exponencial el cual abarca el punto en el que las células se cosechan, alrededor de 0.37 g/L (D.O._{600nm} de 1). Para ambas cepas, cuando la glucosa está por agotarse y el cultivo entra en fase estacionaria, el comportamiento antes mencionado no parece tan claro. La relación lineal entre las variables en el intervalo en que el cultivo alcanza 1 D.O._{600nm} demuestra para ambas cepas la presencia de un estado estacionario, en el punto elegido para el AFM.

a)



b)

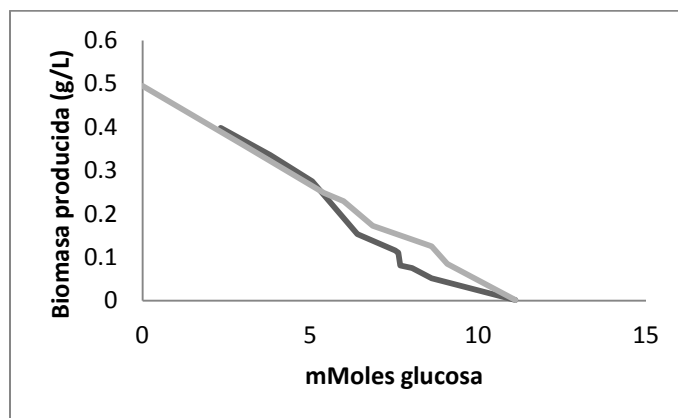


Figura 19. La correlación lineal entre crecimiento y consumos de glucosa indica un estado metabólico estacionario durante la etapa de crecimiento exponencial de cultivo. a) PB12, b) PB12.SA12.

PARTE II.

Estandarización de los pasos de preparación de la muestra para el análisis por GC-MS

METODOLOGÍA

PREPARACIÓN DE LA MUESTRAS PARA EL AFM.

Una vez que se implementó la estrategia de cultivo para ambas cepas, se realizaron fermentaciones bajo las condiciones establecidas. A partir de la tercera etapa de crecimiento en M9 se colectaron y procesaron muestras como se indica a continuación.

Quenching e hidrólisis ácida.

Para cosechar las células, se colectaron volúmenes de 10 y de 1 mL de cultivos crecidos a 37 °C en medio mínimo M9 con 2 g/L de glucosa, cuando las células se encontraron a $D.O_{600nm} = 1.0$, las alícuotas fueron centrifugadas por 10 minutos a 6,000 rpm y 4 °C para separar las células del sobrenadante, las células fueron lavadas dos veces con agua MQ estéril a 4 °C y posteriormente fueron secadas en un evaporador rotatorio (Concentrator 5301, Eppendorf AG). Las pastillas secas se resuspendieron en 0.1 mL de HCl 6 N y se sometieron a 110 °C por 24 h con el fin de hidrolizar la proteína celular presente para la obtención de aminoácidos. Las muestras se neutralizaron con NaOH 6N (el volumen de NaOH requerido para la neutralización es menor al volumen empleado de HCl, debido a la evaporación de este durante la hidrólisis) y se filtraron para eliminar los sólidos con filtros Millex HN de 0.45 µm. El líquido clarificado se liofilizó en el equipo Freeze Dryer 8, LABCONCO [Meza *et al.*, 2012].

Derivatización.

Para determinar las condiciones de reacción óptimas que permitan la derivatización de los aminoácidos obtenidos en la hidrólisis previa y su posterior análisis por MS, se realizaron pruebas con el hidrolizado y con estándares de aminoácidos, empleando como agente derivatizante Bis-N-(trimetilsilil) acetamida (BSA) (Merck KGaA) y variando factores como el solvente y la cantidad de muestra. Experimentos posteriores se realizaron con y N-Metil-N-(terbutildimetilsilil)-trifluoroacetamida (MTBSTFA) (Merck KGaA).

Las reacciones de derivatización se llevaron a cabo en tubos de vidrio de 5 mL en una proporción 1-3, derivatizante-solvente, se calentó a 75 °C por 1 hora, se centrifugó para separar el sobrenadante de la muestra no solubilizada y se empleó el sobrenadante para su análisis por GC-MS [Wittmann, 2007].

GC-MS.

Se realizaron análisis de las muestras derivatizadas en el Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, así como en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

En el primer caso se realizaron en un cromatógrafo de gases (6890 Plus) acoplado a Detector de Masas (5978), (AGILENT) que incluye una columna: HP-5MS (5% phenyl-methyl-siloxan-diphenylpolysiloxan) 60 m x 0.251 mm x 0.25 micrómetros (Agilent) que emplea helio como gas acarreador; las condiciones de operación fueron las siguientes: split 10:1 50 °C por 1 min, rampa de calentamiento de 10 °C por min hasta 250 °C manteniendo esta temperatura 10 min, incremento de 10 °C por min hasta 260 °C manteniendo 20 min. La temperatura en la interfaz es de 250 °C y en la fuente de iones es de 200°C. El voltaje para la ionización es de 70 eV.

En el segundo caso, se empleó un cromatógrafo de gases (GC; Agilent, modelo 6809 network GS sistem) acoplado a un espectrómetro de masas (MS; Agilent modelo 5973 network mass selective detector) con una columna HP-5MS (5% phenyl-methyl-siloxan-diphenylpolysiloxan) 30 m x 0.251 mm x 0.25 micrómetros (Agilent) que emplea helio como gas acarreador. Las condiciones de operación fueron: split 10:1 50 °C por 1 min, rampa de calentamiento de 10 °C por min hasta 250 °C manteniendo esta temperatura 10 min, incremento de 10 °C por min hasta 260 °C manteniendo 20 min y split 10:1 50 °C por 1 min, rampa de calentamiento de 8 °C por min hasta 250 °C manteniendo esta temperatura 10 min con un incremento de 10 °C por min hasta 280 °C manteniendo 10 min. La T en la interfaz es de 250 °C, en la fuente de iones de 200 °C. El voltaje para la ionización es de 70 eV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PREPARACIÓN DE LA MUESTRAS PARA EL AFM.

Entre las razones a considerar en la elección de un agente de derivatización adecuado se encuentra la disponibilidad del mismo, tomando esto en cuenta se trabajó con el compuesto BSA en un primer ensayo de derivatización y análisis por GC-MS de una muestra proveniente de un cultivo de la cepa PB12.

El BSA es considerado un buen reactivo para la sililación de una amplia gama de compuestos, entre ellos aminoácidos. Dadas sus características estructurales en la que los átomos de Si unidos a un N adyacente a un carbonilo (amida) aumentan la reactividad de los hidrógenos ácidos y estabilizan por resonancia el intermediario del estado de transición en la formación del TMS derivado, así como la presencia de un buen grupo saliente (se ha observado una mejor habilidad para donar el grupo silil en comparación a amidas mono sililadas, debido a que uno de los grupos silano atrae los electrones

debilitando el enlace Si-N), por lo que la reacción de sililación se ve favorecida (fig. 20) [Klebe *et al.*, 1996].

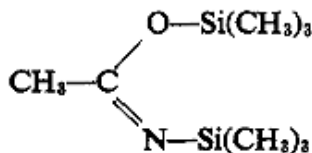


Figura 20. Estructura del compuesto Bis-N-(trimetilsilil) acetamida

El cromatograma obtenido del primer análisis con BSA indica la presencia en la muestra de solo 14 compuestos, de los cuales únicamente 7 correspondieron a aminoácidos (fig. 21). Es importante destacar la presencia de un pico con un área amplia que eluye en los primeros minutos, el cual corresponde al BSA sin reaccionar, este se adiciona en la reacción en exceso ya que la reacción de sililación es reversible y de este modo se garantiza que el equilibrio se encuentre desplazado siempre hacia productos [Moldeveanu y David, 2002].

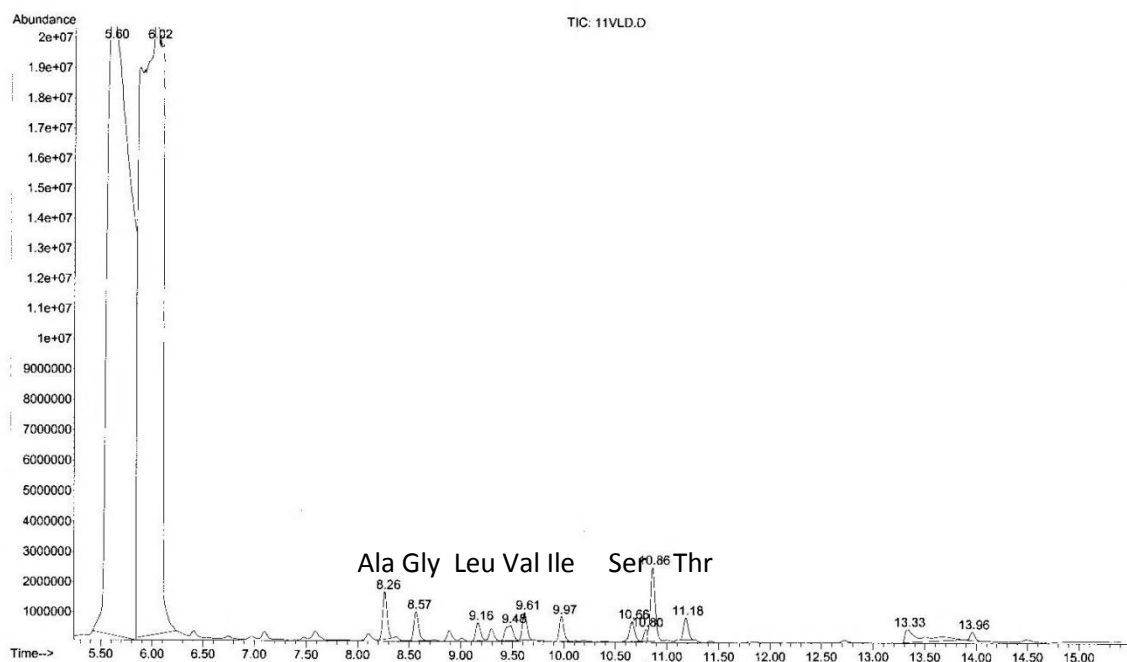


Figura 21. Cromatograma obtenido del análisis de una muestra de 10 mg de proteína celular hidrolizada de la cepa PB12 derivatizada con BSA en cloroformo como solvente.

Teniendo en cuenta las características antes mencionadas del BSA y los resultados del primer análisis, se decidió trabajar con este reactivo, buscando optimizar el proceso y encontrar las condiciones adecuadas que permitieran identificar el total de aminoácidos presentes en el hidrolizado.

Varios factores se ven involucrados en la detectabilidad de los aminoácidos de la proteína celular, entre ellos la eficiencia de la hidrólisis, el solvente empleado y la eficiencia de la derivatización.

El método de hidrólisis empleado, si bien causa la descomposición de algunos de los aminoácidos, está reportado que se logra un grado de hidrólisis adecuado [Tsugita y Scheffler, 1982; Fountoulakis y Lahm, 1998] y ha sido ampliamente empleado tanto para el análisis de la composición de aminoácidos de proteínas [Fountoulakis y Lahm, 1998] como para el procesamiento de la proteína celular en el AFM [Wittmann, 2007].

Por otra parte, está reportado que a partir de mezclas de 10 a 50 mg de hidrocloruros de aminoácidos en acetonitrilo con exceso de BSA se detectan picos independientes para 22 de estos compuestos [Klebe *et al.*, 1996]; considerando que las condiciones de derivatización empleadas son mayores en tiempo y similares en temperatura que las recomendadas para este reactivo [Klebe *et al.*, 1996], se decidió evaluar el efecto del solvente sobre la detectabilidad de los aminoácidos.

Está reportado que el solvente juega un papel importante en la interacción con las moléculas a analizar y por tanto en la detección de las mismas [Gehrke y Leimer, 1970]; en nuestro caso particular puede ocurrir que el solvente empleado (cloroformo), no brinde el ambiente necesario para que los aminoácidos reaccionen con el BSA teniendo como resultado la no detección de los mismos.

Es importante mencionar en este punto que, como resultado de la reacción de hidrólisis con HCl y la posterior neutralización con NaOH, el hidrolizado contiene NaCl, que aunque no interfiere en la reacción de sililación puede afectar indirectamente el sistema, modificando propiedades termodinámicas de los aminoácidos en el hidrolizado como su solubilidad.

Para que la reacción de derivatización se lleve a cabo, la muestra debe estar solubilizada, la observación cualitativa de este fenómeno es indicativo que la reacción se favorecerá, incluso conforme avanza la reacción de sililación el material que queda insoluble se va incorporando a la solución ya que la reacción se va desplazando hacia productos, sin embargo la presencia del NaCl que es insoluble en solventes orgánicos, impide la observación de este fenómeno.

Con la intención de seleccionar un solvente o mezcla de solventes que garantice la solubilización de los aminoácidos y que las partículas en suspensión correspondan exclusivamente al NaCl, se realizaron pruebas de solubilidad y derivatización de aminoácidos puros en una concentración conocida con distintos solventes.

Los solventes más empleados en la derivatización por sililación son dimetilformamida (DMF), piridina, dimetilsulfóxido (DMSO), acetonitrilo (AcN) y tetrahidrofurano (THF); la piridina por su carácter ácido no fue contemplada en el análisis ya que era incompatible con la columna cromatográfica. Los solventes DMF y DMSO tienen características muy

similares, tanto de polaridad como en su punto de fusión elevado, por lo que se seleccionó DMSO para una primera prueba de solubilidad, se trabajó entonces con DMSO, AcN y THF y una mezcla de 5 aminoácidos: Arg, His, Pro, Met y Phe elegidos de acuerdo a su hidrofobicidad (tabla 10) [Eisenberg *et al.*, 1984] a una concentración de 0.5 mg/mL cada uno.

Tabla 10. Escala de hidrofobicidad de los 20 aminoácidos esenciales.

Residue	Consensus†	Normalized consensus‡
Arginine	-1.76	-2.53
Lysine	-1.10	-1.50
Aspartic acid	-0.72	-0.90
Glutamine	-0.69	-0.85
Asparagine	-0.64	-0.78
Glutamic acid	-0.62	-0.74
Histidine	-0.40	-0.40
Serine	-0.26	-0.18
Threonine	-0.18	-0.05
Proline	-0.07	0.12
Tyrosine	0.02	0.26
Cysteine	0.04	0.29
Glycine	0.16	0.48
Alanine	0.25	0.62
Methionine	0.26	0.64
Tryptophan	0.37	0.81
Leucine	0.53	1.06
Valine	0.54	1.08
Phenylalanine	0.61	1.19
Isoleucine	0.73	1.38

Como se observa en la tabla 11, ninguno de los tres solventes disolvió los aminoácidos completamente. Cualitativamente el AcN fue el que mejor disolvió al observarse menos sólidos en suspensión y fue este mismo el que permitió detectar 3 de los 5 aminoácidos presentes en la mezcla (fig. 22) seguido del THF con el que solo se detectó Pro.

Tabla 11. Resultados del análisis por GC-MS para la mezcla de aminoácidos con distintos solventes.

Disolvente	Observaciones
Acetonitrilo	Prolina, fenilalanina, metionina.
Dimetilsulfóxido	Pico al principio con un área muy amplia.
Tetrahidrofurano	Prolina.

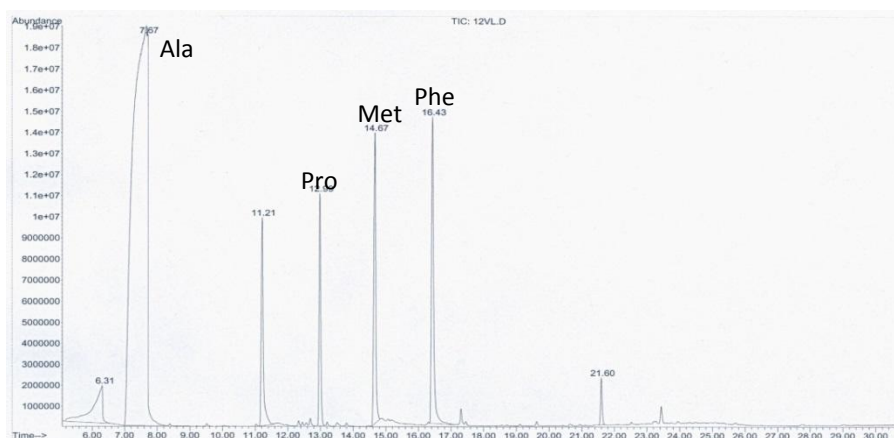


Figura 22. Cromatograma de la mezcla de aminoácidos Pro, Phe, Met, Arg e His en AcN. Se identifican tres de los cinco aminoácidos

El DMSO no permitió la identificación de ninguno de los aminoácidos, se obtuvo un espectro con un pico de gran área desde el minuto 5 hasta el minuto 9 del cromatograma, esto se pudo deber al carácter altamente polar del DMSO que favoreció una interacción fuerte con los aminoácidos provocando que eluyeran en los primeros minutos junto con el solvente e incluso que la derivatización no haya sido favorecida. Una característica del DMSO es su alto punto de ebullición, que no lo hace tan volátil dando como señal un pico no definido.

Se ha demostrado ya el efecto de la polaridad del solvente en la identificación de aminoácidos, siendo esta característica importante solo para algunos [Gehrke y Leimer, 1971], el AcN y THF que permitieron la detección de algunos aminoácidos además de tener una menor polaridad, tienen un punto de ebullición bastante más bajo lo que los hace más volátiles y con ello que no interfieran con la identificación de los analitos de la mezcla.

La muestra derivatizada con tetrahidrofurano se almacenó alejado de la humedad a 4°C e inyectó 5 días después y tras el análisis solo se identifica Pro. Está reportado que hasta por un periodo de 8 días TMS derivados permanecen estables [Gehrke y Leimer, 1971] por lo que no atribuimos a este factor el hecho de detectar solo un aminoácido.

Una desventaja clara del empleo de BSA como derivatizante, se presenta en el cromatograma de la figura 22, donde se observa un pico en los primeros minutos. que de acuerdo a la biblioteca asociada al equipo de GC-MS corresponde a Ala, sin embargo este aminoácido no fue incluido en la mezcla de aminoácidos. Este comportamiento se ha observado en otros trabajos donde bajo ciertas condiciones no se da una separación clara de aminoácidos como Ala y Gly del reactivo derivatizante [Gehrke y Leimer, 1971].

Debido a que no se logró disolver la mezcla de aminoácidos completamente, se amplió el espectro de solventes. Empleando Leu se realizaron pruebas de solubilidad en los solventes presentados en la tabla 12 que abarcan un amplio rango de polaridad.

Tabla 12. Pruebas de solubilidad de la leucina en diferentes solventes.

Disolvente	Leucina	HCl	Índice de polaridad
DMSO	X		7.2
Etilen glicol	X		6.9
DMF	X		6.4
Ácido acético	½		6.2
Acetonitrilo	X		5.8
Etanol	X		5.2
Acetona	X		5.1
Metanol	X		5.1
Dioxano	X		4.8
Acetato de etilo	X	Dos fases	4.4
Isopropanol	X		3.9
Diclorometano	X	Dos fases	3.1

Ningún solvente solubilizó el aminoácido Leu, en cada caso se calentó en un baño a 50°C y no hubo solubilización; con ácido acético se observó cualitativamente una ligera solubilización de éste aminoácido, por lo que se agregó a cada solvente hasta 5 gotas de una solución de HCl 2M observando su solubilización en todos los solventes excepto cuando estos eran inmiscibles y se formaron dos fases. La solubilidad es atribuida a la formación de puentes de hidrógeno de los grupos carboxilo y amina de la Leu y los iones hidronio H_3O^+ presentes ahora en el medio. Como ya se ha mencionado antes al avanzar la reacción de silylación el material insoluble se va incorporando a la solución, quizá al derivatizar con cada uno de estos solventes, la solubilidad del aminoácido se hubiera visto modificada, sin embargo esos experimentos formarían parte de un análisis más amplio.

En presencia de agua los TMS derivados se hidrolizan, por lo que no es posible incluir HCl (solución) en el medio de reacción para obtener un medio ácido en el que los aminoácidos se solubilizan. Está reportado el empleo de piridina al 0.1% para este fin [Wittmann, 2007], sin embargo, como se ha mencionado antes por su bajo pH daña la columna cromatográfica. En otros casos se emplea ácido trifluoroacético (TFA) 0.1%.

Se decidió trabajar con AcN con TFA 0.06% debido a varios factores: 1.- el AcN permitió detectar 3 de 5 aminoácidos, 2.- en la prueba con Leu no hubo otro solvente que resultara

mejor en el proceso de solubilidad y 3.- es el solvente más empleado y recomendado en la derivatización y análisis de aminoácidos. El medio ácido que se genera tras la incorporación de TFA ayuda en la reacción de sililación ya que bajo estas condiciones el grupo carboxilo se encuentra protonado y de este modo se puede llevar a cabo la sustitución nucleofílica.

Empleando el AcN como solvente y TFA 0.06% se determinó un valor aproximado de solubilidad para algunos de los aminoácidos.

Tabla 13. Solubilidad de algunos aminoácidos en acetonitrilo 0.06% de TFA

Aminoácido	Solubilidad mg/mL	Aminoácido	Solubilidad mg/mL	Aminoácido	Solubilidad mg/mL
Valina	0.29	Lisina	0.11	Alanina	0.14
Prolina	0.38	Glicina	0.15	Treonina	0.11
Metionina	0.38	Cisteina	0.16	Serina	0.1
Triptofano	0.29	Fenilalanina	0.31	Isolucina	0.22
Leucina	0.33				

Dados los valores de solubilidad obtenidos (tabla 13) y las concentraciones de los aminoácidos reportadas para proteína celular en *E. coli* [Ku E. *et al.*, 1962], se puede afirmar que los aminoácidos presentes en el hidrolizado celular al estar en concentraciones inferiores a las determinadas en la tabla 14, debieran solubilizarse. Dado que no se pudo determinar la solubilidad de los 20 aminoácidos por las altas cantidades de solvente requeridas, no podemos garantizar que los sólidos en suspensión correspondan únicamente a NaCl.

Empleando los datos obtenidos de solubilidad, se hizo una mezcla de aminoácidos Phe, Met, Pro, Leu, Ile y Val a 30 µg/mL cada uno y otra a una concentración de 3 µg/mL de cada aminoácido. En el primer caso se detectan en muy baja abundancia Phe, Leu e Ile, mientras que en el segundo caso no se alcanza a detectar ninguno de los aminoácidos en la mezcla, esto puede deberse a que la concentración es muy baja para ser detectada por el equipo, esto concuerda con el hecho de que los aminoácidos metionina y prolina que se detectaban a una concentración de 0.5 mg en el experimento anterior, ahora a una concentración más baja ya no son detectables. Usualmente los equipos de GC-MS detectan concentraciones muy bajas de analitos, pero la sensibilidad está en función también del tiempo de uso del equipo.

Se analizó una muestra de proteína celular resultado de la hidrólisis de 1 mL de cultivo a 1 D.O._{600nm} de la cepa PB12 y no se detectó ningún aminoácido. La concentración de los aminoácidos en la célula se encuentra por debajo de las concentraciones empleadas en

los experimentos realizados con aminoácidos puros, estas bajas concentraciones podrían ser la causa por la que no se detecte ningún aminoácido. Diversos factores son los que pueden estar afectando negativamente en el análisis y uno que no se ha mencionado son las condiciones de operación en el cromatógrafo y espectrómetro de masas, es posible que las condiciones de temperatura empleadas sean agresivas para los derivados formados que se sabe son inestables. De este modo, tomando en cuenta los factores de baja concentración de los compuestos a analizar y la baja estabilidad de sus derivados, puede presentarse el caso de que los aminoácidos se derivatizen y se descompongan en algún momento durante el análisis, es común que derivados se descompongan en su paso por la columna cromatográfica.

Con el fin de generar derivados más estables y poder detectar aminoácidos a concentraciones tan bajas como las presentes en la proteína celular, se optó por el empleo de un segundo agente derivatizante, el MTBSTFA (fig. 23).

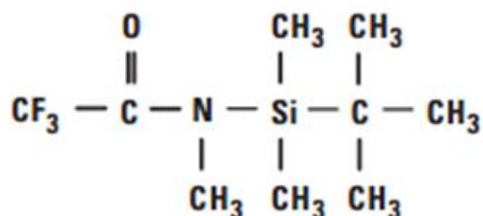


Figura 23. Estructura del compuestos N-Metil-N-(terbutildimetilsilil)-trifluoroacetamida (MTBSTFA)

En la reacción de sililación el MTBSTFA, genera ter-butildimetilsilil derivados (fig. 24), que son muy voluminosos y con ello más estables tanto a humedad como a temperatura, en el caso de la hidrólisis en presencia de agua la reacción no se lleva a cabo con la misma velocidad al existir impedimento estérico. Por otro lado el grupo trifluoroacetamida es un mejor grupo saliente que la acetamida del BSA.

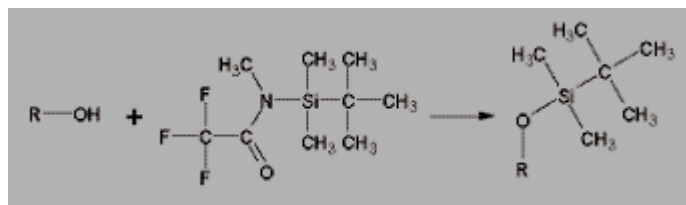


Figura 24. Reacción de sililación con MTBSTFA para la generación de TBDMS derivados

Empleando las mismas condiciones que con el BSA en un primer ensayo, se realizó la derivatización y el análisis por GC-MS de una mezcla de aminoácidos Lys, Leu, Val y Met a una concentración de 40 µg/mL aproximadamente, identificándose los 4 aminoácidos presentes en la mezcla (fig. 26).

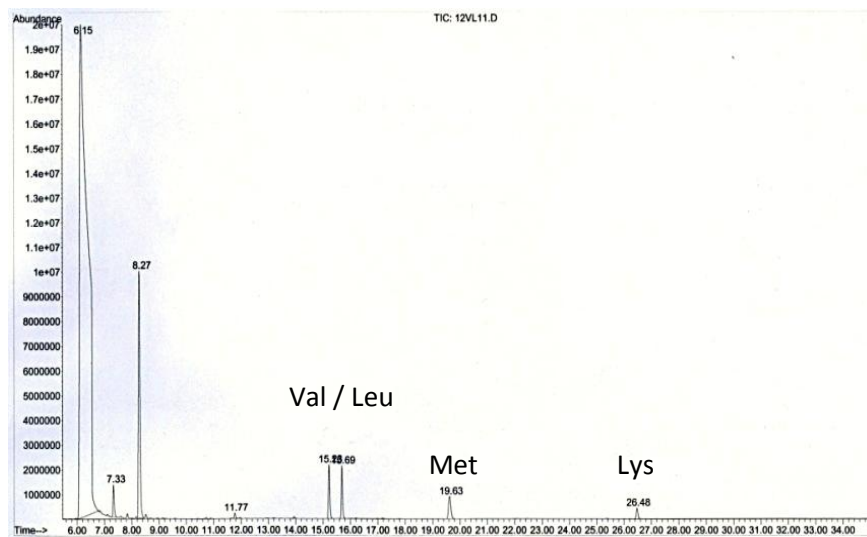


Figura 25. Cromatograma de una mezcla de Lys, Leu, Val y Met derivatizados con MTBSTFA y acetonitrilo 0.06% TFA

La Met que anteriormente no se había detectado a 30 $\mu\text{g/mL}$ con BSA ahora se detecta al igual que la Val; es importante notar que este aminoácido se presenta en la misma abundancia que la leucina el cual si se había detectado anteriormente, lo que demuestra cómo cada aminoácido interacciona de forma diferente con cada solvente y derivatizante. Se realizó entonces un ensayo de derivatización y análisis por GC-MS de una muestra de hidrolizado de proteína lográndose detectar la mayoría de los aminoácidos (fig. 26)

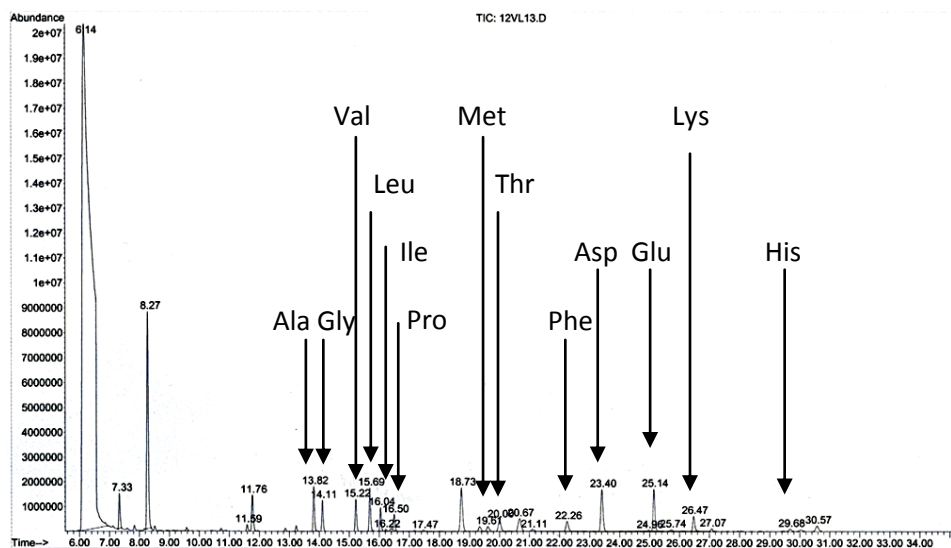


Figura 26. Cromatograma obtenido del análisis de una muestra de 10 mg de proteína celular hidrolizada de la cepa PB12 derivatizada con MTBSTFA en acetonitrilo como solvente.

Se observa en la figura 26, que con MTBSTFA se detectan el doble de aminoácidos en comparación con BSA como derivatizante; sin embargo, dado que el análisis con BSA se realizó con Clf como solvente, se llevó a cabo un ensayo con Clf y MTBSTFA para poder comparar el efecto del derivatizante solamente.

El resultado se muestra en la tabla 14 donde se comparan los aminoácidos detectados en cada ensayo: Clf + BSA, Clf + MTBSTFA y AcN + MTBSTFA (columnas 2, 3 y 4 respectivamente), estos resultados dejan claro que el MTBSTFA es un mejor reactivo derivatizante, aunque no es posible concluir si el hecho de no detectar los aminoácidos radicaba en el proceso de derivatización o en la descomposición de los derivados después de esta reacción.

Es importante mencionar un parámetro importante: la sensibilidad del aparato; en nuestro caso este factor jugó un papel importante en los resultados de los análisis. Los experimentos descritos hasta ahora se realizaron en el Centro de Investigaciones Químicas, UAEM; al realizar los ensayos en un equipo distinto, en el Instituto de Biotecnología, UNAM, bajo las mismas condiciones, se observa un aumento en la cantidad de aminoácidos detectados (tabla 5, columna 4) y aunque este factor contribuía en menor medida es importante tomarlo en consideración.

Tabla 14. Aminoácidos identificados con cloroformo y acetonitrilo en MTBSTFA. Se remarcan en negro los aminoácidos que se descomponen en el proceso de hidrólisis.

Aminoácido	Cloroformo BSA*	Cloroformo MTBSTFA*	Acetonitrilo MTBSTFA*	Acetonitrilo MTBSTFA**
Glicina	√	√	√	√
Ácido glutámico		√	√	√
Prolina		√	√	√
Alanina	√	√	√	√
Histidina			√	√
Serina	√	√		√
Arginina				
Isoleucina	√	√	√	√
Treonina	√	√	√	√
Asparagina				
Leucina	√	√	√	√
Triptófano				√
Ácido aspártico		√	√	√
Lisina			√	√
Tirosina				√
Cisteina				

Metionina		√	√	√
Valina	√	√	√	√
Glutamina				
Fenilalanina		√	√	√

*Experimentos realizados en el Centro de Investigaciones Químicas, UAEM. ** Experimentos realizados en el Instituto de Biotecnología, UNAM.

La diferencia de los compuestos detectados con AcN o Clf puede atribuirse a la naturaleza de los mismos, el AcN es un solvente polar aprótico, el Clf es aprótico también pero su carácter polar es menor; como se observa en la tabla 15 con Clf no fue posible detectar los aminoácidos Lys e His estos aminoácidos clasificados como polares pueden estar interaccionando mucho mejor con el AcN evitando que se adhieran a la columna y puedan eluir adecuadamente.

Como se ha mencionado antes la Gln y Asn se desaminan identificándose como sus respectivos ácidos, el Trp y la Cys se degradan en el proceso de hidrólisis, por lo que estos cuatro aminoácidos eran de esperarse que no se detectaran.

Aunque los dos solventes son capaces de detectar la mayoría de los aminoácidos, hay una diferencia en cuanto a abundancia, lo que indica que cada solvente interacciona distinto con cada aminoácido permitiendo detectarlo en mayor o menor medida. En el caso en el que se emplea Clf como solvente se observa además un cambio en el orden de elución de algunos aminoácidos, específicamente Ser y Thr, este cambio en el tiempo de retención es debido a la incompleta reacción de derivatización donde solo dos de los tres sitios susceptibles de sililarse reaccionan, obteniendo un compuesto de masa menor y eluyendo antes en comparación al cromatograma cuando se emplea AcN.

El aminoácido Arg es el único que no se detecta con ninguno de los dos solventes a partir de la proteína celular, de acuerdo con la literatura esto puede atribuirse a dos causas: la descomposición en la columna o la derivatización no se esté llevando a cabo adecuadamente; para la mayoría de los aminoácidos las condiciones de derivatización generalmente empleadas brindan buenos resultados sin embargo; para algunos otros la reacción necesita ciertas características especiales y esto depende del solvente empleado, del reactivo derivatizante y del aminoácido en cuestión, en el caso de la Arg se han reportado condiciones de derivatización de 2.5 horas a 150°C [Gehrke y Leimer, 1971].

Los resultados anteriores muestran que al derivatizar con MTBSTFA se mejoran las características cromatográficas de los aminoácidos presentes,

La identificación de los aminoácidos en la proteína celular se había realizado de acuerdo a la base de datos asociada al equipo, con el fin de determinar los tiempos de retención

correctos para cada aminoácido se realizó un ensayo con un mezcla estándar de aminoácidos (fig 27).

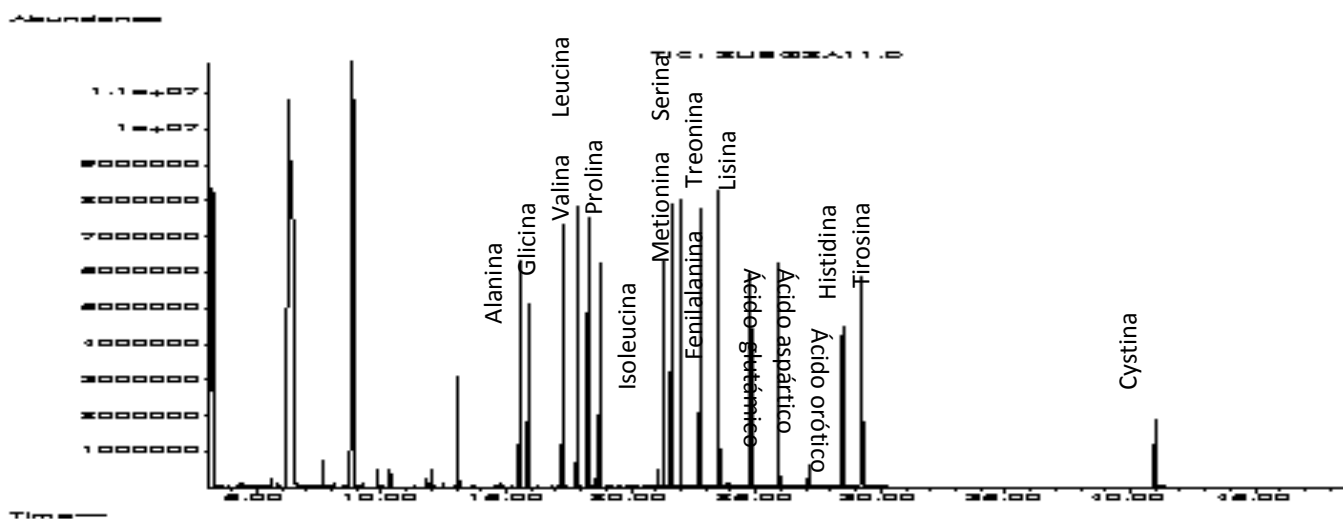


Figura 27. Cromatograma correspondiente al estándar de aminoácidos. Contiene 17 de los 20 aminoácidos esenciales; para algunos de ellos se observa más de un pico.

El estándar de aminoácidos contiene 17 de los 20 aminoácidos esenciales (no contiene Trp, Asn ni Gln), observándose un pico para la mayoría de estos (fig. 27). La concentración de los aminoácidos en el estándar es de 2.5 $\mu\text{mol/mL}$ (excepto la cystina que se encuentra a 1.25 $\mu\text{mol/mL}$), sin embargo se observaron diferencias en la abundancia de estos como resultado de las distintas características de ellos que da una respuesta distinta, observándose aminoácidos que se detectan abundantemente y otros con picos muy pequeños.

Es de importancia resaltar que aparece en el cromatograma (fig. 27) un pico correspondiente a Arg y otro correspondiente a ácido orótico, este último resultado de la degradación de la primera, con esto vemos que las condiciones empleadas son suficientes para derivatizar la Arg contrario a lo que se había mencionado anteriormente; el hecho de no detectarla en el hidrolizado puede atribuirse a que este aminoácido se encuentra en baja proporción en la proteína celular [Okayasu *et al.*, 1997]. Si a este factor sumamos cierto grado de descomposición del aminoácido y una interacción no tan favorable con el solvente y la columna cromatográfica (reflejo del pico de baja abundancia), su detectabilidad puede ser nula. Se derivatizó Arg pura en exceso en acetonitrilo y se analizó, en la figura 28 se muestra el cromatograma obtenido.

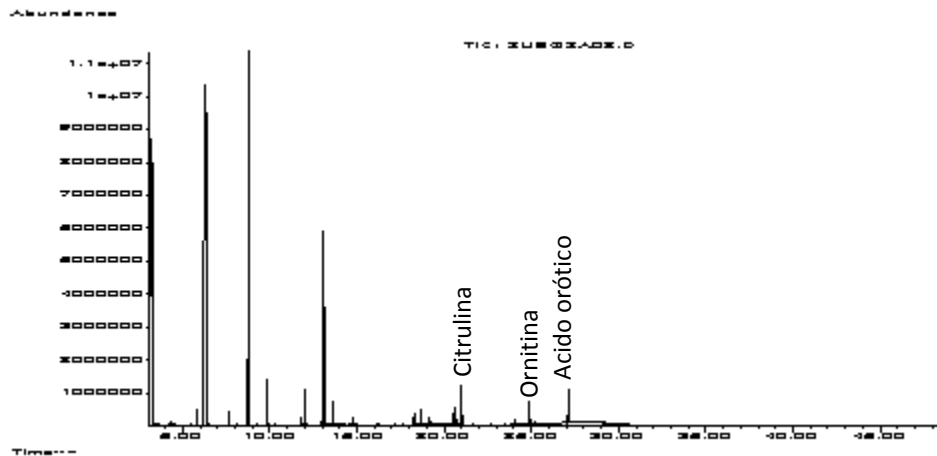


Figura 28. Cromatograma correspondiente a Arg en AcN con TFA 0.06%

Se observan tres picos (fig. 28): correspondientes a Arg: ácido orótico, ornitina y citrulina, de acuerdo con la base de datos del equipo, lo que indica que hay una descomposición del aminoácido además de un bajo factor de respuesta ya que la abundancia es muy baja a pesar de estar el aminoácido en exceso, (a diferencia de otros aminoácidos como His que en exceso dan picos que rebasan los límites del detector) estos factores, aunados a la relativa baja frecuencia en la proteína celular hace que su detección en estas muestras sea nula.

En cromatogramas correspondientes a hidrolizados celulares (fig. 29) se observan los aminoácidos His, Tyr y Pro en muy baja abundancia, lo que concuerda en el bajo porcentaje de estos aminoácidos en la proteína celular de *E. coli* [Okayasu *et al.*, 1997].

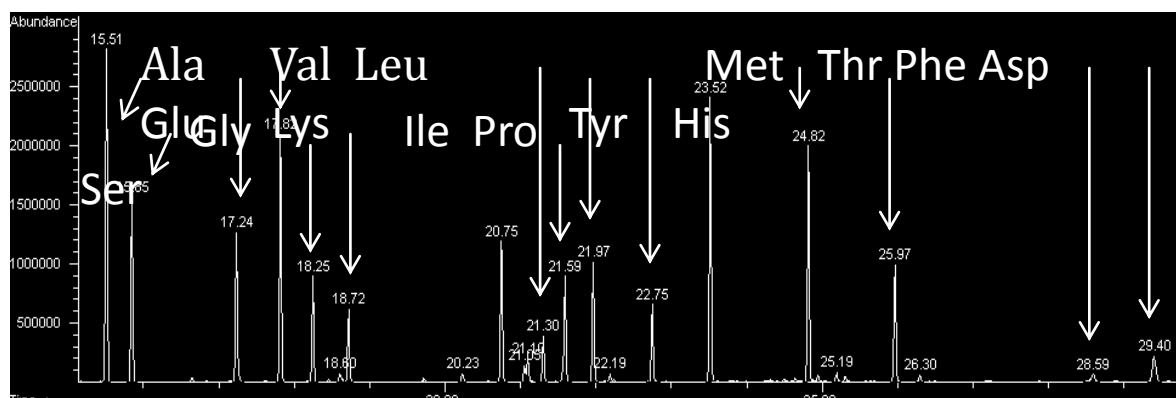


Figura 29. Cromatograma obtenido de un hidrolizado celular de la cepa PB12. Se observan 15 de los 20 aminoácidos esenciales.

Se realizaron ensayos de derivatización con His, Pro y Tyr en exceso al igual que con Arg y se analizaron en GC-MS. En el caso de la His se aprecia una alta abundancia, por lo que los pequeños picos en las muestras de proteína responden a la baja concentración del aminoácido en la proteína y no a un bajo factor de respuesta de estos a las condiciones de reacción y análisis por GC-MS, el mismo efecto aunque no tan evidente se ve con Tyr y Pro.

De los aminoácidos detectados, se ha obtenido su patrón de fragmentación.

En el espectro de masas de un compuesto (fig. 30) se observan varios picos a distintas relaciones m/z que corresponden a la fragmentación del mismo, el fragmento que brinda mayor información generalmente es el ion molecular que corresponde al compuesto sin fragmentar sin embargo; para los TBDMS derivados el ion molecular en el espectro de masa no es abundante, siendo en estos casos de utilidad los picos con una relación m/z más altos [Molnár-Perl y Katona, 1999].

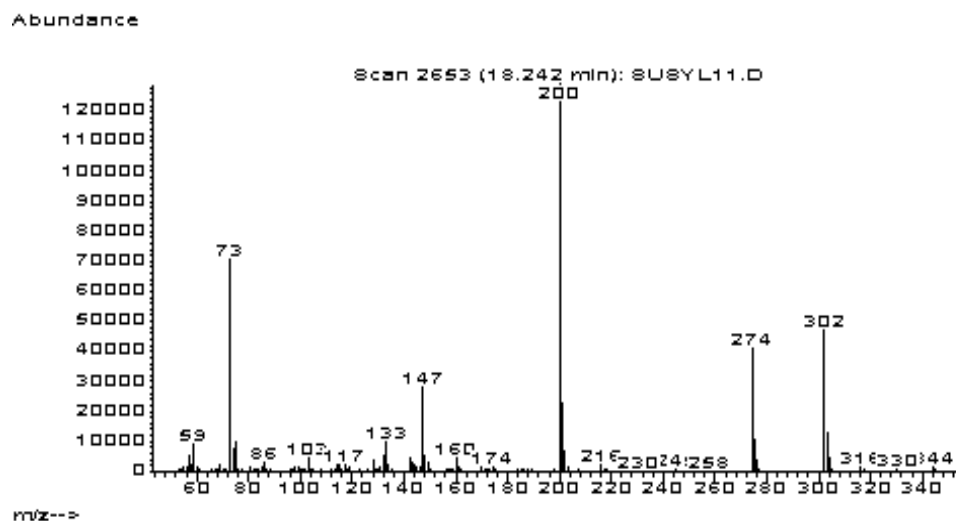


Figura 30. Espectro de masas del aminoácido Ile.

Existen fragmentos característicos y comunes a todos los aminoácidos TBDMS-derivados (fig. 31) encontrados en los espectros de la mayoría de los aminoácidos detectados.

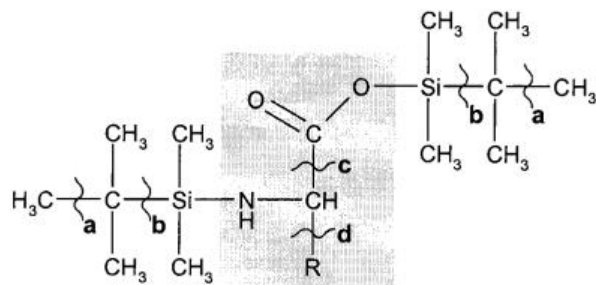


Fig. 31 Fragmentación característica de los derivados TBDMS de aminoácidos. En gris se denota el aminoácido con su cadena lateral R, el rompimiento en las posiciones marcadas genera los fragmentos: a. (M-15)⁺ y un grupo metilo, b. (M-57)⁺ y un grupo terbutilo, c. (M-159)⁺ y un ion COO-TBDMS, d. (f302)⁺ el aminoácido doblemente sililado y la cadena lateral (sc)⁺ que si contiene un grupo susceptible de sililación tendrá un grupo TBDMS añadido.

En el espectro de masas de todos los compuestos se observa que para cada pico con una relación masa-carga dada, hay picos adicionales con masas M+1, M+2, etc. con menores intensidades que corresponden a la abundancia natural de isótopos, como se muestra en la figura 32. En el caso de los compuestos derivados de un sustrato marcado, al incorporar átomos con una unidad de masa extra, la intensidad de los picos M+1, M+1, etc. se ve incrementada y en ocasiones la intensidad es mayor al pico con masa M.

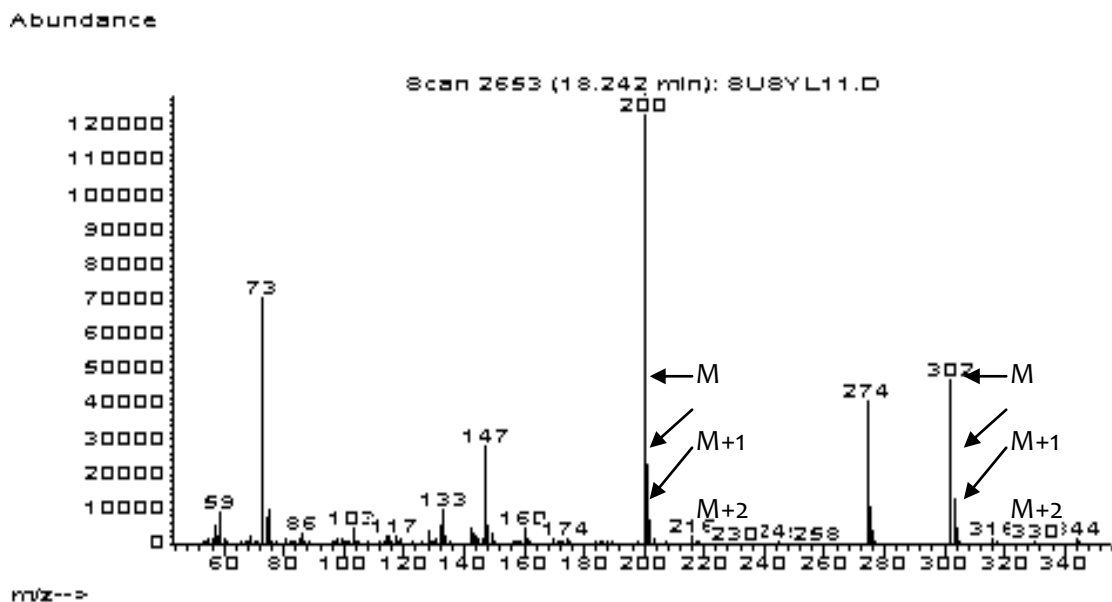


Figura 32. Espectro de masas del aminoácido isoleucina donde se observa la intensidad de la abundancia natural de isótopos.

PARTE III.

**Obtención de datos para el análisis de flujos
metabólicos.**

METODOLOGÍA

CULTIVOS CON GLUCOSA MARCADA.

Se realizaron cultivos en lote por duplicado bajo las condiciones mencionadas en la Parte I, empleando glucosa con diferentes tipos de marcación como se menciona a continuación:

Para ambas cepas: PB12 y PB12.SA12, los lotes consistieron en 8 cultivos: 2 empleando $1\text{-}^{13}\text{C}$ glucosa (Cambridge Isotope Laboratories Inc.) como fuente de carbono, 2 empleando $6\text{-}^{13}\text{C}$ glucosa (OMICRON Biochemicals Inc.), 2 empleando una mezcla equimolar de glucosa marcada uniformemente ($\text{U-}^{13}\text{C}$ glucosa ((Cambridge Isotope Laboratories Inc.)) y glucosa naturalmente marcada y 2 más con glucosa naturalmente marcada para la determinación de parámetros cinéticos.

De los cultivos con glucosa con marcación natural, se tomaron alícuotas a lo largo de la fermentación para determinar crecimiento a partir del pellet celular, así como consumo de sustrato y producción de intermediarios a partir del sobrenadante como se menciona en el apartado I. En los cultivos con glucosa marcada, el crecimiento se monitoreó en un colorimétero Klett correlacionando los valores obtenidos con una curva de crecimiento por $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$.

Se tomaron alícuotas de 5, 5 y 7 mL de todos los cultivos cuando estos alcanzaron 0.4, 0.7 y 1 $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$ respectivamente, para corroborar que los cultivos se encontraran en un estado estacionario en la marcación; se separaron las células del sobrenadante y se trataron como se describe en el apartado II.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CULTIVOS CON GLUCOSA MARCADA.

Los cultivos con distinto marcaje nos brindan información acerca del destino de los átomos del sustrato a lo largo del metabolismo. De acuerdo con las transiciones atómicas entre los intermediarios del metabolismo sabemos por ejemplo que los cultivos con glucosa marcada en el carbono uno, nos permite tener marcación en los aminoácidos provenientes de intermediarios de glucólisis y TCA y que los cultivos con glucosa marcada en el carbono seis nos brindan información acerca del flujo de carbono hacia la vía de las pentosas.

Los parámetros cinéticos obtenidos a partir de los cultivos con glucosa sin marcar se mostraron en el apartado de caracterización de las cepas: determinación de parámetros cinéticos y de producción.

A partir del análisis por GC-MS, de cada una de las muestras obtenidas en diferentes momentos de los cultivos, una vez que cada aminoácido ha sido separado, se obtiene un patrón de fragmentación característico. En los cultivos con marcaje, se obtienen picos correspondientes al ion molecular así como a otros fragmentos con unidades de masa extra, en comparación con los picos observados en las muestras de los cultivos sin marcar.

Los picos más abundantes con unidades de masa extra corresponden generalmente a los fragmentos que contienen la cadena lateral de cada aminoácido, así como el pico M-159 que contiene el carbono anomérico como se puede observar en la figura 33 para el aminoácido His, la cual posee una masa molecular de 155.16 Da y tres sitios susceptibles de sililación, si los tres sitios reaccionan se forma el compuesto observado en la figura 33 cuya masa molecular es 497 Da, al fragmentarse se obtienen los picos M-15 con una $m/z=482$, M-57 con $m/z=440$, M-159 con $m/z=338$ y M-302 con $m/z=196$.

En la figura 39 se observan dos espectros, el superior corresponde al aminoácido sin marcar teórico y el inferior al aminoácido obtenido de un cultivo con $1\text{-}^{13}\text{C}$ glucosa como sustrato; en el espectro correspondiente al cultivo marcado (inferior) se observa el aumento de la intensidad para los picos M+1, M+2 y M+3 para los picos M-15, M-57, M-159 y M-302.

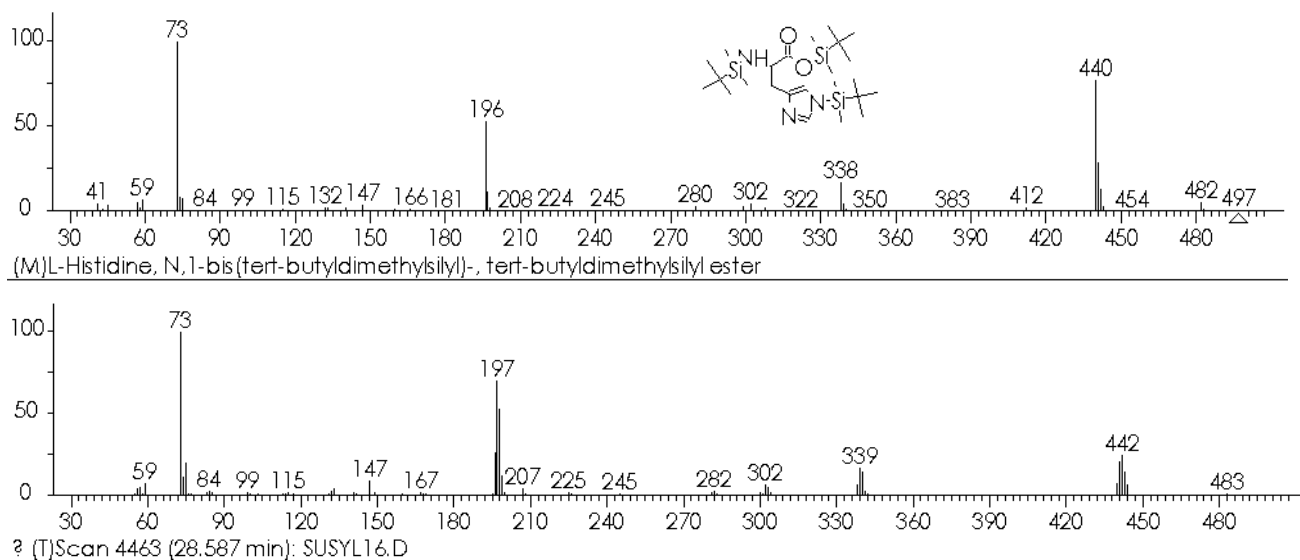


Figura 33. Patrón de fragmentación del aminoácido His proveniente de un cultivo con $1\text{-}^{13}\text{C}$ glucosa como sustrato. Se observan los picos característicos M-15 con $m/z=482$, M-57 con $m/z=440$, M-159 con $m/z=338$ y M-302 con $m/z=196$.

En el caso en que se empleó glucosa sin marcar, no se observa diferencia entre el espectro de la muestra problema y el teórico como se observa en la figura 34.

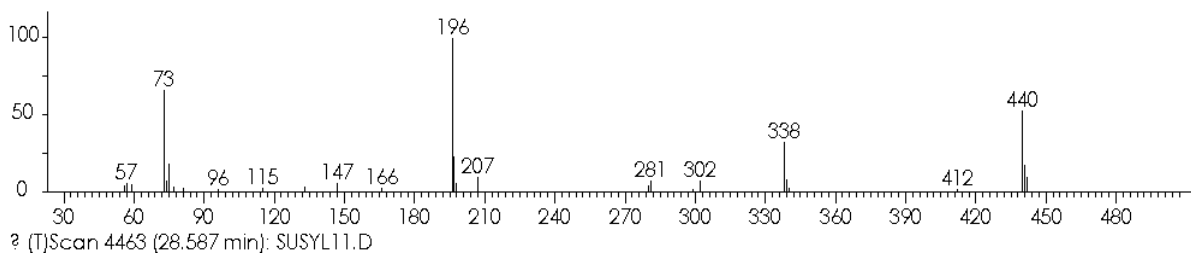
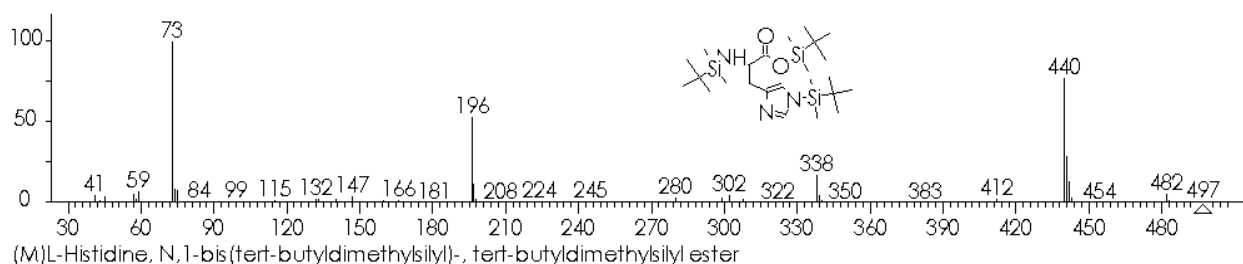


Figura 34. Patrón de fragmentación del aminoácido His proveniente de un cultivo con glucosa sin marcar como sustrato. Se observan los picos característicos M-57 con $m/z=440$, M-159 con $m/z=338$ y M-302 con $m/z=196$.

PROCESAMIENTO DE LOS DATOS

El objetivo de este trabajo es la obtención de datos experimentales listos para integrarse en un modelo matemático, el software OpenFLUX que como se ha mencionado, emplea la distribución de masas de isotopómeros (DMI) para determinar el flujo del carbono en el metabolismo a estudiar. Esta técnica involucra la cuantificación por espectroscopía de masas de la abundancia relativa de las especies moleculares que difieren solo en su masa (isotopómeros de masa).

En la figura 35 se observa a) la DMI para un metabolito proveniente de un cultivo con glucosa naturalmente marcada y b) la DMI para un metabolito proveniente de un cultivo con sustrato marcado en el que el aumento en la abundancia de los picos M+1, M+2, M+3, etc., indican la presencia de átomos de ^{13}C en dicho metabolito.

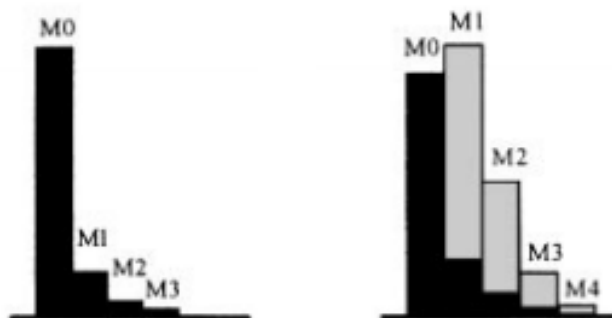


Figura 35. Representación de la distribución de masa de isotopómeros, para a) cultivo con marcación natural y b) cultivo con sustrato marcado con ^{13}C .

De los patrones de fragmentación de los aminoácidos en los cultivos se obtienen los valores para las distribuciones de masa de isotopómeros, representadas generalmente como porcentaje o fracción. Se muestra en la tabla 15 el ejemplo para un cultivo con ^{13}C glucosa, donde se muestran las MIDs del fragmento M-57 de cada aminoácido, este fragmento contiene el aminoácido íntegro.

Tabla 15. Distribución de masa de isotopómeros para el fragmento M-57 de los aminoácidos proteinogénicos de la cepa PB12.SA12 en medio mínimo M9 con $1\text{-}^{13}\text{C}$ glucosa como fuente de carbono.

Compuesto	Fragmento considerado	m (m/z)	m+x (m/z)	DMI (%)	
				m (m/z)	m+x (m/z)
Ala-(TBDMS) ₂	M-57	260	261	40.45	40.31
Gly-(TBDMS) ₂	M-57	246	247	69.89	20.50
Val-(TBDMS) ₂	M-57	288	289	23.41	39.25
Leu-(TBDMS) ₂	M-57	302	304	15.76	30.76
Pro-(TBDMS) ₂	M-159	184	186	22.23	27.44
Met-(TBDMS) ₂	M-57	320	322	14.71	29.88
Ser-(TBDMS) ₃	M-57	390	391	34.93	39.81
Thr-(TBDMS) ₃	M-57	404	406	22.31	25.69
Phe-(TBDMS) ₂	M-57	336	338	15.68	28.67
Asp-(TBDMS) ₃	M-57	418	420	28	25.
Glu-(TBDMS) ₃	M-57	432	434	14.62	29.58
Lys-(TBDMS) ₃	M-57	431	433	13.28	29.85
His-(TBDMS) ₂	M-57	440	443	10.61	29.10
Tyr-(TBDMS) ₃	M-57	466	468	13.86	29.06

En la columna m+x de la tabla 16 se puede observar para los aminoácidos incrementos de una sola unidad, correspondiente a un solo átomo de ^{13}C , mientras que para otros incrementos de dos e incluso tres unidades, es importante mencionar que para la mayoría de los aminoácido se observan picos que corresponden a M+4 aunque con menor abundancia.

A partir de las distribuciones de masas de isotopómeros calculadas, es posible realizar el cálculo de radios de intensidades. El cálculo de este parámetro permite observar con mejor claridad diferencias en los cultivos. En la tabla 16 se muestra el radio de intensidad calculado que corresponde a datos a partir de un estándar de aminoácidos y el

experimental que corresponde a los aminoácidos extraídos de la proteína celular. Los valores experimentales obtenidos muestran una adecuada correlación con los valores teóricos calculados a partir de la abundancia natural de isótopos.

En los experimentos con glucosa marcada, es importante verificar que el sustrato se haya incorporado ampliamente en los metabolitos de la red, y esto se observa con el establecimiento de un estado estacionario en la marcación en el que la distribución de masas de isotopómeros es constante. En las figuras 36 y 37 se observa el establecimiento de dicho estado para la cepa PB12 en cultivos con $1\text{-}^{13}\text{C}$ Glucosa y $\text{U-}^{13}\text{C}$ Glucosa:Glucosa naturalmente marcada desde que el cultivo se encuentra en 0.4 D.O.600nm .

Tabla 16. Radios de intensidad derivados de cultivos con glucosa naturalmente marcados (exp) y muestra de aminoácidos estándar (calc).

Compuesto	M0 [m/z]		Mass isotopomer ratio		
			$I_{M+1/M}$	$I_{M+2/M}$	$I_{M+3/M}$
Ala-(TBDMS) ₂	260	exp	0.238	0.096	0.016
		calc	0.227	0.093	0.014
Asp-(TBDMS) ₃	418	exp	0.354	0.167	0.045
		calc	0.350	0.167	0.038
Glu-(TBDMS) ₃	432	exp	0.378	0.179	0.046
		calc	0.364	0.170	0.041
Gly-(TBDMS) ₂	246	exp	0.217	0.094	0.013
		calc	0.217	0.090	0.013
His-(TBDMS) ₂	440	exp	0.351	0.160	0.054
		calc	0.376	0.173	0.044
Leu-(TBDMS) ₂	302	exp	0.257	0.106	0.020
		calc	0.262	0.104	0.018
Lys-(TBDMS) ₃	431	exp	0.402	0.180	0.051
		calc	0.386	0.171	0.042
Met-(TBDMS) ₂	320	exp	0.256	0.140	0.024
		calc	0.258	0.147	0.028
Phe-(TBDMS) ₂	336	exp	0.294	0.099	0.020
		calc	0.293	0.110	0.020
Pro-(TBDMS) ₂	286	exp	0.255	0.096	0.019
		calc	0.248	0.097	0.017
Ser-(TBDMS) ₃	390	exp	0.335	0.159	0.034
		calc	0.344	0.164	0.037
Thr-(TBDMS) ₃	404	exp	0.339	0.163	0.036
		calc	0.366	0.164	0.038
Val-(TBDMS) ₂	288	exp	0.240	0.095	0.019
		calc	0.255	0.099	0.017
Tyr-(TBDMS) ₃	466	exp	0.399	0.174	0.041
		calc	0.413	0.183	0.046
Ile-(TBDMS) ₂	302	exp	0.269	0.105	0.017
		calc	0.265	0.104	0.018

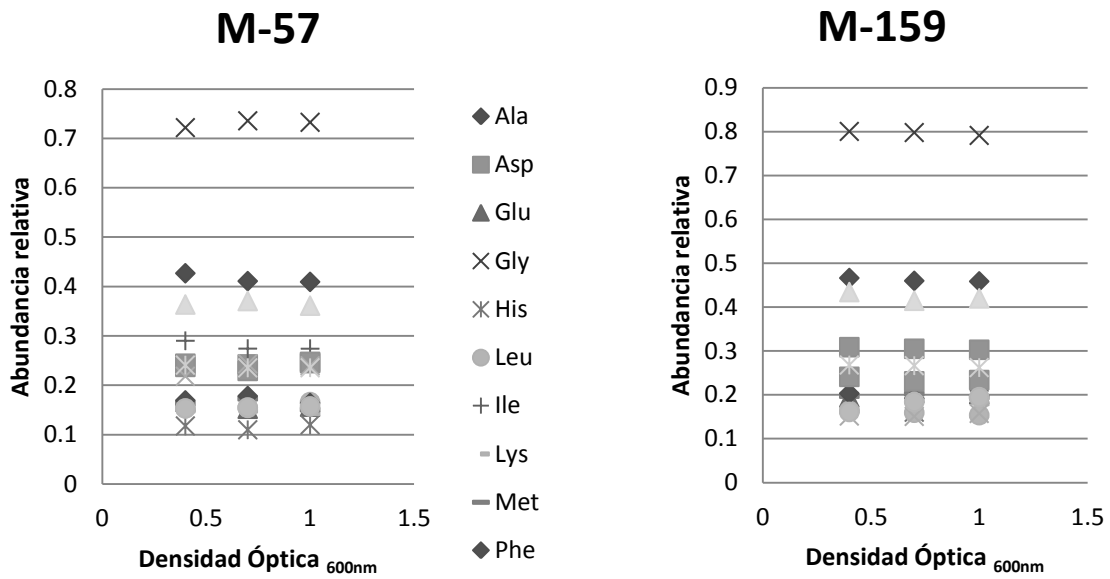


Figura 36. Establecimiento del estado estacionario en la marcación en cultivos alimentados con $1\text{-}^{13}\text{C}$ Glucosa de la cepa PB12

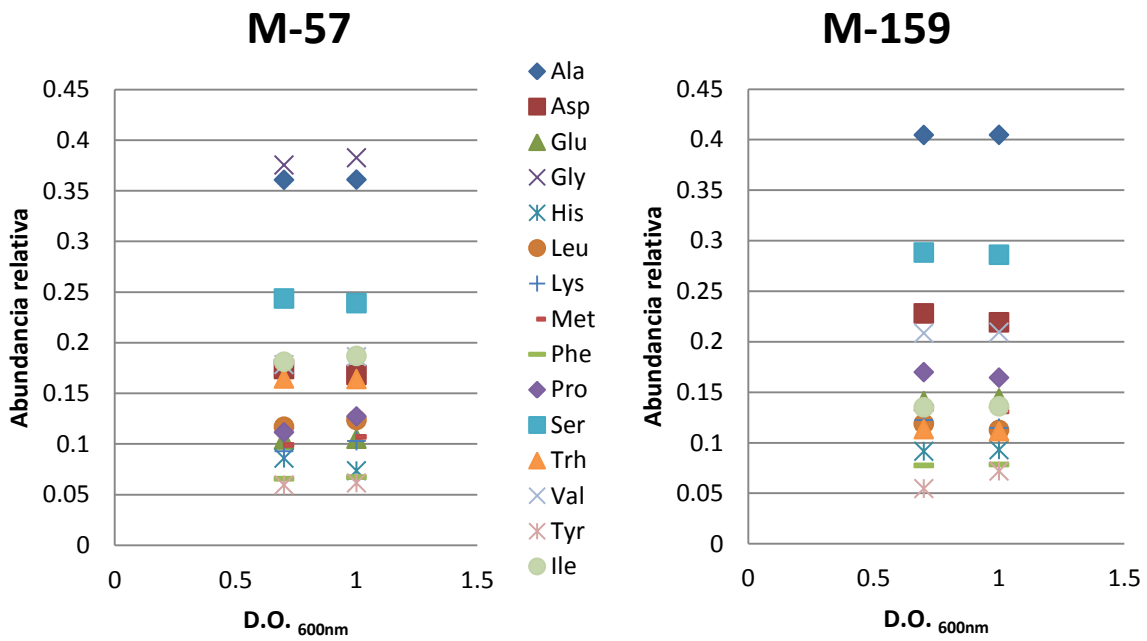


Figura 37. Establecimiento del estado estacionario en la marcación en cultivos alimentados con $U\text{-}^{13}\text{C}$ Glucosa:Glucosa naturalmente marcada de la cepa PB12.

Hasta este momento se cuenta con la información necesaria (tablas 17 y 18) requerida por un modelo matemático para poder estimar el flujo de carbono en el metabolismo central y vía del shikimato.

Tabla 17. Distribución de masa de isotopómeros para el fragmento M-57 de los aminoácidos proteínogénicos de las cepas PB12 y PB12.SA12 en medio mínimo M9 con diferentes sustratos marcados

	PB12			PB12.SA12		
	1- ¹³ C	6- ¹³ C	U- ¹³ C	1- ¹³ C	6- ¹³ C	U- ¹³ C
	Glucosa	Glucosa	Glucosa	Glucosa	Glucosa	Glucosa
ala#111						
M	0.409	0.361	0.361	0.405	0.367	0.305
M+1	0.425	0.468	0.118	0.404	0.464	0.161
M+2	0.121	0.123	0.096	0.141	0.122	0.151
M+3	0.039	0.042	0.353	0.042	0.041	0.317
asp#1111						
M	0.245	0.198	0.168	0.218	0.181	0.139
M+1	0.371	0.378	0.165	0.358	0.353	0.173
M+2	0.237	0.257	0.208	0.260	0.280	0.247
M+3	0.104	0.118	0.228	0.115	0.130	0.227
glu#11111						
M	0.157	0.114	0.105	0.148	0.108	0.087
M+1	0.323	0.304	0.117	0.318	0.292	0.124
M+2	0.296	0.314	0.225	0.294	0.315	0.225
M+3	0.148	0.173	0.225	0.157	0.184	0.233
gly#11						
M	0.733	0.740	0.376	0.700	0.738	0.328
M+1	0.184	0.176	0.150	0.207	0.176	0.241
M+2	0.072	0.073	0.396	0.079	0.074	0.356
M+3	0.012	0.011	0.078	0.014	0.012	0.075
his#111111						
M	0.195	0.136	0.086	0.105	0.141	0.063
M+1	0.337	0.342	0.128	0.260	0.372	0.117

M+2	0.316	0.328	0.142	0.307	0.313	0.137
M+3	0.101	0.128	0.178	0.213	0.129	0.211
leu#111111						
M	0.154	0.105	0.117	0.159	0.117	0.114
M+1	0.335	0.298	0.056	0.343	0.302	0.064
M+2	0.317	0.339	0.276	0.304	0.335	0.271
M+3	0.143	0.189	0.105	0.142	0.178	0.118
lys#111111						
M	0.149	0.106	0.093	0.133	0.108	0.068
M+1	0.325	0.295	0.097	0.312	0.278	0.109
M+2	0.281	0.319	0.154	0.284	0.317	0.177
M+3	0.157	0.178	0.211	0.173	0.184	0.199
met#11111						
M	0.151	0.122	0.099	0.145	0.103	0.171
M+1	0.335	0.302	0.173	0.313	0.288	0.204
M+2	0.301	0.311	0.180	0.299	0.311	0.233
M+3	0.132	0.173	0.212	0.160	0.190	0.191
phe#111111111						
M	0.169	0.042	0.066	0.161	0.051	0.058
M+1	0.355	0.218	0.051	0.322	0.231	0.057
M+2	0.296	0.380	0.084	0.288	0.376	0.087
M+3	0.134	0.255	0.137	0.144	0.242	0.140
pro#11111						
M	0.247	0.175	0.112	0.185	0.174	0.130
M+1	0.322	0.290	0.146	0.260	0.300	0.193
M+2	0.158	0.153	0.160	0.151	0.179	0.231
M+3	0.081	0.093	0.210	0.113	0.097	0.209
ser#111						
M	0.364	0.316	0.244	0.355	0.326	0.229
M+1	0.400	0.442	0.186	0.394	0.422	0.207
M+2	0.158	0.164	0.185	0.172	0.172	0.198

M+3	0.062	0.064	0.288	0.062	0.065	0.272
thr#1111						
M	0.240	0.203	0.165	0.218	0.178	0.137
M+1	0.387	0.376	0.165	0.354	0.365	0.193
M+2	0.231	0.256	0.207	0.261	0.276	0.244
M+3	0.099	0.115	0.231	0.118	0.126	0.252
val#11111						
M	0.241	0.176	0.180	0.234	0.180	0.139
M+1	0.400	0.406	0.075	0.396	0.410	0.095
M+2	0.263	0.300	0.214	0.255	0.295	0.215
M+3	0.070	0.088	0.220	0.087	0.084	0.237
tyr#111111111						
M	0.157	0.043	0.060	0.128	0.045	0.035
M+1	0.334	0.186	0.054	0.295	0.227	0.048
M+2	0.296	0.360	0.088	0.289	0.332	0.087
M+3	0.129	0.258	0.132	0.169	0.253	0.152
ile #111111						
M	0.274	0.229	0.181	0.248	0.211	0.161
M+1	0.346	0.340	0.145	0.349	0.328	0.152
M+2	0.241	0.257	0.246	0.239	0.266	0.249
M+3	0.106	0.121	0.150	0.119	0.136	0.159

Tabla 18. Radios de intensidad calculados para el fragmento M-57 de los aminoácidos
 proteínogénicos de las cepas PB12 y PB12.SA12 en medio mínimo M9 con diferentes sustratos
 marcados.

	PB12			SA12		
	1-13C	6-13C	U-13C	1-13C	6-13C	U-13C
ala#111	Glucosa	Glucosa	Glucosa	Glucosa	Glucosa	Glucosa
M+1/M	1.037	1.296	0.327	0.997	1.265	0.528
M+2/M	0.295	0.342	0.267	0.349	0.333	0.494
M+3/M	0.095	0.116	0.978	0.103	0.112	1.039
asp#1111						
M+1/M	1.515	1.909	0.979	1.645	1.943	1.243
M+2/M	0.968	1.297	1.237	1.195	1.545	1.780
M+3/M	0.427	0.594	1.358	0.527	0.716	1.633
glu#11111						
M+1/M	2.062	2.656	1.123	2.145	2.713	1.426
M+2/M	1.889	2.743	2.149	1.987	2.923	2.579
M+3/M	0.941	1.514	2.149	1.059	1.708	2.673
gly#11						
M+1/M	0.251	0.237	0.400	0.295	0.239	0.734
M+2/M	0.098	0.098	1.055	0.113	0.100	1.084
M+3/M	0.016	0.015	0.207	0.020	0.017	0.229
his#111111						
M+1/M	1.725	2.514	1.488	2.482	2.641	1.843
M+2/M	1.621	2.409	1.645	2.933	2.221	2.164
M+3/M	0.519	0.942	2.065	2.031	0.918	3.329
leu#111111						
M+1/M	2.178	2.833	0.474	2.148	2.567	0.558
M+2/M	2.062	3.223	2.358	1.909	2.855	2.371

M+3/M	0.926	1.796	0.899	0.890	1.515	1.030
lys#111111						
M+1/M	2.187	2.789	1.049	2.348	2.583	1.598
M+2/M	1.892	3.016	1.654	2.139	2.948	2.606
M+3/M	1.055	1.687	2.274	1.303	1.711	2.930
met#11111						
M+1/M	2.220	2.479	1.749	2.155	2.779	1.194
M+2/M	1.998	2.549	1.817	2.060	3.002	1.365
M+3/M	0.877	1.416	2.141	1.101	1.836	1.121
phe#11111111						
1						
M+1/M	2.097	5.183	0.770	2.001	4.481	0.981
M+2/M	1.749	9.039	1.276	1.792	7.299	1.506
M+3/M	0.793	6.062	2.090	0.899	4.701	2.426
pro#11111						
M+1/M	1.300	1.655	1.305	1.407	1.725	1.493
M+2/M	0.637	0.872	1.435	0.817	1.027	1.781
M+3/M	0.326	0.529	1.884	0.614	0.557	1.614
ser#111						
M+1/M	1.100	1.397	0.765	1.111	1.295	0.905
M+2/M	0.435	0.519	0.761	0.484	0.527	0.866
M+3/M	0.169	0.202	1.183	0.175	0.201	1.189
thr#1111						
M+1/M	1.616	1.856	1.004	1.626	2.048	1.405
M+2/M	0.963	1.263	1.258	1.195	1.545	1.775
M+3/M	0.414	0.568	1.399	0.539	0.704	1.833

val#11111

M+1/M	1.660	2.315	0.415	1.690	2.277	0.680
M+2/M	1.093	1.711	1.189	1.089	1.637	1.549
M+3/M	0.292	0.499	1.224	0.372	0.468	1.701

tyr#111111111

M+1/M	2.125	4.341	0.907	2.305	5.092	1.370
M+2/M	1.883	8.388	1.474	2.256	7.437	2.486
M+3/M	0.822	6.018	2.214	1.323	5.667	4.342

ile #111111

M+1/M	1.262	1.487	0.799	1.407	1.556	0.947
M+2/M	0.879	1.124	1.359	0.963	1.263	1.550
M+3/M	0.386	0.528	0.830	0.478	0.647	0.989

Debido a que el software OpenFLUX es capaz de generar balances tanto de metabolitos como de isotopómeros para crear un modelo de flujos teórico, y se cuenta con los datos experimentales necesarios para poder aplicar la función mediante la cual se minimiza la diferencia entre los datos teóricos y experimentales, queda como perspectiva el planteamiento de la red metabólica a estudiar.

CONCLUSIONES

- La cepa PB12.SA12 requiere de un paso de adaptación en el que sea suplementada con compuestos aromáticos para poder crecer en medio mínimo.
- La presencia de la isoenzima shikimato cinasa II (AroK), permite a la cepa PB12.SA12 producir sus propios compuestos aromáticos y crecer en medio mínimo, al tiempo que se acumula SA y el resto de los intermediarios de la VSA en el medio de cultivo, lo que convierte a esta cepa en un modelo adecuado para el AFM en la producción de SA.
- Existe una relación lineal entre la biomasa producida y la glucosa consumida para las cepas PB12 y PB12.SA12, en un intervalo de la etapa exponencial de crecimiento desde 0.4 hasta 1.2 D.O._{600nm}, que corresponde al estado estacionario del cultivo.
- La hidrólisis del extracto celular y la derivatización son pasos clave en el AFM, ya que de ellos depende una obtención satisfactoria de los compuestos a analizar.
- El compuesto derivatizante N -Metil- N -(ter -butildimetilsilil)-trifluoroacetamida otorga mejores características cromatográficas a los elementos analizados, con lo que ofrece una mejor identificación de estos en comparación con el N-(trimetil silil)-acetamida con el que se identifica solo un pequeño grupo de aminoácidos.
- El solvente empleado en el procesamiento y análisis del hidrolizado de proteína celular juega un papel importante tanto en la solubilidad de la muestra como en la separación cromatográfica.
- El acetonitrilo permitió detectar adecuadamente la mayoría de los aminoácidos haciendo posible la obtención del patrón de fragmentación de los mismos.
- La sensibilidad del equipo es un parámetro importante a considerar, sobre todo si se desea cuantificar concentraciones bajas de metabolitos.
- Se obtuvieron los patrones de fragmentación de los aminoácidos presentes en la proteína celular, observándose diferencias en la presencia de isótopos en los cultivos sin y con marcación.
- Existe un estado estacionario en la marcación a los largo de los cultivos.
- Se obtuvo la información experimental requerida para un AFM: la distribución de masas de isotopómeros de los distintos fragmentos de los aminoácidos proteínogénicos en cultivos con glucosa marcada; sin embargo, aún no es posible determinar los flujos de carbono a través de las vías metabólicas de las cepas en estudio.

PERSPECTIVAS

-
- Planteamiento de la red metabólica en el software OpenFLUX y análisis de flujo de carbono para las cepas PB12 y PB12.SA12

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar C, Escalante A, Flores N, de Anda R, Riveros F, Gosset G, Morett E, Bolívar F: **Genetic changes during a laboratory adaptative evolution process allowed fast growth in glucose to an *Escherichia coli* strain lacking the major glucose transport system.** BMC Genomics, 2012, **13**:1-17
2. Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D: **Short protocols in molecular biology: A compendium of methods from current protocols in molecular biology.** John Wiley & Sons, 1999, 4th edition.
3. Antoniewicz M, Kelleher J, Stephanopoulos G: **Elementary metabolic units (EMU): A novel framework for modeling isotopic distributions.** Metabolic Engineering, 2007 **9**:68-86
4. Balderas VE, Sabido A, Silva P, Cabrera N, Hernandez G, Baez JL, Martinez A, Bolivar F, Gosset G: **Metabolic engineering for improving anthranilate synthesis from glucose in *Escherichia coli*.** Microbial Cell Factories, 2009, **8**:19
5. Carmona S: **Efecto de la clonación del gen *zwf* sobre la producción de shikimato en la cepa de *Escherichia coli* PB12.SA22.** Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, 2011
6. Christensen B, Nielsen J: **Isotopomer Analysis Using GC-MS.** Metabolic Engineering, 1999 **1**:282-290
7. Cortés L: **Análisis transcryptómico de una cepa de *Escherichia coli* (PTS-Glc+) productora de shikimato en fermentador en medio enriquecido usado para producción.** Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, 2012.
8. Cox G, Gibson F: **2,3-Dihydroxybenzoic acid, a new growth factor for multiple aromatic auxotrophs.** Journal of Bacteriology. 1967, **93**:502–503.
9. Dauner M, Sauer U: **GC-MS analysis of amino acids rapidly provides rich information for isotopomer balancing.** Biotechnology Progress, 2000, **16**:642-9
10. Davis B: **Inhibition of *Escherichia coli* by p-aminobenzoic acid and its reversal by p-hidroxibenzoic acid.** Journal of Experimental Medicine. 1951, **94**: 243–254
11. Davis B: **AROMATIC BIOSYNTHESIS IV. Preferential conversion, in incompletely blocked mutants, of a common precursor of several metabolites.** Journal of Bacteriology. 1952, **64**:729–748.

-
12. Draths K, Knop D, Frost J: **Shikimic acid and quinic acid: replacing isolation from plant sources with recombinant microbial biocatalysis.** Journal of the American Chemical Society, 1999, **121**:1603-1604
 13. Eisenberg D, Schwarz E, Komaromy M, Wall R: **Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot.** Journal of Molecular Biology, 1984, **179**:125-142
 14. Eli B, Pittard J: **Aromatic amino acid biosynthesis: Regulation of shikimate kinase in *Escherichia coli* K-12.** Journal of Bacteriology, 1979, **138**:933-943
 15. Escalante A, Calderón R, Valdivia A, De anda R, Hernández G, Ramírez O, Gosset G, Bolívar F: **Metabolic engineering for the production of shikimic acid in a evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotranferase system.** Microbial Cell Factories, 2010, **9**:1-12
 16. Fischer E, Zamboni N, Sauer U: **High-throughput metabolic flux analysis based on gas chromatography–mass spectrometry derived ¹³C constraints.** Analytical Biochemistry. 2004 **325**:308–316
 17. Flores N, Xiao J, Berry A, Bolivar F, Valle F: **Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*.** Nature Biotechnology, 1996, **14**:620-623
 18. Flores N, Flores S, Escalante A, de Anda R, Leal L, Malpica R, Georgellis D, Gosset G, Bolivar F: **Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in a *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system.** Metabolic Engineering, 2005, **7**:70-87
 19. Flores S, Gosset G, Flores N, A. de Graaf A, Bolivar F: **Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by ¹³C labeling and NMR spectroscopy.** Metabolic Engineering, 2002, **4**:124-137
 20. Fountoulakis M y Lahm H: **Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins.** Journal of Chromatography, 1998, **826**:109-134
 21. Frost G, Rosenberg H: **The inducible citrate-dependent iron transport system in *Escherichia coli* K12.** Biochimica et Biophysica Acta, 1973, **330**: 90-101
 22. Gehrke C, Leimer K: **Trimethylsilylation of amino acids. Effect of solvents on derivatización using BSTFA.** Journal of Chromatography, 1970, **53**:201-208
 23. Gehrke C, Leimer K: **Trimethylsilylation of amino acids. Derivatization and chromatography.** Journal of Chromatography, 1971, **57**: 219-238
 24. Ghosh S, Chisti Y, Banerjee U: **Production of shikimic acid.** Biotechnology Advances, 2012, **30**:1425-1431
 25. Gosset G: **Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system.** Microbial Cell Factories, 2005, **4**:1-11

-
26. Halket J, Waterman D, Przyborowska A, Patel R, Fraser P, Bramley P: **Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS.** Journal of Experimental Botany, 2004, **56**: 219–243
 27. Herrmann KM, Weaver LM: **The shikimate pathway.** Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1999, **50**:473-503
 28. Hulshoff A, Lingeman H: **Derivatization reactions in the gas-liquid chromatographic analysis of drugs in biological fluids.** Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 1984, **2**: 337-38
 29. Iwatani S, Yamada Y, Usuda Y: **Metabolic flux analysis in biotechnology processes.** Biotechnology Letters, 2008, **30**:791–799
 30. Johansson L, Lindskog A, Silfversparre G, Cimander C, Nielsen K, Lidén G: **Shikimic acid production by a modified strain of *E. coli* (W3110.shik1) under phosphate-limited and carbon-limited conditions.** Biotechnology and Bioengineering, 2005 **92**: 541-552
 31. Kai L, Mikola M, Draths K, Worden R, Frost J: **Fed-batch fermentor synthesis of 3-dehydroshikimic acid using recombinant *Escherichia coli*,** Biotechnology and Bioengineering, 1999, **64**:61-73
 32. Kern A, Tilley E, Hunter I, Legiša M, Glieder A: **Engineering primary metabolic pathways of industrial microorganisms.** Journal of Biotechnology, 2007, **129**:6–29
 33. Klebe J, Finkbeiner H, White M: **Silylations with Bis(trimethylsilyl) acetamide, a highly reactive silyl donor.** Journal of the American Chemical Society, 1996, **88**:3390-3395
 34. Knop D, Draths K, Chandran S, Barker J, Daeniken R, Weber W, Frost J: **Hydroaromatic equilibration during biosynthesis of shikimic acid.** Journal of the American Chemical Society, 2001, **123**:10173-10182
 35. Kohlstedt M, Becker J, Wittmann C: **Metabolic fluxes and beyond—systems biology understanding and engineering of microbial metabolism.** Applied Microbiology Biotechnology, 2010, **88**:1065–1075
 36. Ku E, King K, Engel R: **Nutritional factors influencing the efficiency of utilization of essential amino acids: level of nonessential nitrogen.** The Journal of Nutrition, 1962, **77**:433-438
 37. Lequeux G, Johansson L, Maertens J, Vanrolleghem P, Lidén G: **MFA for overdetermined systems reviewed and compared with RNA expression data to elucidate the difference in shikimate yield between carbon- and phosphate-limited continuous cultures of *E. coli* W3110.shik1.** Biotechnology Progress, 2006, **22**:1056-1070.
 38. Li K, Mikola M, Draths K, Worden R, Frost J: **Fed -batch fermentor synthesis of 3-dehydroshikimic acid using recombinant *Escherichia coli*.** Biotechnology and Bioengineering, 1999, **64**:61-73
-

-
39. Matsuoka Y, Shimizu K: **Current status of ^{13}C -metabolic flux analysis and future perspectives.** Process Biochemistry, 2010, 45:1873-1881
 40. Meza E, Becker J, Bolivar F, Gosset G, Wittmann C: **Consequences of phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system and pyruvate kinase isozymes inactivation in central carbon metabolism flux distribution in *Escherichia coli*.** Microbial Cell Factories, 2012 11:1-13
 41. Molnár-Perl I, Katona Z: **GC-MS of Amino Acids as Their Trimethylsilyl/t-butyldimethylsilyl Derivatives: in Model Solutions III.** Chromatography Supplement, 2000, 51: 228-236
 42. Moldoveanu S, David V: Chemical reactions used in derivatization; in Moldoveanu S, David V: **Sample preparation in chromatography.** Journal of chromatography library, 2002, 65: 545-568
 43. Neijssel O, Teixeira M: **The energetics of bacterial growth: a reassessment.** Molecular Microbiology, 1994 13:179-182.
 44. Nikel, P: **Metabolitos de interés biotecnológico a la carte: Análisis de flujos metabólicos como herramienta para la evaluación de fenotipos industriales.** Química Viva, 88:125-144
 45. Noh K, Wahl A, Wiechert W: **Computational tools for isotopically instationary ^{13}C labeling experiments under metabolic steady state conditions.** Metabolic Engineering, 2006 8:554–577
 46. Okayasu T, Ikeda M, Akimoto K, Sorimach K: **The amino acid composition of mammalian and bacterial cells.** Amino Acids, 1997, 13:379-391
 47. Pittard J, Wallace B: **Distribution and Function of Genes Concerned with Aromatic Biosynthesis in *Escherichia coli*.** Journal of Bacteriology, 1966, 91:1494–1508
 48. Quek L, Wittmann C, Nielsen L, Krömer J: **OpenFLUX: efficient modelling software for ^{13}C -based metabolic flux analysis.** Microbial Cell Factories 2009, 8:1-25
 49. Rawat G, Tripathi P: **Expanding horizons of shikimic acid.** Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97:4277-4287
 50. Riascos C, Gombert A, Pinto J: **A global optimization approach for metabolic flux analysis based on labeling balances.** Computers and Chemical Engineering, 2005, 29:447–458
 51. Shummer C, Delhomme O, Appenzeller B: **Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis.** Talanta, 2009, 77:1473-1482
 52. Sprenger G: **Aromatic amino acids.** Microbiology monographs, 2006, 5:93-118
 53. Tempest D, Dicks J, Hunter J: **The interrelationship between potassium, magnesium and phosphorus in potassium-limited chemostat cultures of *Aerobacter aerogenes*.** Journal of General Microbiology, 1996, 45:185-146
-

-
54. Tsugita A, Scheffler J: **A rapid method for acid hydrolysis of protein with a mixture of trifluoroacetic acid and hydrochloric acid.** European Journal of Biochemistry, 1982, **124**:585-588
 55. Varma A, Palsson B: **Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type Escherichia coli W3110.** Applied and Environmental Microbiology, 1994, **60**:3724–3731.
 56. Weissbach, A., Hurwitz, J., 1958. **The formation of 2-Keto-3-deoxyheptonic acid in extracts of Escherichia coli B.** Journal of Biological Chemistry, **234**:705–709.
 57. Wittmann C, Heinzle E: **Mass spectrometry for metabolic flux analysis.** Biotechnology and Bioengineering, 1999, **62**:739-750
 58. Wittmann C: **Fluxome analysis using GC-MS.** Microbial Cell Factories, 2007, **6**:6
 59. Yi J, Li K, Draths K, Frost J: **Modulation of phosphoenolpyruvate synthase expression increases shikimate pathway product yields in E. coli.** Biotechnology Progress, 2002, **18**:1141-1148
 60. Young J, Walther J, Antoniewicz M, Yoo H, Stephanopoulos G: **An elementary metabolite unit (EMU) based method of isotopically nonstationary flux analysis.** Biotechnology and Bioengineering, 2008, **99**:686-699

APÉNDICES.

APÉNDICE 1 -TRANSICIONES ATÓMICAS-

Tabla 19. Transiciones atómicas en las distintas reacciones del metabolismo central y síntesis de aminoácidos.

Glucólisis	
GLC_EX = GLC6P	abcdef = abcdef
GLC6P = F6P	abcdef = abcdef
F6P = GLC6P	abcdef = abcdef
F6P = F16BP	abcdef = abcdef
F16BP = DHAP + G3P	abcdef = abc + def
DHAP = G3P	abc = cba
G3P = 3PG	abc = abc
3PG = PYR	abc = abc
PYR = LAC	abc = abc
PYRC = ACETAL + CO2	abc = bc + a
ACETAL = ETOH	ab = ab
ACETAL = ACE	ab = ab
G6P = G3P + PYR	abcdef = def + abc
Vía de PP	
GLC6P = P5P + CO2	abcdef = bcdef + a
P5P + P5P = S7P + G3P	abcde + fghij = fgabcde + hij
S7P + G3P = E4P + F6P	abcdefg + hij = defg + abchij
E4P + P5P = F6P + G3P	abcd + efghi = efabcd + ghi
TCA	
PYR = ACCOA + CO2	abc = bc + a
ACCOA + OAA = CIT	ab + cdef = fedbac
CIT = AKG + CO2	abcdef = abcde + f
AKG = 0.5 SUC + 0.5 SUC + CO2	abcde = 0.5 bcde + 0.5 edcb + a
SUC = OAA	abcd = abcd
PYR + CO2 = OAA	abc + d = abcd
CIT = GLYOXY + 0.5 SUC + 0.5 SUC	abcdef = ab + 0.5 cdef + 0.5 fedc
ACCOA + GLYOXY = OAA	ab + cd = cdab

Síntesis de aminoácidos	
PYR = ALA	abc = abc
OAA = ASP	abcd = abcd
OAA = ASN	abcd = abcd
AKG = GLU	abcde = abcde
AKG = GLN	abcde = abcde
3PG = SER	abc = abc
SER = GLY + MTHF	abc = ab + c
OAA = THR	abcd = abcd
THR = GLY + ACETAL	abcd = ab + cd
PYR + PYR = VAL + CO ₂	abc + def = abefc + d
E4P + PYR = SHKM	abcd + efg = efgabcd
SHKM + PYR = CHRM	abcdefg + hij = abcdefghij
CHRM = PHE + CO ₂	abcdefghij = hijbcdefg + a
CHRM = TYR + CO ₂	abcdefghij = hijbcdefg + a
CHRM = ANTHR + PYR	abcdefghij = abcdefg + hij
ANTHR + P5P = CPADR5P	abcdefg + hijkl = abcdefghijkl
CPADR5P = INDG + CO ₂	abcdefghijkl = abcdfghijkl + e
INDG = IND + G3P	abcdefghijk = abcdefgh + ijk
IND + 3PG = TRP	abcdefgh + ijk = abcdefghkji
PYR + OAA = ILE + CO ₂	abc + defg = debfgc + a
PYR + PYR = ISV + CO ₂	abc + def = abefc + d
ISV + ACCOA = LEU + CO ₂	abcde + fg = fgbcde + a
AKG + CO ₂ = ARG	abcde + f = abcdef
3PG = CYS	abc = abc
OAA + MTHF = MET	abcd + e = abcde
AKG = PRO	abcde = abcde
OAA + PYR = LYS + CO ₂	abcd + efg = abcdgf + e
OAA + PYR = 0.5 LYS + 0.5 CO ₂ + 0.5 LYS + 0.5 CO ₂	abcd + efg = 0.5 abcdgf + 0.5 e + 0.5 efgdcb + 0.5 a
R5P + MTHF = HIS	abcde + f = edcbaf

APÉNDICE 2. CRECIMIENTO EN MEDIO MÍNIMO DE LA CEPA PB12.SA22

La producción de SA con la cepa PB12.SA22, obtenida en el laboratorio del Dr. Francisco Bolívar Zapata, que presenta el genotipo PB12 $\Delta aroL \Delta aroK tktA aroG^{fbr} aroB aroE$, se realiza en medio mineral (tabla 20) suplementado con glucosa 25 g/L y extracto de levadura 15 g/L.

Tabla 20. Medio de producción empleado por Li *et al.* (1999), para la producción de DHS y empleado para la producción de SA con la cepa PB12.SA22.

Componente	g/L
K ₂ HPO ₄	7.5
Citrato de amonio FeIII	0.3
Ácido cítrico	2.1
H ₂ SO ₄	1.2(mL)
MgSO ₄	0.2465
CaCl ₂	0.0147
Vitamina B1	0.0001
Glucosa	25.0
Elementos traza	g/L
(NH ₄) ₆ (Mo ₇ O ₂₄).4H ₂ O	0.0037
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.0029
H ₃ BO ₃	0.0247
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0025
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.0158

Como se ha mencionado antes, al eliminar el extracto de levadura del medio, esta cepa no presenta crecimiento. En el perfil de consumo de glucosa y crecimiento de la cepa (fig. 38) se observa un comportamiento en el que en la fase de crecimiento exponencial, ocupa muy poca de la glucosa presente en el medio, lo que indica que el crecimiento depende principalmente de la presencia del extracto de levadura; en experimentos realizados con 5 g/L de extracto de levadura (resultados sin mostrar), se ha observado una fuerte represión en el crecimiento alcanzando los cultivos D.O. bajas.

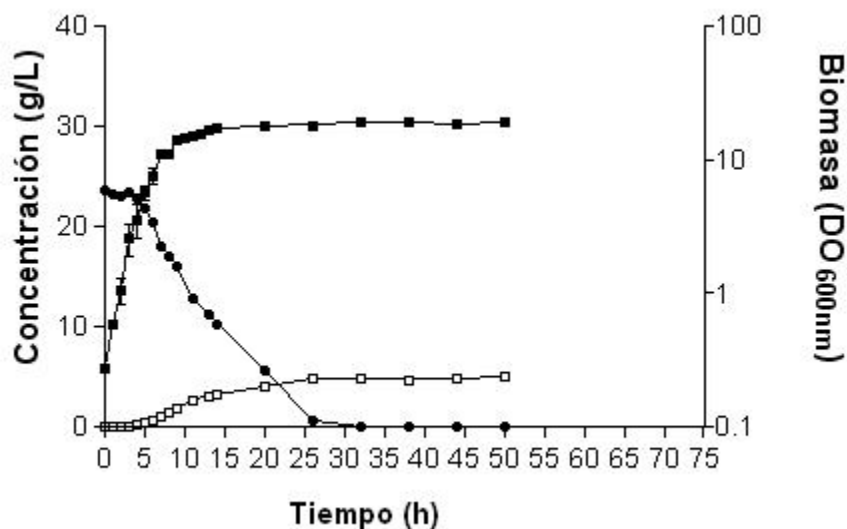


Figura 38. Perfil de crecimiento (cuadrados llenos), consumo de glucosa (círculos llenos) y producción de SA (cuadrados vacíos) de la cepa PB12.SA22. El crecimiento en la fase de crecimiento exponencial no se asocia con el mayor consumo de glucosa.

Ya que esta cepa tiene completamente truncada la VSA, es posible que el extracto de levadura le proporcione compuestos necesarios para su crecimiento o bien, para la síntesis de los mismos.

Se ha reportado que cepas de *E. coli* afectadas en la vía común de aromáticos, pueden requerir para su óptimo crecimiento en un medio mineral con glucosa la adición de fenilalanina, tirosina, triptófano, p-aminobenzoato, p-hidroxibenzoato y 3,4-dihidroxibenzaldehído, mientras que algunas otras cepas bloqueadas en esta misma parte (auxótrofas aromáticas múltiples), crecen pobremente o no lo hacen en el medio aún suplementado, a menos que se añada extracto de levadura (Cox y Gibson, 1966).

Se ha reportado que cepas de producción de SA [Johansson *et al.*, 2005; Yi *et al.*, 2002; Li y Frost, 1999] al ser suplementadas con los compuestos aromáticos derivados de la VSA (aminoácidos y vitaminas), presentan buen crecimiento, lo que no sucede con la cepa PB12.SA22, como se observa en la tabla 21 prueba 4, en esta tabla se muestra el resultado en el crecimiento tras la complementación con varios compuestos.

Tabla 21. Pruebas de crecimiento para la cepa PB12.SA22 en medio líquido mínimo suplementado.

# Prueba	Suplementos	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
1	Corismato	-	-	+	+
2	Corismato + Aaa	-	-	+	++
3	Corismato + succinato	-	-	+	+
4	Suc. + Vit. + Aaa	-	-	-	-

Aaa = aminoácidos aromáticos; Corismato 0.4 mg/mL, Succinato 0.4%; Vitaminas: PHB: 10 mg/mL, PABA: 10 mg/mL, DHB: 10 mg/mL; Aminoácidos: Fenilalanina: 0.7 mg/mL, Tirosina: 0.2 mg/mL, Triptófano: 0.35 mg/mL. Las pruebas se realizaron sin réplica.

Se ha reportado que auxótrofas múltiples de *E. coli* crecen mejor cuando el succinato es empleado como fuente de carbono en lugar de glucosa [Davis, 1952], razón por la cual se incluyó el succinato en las pruebas de crecimiento aunque sin eliminar la glucosa; dado que el corismato representa el último compuesto de la vía común de aromáticos, resulta lógico pensar que así como en un buen número de casos la suplementación de los medios con SA, permite satisfacer los requerimientos de cepas poliauxótrofas [Sprenger, 2006], la suplementación con este compuesto pudiera tener un efecto similar.

Como se observa, se presentó un buen crecimiento de la cepa suplementada con corismato y los aminoácidos aromáticos y esto se observó hasta el cuarto día, este comportamiento hizo sentido con la ya reportado en la literatura: i) cepas bloqueadas en esta vía tardan mucho (hasta 5 días) en restaurar su crecimiento (Davis, 1951) y ii) no hay una correlación clara entre las auxotrofías y los compuestos necesarios para recuperar el crecimiento de estas cepas, observándose efectos sinérgicos de compuestos que por sí solos no permiten el crecimiento [Davis, 1952; Pittard y Wallace, 1966].

Se monitoreó el crecimiento de la cepa PB12.SA22 en el medio mínimo con corismato y aminoácidos (fig. 39a).

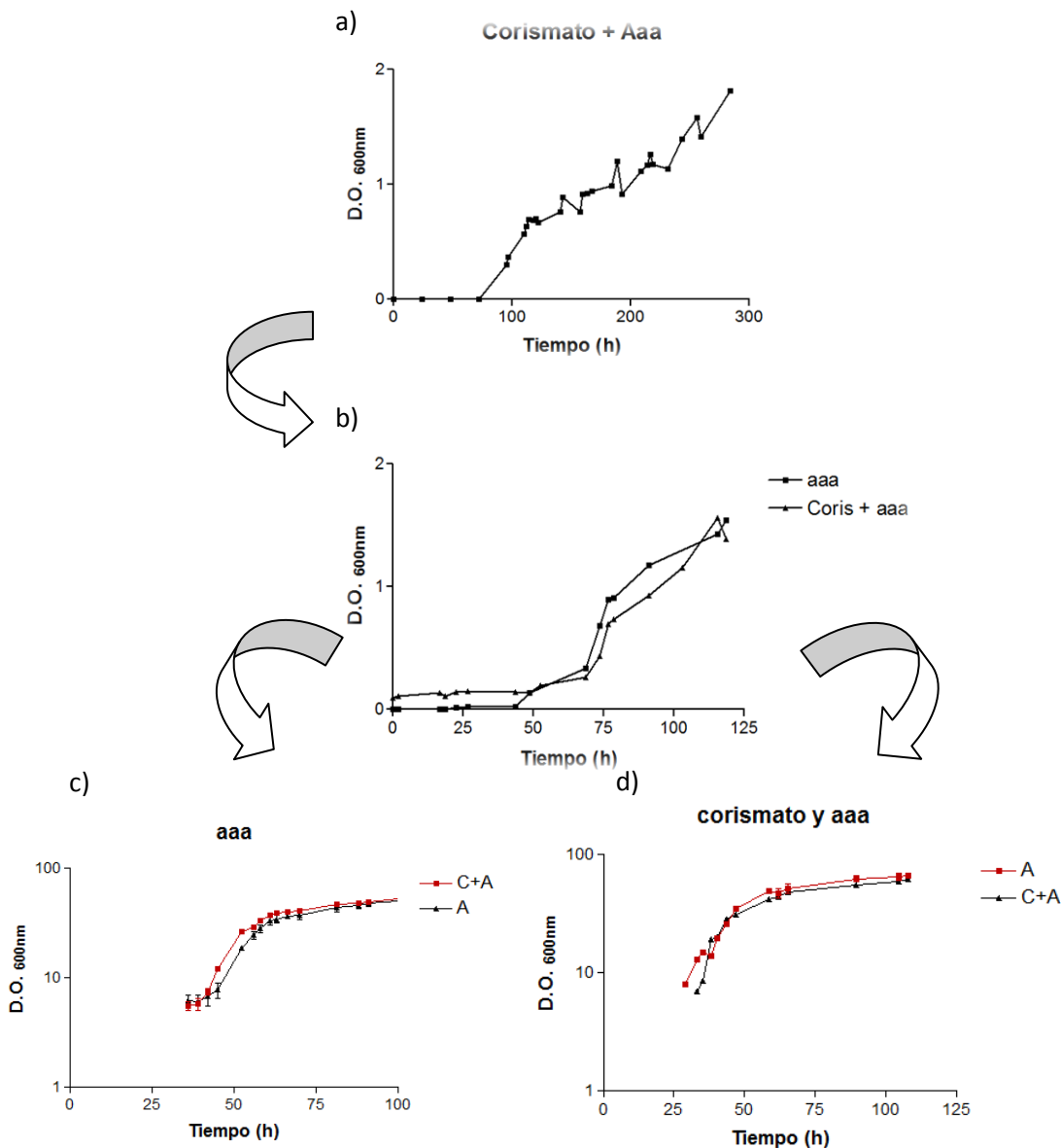


Figura 39. Cinéticas de crecimiento de la cepa "PB12.SA22" en el medio base mineral empleado en la producción de SA suplementado con corismato y aminoácidos aromáticos (aaa).

Ya que el AFM consta de varias etapas de cultivo y con la finalidad de tener una idea del tiempo que tardaría cada una de las mismas, pensando en emplear esta cepa en este medio, se resembró con una asada tomada cuando el cultivo se encontraba alrededor de $D.O_{600nm} = 0.5$, en medio con corismato y aminoácidos, así como en medio con aminoácidos únicamente, ésta última opción pensando en que el corismato no fuera necesario en todas las etapas debido a su alto costo (fig. 45b). Se observa una disminución en la fase lag presentada en el primer cultivo y un comportamiento similar en el medio con corismato y sin él. Se resembró por segunda ocasión con una asada también de las células creciendo en medio con corismato y aminoácidos nuevamente en

medio con los mismos componentes y únicamente con aminoácidos, lo mismo se hizo a partir del medio con aminoácidos solamente (fig. 45c y 45d), se observa también una disminución en la fase lag, siendo esta menor en el caso de los medios inoculados con células provenientes del medio suplementado con aminoácidos y corismato. En todos los casos se observa que las células al crecer en un medio con aminoácidos sin corismato, tardan en comenzar su crecimiento y tardan ligeramente más en alcanzar la D.O._{600nm} más alta que para estos cultivos no rebasa de 1.5.

Teniendo estos resultados, se procedió con los experimentos por triplicado para el AFM. La cepa PB12.SA22 partiendo de glicerol nuevamente, en el medio base mineral de producción suplementada con corismato y aminoácidos aromáticos no volvió a presentar crecimiento.

Colonias obtenidas del último cultivo recuperadas en medio LB con Km (30 µg/mL), Tc (30 µg/mL) y Cm (20 µg/mL), al inocularse en el mismo medio en que se evaluó la cepa PB12.SA22 proveniente de glicerol, presentaron crecimiento; esto indica que probablemente ya no se trata de la misma cepa. La cepa PB12.SA22 proviene de la cepa evolucionada PB12, que es una cepa mutagénica, lo que hace pensar que la cepa pudo haber mutado de un modo favorable para crecer en medio mínimo suplementado. El hecho que la cepa PB12.SA22 no creciera en el medio con corismato puede deberse a que presumiblemente este compuesto no presenta transportadores en la membrana de *E. coli* que le permitan ser internalizado a la célula [Sprenger, 2006] e integrarse a la VSA restaurando las auxotrofías de la cepa.

La respuesta positiva a la suplementación con distintos compuestos, depende de múltiples factores, por ejemplo: en algunas cepas el 2,3-dihidroxibenzoato reemplaza los requerimientos del extracto de levadura, pero eso no se observa en otras tales como la cepa de *E. coli* K12, en este caso particular, el requerimiento tan solo de este factor, es dependiente de factores como la aireación, presencia de metales y el medio base empleado [Cox y Gibson, 1966], una cepa auxótrofa múltiple requiere de pruebas variando distintos parámetros para lograr una suplementación adecuada.

APÉNDICE 3 -METODOLOGÍAS-

Extracción de ADN plasmídico -Miniprep alcalina- (Ausubel *et al.*, 1999)

1. Crecer un cultivo de la cepa que contenga el plásmido de interés toda la noche hasta la saturación. Tomar 1.5 mL de este cultivo en un tubo eppendorf y se centrifugar a 12800 x *g* por 2 minutos, eliminar el sobrenadante
2. Resuspender la pastilla en 150 μ L de solución I fría y 5 μ L de RNAsa (5 mg/mL).
3. Agregar 350 μ L de la solución II (preparada al momento) y mezclar por inversión. Incubar en hielo 10 minutos.
4. Adicionar 250 μ L de la solución III fría, mezclar por inversión e incubar en hielo 30 minutos. Centrifugar a 12800 x *g* por 15 minutos. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio y desechar la pastilla.
5. Llenar el tubo con el sobrenadante con isopropanol a temperatura ambiente y mezclar bien, centrifugar a 12800 g por 15 minutos y se desechar el sobrenadante; agregar al tubo 1 mL de etanol al 70% y mezclar por inversión.
6. Centrifugar como la primera vez y decantar el sobrenadante, evaporar el contenido del tubo a 37°C en un concentrador (Eppendorf Contrator 5301), resuspender en 50 μ L de agua MQ estéril y guardar a -20°C para su purificación.

Solución I : Tris-HCl 0.05 M, EDTA 0.05 M, Sacarosa 8%, pH 8.0

Solución II : SDS 1%, NaOH 0.2M

Solución III: Acetato de Sodio 3M pH 5.2

Electroforesis de ADN en geles de agarosa

1. Preparar 40 ml de agarosa al 1% con amortiguador TBE. Una vez disuelta la agarosa (calentar para disolver), adicionar 4 μ L de bromuro de etidio.
2. Montar la cámara de electroforesis y verter la agarosa. Una vez solidificada se llenar la cámara con amortiguador TBE hasta que el nivel del mismo alcance medio cm sobre la superficie del gel.
3. Colocar en cada uno de los carriles el marcador de peso molecular, así como la mezcla de ADN a estudiar y colorante de carga (gel loading buffer).
4. Conectar la cámara a un voltímetro y aplicar la corriente con el voltaje requerido.

Amortiguador TBE: Tris-Boratos-EDTA ; Tris 90mM, ácido bórico 90mM y EDTA 2.5mM a pH 8.2

Colorante de carga (10 mL): urea 6g, 1mL de azul de bromofenol al 0.5% en agua, 1ml de xilen-cianol al 0.5% en agua
Bromuro de etidio 0.004%

Preparación de células competentes

1. Crecer un cultivo de la cepa de interés toda la noche en medio LB con los antibióticos necesarios.
2. Tomar 100 μ L de este cultivo e inocular con este volumen 10 mL de medio LB más antibióticos, crecer las células a 37°C con agitación. Monitorear la D.O._{600nm} del cultivo y una vez que se encuentre entre 0.5-0.9, cosechar las células.
3. Enfriar el matraz con las células en hielo por aproximadamente 5 minutos y centrifugar a 4000 x g por 10 minutos a 4°C, descartar el medio.
4. Lavar la pastilla 2 veces con 100 mL de agua fría estéril y centrifugar bajo las condiciones anteriores.
5. Descartar de nuevo el sobrenadante y resuspender las células en 20 mL de glicerol frío al 10%; hacer alícuotas de 50 μ L y congelar primero en hielo seco, almacenar a continuación a -70°C.

Electrotransformación de células competentes

1. Descongelar en hielo una alícuota de 50 μ L de células competentes bajo un área estéril.
2. Transferir 3 μ L de plásmido a las células competentes. Transferir esta mezcla (células competentes y DNA plasmídico) a la celda de electroporación enfriada previamente en hielo y electroporar en un electroporador BioRad Gene Pulser a 2500 volts.
3. Agregar 1 mL de medio SOC con glucosa en la celda y traspasar el contenido total de la celda a un tubo de ensaye de 13x100 e incubar 1 hora con agitación a 37°C.
4. Centrifugar las células a 12800 g por 3 minutos y resuspender en 50 μ L de medio SOC. Plaquear ese volumen en cajas de medio LB con antibiótico.

Cuantificación de proteína por el método de Bradford

Obtención de la recta patrón:

1. Diluir 1/5 el Reactivo Bradford (BioRad).
2. Preparar la curva patrón de albúmina bovina en un rango desde 0 hasta 1 mg/mL
3. Añadir a cada tubo 1 ml del Reactivo de Bradford diluido. Mezclar por inversión.
4. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Realizar la lectura en una longitud de onda (λ) de 595nm
6. Obtener la ecuación de la recta de regresión

Medición de proteína de las muestras:

1. A cada tubo con 20 μ L de muestra, añadir 1 ml del Reactivo de Bradford diluido. Mezclar por inversión.
2. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Realizar la lectura en una λ de 595nm
4. Calcular el contenido proteico en la muestra a partir de la ecuación de la recta patrón

Ensayo para la determinación de 3-D-arabinoheptulosonato-7-P (DAHP).

Una alícuota de 1 mL del cultivo se centrifuga a velocidad máxima durante 10 minutos. Se separa el sobrenadante de la pastilla celular y se toma una muestra de 200 μ L. Los sobrenadantes se pueden guardar para hacer la determinación después, pero es recomendable procesarlos de inmediato.

1. Transferir los 200 μ L de la muestra a un tubo corning de 50 mL.
2. Adicionar 50 μ L de ácido tricloroacético al 20%, mezclar usando vortex.
3. Adicionar 250 μ L de periodato de sodio 0.25 M (preparado en ácido sulfúrico 0.125 N), mezclar usando vortex.
4. Incubar a 37°C durante 30 minutos.
5. Adicionar 500 μ L de arsenito de sodio al 2% (preparado en ácido clorhídrico 0.5 N), mezclar usando vortex. La solución debe de tomar una coloración amarilla que desaparece gradualmente.
6. Adicionar 2 mL de ácido tiobarbitúrico 0.3%, mezclar usando vortex.
7. Incubar en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos, en los cuales las muestras adquirirán un color rojizo. Después de los 10 minutos de incubación, las muestras deben de mantenerse arriba de 55°C de lo contrario se perderá la coloración.
8. Medir absorbancia a 549 nm. El valor de absorbancia debe de estar entre 0.02 y 1.2, si es mayor a 1.2 entonces es necesario hacer una dilución de la muestra y repetir el procedimiento.

El valor de la concentración de DAHP se determina con la siguiente fórmula:

$Abs_{549} \times 334 \times \text{dilución} = \text{nmoles DAHP/ml de sobrenadante.}$

Coeficiente de extinción molar a 549nm = 45,000.

