



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Ingeniería metabólica para la producción de pinosilvina en *Escherichia coli*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Prisciluis Caheri Salas Navarrete

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Guillermo Gosset Lagarda
Instituto de Biotecnología UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Enrique Merino Pérez
Instituto de Biotecnología UNAM
Dr. Otto Geiger
Centro de Ciencias Genómicas UNAM

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Enero, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de ingeniería de vías metabólicas del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en Cuernavaca, Morelos, bajo la dirección del Dr. Guillermo Gosset Lagarda.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por la vida

A mis padres, sin ustedes yo sería nada

A mi mamá "Corita", por todo lo que hiciste por mí

A Angie, sin ti no habría podido terminar este trabajo

A mi comité tutorial:

Dr. Guillermo Gosset Lagarda,

Dr. Enrique Merino Pérez

Dr. Otto Geiger

por haberme guiado en el desarrollo de esta tesis

A la Q.I. Luz María Martínez Mejía por el apoyo con las técnicas de biología molecular empleadas en este trabajo

A la Dra. Noemí Flores Mejía por el apoyo técnico en los análisis de PCR cuantitativo

A la M.C. Georgína Hernández Chávez por el apoyo técnico en los análisis cromatográficos

A la C.D. Mercedes Enzaldo Cruz por el apoyo técnico. ¡Muchas gracias Mechita!

A la auxiliar de laboratorio Aurelia González Guzmán por el apoyo técnico

A todos los compañeros del laboratorio Bolívar-Gosset de quienes aprendí mucho especialmente a José Utrilla, Alberto y Andrés

A mis amigos Iván, Ale Mejía, Omar ("Omar el genómico"), Uriel, Ale Vargas, "Eneri" y "Man", gracias por tantos buenos momentos compartidos.

A Conacyt por el apoyo CONACYT 177568, a la UNAM por el apoyo PAPIIT/UNAM IT200314, al PAEP por el apoyo para asistir al congreso "12th International Symposium on the genetics of industrial microorganisms", realizado en el Centro de convenciones de Cancún Cancún, Quintana Roo, México, 2013, así como al SNI, por el apoyo económico "AYUDANTE DE INVESTIGADOR SNI III" con número de expediente 8241 para la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A Sinuhé Caheri, “Mamá Corita”, José Luis, Miriam y Angie

Índice General

AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIA.....	II
Índice General	I
Índice de tablas	IV
Índice de figuras.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
I. Antecedentes.....	6
I.1 Producción heteróloga de pinosilvina.....	6
I.1.1 Cultivos de producción de pinosilvina	6
I.1.2 Malonil coenzima A.....	9
I.1.2.1 Enzima enoil-(proteína-acarreadora de acilo)-reductasa	11
JUSTIFICACIÓN	13
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	15
Objetivo General	15
Objetivos específicos	15
II. Materiales	16
III. Plásmido de producción heteróloga de estilbenos	19
III.1 Metodología	19
III.1.1 Plásmido de producción de estilbenos	19
III.2 Resultados	21
III.2.1 Plásmido de producción de estilbenos	21
IV. Bloqueo de la traducción del RNA mensajero del gen <i>fabI</i>	24
IV.1 Metodología	24
IV.1.1 Plásmido para bloquear la traducción del mRNA del gen <i>fabI</i>	24
IV.1.2 Efecto del anhidro-tetraciclina sobre el crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	26
IV.1.3 Efecto de expresar el RNAn _c / <i>fabI</i> sobre el crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	27

IV.1.4	Efecto de la expresión del RNAn <i>cfabI</i> sobre la producción de pinosilvina en <i>Escherichia coli</i>	28
IV.1.5	Extracción y cuantificación de la pinosilvina	29
IV.2	Resultados	30
IV.2.1	Plásmido para bloquear la traducción del mRNA del gen <i>fabI</i>	30
IV.2.1	Efecto del anhidro-tetraciclina sobre el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> 31	
IV.2.2	Efecto de expresar el RNAn <i>cfabI</i> sobre el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> 32	
IV.2.3	Efecto de la expresión del RNAn <i>cfabI</i> sobre la producción de pinosilvina en <i>Escherichia coli</i>	34
IV.3	Discusión.....	36
V.	Eliminación de la región intergénica y el hexámero -35 del gen <i>fabI</i> en <i>Escherichia coli</i>	38
V.1	Metodología	38
V.1.1	Eliminación de la región intergénica y del hexámero -35 de la región promotora del gen <i>fabI</i> de una cepa de <i>Escherichia coli</i>	38
V.1.2	Efecto de la eliminación de la región intergénica y del hexámero -35 del promotor del gen <i>fabI</i> sobre la transcripción de genes que codifican para enzimas del metabolismo de lípidos en <i>Escherichia coli</i>	42
V.1.3	Efecto de la eliminación de la región intergénica y del hexámero -35 del promotor del gen <i>fabI</i> sobre la producción de pinosilvina en <i>Escherichia coli</i> 44	
V.2	Resultados	46
V.2.1	Eliminación de la región intergénica y del hexámero -35 de la región promotora del gen <i>fabI</i> de una cepa de <i>Escherichia coli</i>	46
V.2.2	Efecto de la eliminación de la región intergénica y del hexámero -35 del promotor del gen <i>fabI</i> sobre la transcripción de genes que codifican para enzimas del metabolismo de lípidos en <i>Escherichia coli</i>	47
V.2.3	Efecto de la eliminación de la región intergénica y del hexámero -35 del promotor del gen <i>fabI</i> sobre la producción de pinosilvina en <i>Escherichia coli</i> 51	
V.2.3.1	Producción de pinosilvina con la cepa W3110Δ-35 <i>fabI</i> ::Cm/pSc4CL _(M) AhSTS en medio M9.....	51
V.2.3.2	Producción de pinosilvina con la cepa W3110Δ-35 <i>fabI</i> ::Cm/pSc4CL _(M) AhSTS en medio LB.....	54

V.2.3.3 Producción de pinosilvina con la cepa W3110Δ-35fabI::Cm/pSc4CL _(M) VvSTS en medio LB	58
V.2.3.4 Producción de resveratrol en medio LB GLY 10 g/L ac. cumárico 3 mM	60
V.3 Discusión.....	63
CONCLUSIONES GENERALES.....	66
PERSPECTIVAS.....	67
BIBLIOGRAFÍA	69

Índice de tablas

Tabla 1. Organismos y estrategias de cultivo usados para producir pinosilvina en diferentes organismos	6
Tabla 2. Estrategias que se han usado hasta el momento para aumentar la poza de malonil-CoA en <i>E. coli</i>	9
Tabla 3. Material biológico usado en este estudio	16
Tabla 4. Reacciones de restricción para generar el plásmido pSc4CL _(M) VvSTS ..	19
Tabla 5. Reacción de ligación para la construcción del plásmido pSc4CL _(M) VvSTS	20
Tabla 6. Mezcla de reacción para generar el producto de PCR para eliminar la región promotora del gen <i>fabI</i>	40
Tabla 7. Condiciones de reacción del PCR para eliminar la región promotora del gen <i>fabI</i>	41
Tabla 8. Mezcla de reacción para amplificar la región <i>ycjD</i> -Cm	41
Tabla 9. Mezcla de reacción para amplificar la región Cm- <i>fabI</i>	42

Índice de figuras

Figura 1. Estructura química de la pinosilvina.	3
Figura 2. Ruta metabólica de síntesis de pinosilvina en plantas	4
Figura 3. A). Plásmido pTrcSc4CL _(M) AhSTS. B). pTrcSc4CL _(M) VvSTS..	8
Figura 4. Rutas metabólicas relacionadas con la biosíntesis y el consumo de malonil-CoA.....	12
Figura 5. Gel de agarosa donde se comprueba por digestión la clonación del gen armonizado que codifica para la STS de <i>V. vinífera</i>	21
Figura 6. Plásmido pSc4CL _(M) VvSTS generado <i>in silico</i>	22
Figura 7. Alineamiento de la secuencia del RNA mensajero del gen <i>fabI</i> y el RNA pequeño que bloquea la traducción de éste.....	25
Figura 8. Metodología general para clonar secuencias pequeñas mediante una reacción de PCR	25
Figura 9. Plásmidos que tiene clonado el RNA pequeño no codificante que bloquea la traducción del RNAm del gen <i>fabI</i>	30
Figura 10. Caracterización del efecto del inductor AnTc sobre la velocidad específica de crecimiento de la cepa W3110 en medio LB y M9 GLC 10 g/L.	31
Figura 11. Caracterización del efecto de la expresión del RNAnc sobre la velocidad específica de crecimiento de <i>E. coli</i> en LB.....	32
Figura 12. Caracterización del efecto de la expresión del RNAnc sobre la velocidad específica de crecimiento en <i>E. coli</i> en medio M9 GLC 10 g/L.	33
Figura 13. Caracterización del efecto de la expresión del RNAnc sobre la producción de pinosilvina en LB GLY 10 g/L ac. cinámico 3 mM.....	34
Figura 14. Rendimiento producto/biomasa de la cepa W3110/pA4Km/pSc4CL _(M) VvSTS en medio LB GLY 10 g/L ac cinámico 3 mM.	35
Figura 15. Esquema de la estrategia de eliminación de la región intergénica y del hexámero -35 de la región promotora del gen <i>fabI</i>	39
Figura 16. A. Gel de agarosa de las amplificaciones de las regiones <i>ycjD</i> -Cm (450 pb) y Cm- <i>fabI</i> (780 pb). B. esquema de las amplificaciones de las regiones <i>ycjD</i> -Cm (450 pb) y Cm- <i>fabI</i> (780 pb).....	46
Figura 17. Alineamiento de las secuencias de la región Cm- <i>fabI</i>	47
Figura 18. Nivel de transcripción de los genes de las rutas de biosíntesis de ácidos grasos y fosfolípidos de la cepa W3110Δ-35 <i>fabI</i> ::Cm relativo a la cepa W3110.....	49
Figura 19. Producción de pinosilvina con la cepa W3110Δ-35 <i>fabI</i> ::Cm/pSc4CL _(M) AhSTS en medio M9 GLC 10 g/L y M9 GLY 10 g/L.	51
Figura 20. Rendimiento producto/biomasa de la cepa W3110Δ-35 <i>fabI</i> ::Cm/pSc4CL _(M) AhSTS en medio M9 GLC 10 g/L y M9 GLY 10 g/L..	53
Figura 21. Producción de pinosilvina con la cepa W3110Δ-35 <i>fabI</i> ::Cm/pSc4CL _(M) AhSTS en medio LB GLC 10 g/L y LB GLY 10 g/L.....	55

Figura 22. Rendimiento producto/biomasa con la cepa W3110Δ-35 <i>fabI</i> ::Cm/pSc4CL _(M) AhSTS en medio LB GLC 10 g/L y LB GLY 10 g/L.....	56
Figura 23. Producción de pinosilvina en medio LB GLY ac. cinámico 3 mM con la cepa W3110Δ-35 <i>fabI</i> ::Cm/pSc4CL _(M) VvSTS.....	58
Figura 24. Rendimiento producto/biomasa en medio LB GLY ac. cinámico 3 mM con la cepa W3110Δ-35 <i>fabI</i> ::Cm/pSc4CL _(M) VvSTS.	59
Figura 25. Producción de resveratrol con la cepa W3110Δ-35 <i>fabI</i> ::Cm/pSc4CL _(M) AhSTS en medio LB GLC 10 g/L y LB GLY 10 g/L.61	
Figura 26. Rendimiento producto/biomasa con la cepa W3110Δ-35 <i>fabI</i> ::Cm/pSc4CL _(M) AhSTS en medio LB GLC 10 g/L y LB GLY 10 g/L.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

4CL: 4-cinamoil-CoA ligasa.

ac. cinámico: ácido trans-cinámico.

ac. cumárico: ácido trans-cumárico.

AhSTS: Estilbeno sintasa de *Arachis hypogaea*.

AnTc: Anhidro tetraciclina.

AnTc 0.05: Anhidro tetraciclina a una concentración final de cinco nanogramos por mL.

Cb: Carbenicilina.

Cb 100: Carbenicilina a una concentración final de cien microgramos por mL.

D: Tasa de dilución.

E. coli: *Escherichia coli*.

g: Gramos.

g/L: gramo por litro.

GLC: Glucosa.

GLC 10 ó 10 GLC: Glucosa a una concentración final de diez gramos por litro.

GLY: Glicerol.

GLY 10 ó 10 GLY: Glicerol a una concentración final de diez gramos por litro.

h: Horas.

IPTG: Iso-propil-pirolgalactosido.

IVM: Ingeniería de vías metabólicas.

Km: Kanamicina.

Km 30: Kanamicina a una concentración final de 30 microgramos por mL.

L: Litros.

M: Molar.

malonil-CoA: Malonil coenzima A.

mg: miligramos.

mg/g: miligramo por gramo

mL: mililitro

mM: Milimolar.

RNAnc: RNA pequeño no codificante.

RNAncfabl: RNA pequeño no codificante que bloquea la traducción del RNA mensajero del gen *fabl*.

ng/mL: Nanogramos por mL.

PAL: L-fenilalanina amonio liasa.

pH: Potencial de hidrogeno.

PM: Peso molecular.

rpm: Revoluciones por minuto.

STS: Estilbeno sintasa.

v/v: Volumen por volumen.

VvSTS: Estilbeno sintasa de *Vitis vinifera*

Y_{pino/gpcs}: Rendimiento que expresa los miligramos de pinosilvina producidos por gramo de peso celular seco.

L-Phe: L-fenilalanina.

°C: Grados centígrados

µg: Micro gramos

µL: Microlitros

RESUMEN

La **pinosilvina** es un compuesto que tiene efectos benéficos sobre la salud de los seres humanos, lo que le da gran potencial en la industria farmacéutica. Sin embargo, la disponibilidad de esta molécula para realizar ensayos clínicos y para su uso terapéutico está limitada por la baja productividad de los procesos de extracción a partir de sus fuentes naturales. Debido a esto, se ha explorado la producción heteróloga de dicha molécula y se ha determinado que el **malonil coenzima A (malonil-CoA)** es su precursor limitante. Esto señala la necesidad de desarrollar cepas productoras de pinosilvina con una mayor disponibilidad intracelular de malonil-CoA. En este trabajo se presenta la aplicación de dos estrategias de **ingeniería de vías metabólicas (IVM)** diseñadas para disminuir la expresión del gen *fabI*, éste codifica para la enzima enoli-ACP-reductasa en ***Escherichia coli (E. coli)***. Esta enzima participa en la **biosíntesis de ácidos grasos (FAB)**, que es la única vía que consume malonil-CoA en *E. coli*. Por lo que, con estas estrategias se espera aumentar la producción heteróloga de pinosilvina. Estas estrategias son independientes y no secuenciales por lo que se presentan en capítulos separados.

En el capítulo IV se presenta la generación y caracterización de un plásmido (**pA4Km**) que expresa un **RNA pequeño no codificante diseñado para bloquear la traducción del RNA mensajero del gen *fabI*** de *E. coli*. Con esta estrategia se alcanzó una producción de 0.380 ± 0.028 mg/L de pinosilvina.

En el capítulo V se presenta la generación y caracterización de una cepa de *E. coli* a la cual se le eliminó la región intergénica y el hexámero -35 de la región promotora del gen *fabI* (**W3110 Δ -35*fabI*::Cm**). Con esta cepa se alcanzó un título de producción de 52.67 ± 2.95 mg/L de pinosilvina y un **rendimiento de pinosilvina por gramo de peso celular seco ($Y_{\text{pino/gpcs}}$)** de 15.01 ± 1.10 mg pinosilvina/gpcs. Este es el mejor $Y_{\text{pino/gpcs}}$ que se ha reportado en *E. coli* hasta el día de hoy.

INTRODUCCIÓN

Diferentes microorganismos que se encuentran en la naturaleza pueden emplearse para producir una amplia variedad de servicios y productos útiles para el hombre tales como biomateriales, biocombustibles, alimentos, bebidas, compuestos químicos, entre otros. Dentro de las células de dichos microorganismos los compuestos químicos son intermediarios o productos de una compleja red de reacciones químicas a las que, en su conjunto total, se les llama metabolismo. Sin embargo, el metabolismo microbiano no evolucionó para satisfacer las necesidades ni las expectativas de los seres humanos. Por lo que en general, la eficiencia en la producción de compuestos químicos usando microorganismos aislados de nichos naturales es muy baja. Para superar estas limitaciones la IVM busca transformar a estos microbios silvestres en fábricas biológicas altamente eficientes, para lograrlo, ésta se vale de un marco de conceptos y técnicas que dan sustento a un amplio espectro de estrategias. Estas fábricas celulares se utilizan en la producción de compuestos dirigidos a diferentes industrias, dentro de las que destacan la farmacéutica, química, alimenticia, cosmética y de combustibles, entre otras. Dentro de la industria farmacéutica actual, destaca una familia de compuestos polifenólicos llamados fenilpropanoides (Lee et al., 2012; E Leonard, Runguphan, O'Connor, & Prather, 2009; Stephanopoulos & Valino, 1991). Los fenilpropanoides son compuestos generados principalmente por el metabolismo secundario de las plantas. Estos compuestos se derivan de la L-Fenilalanina (L-Phe) y la L-Tirosina (L-Tyr) y se sintetizan en respuesta a diferentes condiciones de estrés como radiación UV, exposición al ozono, entre otras (Chong et al, 2009. Korkina, 2007). Dentro de los fenilpropanoides encontramos a los estilbenos, que son un pequeño grupo de polifenoles que se caracterizan por tener un esqueleto 1,2-difenil-etileno. Estos compuestos han recibido mucha atención durante los últimos 15 años debido a sus actividades biológicas y a sus posibles aplicaciones farmacológicas (Chong et al., 2009).

La **pinosilvina** o **trans-3'-5'-dihidroxiestilbeno** (figura 1) ($C_{14}H_{12}O_2$, PM 212.26 g/mol) pertenece al grupo de estilbenos. Ésta se encuentra principalmente en la pulpa de la madera del eucalipto y de varias especies de pino, como *Pinus sylvestris*, *Pinus densiflora*, *Pinus taeda* y *Pinus strobus*. Este compuesto también se encuentra en la albura; la parte joven de la madera que se encuentra debajo de la corteza que incluye los anillos de crecimiento más recientes, en el floema y en la agujas de los pinos. En estas partes de las plantas la pinosilvina se sintetiza en respuesta a infecciones por hongos o estrés ambiental como radiación UV y exposición a ozono (Katz, Förster, David, Peter Schmidt, Hans Sendelius, & Bjorn, Sara Peterson Thomasen Durhuus, 2013; Roupe, Remsberg, Yáñez, & Davies, 2006).

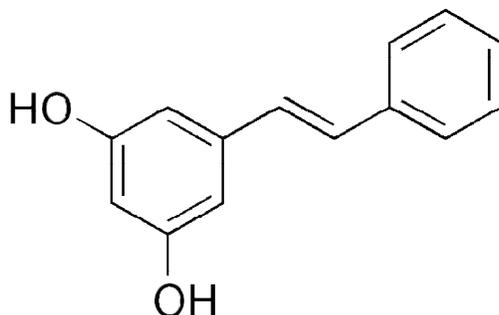


Figura 1. Estructura química de la pinosilvina (Roupe et al., 2006).

La pinosilvina se sintetiza a partir de la ruta general de los fenilpropanoides, en la que el **ácido trans-cinámico (ac. cinámico)** es el primer intermediario (figura 2). Éste se genera mediante la desaminación no oxidativa de la **L-fenilalanina (L-Phe)** por la acción de la enzima **L-fenilalanina amonio liasa (PAL)** (Vogt, 2010). En la ruta de síntesis de pinosilvina, el **ac. cinámico** es directamente activado a **cinamoil-CoA** por la enzima **4-cinamoil-CoA ligasa (4CL)**. Posteriormente la enzima **estilbeno sintasa (STS)** cataliza la condensación de una unidad de cinamoil-CoA con 3 unidades de malonil-CoA, formando así un intermediario tetracétido de cadena abierta. Finalmente la misma enzima STS cicla este intermediario y forma la pinosilvina (Katz et al., 2013). Las STS son enzimas

promiscuas que pueden aceptar diferentes derivados del ácido cinámico; una misma enzima puede ser responsable de la síntesis de varios estilbenos dependiendo de la molécula que use como sustrato. De manera similar, la 4CL puede utilizar ácido cinámico o ácido cumárico como sustrato, aunque con una eficiencia catalítica (K_M/K_{cat}) 100 veces menor para el cinámico comparado con el cumárico (Chong, Poutaraud, & Hugueney, 2009; Katz et al., 2013).

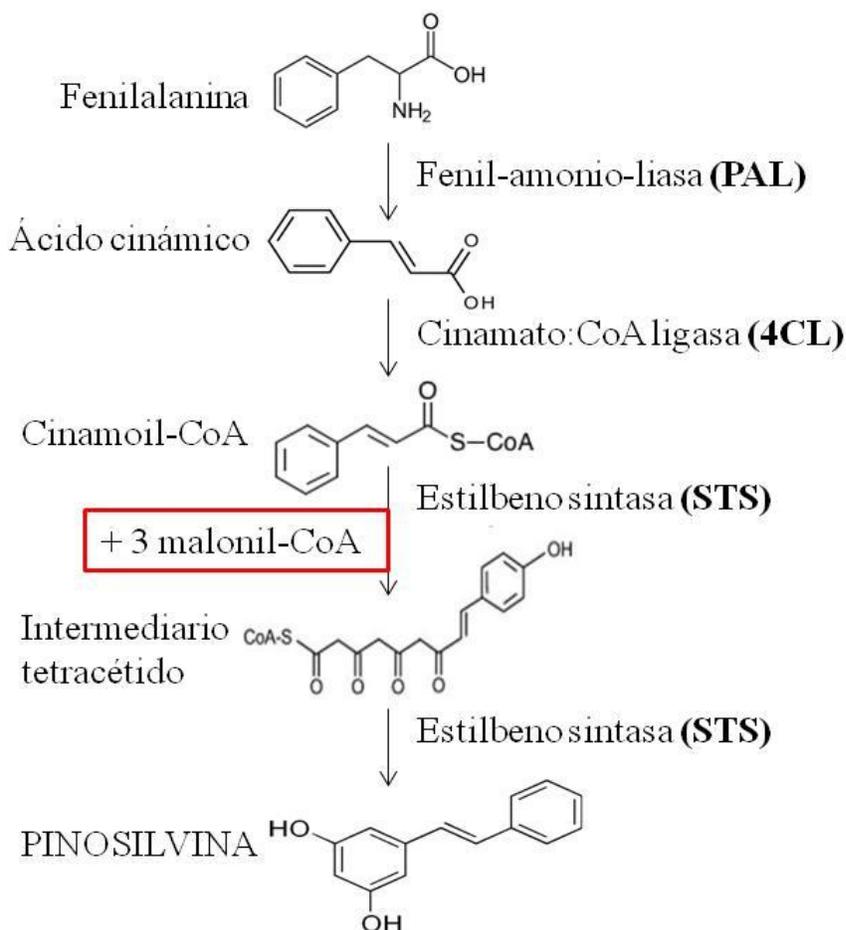


Figura 2. Ruta de pinosilvina en plantas (Chong et al., 2009).

Se ha demostrado que la pinosilvina tiene actividad cardioprotectora, antiinflamatoria, antioxidante, anticancerígena, entre otras (Jancinova et al., 2012; Jančinová et al., 2010; Katz et al., 2013; Roupe et al., 2006). Estas propiedades

que impactan positivamente la salud de los seres humanos le dan un gran potencial de aplicación en la industria farmacéutica. Actualmente la pinosilvina se extrae de varias especies de pino; en uno de los procesos de extracción de pinosilvina reportados parten de pinos de 30 años de edad para hacer la extracción del compuesto. El proceso consta de dos extracciones sucesivas, la primera con hexano a 90 °C y la segunda es una extracción con acetona-agua (90 v/v) a 100 °C. De estas extracciones se obtiene una mezcla de fenoles simples, estilbenos (pinosilvina y metil-ester-pinosilvina), flavonoides y lignanos, que posteriormente deben ser purificados. Los rendimientos de pinosilvina observados en este proceso varían de 1.7 a 6.2 mg/g (Conde et al., 2014). La variabilidad en la materia prima, el impacto ecológico, el complicado proceso de purificación y la baja productividad, limitan y encarecen la extracción de este compuesto a partir de sus fuentes naturales. Debido a esto, existe un gran interés en desarrollar cepas de microorganismos que produzcan esta molécula de forma eficiente (Katz et al. 2013; Conde et al. 2014).

I. Antecedentes

I.1 Producción heteróloga de pinosilvina

I.1.1 Cultivos de producción de pinosilvina

La producción heteróloga de pinosilvina se ha abordado usando dos configuraciones de las enzimas de la ruta heteróloga (tabla 1); en una de éstas se expresan las tres enzimas de la ruta de síntesis de pinosilvina (PAL, 4CL y STS), mientras que en la otra solo se expresan dos de las enzimas (4CL y STS). Cabe destacar que con la primer configuración tanto el malonil-CoA y el ac. cinámico (precursores de la pinosilvina) provienen del metabolismo central de los microorganismos. Mientras que con la segunda configuración es necesario alimentar ac. cinámico al medio de cultivo, ya que la cepa no es capaz de producirlo. Esto se debe a que en la segunda configuración no se expresa la enzima PAL, la cual conecta el metabolismo central de los microorganismos con la ruta de producción de pinosilvina. Se ha determinado *in vitro* que el pH y la temperatura óptimos de las reacciones catalizadas por las enzimas 4CL y PAL son 8 y 30 °C respectivamente (Kaneko, Ohnishi, & Horinouchi, 2003; Katz et al., 2013; Park et al., 2009; van Summeren-Wesenhagen & Marienhagen, 2015; Watts, Lee, & Schmidt-Dannert, 2006).

Tabla 1. Producción heteróloga de pinosilvina

Organismo	Plásmidos	Estrategia	Título	Referencia
<i>Streptomyces venezuelae</i>	Plásmido pSE34 con un promotor no inducible fuerte Sc4CL y AhSTS	50 mL de medio complejo suplementado con 250 g/L de sacarosa y 1.4 mM de ac. cinámico. Incubados a 30 °C por 66 h.	0.6 mg/L	(Park et al., 2009)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	pESC-URA-PAL2 y pESC-TRP-	Producción en cultivo continuo en reactor con un	130 mg/L total (113.57)	(Katz et al., 2013)

	4CL1-VST1	volumen de trabajo de 1 L de medio mineral, con vitaminas, elementos traza, 5 g/L de GLC, 35 g/L de galactosa incubados por 300 h a 30 °C y 160 rpm. D = 0.050 h ⁻¹	mg/L extracelular)	
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	pET16B-PAL2 y pET26B-4CL1-VST1	Producción en lote en reactores con un volumen de trabajo de 1.5 L medio mineral con 6 g/L de extracto de levadura y 20 g/L de glicerol e IPTG 1 mM a 30 °C y 800 rpm.	0.016 mg/L intracelular	(Katz et al., 2013)
<i>Aspergillus nidulans</i>	Integraron la ruta al cromosoma	Producción en matraces de 500 mL con 100 mL de medio definido a 30 °C y 150 rpm por 24 h.	1-2 mg/L	(Katz et al., 2013)
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	pR-His <i>Pstrsts2*</i> - <i>Sc4cl-Pcpal1</i>	10 mL de YNB suplementado con 5g/L de glucosa, 200 µM de cerulenina, 3 mM de L-Phe y 1 mM IPTG a 26 °C y 170 rpm por 36 h.	91 mg/L	(van Summeren-Wesenhagen & Marienhagen, 2015)
<i>Escherichia coli</i> DH5α	pQE-30-Vvrs-At4cl	Matraces con 100 mL de YM9 con GLY, 0.5 mM ac. cinámico, 1 µM de AnTc a 37 °C y 200 rpm	47.49 mg/L	(Liang et al., 2016)

En los antecedentes directos para el presente estudio utilizaron una estrategia similar a la reportada por Park y sus colaboradores en el 2009 (tabla 1). Con una versión mutante del gen que codifica para la 4CL de *S. coelicolor* (4CL A294G; Kaneko et al. 2003) y la versión del gen que codifica para la enzima STS de *A. hypogaea* obtenida por Watts y sus colaboradores en el 2006 se generó el plásmido pSc4CL_(M)AhSTS (figura 3-A). Esta versión mutante de la 4CL tiene una

mayor eficiencia catalítica *in vitro*, comparada con la enzima silvestre, usando ac. cinámico como sustrato (Kaneko et al., 2003). Posteriormente, a partir de ese plásmido se construyó el plásmido pSc4CL_(S)AhSTS (Ramírez-Iñiguez et al., datos no publicados). Con éste se transformó una cepa de *E. coli* y se demostró *in vivo* que las enzimas codificadas por los genes de esta construcción producen resveratrol en medio LB suplementado con **glicerol (GLY)** y **ácido cumárico (ac. cumárico)** (Ramírez-Iñiguez et al., datos no publicados).

Por otro lado, Se ha demostrado que la armonización de los codones aumenta la expresión heteróloga de diferentes proteínas (Angov, Hillier, Kincaid, & Lyon, 2008). Por lo que, con un gen con los codones armonizados que codifica para una STS de *V. vinifera* (Camacho-Zaragoza et al., 2016) y con el gen que codifica para una versión silvestre de la enzima 4CL de *S. coelicolor* (Kaneko et al., 2003) se construyó el plásmido pSc4CL_(M)VvSTS. Posteriormente se transformó una cepa de *E. coli* con este plásmido y se demostró *in vivo* que las enzimas codificadas por los genes de esta construcción producen resveratrol en medio LB suplementado con GLY y ac. cumárico.

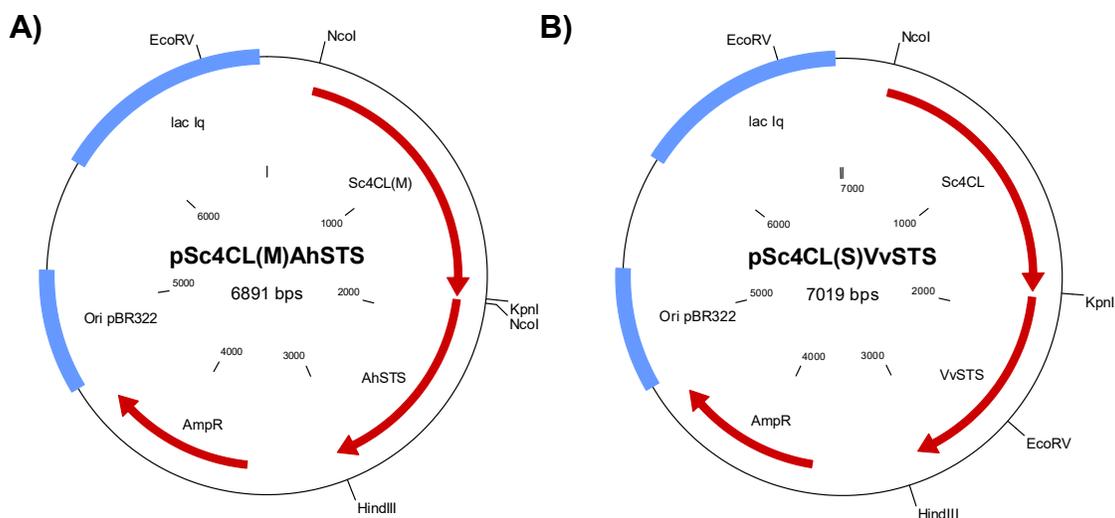


Figura 3. Plásmidos de producción de estilbenos. **A).** Plásmido pTrcSc4CL_(M)AhSTS. Tiene clonada una versión mutante del gen que codifica para la enzima 4CL de *S. coelicolor* y el gen que codifica para la enzima STS de cacahuete (Ramírez-Iñiguez *et al.*, datos no publicados). **B).** pTrcSc4CL_(S)VvSTS. Tiene clonada la versión silvestre del gen que codifica para la enzima 4CL de

S. coelicolor y el gen con los codones armonizados que codifica para la enzima STS de uva (Camacho-Zaragoza et al., 2016).

Estos antecedentes demuestran que se han hecho avances significativos en lo que respecta a la construcción de rutas heterólogas de producción de estilbenos. Sin embargo, es necesario diseñar estrategias para incrementar la disponibilidad intracelular de malonil-CoA de las cepas productoras de pinosilvina, y de estilbenos en general.

I.1.2 Malonil coenzima A

El malonil-CoA es el precursor principal de la FAB en *E. coli* (Cronan & Thomas, 2009). Éste también es el precursor limitante en la producción heteróloga de una gran variedad de moléculas de alto valor agregado como algunos fenilpropanoides y algunos polifenoles (Xu, Ranganathan, Fowler, Maranas, & Koffas, 2011). Por lo que actualmente, aumentar la disponibilidad intracelular de malonil-CoA en diferentes organismos se ha convertido en una línea de investigación de gran interés.

Compuesto	Estrategia	Título del control (mg/L)	Título con la estrategia (mg/L)	Aumento (veces)	Referencia
Naringenina	Expresión <i>matC</i> y <i>matB</i>	42 ± 1	155 ± 12	2.6	(Effendi Leonard, Yan, Fowler, & Li, 2008)
Eriodictoil	Expresión <i>matC</i> y <i>matB</i>	11 ± 1	50 ± 7	3.5	(Effendi Leonard et al., 2008)
Pinocembrina	Expresión <i>matC</i> y <i>matB</i>	29 ± 2	480 ± 23	15.5	(Effendi Leonard et al., 2008)
5,7-dihydroxy-2'-fluoroflavanona	Cerulenina	1.6 ± 0	3.6 ± 1	1.2	(Effendi Leonard et al., 2008)
5,7-dihydroxy-4'-	Cerulenina		3.0 ± 1	0.2	(Effendi

fluroflavanona			2.5 ± 0			Leonard et al., 2008)
5,7,2'-trihydroxyflavanona	Cerulenina		3.4 ± 1	23.2 ± 1	5.8	(Effendi Leonard et al., 2008)
4'-amino-5,7-dihydroxyflavanona	Cerulenina		3.7 ± 1	12.4 ± 2	2.3	(Effendi Leonard et al., 2008)
Resveratrol (RNA monocistrónico STS-Ah)	Expresión ACC y BirA		33	45.9 ± 1.7	0.39	(Lim, Fowler, Hueller, Schaffer, & Koffas, 2011)
Resveratrol (RNA monocistrónico STS-Ah)	Cerulenina		33	65.3 ± 0.1	0.97	(Lim et al., 2011)
Resveratrol (RNA policistrónico STS-Vv)	Cerulenina		1 380 ± 183	2 340 ± 90	0.6	(Lim et al., 2011)
Resveratrol	<i>ΔfumC</i> expresión PGK-GapA PDH		900	1600	0.7	(Bhan, Xu, Khalidi, & Koffas, 2013)
Pinosilvina	Cerulenina		3.3	91	26.5	(van Summeren-Wesenhagen & Marienhagen, 2015)
Pinosilvina	Represión <i>fabD</i>		16.37	47.49	1.9	(Liang et al., 2016)

Una estrategia que se ha usado para aumentar la poza intracelular de malonil-CoA consiste en expresar los genes *matB* y *matC* de *Rizobium trifoli* (*R. trifoli*) en *E. coli*. Estos le confieren la capacidad de transportar malonato (MatC) y de condensarlo con el acetyl-CoA (MatB) para formar malonil-CoA y acetato. Con este enfoque se logró aumentar la producción de diferentes flavonoides (tabla 2) (Effendi Leonard et al., 2008). También se han desarrollado estrategias a partir de modelos estequiométricos (tabla 2) (Fowler et al. 2009; Bhan et al. 2013). Éstas consisten en eliminar genes y sobreexpresar enzimas, para redirigir el flujo de carbono hacia la biosíntesis de malonil-CoA en *E. coli*.

La estrategia más usada en *E. coli* consiste en agregar el compuesto cerulenina al medio de cultivo. Éste inhibe la actividad de las enzimas FabB y FabF, causando

la reducción en la tasa de síntesis de ácidos grasos, y con esto, la reducción en el consumo de malonil-CoA por esta vía (Heath & Rock, 1995; Lim et al., 2011; van Summeren-Wesenhagen & Marienhagen, 2015). Sin embargo, con esta estrategia se aumenta el costo de producción de la pinosilvina y de cualquier otro fenilpropanoide. Finalmente cabe destacar el uso de estrategias basadas en CRISPRi para reprimir la expresión de genes que codifican para las enzimas de la FAB que utilizan al malonil-CoA como sustrato (Liang et al., 2016). Sin embargo, los títulos de producción de pinosilvina alcanzados con estas estrategias pueden ser mejorados.

I.1.2.1 Enzima enoil-(proteína-acarreadora de acilo)-reductasa

En *E. coli* el gen *fabI* codifica para la enzima **enoil-(proteína acarreadora de acilo)-reductasa (FabI)**. Se ha demostrado que este gen es esencial para el crecimiento celular de *E. coli*, ya que, al eliminarlo del cromosoma se obtiene una cepa mutante que no es capaz de crecer en los medios de cultivo estándar para *E. coli* (Baba et al., 2006; Bergler, Fuchsbichler, Högenauer, & Turnowsky, 1996). La enzima FabI cataliza la última reacción de la FAB, en ésta se genera una molécula de **acil-ACP**. Este metabolito se condensa con dos carbonos provenientes del malonil-ACP y se inicia así un nuevo ciclo de elongación en la FAB (figura 4) (Cronan & Thomas, 2009). Con lo anterior se establece que el malonil-CoA y el acil-ACP son los precursores de la FAB. Por lo que, inhibir la síntesis de acil-ACP reduce la tasa de consumo del malonil-CoA por la FAB y la tasa de síntesis de ácidos grasos (Heath & Rock, 1995). Para demostrar esto, Cronan & Thomas en el 2009 generaron una cepa con una versión mutante del gen *fabI* que codifica para una enzima **FabI termosensible (FabI_(TS))**. Al cultivar esta cepa a 42 °C, la enzima FabI_(TS) disminuye su actividad catalítica lo que resulta en un aumento del 30 % en la poza intracelular de malonil-CoA (Heath & Rock, 1995). Estos resultados sugieren que es posible aumentar la disponibilidad de malonil-CoA, lo

que a su vez aumentará la producción de pinosilvina, si se aplican estrategias que disminuyan la expresión del gen *fabI*.

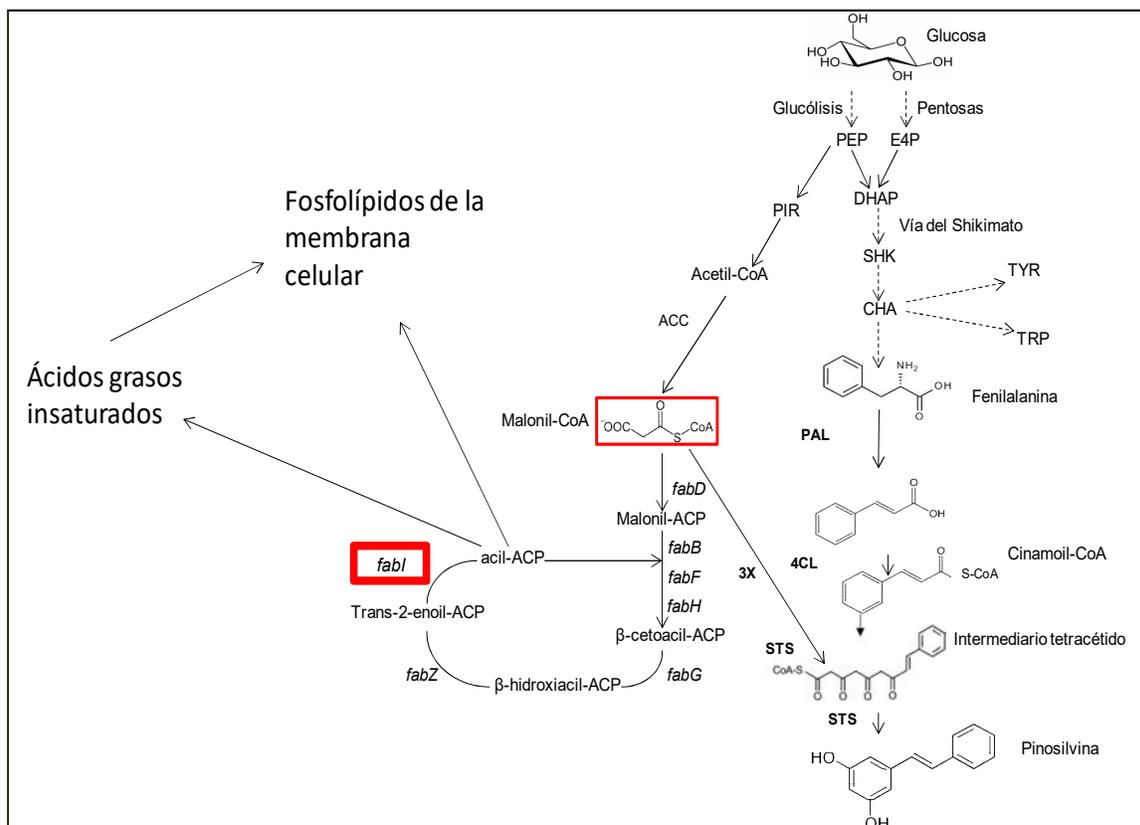


Figura 4. Biosíntesis de ácidos grasos en *E. coli*. En la figura se resalta el gen *fabI* y la reacción que cataliza la enzima codificada por dicho gen.

JUSTIFICACIÓN

El potencial farmacéutico que posee la pinosilvina ha generado un gran interés en desarrollar cepas de microorganismos que sean capaces de producirla de forma eficiente. En este sentido, se ha reportado que el malonil-CoA es el precursor limitante en la producción heteróloga de pinosilvina. Esto pone de manifiesto que es necesario desarrollar estrategias novedosas que aumenten la poza intracelular de malonil-CoA y con esto aumentar la producción de pinosilvina. Así mismo, se ha demostrado que inhibir la actividad de la enzima FabI aumenta la poza intracelular de malonil-CoA, por lo que, en el presente trabajo se plantean dos estrategias para disminuir la expresión del gen *fabI* con las que se espera aumentar la producción de pinosilvina en *E. coli*.

HIPÓTESIS

Reducir la expresión del gen *fabI* aumentará la producción heteróloga de pinosilvina en *E. coli*.

OBJETIVOS

Objetivo General

Reducir la expresión del gen *fabI* y analizar el efecto de esta reducción sobre la producción de pinosilvina en *E. coli*.

Objetivos específicos

- Generar un plásmido que exprese las enzimas 4CL y STS que participan en la síntesis de estilbenos.
- Generar un plásmido que exprese un RNA pequeño no codificante para bloquear la traducción del RNA mensajero del gen *fabI*.
- Caracterizar el efecto del bloqueo de la traducción del RNA mensajero del gen *fabI* sobre el crecimiento de *E. coli*.
- Caracterizar el efecto del bloqueo de la traducción del RNA mensajero del gen *fabI* sobre la producción heteróloga de pinosilvina en *E. coli*.
- Diseñar e implementar una mutación sobre la región promotora del gen *fabI* para disminuir su nivel de transcripción.
- Caracterizar el efecto de la mutación en el promotor del gen *fabI* sobre su nivel de transcripción.
- Caracterizar el efecto de la mutación en el promotor del gen *fabI* sobre la transcripción de los genes que codifican para enzimas que participan en la síntesis de lípidos en *E. coli*.
- Caracterizar el efecto de la mutación en el promotor del gen *fabI* sobre la producción heteróloga de pinosilvina en *E. coli*.

II. Materiales

En la tabla 3 se describen de manera general las cepas, los plásmidos y los oligonucleótidos empleados en el desarrollo de las estrategias para aumentar la poza intracelular de malonil-CoA y la producción de pinosilvina en *E. coli*.

Como se menciona en el resumen, cada estrategia se describe en un capítulo independiente. En cada uno de estos se muestra la metodología, los resultados y la discusión. Finalmente se exponen las conclusiones generales y las perspectivas del presente estudio.

Tabla 3. Material biológico		
Cepa	Genotipo	Referencia
W3110	F ⁻ λ ⁻ rph-1 INV(rrnD, rrnE)	(Bachmann, 1973)
W3110 Δ-35fabI::Cm	Cepa W3110 a la que se le insertó el casete de Cm por el método reportado por Datsenko & Wanner en el 2000. El casete se insertó en la región intergénica del gen <i>fabI</i>	Este trabajo
W3110 Δ-35fabI::FRT	Cepa W3110 a la que se le eliminó por el método de Datsenko y Wanner la región intergénica del gen <i>fabI</i> y se le escindió el casete de resistencia a Cm	Este trabajo
W3110/pSc4CL _(M) AhSTS	Cepa W3110 transformada con el plásmido que codifica para una versión mutante de la 4CL de <i>S. coelicolor</i> y la STS de <i>A. hypogaea</i>	Este trabajo
W3110 Δ-35fabI::Cm/pSc4CL _(M) AhSTS	Cepa W3110 a la que se le insertó el casete de Cm por el método de Datsenko y Wanner en la región intergénica del gen <i>fabI</i> transformada con el plásmido que codifica para una versión mutante de la 4CL de <i>S. coelicolor</i> y la STS de <i>A. hypogaea</i>	Este trabajo
W3110/pSc4CL _(M) VvSTS	Cepa W3110 transformada con el plásmido que codifica para una versión mutante de la 4CL de <i>S. coelicolor</i> y la STS de <i>V. vinifera</i>	Este trabajo
W3110 Δ-35fabI::Cm/	Cepa W3110 a la que se le insertó el casete de Cm por el método de Datsenko y Wanner en la región intergénica del gen	Este trabajo

pSc4CL_(M)VvSTS	<i>fabI</i> transformada con el plásmido que codifica para una versión mutante de la 4CL de <i>S. coelicolor</i> y la STS de <i>V. vinifera</i>	
W3110/pA4Km/pSc4CL_(M)VvSTS	Cepa silvestre transformada con un plásmido que codifica para un RNanc que bloquea la traducción del RNA mensajero del gen <i>fabI</i> y con el plásmido que codifica para una versión mutante de la 4CL de <i>S. coelicolor</i> y la STS de <i>V. vinifera</i>	Este trabajo
Plásmido	Características	Referencia
pKD46	Plásmido que codifica para las recombinasas del fago λ red.	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKD3	Plásmido que codifica para el gen de resistencia a Cm flanqueado por los sitios FRT	(Datsenko & Wanner, 2000)
pCP20	Plásmido que codifica para la flipasa	(Datsenko & Wanner, 2000)
pSc4CL_(M)AhSTS	Plásmido que codifica para una versión mutante de la 4CL de <i>S. coelicolor</i> y la STS de <i>A. hypogaea</i>	(Ramírez-Íñiguez et al., Datos no publicados)
pSc4CL_(S)VvSTS	Plásmido que codifica para la versión silvestre de la 4CL de <i>S. coelicolor</i> y la STS de <i>V. vinifera</i>	(Camacho-Zaragoza et al., datos no publicados).
pSc4CL_(M)VvSTS	Plásmido que codifica para una versión mutante de la 4CL de <i>S. coelicolor</i> y la STS de <i>V. vinifera</i>	Este trabajo
pA4Km	Plásmido que codifica para un RNanc que bloquea la traducción del RNA mensajero del gen <i>fabI</i>	(Merino-Pérez E. et al., datos no publicados)

Oligonucleótido	Secuencia	Referencia
-35 <i>fabI</i>-F	5'TGCTGGAGAATATTCTGCAGGAACTGAACCGCCGGTCAC CCTCTCCCTGATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC3'	Este trabajo
-35 <i>fabI</i>-R	5'GTAAACAGTACGAACAGATAAACGGTTATTATAATCAACC TGGCTGTGAGCATATGAATATCCTCCTTAG3'	Este trabajo
<i>ycjD</i>-F	5'ATTTGCGCCGTCAACATCCAG3'	Este trabajo
<i>fabI1</i>-R	5'TACGGATCGGACCAGCAGAG3'	Este trabajo
C1	5'ATATTTGCCCATGGTGAAAA3'	(Datsenko & Wanner, 2000)
C2	5'GATCTTCCGTCACAGGTAGG3'	(Datsenko & Wanner, 2000)
Fw_sc4CL_600	5'ATTCTGGTTTGCGATAGC3'	(Camacho-Zaragoza et al., Datos no publicados)
Fw_sc4CL_1200	5'GGGTACAGTTGGTCGTCT3'	(Camacho-Zaragoza et al., Datos no publicados)

III. Plásmido de producción heteróloga de estilbenos

III.1 Metodología

III.1.1 Plásmido de producción de estilbenos

A partir de los plásmidos pSc4CL_(S)VvSTS y pSc4CL_(M)AhSTS (figura 3) se construyó el plásmido pSc4CL_(M)VvSTS mediante protocolos de clonación estándar. En la tabla 4 se muestran las reacciones de restricción que se prepararon para generar el plásmido receptor (**HindIII-pSc4CL_(M)-KpnI**) y el fragmento que se insertó en dicho vector (**KpnI-VvSTS-HindIII**).

Tabla 4. Digestiones para generar el plásmido pSc4CL_(M)VvSTS

Componente de la reacción	Volumen para preparar el plásmido	Volumen para preparar el inserto
Agua	37 µL	37 µL
Buffer KpnI 10 X	5 µL	5 µL
pSc4CL _(M) AhSTS (1 µg/µL)	5 µL (5 µg)	-
pSc4CL _(S) VvSTS (1 µg/µL)	-	5 µL (5 µg)
KpnI (10 U/µL)	1 µL (10 U)	1 µL (10 U)
HindIII (10 U/µL)	2 µL (20 U)	2 µL (20 U)
Volumen total	50 µL	50 µL

Estas reacciones se incubaron a 37 °C durante una hora. Posteriormente se inactivaron las enzimas a 80 °C por 20 min. Las mezclas de reacción con las enzimas inactivadas se cargaron en un gel de agarosa preparativo y se cortaron las bandas correspondientes a 5 694 pb y de 1 325 pb del plásmido receptor y del inserto respectivamente. Estos fragmentos de DNA fueron purificados con el kit GeneJET Gel Extraction Kit de la compañía Thermo Scientific siguiendo las

recomendaciones del fabricante. El DNA purificado fue cuantificado en un espectrofotómetro nanoDrop de la compañía Thermo Scientific y se preparó la reacción de ligación (tabla 5). Esta reacción se puso en hielo y se dejó incubando por 16 h. Posteriormente se inactivó la enzima y el DNA de la reacción se precipitó con butanol. La pastilla que se formó de la precipitación se resuspendió en 10 μL de agua mQ y con estos 10 μL se transformaron 50 μL de células electrocompetentes de la cepa W3110.

Tabla 5. Ligación para generar el plásmido pSc4CL_(M)VvSTS

Componente de la reacción	Volumen
Agua	26 μL
Buffer T4 DNA ligasa 10X	5 μL
pSc4CL _(M) lineal (20 ng/ μL)	3 μL (60 ng)
VvSTS (10 ng/ μL)	10 μL (100 ng)
DTT 100mM	5 μL (10 mM)
T4 DNA ligasa (1 U/ μL)	1 μL (1 U)
Volumen total	50 μL

Después de la transformación, las células se dejaron recuperando en un mL de LB líquido sin antibiótico a 37 °C y 300 rpm por una h. Posteriormente se esparcieron 100 μL de estas células en una caja de petri con medio LB más **Carbenicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Cb 100)** y se incubaron por 14 h a 37 °C. Una vez obtenidas las colonias en la caja de petri, se seleccionaron 4 candidatas al azar y se les extrajo el DNA plasmídico por el método de lisis alcalina (Birnboim & Doly 1979). Los plásmidos que se extrajeron fueron digeridos con la enzima *EcoRV* para confirmar la construcción. Posteriormente se secuenció una de las candidatas para confirmar que la 4CL clonada en el plásmido es la versión mutante del gen que genera el cambio A294G en la secuencia de aa (Unidad de síntesis y secuenciación de DNA IBt-UNAM).

III.2 Resultados

III.2.1 Plásmido de producción de estilbenos

El pSc4CL_(M)VvSTS es un plásmido de 7 000 pb aproximadamente, el cual tiene clonado el gen *lacI^q* que codifica para el represor del promotor *trc*. También codifica para la β-lactamasa, que le da resistencia a ampicilina. Dado que es derivado de pTrc99A, tiene un origen de replicación derivado del pBR322. También tiene clonada una versión mutante del gen que codifica para la 4CL_(M) de *S. coelicolor*, así como una versión con los codones armonizados del gen que codifica para una STS de *V. vinifera*. Estos genes se encuentran en operón y su expresión está controlada por el promotor *trc* (figura 5), por lo que para inducir la expresión de dichos genes es necesario agregar IPTG al medio de cultivo.

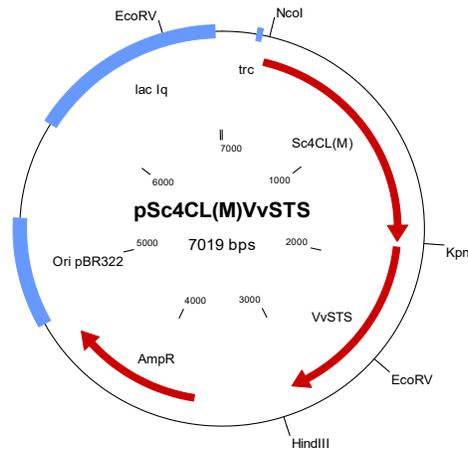


Figura 5. Plásmido pSc4CL_(M)VvSTS. Se muestra la posición de los sitios de restricción con los que fueron clonados cada uno de los genes, así como el sitio *EcoRV* que se usó para comprobar la construcción.

La distancia que existe del codón de término de la traducción del mRNA del gen que codifica para la 4CL_(M) al codón de inicio de la traducción del gen que codifica para VvSTS es de 37 nucleótidos. El mRNA del gen que codifica para la Sc4CL_(M) se traduce a partir el **sitio de unión al ribosoma (RBS)** del plásmido, mientras

que el mRNA del gen que codifica para la VvSTS se traduce a partir de un RBS que se diseñó específicamente para este gen a partir de la secuencia de su propio mRNA (Amann et al. 1988; Camacho-Zaragoza et al., 2016). El pSc4CL_(M)VvSTS tiene dos sitios de restricción *EcoRV* (figura 5 y figura 6), uno en la región del gen *lacI^q* y otro en la secuencia del marco de lectura del gen que codifica para la VvSTS, a diferencia del plásmido pSc4CL_(M)AhSTS, que tiene únicamente el sitio *EcoRV* en la región del gen *lacI^q* (figura 3-A y figura 6).

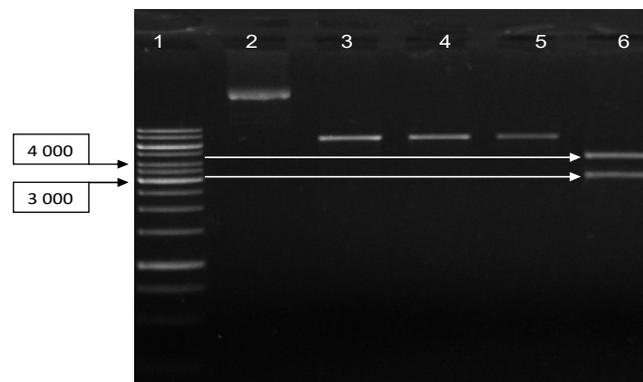


Figura 6. Comprobación del plásmido pSc4CL_(M)VvSTS. Se presenta un gel de agarosa donde se comprueba por digestión la clonación del gen que codifica para la STS de *V. vinifera*. Gel de agarosa al 1 %. Carril 1, marcador de tamaño 1 Kb; Carril 2, plásmido sin digerir; Carril 3 al 6, candidatas seleccionadas al azar.

En la figura 6 se muestra un gel de agarosa al 1 %, donde se cargaron las digestiones del DNA plasmídico de 4 candidatas seleccionadas al azar. Estas digestiones se hicieron con la enzima *EcoRV* ya que con ésta el patrón de restricción del plásmido pSc4CL_(M)VvSTS es diferente al del plásmido pSc4CL_(M)AhSTS. En el carril 1 se cargó el marcador de tamaño molecular 1 kb. En el carril dos, se observa plásmido sin digerir de la misma candidata que se muestra digerida en el carril tres. Del carril tres al carril cinco se observa una sola banda en 8 000 pb aproximadamente en cada carril; este patrón de digestión corresponde al plásmido pSc4CL_(M)AhSTS, ya que tienen un solo sitio *EcoRV* (figura 3-A). En el carril seis de la figura 6 se observan 2 bandas, una aproximadamente de 4 137 y la otra de 2 888 aproximadamente. Estos

fragmentos corresponden a los fragmentos que se generan a partir del plásmido pSc4CL_(M)VvSTS, cuando este se digiere en las posiciones 2 559 y 6 696, que es donde se encuentran los sitios *EcoRV* (figura 3-B).

IV. Bloqueo de la traducción del RNA mensajero del gen *fabI*

El gen *fabI* es esencial para el crecimiento celular de *E. coli*, por lo que no puede ser eliminado del cromosoma. Por otro lado, en la naturaleza existen RNA pequeños no codificantes que regulan, en *trans*, la expresión genética en bacterias. Esto abre la posibilidad de disminuir la expresión de un gen específico sin necesidad de eliminarlo del cromosoma. Actualmente, es posible diseñar y sintetizar estos RNA pequeños de tal forma que hibriden en diferentes posiciones de la secuencia de un mRNA en particular. Con esta estrategia es posible regular la traducción del mRNA de diferentes genes sin modificar su secuencia en el cromosoma (Na et al., 2013). Esta estrategia tiene un gran potencial, ya que la capacidad de modular la expresión de genes en el cromosoma tiene ventajas sustanciales sobre las técnicas de eliminación cromosomal, sobre todo cuando se trata de genes esenciales para el crecimiento de las bacterias como es el caso de *fabI* (Baba et al., 2006; Na et al., 2013; Yoo, Na, & Lee, 2013).

IV.1 Metodología

IV.1.1 Plásmido para bloquear la traducción del mRNA del gen *fabI*

Con el objetivo de generar una cepa productora de pinosilvina con una mayor disponibilidad intracelular de malonil-CoA, se diseñó una estrategia para bloquear la traducción del mRNA del gen *fabI*. Ésta consiste en un RNA pequeño no codificante que hibrida de manera complementaria y antiparalela en un fragmento de 26 pb de la región no traducida al 5' (5' UTR) del RNA mensajero del gen *fabI* (figura 7). Dicha secuencia se clonó en el plásmido pMOS (GE Healthcare, antes Amersham Biosciences). La metodología para insertar la secuencia que bloquea la traducción del mRNA del gen *fabI* es similar a la que se usa para hacer mutagénesis sito dirigida. Para ésta se diseñaron dos oligonucleótidos que hibridan de forma divergente en el plásmido pMOS, en estos oligonucleótidos se incluyó la secuencia que se bloquea en el mRNA del gen *fabI*.

5' gca tca aca at aagga tta aag cta tg 3' 26pb
 3' cgt agt tgt ta t t c c t aat t tc gat ac 5' 26pb

Figura 7. Secuencia DNA a partir de la cual se transcribe un RNA pequeño diseñado para bloquear la traducción del mRNA de *fabI*. Se resalta en morado la secuencia de unión al ribosoma del gen *fabI* y en rojo la secuencia de DNA a partir de la cual se transcribe la secuencia del RNA pequeño con la que hibrida.

Posteriormente se amplificó el plásmido completo con estos oligonucleótidos. La mezcla de reacción de PCR fue digerida con la enzima DpnI para eliminar el DNA metilado. El plásmido lineal que se generó en la reacción de PCR se corrió en un gel de agarosa, se cortó y se purificó con el Gel extraction kit de Fermentas de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En esta construcción también se incluyó el gen *tetR* que codifica para el represor de la expresión del promotor *tet*. A partir del DNA plasmídico lineal se prepara una reacción de ligación para circularizar dicha molécula. Con esta reacción de ligación se transformaron células competentes de la cepa de *E. coli* MG1655. Después de la transformación, las células se cultivaron en un mL de LB líquido sin antibiótico por una h.

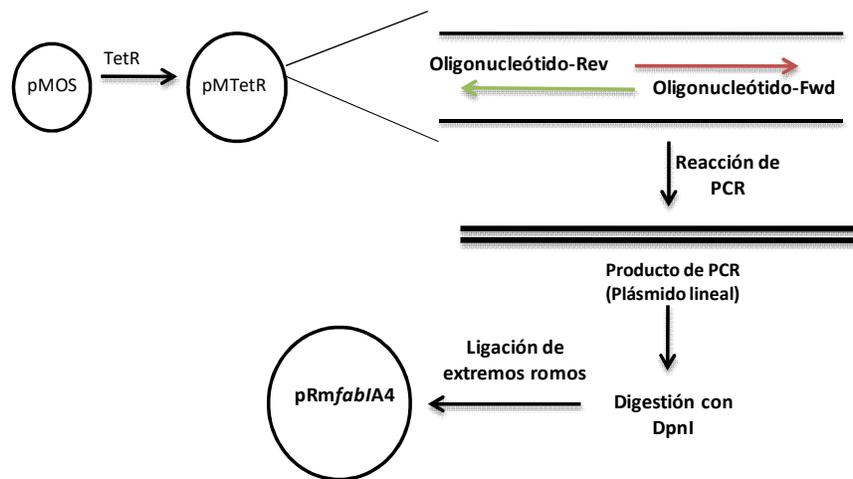


Figura 8. Metodología general para clonar secuencias pequeñas mediante una reacción de PCR.

Posteriormente se esparcieron 100 μ L de estas células en una caja de petri con medio LB Cb 100 y se dejaron incubando por 14 h a 37 °C. Una vez obtenidas las colonias en la caja de petri se seleccionaron 4 candidatas al azar y se les extrajo el DNA plasmídico por el método de lisis alcalina (Birnboim & Doly 1979). Finalmente se secuenció (Unidad de síntesis y secuenciación de DNA IBt-UNAM) una de las candidatas para confirmar que el RNA pequeño no codificante tenía la secuencia que fue diseñada para hibridar con el mRNA del gen *fabI*. A la molécula de RNA pequeño no codificante que bloquea la traducción del mRNA se le nombró **RNAnc*fabI*** (figura 7). Por otro lado, la construcción anterior fue digerida con la enzima de restricción BsmAI, la cual tiene dos sitios de corte dentro de la secuencia del gen que codifica para la β -lactamasa y en dicho corte se insertó el casete de resistencia kanamicina. Generándose así un plásmido derivado, que tiene clonado el RNAnc*fabI*, pero con resistencia a Km. Una vez obtenidos estos plásmidos se inició la caracterización de la expresión del RNAnc*fabI* sobre la velocidad de crecimiento y la producción de pinosilvina en *E. coli*.

IV.1.2 Efecto del anhidro-tetraciclina sobre el crecimiento de *Escherichia coli*

El **anhidro-tetraciclina (AnTc)** es un análogo de la tetraciclina y es el inductor del promotor *tet*, por lo que se determinó si este compuesto tiene algún efecto antibiótico sobre *E. coli*. Para dicho fin se hicieron cinéticas de crecimiento con la cepa W3110 en medio LB y en medio M9 con GLC 10 g/L como fuente de carbono. En ambos casos se utilizó el inductor **anhidro tetraciclina 5 ng/mL (AnTc 0.05)**.

Los cultivos en LB se iniciaron en tubo de ensayo de 16 x 150 mm con 3 mL de LB Cb 100 a 37 °C y 300 rpm durante 12 h. A partir de este tubo se inocularon dos matraces con deflectores de 250 mL que contenían 50 mL de medio LB fresco a una densidad óptica de 0.1 (D.O. 600 nm) en ambos casos. Solo a uno de estos matraces se le agregó AnTc 0.05 en el tiempo cero de la cinética, se incubaron a

37 °C y 300 rpm. Se monitoreó el aumento de la biomasa celular midiendo la D.O. durante 16 h.

Las pruebas en M9 GLC 10 g/L se iniciaron en un tubo de ensayo de 16 x 150 mm con 3 mL de LB Cb 100 a 37 °C y 300 rpm durante 12 h. A partir de este tubo se inoculó un matraz con deflectores de 250 mL que contenía 50 mL de medio M9 GLC 10 g/L fresco y Cb 100 a una densidad óptica de 0.1 (D.O. 600 nm), este matraz se incubó a 37 °C y 300 rpm durante 12 h. A partir de éste, se inocularon dos matraces con deflectores de 250 mL que contenían 50 mL de medio M9 GLC 10 g/L fresco y Cb 100 a una densidad óptica de 0.1 (D.O. 600 nm) en ambos casos. Solo a uno de estos matraces se le agregó AnTc 0.05 en el tiempo cero. Estos matraces se incubaron a 37 °C y 300 rpm y se monitoreó el aumento de la biomasa celular midiendo la D.O. durante 16 h. Para confirmar la reproducibilidad de los resultados se hicieron al menos tres experimentos independientes.

IV.1.3 Efecto de expresar el RNAn*cfabI* sobre el crecimiento de *Escherichia coli*

Se caracterizó el efecto de la expresión del RNAn*cfabI* sobre la velocidad específica de crecimiento de *E. coli*. Para esto se transformó la cepa W3110 con el plásmido pRm*fabIA4*, posteriormente con la cepa W3110/pRm*fabIA4* se hicieron cultivos en medio LB y medio M9 con GLC 10 g/L. En ambos medios se usó **Carbenicilina 100 µg/mL (Cb 100)** para mantener el plásmido en todos los casos y AnTc 0.05 se usó solo en los casos que se indica.

Las pruebas en LB se iniciaron en tubos de ensayo de 16 x 150 mm con 3 mL de LB Cb 100 a 37 °C y 300 rpm durante 12 h. A partir de este tubo se inocularon dos matraces con deflectores de 250 mL que contenían 50 mL de medio LB fresco a una densidad óptica de 0.1 (D.O. 600 nm) en ambos casos. A uno de los matraces se le agregó AnTc 0.05 en el tiempo cero y al otro no. Posteriormente éstos se

incubaron a 37 °C y 300 rpm durante 16 h y se monitoreó el aumento de la biomasa celular midiendo la D.O.

Las pruebas en M9 GLC 10 g/L se iniciaron en tubos de ensayo de 16 x 150 mm con 3 mL de LB Cb 100 a 37 °C y 300 rpm durante 12 h. A partir de este tubo se inoculó un matraz con deflectores de 250 mL que contenía 50 mL de medio M9 GLC 10 g/L y Cb 100, este cultivo se inició a una densidad óptica de 0.1 (D.O. 600 nm). Este matraz se incubó a 37 °C y 300 rpm durante 12 h y a partir de éste se inocularon dos matraces con deflectores de 250 mL que contenían 50 mL de medio M9 GLC 10 g/L y Cb 100. Estos cultivos se iniciaron a una densidad óptica de 0.1 (D.O. 600 nm). A uno de los matraces se le agregó AnTc 0.05 en el tiempo cero y al otro no, éstos se incubaron a 37 °C y 300 rpm durante 16 h, durante este tiempo se monitoreó el aumento de la biomasa celular midiendo la D.O.

Para confirmar la reproducibilidad de los resultados se hicieron al menos tres experimentos independientes de los cultivos en ambos medios.

IV.1.4 Efecto de la expresión del RNAn*cfabI* sobre la producción de pinosilvina en *Escherichia coli*

Para caracterizar el efecto la expresión del RNAn*cfabI* sobre la producción de pinosilvina en *E. coli* se transformó la cepa W3110 con el plásmido pA4Km y con el plásmido pSc4CL_(M)VvSTS y posteriormente se hicieron cultivos de producción de pinosilvina con la cepa obtenida la cual se nombró W3110/pA4Km/pSc4CL_(M)VvSTS. Estos cultivos se llevaron a cabo en medio LB GLY 10 g/L y ac. cinámico 3 mM. Las cinéticas de producción se iniciaron en tubos de ensayo de 16 x 150 mm con 3 mL de LB, Cb 100 y **Kanamicina 30 µg/mL (Km 30)** a 37 °C y 300 rpm durante 12 h. A partir de este tubo se inoculó un matraz con deflectores de 250 mL que contenían 50 mL de medio LB GLY 10 g/L, ac. cinámico 3 mM, Cb 100 y Km 30. Estos cultivos se iniciaron a 0.1 D.O., los matraces se incubaron a 30 °C y 300 rpm y una vez que los cultivos

alcanzaron una D.O. de 0.8 se agregó IPTG a una concentración final de 0.5 mM en ambos matraces, pero solo a uno de ellos se le agregó AnTc 0.05 para inducir la expresión del RNAn $cfabI$. 20 h después de la inducción de la expresión de las enzimas de la ruta de producción de pinosilvina y del RNAn $cfabI$ se cosecharon 0.1 mL del cultivo para medir la D.O. y 0.5 mL para medir la concentración de pinosilvina. Los cálculos de los rendimientos producto/biomasa se hicieron multiplicando los valores de densidad óptica de por el factor 0.37 **gramos de peso celular seco sobre L (gpcs/L)** (Hernández-Montalvo et al., 2003), con lo que se obtuvo la cantidad de biomasa en gpcs/L. Posteriormente se dividió el título de producción del respectivo estilbena entre la biomasa en g/L por la biomasa en gpcs/L y se obtuvo el $Y_{\text{producto/biomasa}}$.

Para confirmar la reproducibilidad de los resultados se hicieron al menos tres experimentos independientes de los cultivos.

IV.1.5 Extracción y cuantificación de la pinosilvina

La extracción de pinosilvina se hizo inmediatamente después de tomar la alícuota de medio de cultivo. A la alícuota del cultivo contenida en un micro tubo de 1.5 mL se le agregó un volumen igual de acetato de etilo, se le dio vortex intenso por 30 s. Posteriormente se centrifugó a máxima velocidad en una microcentrífuga por 2 min para separar las fases y se pipetearon 200 μL de la fase orgánica a un micro tubo limpio. La fase orgánica se evaporó en una microcentrífuga con vacío y la pastilla formada se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de ser cuantificada.

La cuantificación de las muestras se hizo mediante **cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)**. La pastilla obtenida fue resuspendida en 400 μL de metanol grado HPLC e inyectada en un equipo 1100 system Agilent Technologies, Palo Alto, CA. Se utilizó una columna Synergy Hydro C_{18} 4 μm de 4.6 x 150 mm d fase reversa adquirida de Phenomenex, Torrance, CA. El método de corrida fue un gradiente de 20, 40, 60, 80 y 100 % de acetonitrilo-agua ac. trifluoroacético 0.1 %

como fase móvil a un flujo de 0.5 mL/min. La detección de la pinosilvina se llevó a cabo con un detector de ultravioleta y arreglo de diodos a una $\lambda = 306$ nm. La pinosilvina (98 % de pureza) que se utilizó para preparar la curva estándar con la que se cuantificaron las muestras se compró a Sigma Aldrich.

IV.2 Resultados

IV.2.1 Plásmido para bloquear la traducción del mRNA del gen *fabI*

El RNAn*cfabI* clonado en el plásmido pRm*fabI*A4 hibrida de manera complementaria y antiparalela en un fragmento del 5' UTR que incluye la secuencia del sitio de unión al ribosoma (RBS) del mRNA del gen *fabI* (figura 7). La unidad transcripcional de la que forma parte el RNAn*cfabI* está constituida por el sitio operador *tet* O1, el promotor *tet*, una secuencia de 28 pb que se transcribe para dar lugar al RNAn*cfabI* (figura 7) y un terminador transcripcional intrínseco. En una unidad transcripcional independiente se encuentra el gen que codifica para el regulador TetR, el cual se expresa de manera constitutiva, y se une al sitio operador *tet* O1 evitando la transcripción del RNAn*cfabI*.

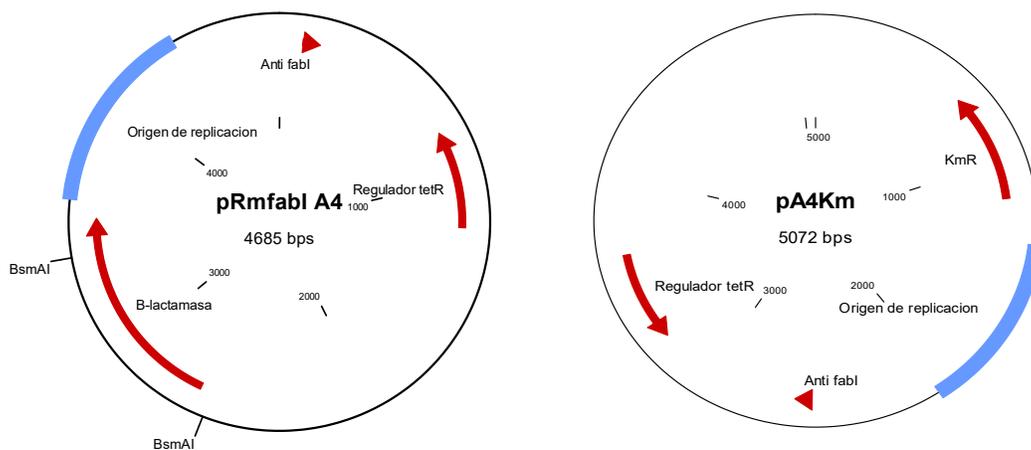


Figura 9. Plásmidos que tienen clonado un RNA pequeño no codificante que bloquea la traducción del RNAm del gen *fabI* en *Escherichia coli*.

El plásmido pRm*fabI*A4 es derivado del plásmido de clonación pMOS (GE Healthcare, antes Amersham Biosciences), por lo que tiene resistencia a ampicilina. El segundo plásmido que se generó para bloquear la traducción del mRNA del gen *fabI* es el pA4Km (figura 9); este plásmido contiene los mismo elementos que el plásmido pRm*fabI*A4, pero tiene resistencia a Km y no a Amp (figura 9).

IV.2.1 Efecto del anhidro-tetraciclina sobre el crecimiento de *Escherichia coli*

El AnTc 0.05 no disminuye la velocidad específica de crecimiento de la cepa de *E. coli* W3110. En la figura 10 se muestran las cinéticas de crecimiento de la cepa W3110 en medio LB y en medio M9 GLC 10 g/L.

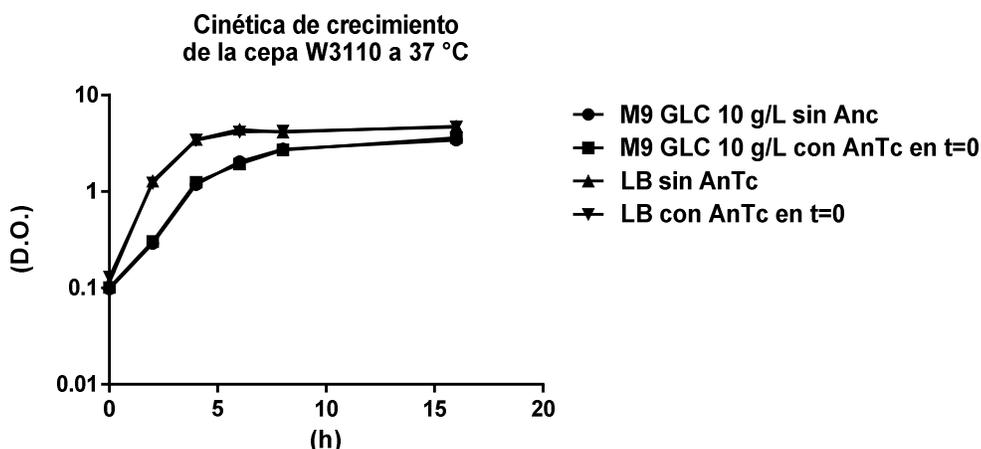


Figura 10. Caracterización del efecto del inductor AnTc sobre la velocidad específica de crecimiento de la cepa W3110 en medio LB y M9 GLC 10 g/L. Todas las curvas representan el aumento en la biomasa de la cepa silvestre W3110. En la curva con los círculos sólidos se usó M9 GLC 10 g/L y no se agregó AnTc al medio. En la curva con los cuadrados sólidos se usó M9 GLC 10 g/L y sí se agregó AnTc. En la curva con los triángulos se utilizó LB y no se agregó AnTc. En la curva con los triángulos sólidos invertidos se utilizó LB y sí se agregó AnTc.

Las curvas se empalman una sobre otra en los dos medios de cultivo que se utilizaron, lo cual indica que la velocidad de crecimiento de la cepa W3110 es la misma cuando se agrega AnTc al medio de cultivo que cuando no se agrega, lo

que indica que la velocidad de crecimiento es la misma en ambos casos (figura 10).

IV.2.2 Efecto de expresar el RNAn*cfabI* sobre el crecimiento de *Escherichia coli*

La expresión del RNAn*cfabI* retrasa el inicio de la fase exponencial de crecimiento de *E. coli* tanto en medio LB como en medio M9 GLC 10 g/L. En la figura 11 se muestran los cultivos de la cepa W3110/pRm*fabI*A4 en LB, mientras que en la figura 12 se muestran los cultivos de la cepa W3110/pRm*fabI*A4 en M9 GLC 10 g/L.

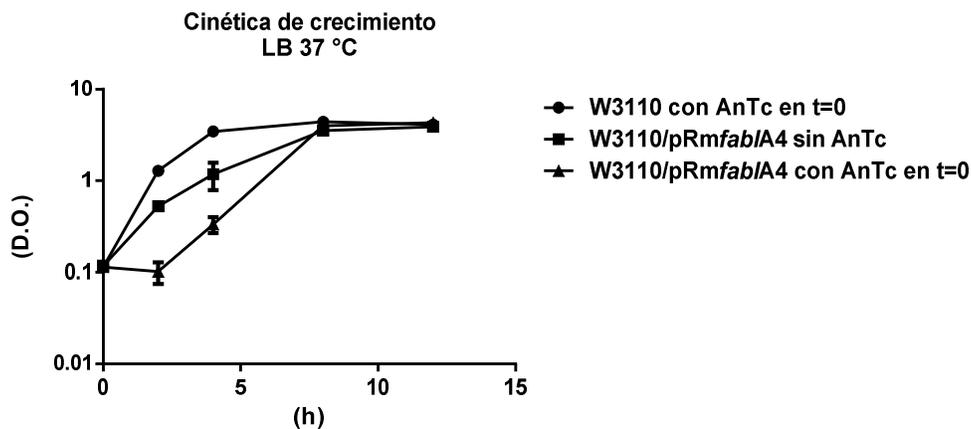


Figura 11. Efecto de la expresión del RNAn*cfabI* sobre la velocidad específica de crecimiento de *E. coli* en LB. La curva con círculos sólidos representa el crecimiento de la cepa W3110 sin plásmido con AnTc 0.05. La curva con los cuadrados sólidos representa el crecimiento de la cepa W3110/pRm*fabI*A4 en la condición de cultivo en la que no se indujo la expresión del RNAn*cfabI*. La curva con los triángulos sólidos muestra el crecimiento de la cepa W3110/pRm*fabI*A4 en la condición de cultivo en la que se indujo la expresión del RNAn*cfabI* en el tiempo cero de la cinética.

La cepa W3110/pRm*fabI*A4 crece más lento que la cepa W3110 a la que se le agregó AnTc 0.05 (figura 11), esta disminución en el crecimiento se debe a la carga metabólica impuesta por el plásmido pRm*fabI*A4. En la figura 11 se compara

el crecimiento de la cepa W3110/pRm*fab*/A4 en la condición en la que se agregó AnTc con la condición en la que no se agregó. Se observa que la cepa W3110/pRm*fab*/A4 tardó dos horas más en entrar a la fase exponencial de crecimiento en la condición en la que se agregó el inductor comparada con la condición en la que no se agregó dicho compuesto (figura 11).

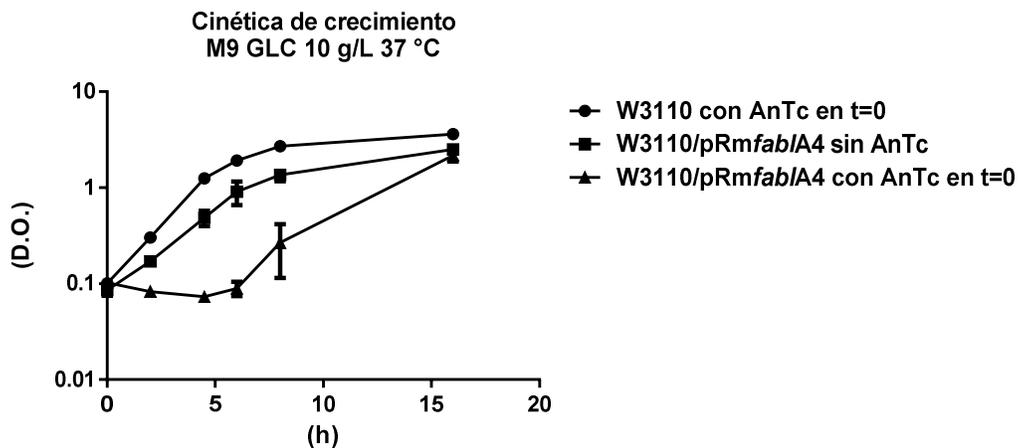


Figura 12. Caracterización del efecto de la expresión del RNAnc sobre la velocidad específica de crecimiento en *E. coli* en medio M9 GLC 10 g/L. En la curva con círculos sólidos se observa el crecimiento de la cepa W3110, a este cultivo se le agregó AnTc 0.05 en el tiempo cero de la cinética. En la curva con los cuadros sólidos se observa el crecimiento de la cepa W3110/pRm*fab*/A4 en la condición de cultivo en la que no se indujo la expresión del RNAnc*fab*. La curva con los triángulos sólidos representa el crecimiento de la cepa W3110/pRm*fab*/A4 en la condición de cultivo en la que se indujo la expresión del RNAnc*fab* en el tiempo cero de la cinética.

De la misma forma que en medio LB; se observa una disminución en el crecimiento entre la cepa silvestre y la cepa W3110/pRm*fab*/A4 en la condición en la que no se agregó el inductor, esta diferencia se debe a la carga metabólica impuesta por el plásmido pRm*fab*/A4 (figura 12). Al comparar el crecimiento de la cepa W3110/pRm*fab*/A4 en las dos condiciones de cultivo, se observa que tardó seis horas más en entrar a la fase exponencial de crecimiento en la condición en la que se añadió AnTc al medio de cultivo (figura 12).

Dado que el gen *fabI* es esencial para el crecimiento celular, esta fase lag sugiere que el RNAn*cfabI* está bloqueando la traducción del mRNA del gen *fabI* en los medios de cultivos que se probaron en este trabajo (figuras 11 y 12).

IV.2.3 Efecto de la expresión del RNAn*cfabI* sobre la producción de pinosilvina en *Escherichia coli*

La expresión del RNAn*cfabI* aumenta el título de producción de pinosilvina en *E. coli* en medio LB GLY 10 g/L ac. cinámico 3mM. En la figura 13 se muestran los títulos de producción de pinosilvina alcanzados con la cepa W3110/pA4Km/pSc4CL_(M)VvSTS. En la condición en la que se induce la expresión del RNAn*cfabI*, la cepa W3110/pA4Km/pSc4CL_(M)VvSTS alcanzó un título de 0.380 ± 0.028 mg/L (figura 13) y una biomasa promedio de 6.453 ± 0.414 D.O. Mientras que en la condición en la que no se induce la expresión del RNAn*cfabI*, la cepa W3110/pA4Km/pSc4CL_(M)VvSTS alcanzó un título de producción de pinosilvina de 0.304 ± 0.035 mg/L (figura 13) y una biomasa promedio de 6.200 ± 0.360 D.O.

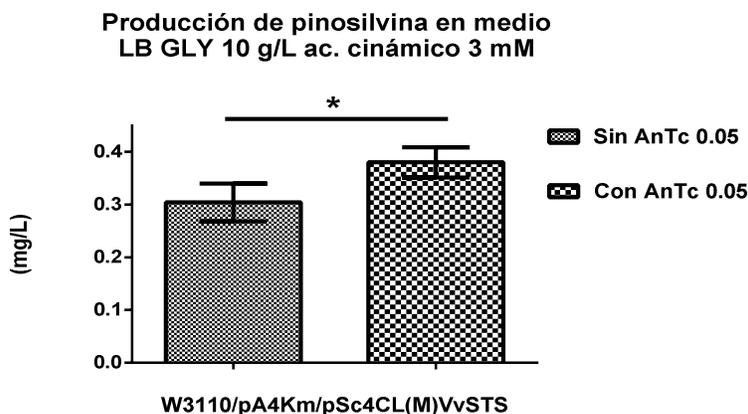


Figura 13. Efecto de la expresión del RNAn*cfabI* sobre la producción de pinosilvina en LB GLY 10 g/L ac. cinámico 3 mM. La barra con cuadros representa el título de producción de pinosilvina en la condición de cultivo en la que se induce la expresión del RNAn*cfabI*. La barra punteada simboliza la condición en la que no se induce la expresión del RNAn*cfabI*. La línea horizontal sobre las barras indica que los promedios y las desviaciones estándar de los datos de dicho par de barras fueron utilizados en un análisis de t de student individual. * Indica que $0.05 > p \geq 0.01$.

Existe una diferencia de 0.076 mg/L de pinosilvina en la condición entre la condición en la que se expresa y la condición en la que no se expresa el *RNAncfabI*. Mediante una prueba de t de student se calculó un valor de p de 0.045, de acuerdo con este valor la diferencia entre los títulos de producción de pinosilvina es estadísticamente significativa.

Dado que la biomasa alcanzada por la cepa en cada una de las condiciones afecta directamente el título de producción de pinosilvina, es necesario usar otro parámetro para determinar si la expresión del *RNAncfabI* está aumentando la producción de pinosilvina, y descartar que la diferencia en los títulos de producción sea un efecto provocado por la diferencia en la biomasa alcanzada en cada una de las condiciones de cultivo. El parámetro que se utilizó fue el **rendimiento producto/biomasa ($Y_{\text{pino/gpcs}}$)**, el cual expresa los mg de pinosilvina producidos por **g de peso celular seco (gpcs)**.

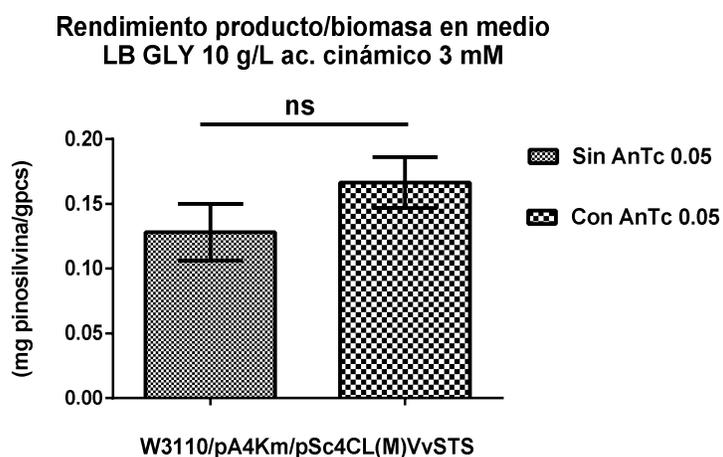


Figura 14. Efecto de la expresión del *RNAncfabI* sobre el rendimiento producto/biomasa. $Y_{\text{pino/gpcs}}$ de la cepa W3110/pA4Km/pSc4CL_(M)VvSTS en medio LB GLY 10 g/L ac. cinámico 3 mM. La barra con cuadros representa la condición en la que se indujo la expresión del *RNAncfabI*. La barra punteada corresponde a la condición en la que no se indujo la expresión del *RNAncfabI*. La línea horizontal sobre las barras indica que los promedios y las desviaciones estándar de los datos de dicho para de barras fueron utilizados en un análisis de t de student individual. ns significa que las diferencias entre estos promedios no son estadísticamente significativas.

La expresión del RNAn*cfabI* no aumenta el $Y_{\text{pino/gpcs}}$ en *E. coli* en medio LB GLY 10 g/L ac. cinámico 3mM. En la figura 14 se comparan los $Y_{\text{pino/gpcs}}$ que alcanzó la cepa W3110/pA4Km/pSc4CL_(M)VvSTS en cada una de las condiciones de cultivo (los cálculos de los rendimientos se describen en el anexo A). En la condición en la que se indujo la expresión del RNAn*cfabI* se calculó un $Y_{\text{pino/gpcs}}$ de 0.16 ± 0.019 mg pino/gpcs. En la condición en la que no se indujo la expresión del RNAn*cfabI* se alcanzó un $Y_{\text{pino/gpcs}}$ de 0.12 ± 0.021 mg pino/gpcs (figura 14).

La diferencia entre los $Y_{\text{pino/gpcs}}$ es de 0.04 mg de pino/gpcs. Para esta diferencia se calculó un valor de p de 0.088, lo que indica que dicha diferencia no es estadísticamente significativa.

IV.3 Discusión

El AnTc no tiene efecto antibiótico sobre la cepa W3110 de *E. coli*; como se observa en la figura 10, la curva de crecimiento en la condición en la que se agrega AnTc 0.05 al medio de cultivo tiene el mismo perfil que la curva de la condición en la que no se agregó AnTc al medio.

Los resultados de la caracterización del efecto de la expresión del RNAn*cfabI* sobre la velocidad de crecimiento (apartado 4.2.1) sugieren que éste está bloqueando la traducción del mRNA del gen *fabI*, ya que se observa un retraso en el inicio de la fase exponencial del crecimiento. De la misma forma, el aumento en el título de producción que se alcanzó al expresar el RNAn*cfabI* indica que el RNAn*c* está bloqueando la traducción del mRNA del gen *fabI*, lo que se traduce en aumento en la producción de pinosilvina. Sin embargo, la diferencia en los $Y_{\text{pino/gpcs}}$ calculados no es significativa. Lo anterior sugiere fuertemente que la diferencia que se observa en los títulos de producción se debe a que la cepa W3110/pA4Km/pSc4CL_(M)VvSTS alcanza una biomasa más alta en la condición en la que se expresa el RNAn*c/fabI* y no a la expresión del RNAn*cfabI*. De lo anterior se puede concluir que la estrategia tal como se diseñó en este trabajo no está

funcionando, sin embargo, otras estrategias de bloqueo de la traducción del mRNA del gen *fabI* pueden tener un efecto positivo sobre la producción de pinosilvina.

V. Eliminación de la región intergénica y el hexámero -35 del gen *fabI* en *Escherichia coli*

El gen *fabI* es esencial para el crecimiento celular de *E. coli*, por lo que no puede ser eliminado del cromosoma. Sin embargo, la metodología reportada por Datsenko and Wanner en el año 2000 puede utilizarse para eliminar regiones cromosomales intergénicas, reguladoras, marcos de lectura o terminadoras. Esto abre la posibilidad de eliminar las regiones de DNA que controlan la transcripción de los genes. Con este tipo de estrategias se puede disminuir la eficiencia con la que la RNA polimerasa se une a dichas regiones, lo que puede resultar en un decremento en la transcripción de los genes. En este capítulo se muestra el diseño y la implementación de una estrategia para eliminar la región intergénica y el hexámero -35 del gen *fabI*. Posteriormente se presenta la caracterización del efecto de la mutación sobre la transcripción de *fabI*. Finalmente se presenta la caracterización del efecto de esta mutación sobre la producción de pinosilvina.

V.1 Metodología

V.1.1 Eliminación de la región intergénica y del hexámero -35 de la región promotora del gen *fabI* de una cepa de *Escherichia coli*

Para eliminar la región intergénica y el elemento -35 de la región promotora del gen *fabI*, se siguió la metodología descrita por Datsenko & Wanner en el año 2000. Solo se modificaron la mezcla (tabla 6) y las condiciones de la reacción (tabla 7) para obtener el producto de PCR para hacer la eliminación. Esto se debe a que se usó una polimerasa diferente (tabla 6). Para obtener el producto de PCR se diseñaron los oligonucleótidos -35*fabI*-F y -35*fabI*-R (tabla 3). El extremo 5' del oligonucleótido -35*fabI*-F tiene 50 nucleótidos de homología con los nucleótidos del 3' de la secuencia del gen *ycjD*, empalmado justamente hasta el codón de paro de la traducción (figura 15). El extremo 3' de este iniciador tiene 20

nucleótidos de homología con la secuencia P1 del plásmido pKD3 para amplificar la secuencia FRT y el casete de resistencia a cloranfenicol (figura 15).

El extremo 5' del oligonucleótido -35*fabI*-R tiene 50 nucleótidos de homología con los nucleótidos del 5' de la secuencia del marco de lectura y con la región 5' no traducida del gen *fabI*, terminando el empalme justamente en el nucleótido -32 de la región promotora, es decir, no se incluye ni una sola base del elemento -35 en el diseño de este oligonucleótido (figura 15). El extremo 3' de este iniciador tiene 20 nucleótidos de homología con la secuencia P2 del plásmido pKD3 para amplificar la secuencia FRT y el casete de resistencia a cloranfenicol (figura 15).

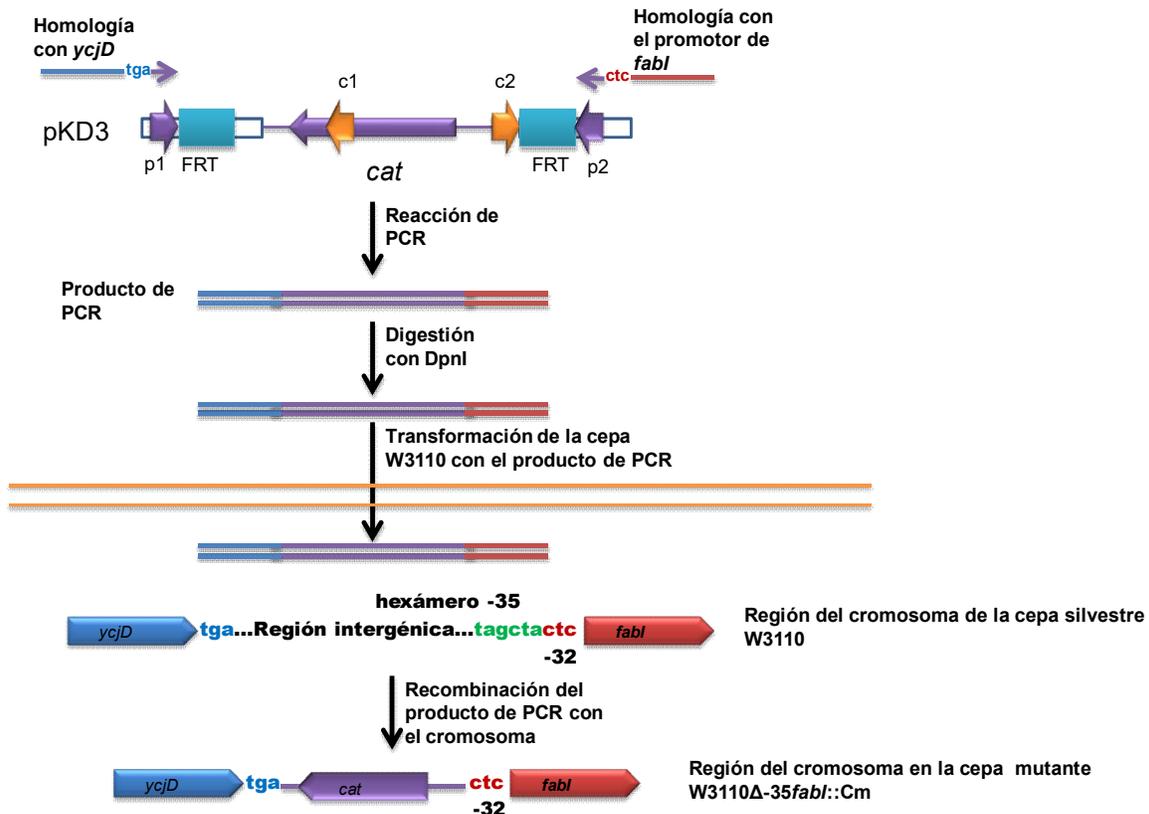


Figura 15. Esquema de la estrategia de eliminación de la región intergénica y del hexámero -35 de la región promotora del gen *fabI*.

Se preparó la mezcla descrita en la tabla 6 multiplicada por 4 para obtener aproximadamente 6 µg de DNA y al final de los pasos de purificación tener

suficiente DNA para poder transformar la cepa *E. coli* W3110 con 2 µg de DNA. El producto de PCR se digirió con la enzima DpnI a 37 °C durante una h. Posteriormente el DNA de la reacción se purificó a partir de un gel de agarosa estos fueron purificados con el kit GeneJET Gel Extracción Kit de la compañía Thermo Scientific siguiendo las recomendaciones del fabricante. Con este DNA se transformaron células competentes de la cepa de *E. coli* W3110 mediante electroporación. Después de la transformación, las células se dejaron recuperando en 1 mL de medio LB sin antibiótico por cuatro horas. Posteriormente se esparció todo el volumen de este medio rico en cajas de petri con medio LB más **Cloranfenicol 30 µg/mL (Cm 30)** y se dejaron incubando por 36 h a 37 °C.

Tabla 6. Mezcla de reacción para generar el producto de PCR para eliminar la región promotora del gen *fabI*

Componente de la mezcla	Volumen
Agua mQ	34.5 µL
10 X buffer con MgSO ₄	5 µL (10%)
Mezcla de dNTPs 10 mM	1 µL (0.2 mM)
Oligonucleótido -35 <i>fabI</i> -F (10 pmol/µL)	1 µL (0.2 µM)
Oligonucleótido -35 <i>fabI</i> -R (10 pmol/µL)	1 µL (0.2 µM)
Plásmido templado pKD3 (1.5 ng/µL)	2 µL (3 ng)
DMSO	5 µL (10 %)
<i>Pfu</i> DNA polimerasa (2.5 U/µL)	0.5 µL (1.25 U)
Volumen total	50 µL

Después de las 36 h, se picaron todas las colonias obtenidas con palillos estériles, se mezclaron las células de 10 clonas en tubos con 100 µL de agua estéril. Estas mezclas se usaron como templados para hacer PCR de colonia y con esto determinar si en alguna clona se había logrado la eliminación del elemento -35 (tablas 8 y 9). Cuando una de estas mezclas de colonias dio un producto de PCR positivo, se tomaron las colonias individuales y se les extrajo el DNA por el método

de ebullición y se repitió el PCR como se describe a continuación. Para confirmar la eliminación del hexámero -35 del promotor del gen *fabI* en las candidatas separadas, amplificamos las regiones al 5' del gen *fabI* y el 3' del gen *ycjD* para verificar la inserción del casete de Cm en la orientación correcta.

Tabla 7. Condiciones de reacción del PCR para eliminar la región promotora del gen *fabI*

Etapas de la reacción	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3	1
Desnaturalización	95	0.5	30
Alineamiento	61	1	
Extensión	68	4	
Extensión final	68	7	1

Para amplificar estas regiones se prepararon las dos mezclas de reacción que se describen en las tablas 8 y 9. El DNA se extrajo a partir de un cultivo saturado en medio LB, se tomaron 1.5 mL de este cultivo se centrifugaron en una microcentrífuga a máxima velocidad por 2 min, se tiró el sobrenadante y a la pastilla celular se le agregaron 200 µL de agua mQ.

Tabla 8. Mezcla de reacción para amplificar la región *ycjD*-Cm

Componente de la mezcla	Volumen
Agua mQ	39.5 µL
10X buffer con MgSO₄	5 µL (10%)
Mezcla de dNTPs 10mM	1 µL (0.2 mM)
Oligonucleótido <i>ycjD</i>-F (10 pmol/ µL)	1 µL (0.2 µM)
Oligonucleótido c1-R (10 pmol/ µL)	1 µL (0.2 µM)
DNA templado de la cepa W3110 Δ-35<i>fabI</i>::Cm	2 µL
<i>Pfu</i> DNA polimerasa (2.5 U/ µL)	0.5 µL (1.25 U)
Volumen total	50 µL

Posteriormente éste se puso en un baño de agua a ebullición por 10 min. Después de los 10 min de ebullición se centrifugó en una microcentrífuga a máxima velocidad por 2 min. Del sobrenadante se pipetearon 20 µL a un tubo nuevo que contenía 180 µL de agua mQ y éste se usó para la amplificación de las regiones ya mencionadas. Como control de este experimento se usó el DNA de la cepa silvestre W3110.

Componente de la mezcla	Volumen
Agua mQ	39.5 µL
10X buffer con MgSO₄	5 µL (10%)
Mezcla de dNTPs 10mM	1 µL (0.2 mM)
Oligonucleótido c2-F (10 pmol/ µL)	1 µL (0.2 µM)
Oligonucleótido <i>fabI</i>-R (10 pmol/ µL)	1 µL (0.2 µM)
DNA templado de la cepa W3110Δ-35<i>fabI</i>::Cm	2 µL
<i>Pfu</i> DNA polimerasa (2.5 U/ µL)	0.5 µL (1.25 U)
Volumen total	50 µL

Finalmente los productos obtenidos de la cepa mutante se cargaron en un gel de agarosa preparativo y se cortaron las bandas correspondientes a 450 pb y de 780 pb, estos fueron purificados con el kit GeneJET Gel Extracción Kit de la compañía Thermo Scientific siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez obtenidos estos productos de PCR se secuenciaron (Unidad de síntesis y secuenciación de DNA del IBt-UNAM).

V.1.2 Efecto de la eliminación de la región intergénica y del hexámero -35 del promotor del gen *fabI* sobre la transcripción de genes que codifican para enzimas del metabolismo de lípidos en *Escherichia coli*

Para determinar si la eliminación de la región intergénica y del hexámero -35 del gen *fabI* disminuye el nivel de transcripción de dicho gen y/o de otros genes que codifican para las enzimas del metabolismo de lípidos, se hicieron análisis de RT-

qPCR. Para preparar el cDNA templado para estos análisis se hicieron cultivos en M9 GLC 10 g/L. Los cultivos se iniciaron en tubos de ensayo de 16 x 150 mm con 3 mL de LB Cm 30 (el Cm 30 lo usamos únicamente para la cepa mutante) a 37 °C y 300 rpm durante 12 h. A partir de este tubo se inoculó un matraz con deflectores de 250 mL que contenía 50 mL de medio M9 GLC 10 g/L fresco sin antibiótico a 0.1 D.O., éste se incubó a 37 °C y 300 rpm durante 12 h. A partir de este cultivo se inoculó otro matraz con deflectores de 250 mL que contenía 50 mL de medio M9 GLC 10 g/L fresco sin antibiótico a 0.1 D.O. y se incubó a 37 °C y 300 rpm.

Las cepas que se cultivaron en M9 GLC 10 g/L se cosecharon cuando alcanzaron 1 D.O. en un tubo cónico estéril se cosecharon 20 mL de medio de cultivo en condiciones asépticas, a las que se agregaron 0.4 mL del reactivo RNAlater (que protege la muestra de RNAsas). Este tubo se agitó mecánicamente con vortex, posteriormente se centrifugó a 5 000 rpm por 10 min, el sobrenadante fue desechado y la pastilla celular almacenada a -70 °C hasta el momento de la extracción de RNA total.

La extracción del RNA total se llevó a cabo por el método estándar de fenol caliente (Aguilar et al., 2015) y se cuantificó en un espectrofotómetro nanoDrop Thermo Scientific® para posteriormente sintetizar el cDNA a partir de éste. La síntesis del cDNA se realizó utilizando de 1 a 5 µg de RNA total con el kit RevertAid™ (Fermentas LifeSciences, USA) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Una vez sintetizado el DNAc se utilizó 1 ng por reacción para realizar los ensayos de RT-qPCR en ambas cepas (control y mutante).

Para determinar el nivel de transcripción de los genes de la biosíntesis de ácidos grasos y de fosfolípidos se prepararon reacciones de 10 µL con 1 ng de DNAc y el kit MAXima^R SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Fermentas LifeSciences, USA) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Una vez obtenidos los datos de fluorescencia que genera el equipo, se analizaron por el método de Livak *et al.*, 2001, en el que se usa la fórmula (1) para calcular los valores relativos de transcripción de estos genes.

$$2^{-\Delta\Delta CT} \quad (1)$$

Donde:

C_T . Ciclo umbral o límite. Es el valor de fluorescencia en el que el valor de la muestra se encuentra en la fase exponencial de la curva y supera al valor del ruido de fondo.

ΔCT . $C_{T,X} - C_{T,C}$. Es la diferencia entre los valores C_T del gen que se está analizando (X) respecto al gen calibrador (gen de referencia) (C). Este dato permite corregir los errores en la cantidad de RNA mensajero, en este caso usamos el gen *ihfB*.

$\Delta\Delta CT$. $\Delta CT_X - \Delta CT_R$. Es la diferencia entre los valores de ΔCT calculados para el gen en la cepa mutante (X) respecto al valor del mismo gen en la cepa silvestre, al que se le asigna el valor de uno, a este valor se le denomina valor de normalización (R). En este caso comparamos cada gen de la cepa mutante contra su homólogo en la cepa silvestre.

Se calcularon los valores de los niveles de transcripción de genes que codifican para enzimas del metabolismo de lípidos de *E. coli*. Se presenta la desviación estándar de tres experimentos independientes y el valor p de una prueba t de student. Los valores de $p \leq 0.05$ indican que las diferencias en los niveles de transcripción de los genes de la cepa a la que se le eliminó la región intergénica y el hexámero -35 del gen *fabI* comparados con los de la cepa W3110 son estadísticamente significativas.

V.1.3 Efecto de la eliminación de la región intergénica y del hexámero -35 del promotor del gen *fabI* sobre la producción de pinosilvina en *Escherichia coli*

Para caracterizar el efecto de la eliminación de la región intergénica y del elemento -35 sobre la producción de pinosilvina en *E. coli* se utilizaron diferentes medios. Para estos cultivos, se transformaron las cepas W3110 Δ -35*fabI*::Cm y

W3110 con los plásmidos pSc4CL_(M)AhSTS y pSc4CL_(M)VvSTS. Con las cepas W3110 Δ -35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS y W3110/pSc4CL_(M)AhSTS se hicieron cultivos en medio LB GLC 10 g/L, LB **glicerol (GLY)** 10 g/L, M9 GLC 10 g/L y M9 GLY 10 g/L. Mientras que con las cepas W3110 Δ -35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)VvSTS y W3110/pSc4CL_(M)VvSTS solo se hicieron cultivos en medio LB GLY 10 g/L. En todos los medio se usó ac. cinámico 3 mM como segunda fuente de carbono.

Los cultivos en M9 GLC y M9 GLY se iniciaron en tubos de ensayo de 16 x 150 mm con 3 mL de LB Cb 100 y Cm 30 (únicamente para la cepa mutante) a 37 °C y 300 rpm durante 12 h. A partir de este tubo se inoculó un matraz con deflectores de 250 mL que contenían 50 mL de medio M9 GLC o M9 GLY fresco, ac. cinámico 3 mM y Cb 100 a una D.O. de 0.1. Se incubó a 37 °C y 300 rpm hasta que entraran en fase estacionaria temprana. A partir de este tubo se inoculó un matraz con deflectores de 250 mL que contenían 50 mL de medio M9 GLC o M9 GLY fresco, ac. cinámico 3 mM y Cb 100 a una D.O. de 0.1. Se incubó a 30 °C y 300 rpm, una vez que los cultivos alcanzaron una D.O. de 0.8 se agregó IPTG a una concentración final de 0.5 mM. 20 h después de la inducción se cosechó 0.1 mL del cultivo para medir la D.O. y 0.5 mL para extraer la pinosilvina.

Para los cultivos en LB GLC y LB GLY se inició en tubos de ensayo de 16 x 150 mm con 3 mL de LB Cb 100 y Cm 30 (únicamente para la cepa mutante) a 37 °C y 300 rpm durante 12 h. A partir de este tubo se inoculó un matraz con deflectores de 250 mL que contenían 50 mL de medio LB GLC o LB GLY fresco, ac. cinámico 3 mM y Cb 100 a una D.O. de 0.1. Se incubó a 30 °C y 300 rpm, una vez que los cultivos alcanzaron una D.O. de 0.8 se agregó IPTG a una concentración final de 0.5 mM. 20 h después de la inducción se cosecharon 0.1 mL del cultivo para medir la D.O. y 0.5 mL para cuantificar la pinosilvina.

Se calculó la desviación estándar de tres experimentos independientes y el valor p de una prueba t de student. Los valores de $p \leq 0.05$ indican que las diferencias en los niveles de transcripción de los genes de la cepa W3110 Δ -35*fabI*::Cm comparados con los de la cepa W3110 son estadísticamente significativas.

V.2 Resultados

V.2.1 Eliminación de la región intergénica y del hexámero -35 de la región promotora del gen *fabI* de una cepa de *Escherichia coli*

Se logró eliminar la región intergénica y el hexámero -35 del promotor del gen *fabI* la cepa silvestre de *E. coli* W3110, a la cepa mutante que se generó con esta mutación se le nombro W3110 Δ -35*fabI*::Cm. La cepa que se generó tiene insertado el casete de resistencia a Cm, esta secuencia está bordeada al 3' por el codón de paro de la transcripción del gen *ycjD* y al 5' por el nucleótido -32 del promotor del gen *fabI* (figura 16-B).

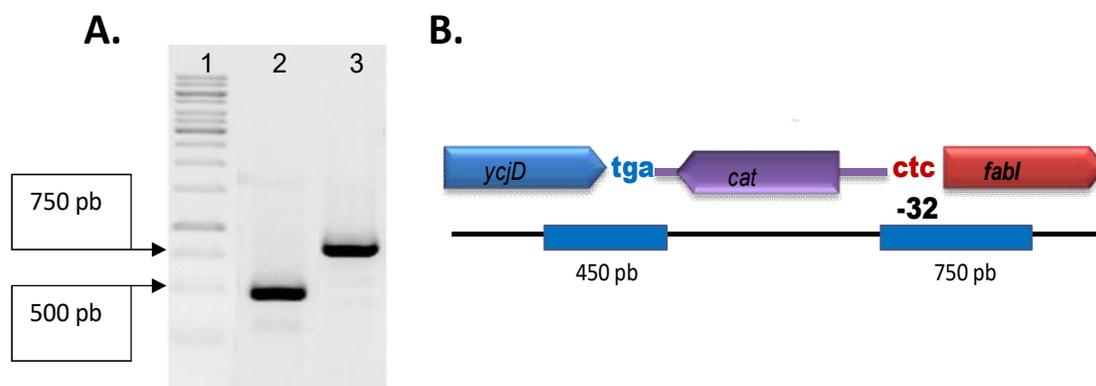


Figura 16. Comprobación de la eliminación de la región intergénica y el hexámero -35 del gen *fabI* en *Escherichia coli*. A. Gel de agarosa de las amplificaciones de las regiones *ycjD*-Cm (450 pb) y Cm-*fabI* (780 pb). B. esquema de las amplificaciones de las regiones *ycjD*-Cm (450 pb) y Cm-*fabI* (780 pb).

En la figura 16 se muestran los productos de PCR que confirman la eliminación de la región intergénica y del hexámero -35 de la región promotora del gen *fabI* y la integración del casete de Cm en dicha región del cromosoma de *E. coli*. Estos productos de PCR son de 450 pb (carril 2) y de 780 pb (carril 3) respectivamente (figura 16 A y B). Con la secuenciación de estos productos de PCR comprobó que la mutación de la región Cm-*fabI* ocurrió como fue diseñada (figura 17), es decir, la

transcripción del casete de Cm ocurre de forma divergente a la transcripción del gen *fabI* (se esquematiza en la figura 16-B). Lo anterior evita que la transcripción del casete de resistencia a Cm afecte la transcripción del gen *fabI*. No se generó ninguna mutación espontánea que modifique el resto de la secuencia del promotor, ni la secuencia del sitio de unión al ribosoma, ni se generó ningún cambio en la región 5' no traducida que pudiera alterar la transcripción del gen *fabI* (figura 17).

```

mutante -35      1318 acttttctagagaataggaacttcggaataggaactaaggaggatattcat
16324           6 w....sw-.....-.....-.....k.....k.....

mutante -35      1368 atgctcacagccaggttgattataataaccgtttatctgttcgtactggtt
16324           53 .....

mutante -35      1418 tactaaaacgacgaatcgctgattttcaggcacaacaagcatcaacaat
16324           103 .....s.....

mutante -35      1468 aaggattaaagctatgggttttctttccggttaagcgcattctggtaaccg
16324           153 .....

mutante -35      1518 gtgttgccagcaaaactatccatcgctacggatcgctcaggcgatgcac
16324           203 .....

mutante -35      1568 cgccaaggagctgaactggcattcacctaccagaacgacaaaactgaaagg
16324           253 .....

```

Figura 17. Comprobación de la eliminación del hexámero -35 de la región promotora del gen *fabI*. Se resalta en rojo el codón de inicio de la traducción así como el elemento -10 del promotor del gen *fabI*. Se resalta en verde una parte de la secuencia del casete de Cm, se resalta también en rojo un atg que reemplazó al elemento -35 del promotor del gen *fabI*.

V.2.2 Efecto de la eliminación de la región intergénica y del hexámero -35 del promotor del gen *fabI* sobre la transcripción de genes que codifican para enzimas del metabolismo de lípidos en *Escherichia coli*

El nivel de transcripción del gen *fabI* de la cepa W3110Δ-35*fabI*::Cm bajó 79 % respecto al nivel de transcripción del gen *fabI* de la cepa silvestre (figura 18). Esta

disminución indica que la eliminación de la región intergénica y del elemento -35 del promotor del gen *fabI* es una estrategia que permite disminuir la expresión de dicho gen. En este sentido, cabe destacar que Heath & Rock (1995) generaron una cepa de *E. coli* con una versión mutante del gen *fabI* que codifica para una enzima enoil-ACP reductasa que disminuye su actividad catalítica cuando se aumenta la temperatura de cultivo de la cepa, lo cual aumenta la poza intracelular de malonil-CoA.

De la misma forma, el nivel de transcripción del gen *birA* de la cepa W3110Δ-35*fabI*::Cm disminuye 49 % respecto a su homólogo en la cepa silvestre (figura 18). Este gen codifica para la enzima bifuncional BirA, ésta tiene la actividad biotín ligasa y a su vez actúa como represor transcripcional del operón de síntesis de biotina (Eisenberg, Prakash, & Hsiung, 1982). BirA cataliza la biotinilación de la proteína acarreadora de biotín-carboxilo (apoBCCP) a partir de la molécula biotinil-5'-adenilato (bio-5'-AMP). La apoBCCP tiene un papel central en el complejo enzimático acetil-CoA carboxilasa (ACC), ya que la apoCCP contiene un grupo prostético biotinil unido covalentemente a un residuo de lisina que es carboxilado en la primera parte de la reacción. En la segunda parte de la reacción el grupo carboxilo se transfiere a al acetil-CoA para formar el malonil-CoA (Sutton et al., 1977). La reacción catalizada por la ACC es esencial para la FAB ya que es propiamente la primer reacción y controla el flujo de carbono hacia dicha ruta (Broussard, Price, Laborde, & Waldrop, 2013). La enzima FabI está relacionada con esta ruta metabólica ya que participa en la elongación del 3cetoglutaryl-ACP-metil-ester a pimeloil-ACP-metil-ester, esta última molécula es el principal precursor de la síntesis de biotina (Lin, Hanson, & Cronan, 2010). Como ya se mencionó la biotina participa como cofactor en la reacción catalizada por la ACC (Sutton et al., 1977). En este sentido, el bio-5'-AMP también es el efector de la actividad de BirA como factor transcripcional, por lo que cuando baja la concentración de la proteína apoBCCP (y consecuentemente la demanda celular de biotina) se reprime la transcripción del operón de biotina (Beckett, 1998). El nivel de la transcripción del gen que codifica para la enzima AccD disminuye 48 % en la cepa W3110Δ-35*fabI*::Cm respecto a la cepa silvestre. Esta enzima es la

subunidad beta de la carboxil-transferasa, la cual forma parte del complejo enzimático ACC (Meades, Benson, Grove, & Waldrop, 2009). Se ha demostrado que la expresión de este gen está regulada por la velocidad de crecimiento (Lit & Cronan, 1993).

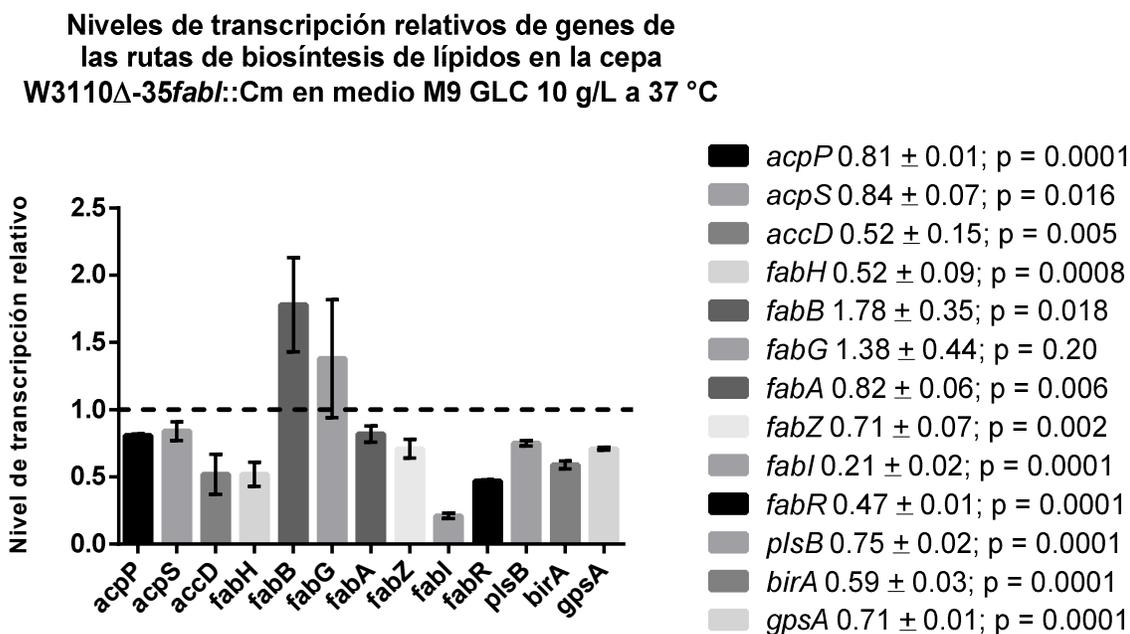


Figura 18. Niveles de transcripción de genes que codifican para enzimas del metabolismo de lípidos de la cepa W3110Δ-35*fabI*::Cm. El valor del nivel de transcripción de la cepa silvestre es uno en todos los casos y está representado por la línea punteada.

En la cepa W3110Δ-35*fabI*::Cm el nivel de la transcripción de los genes *acpP* y *acpS* disminuye 19 y 16 por ciento, respectivamente, comparados con sus homólogos en la cepa silvestre. El gen *acpP* codifica para la proteína acarreadora de acilo (ACP) en su forma apo, para que se forme la holoproteína de la ACP es necesario que se le transfiera un grupo 4'-fosfopantoteína de una molécula de coenzima A, esta reacción la cataliza la enzima AcpP. La ACP en su forma holo es la proteína acarreadora acilos en la FAB, en este sentido se ha demostrado que la relación entre apo-ACP y holo-Acp no afecta la abundancia de lípidos en *E. coli* (Jackowski & Rock, 1983).

En la cepa W3110 Δ -35*fabI*::Cm la transcripción del gen *fabH* disminuyen 48 % respecto a la cepa silvestre (figura 18), este gen codifica para la β -ceto-acil-ACP sintasa III que es esencial para la iniciación de los ciclos de elongación de la biosíntesis de ac. grasos. Así mismo, el nivel de transcripción del gen *fabZ* disminuye 79 % respecto a la cepa silvestre, este gen codifica para la enzima β -hidroxiacil-ACP deshidratasa la cual cataliza la deshidratación de β -hidroxiacil-ACP de cadena corta y los β -hidroxiacil-ACP saturados e insaturados de cadena larga. El nivel de transcripción del gen *fabA* disminuye 18 % respecto a la cepa silvestre, este gen codifica para una enzima deshidratasa/isomerasa que tiene un papel esencial en la síntesis de ac. grasos insaturados. Es el punto de ramificación entre los los ac. grasos saturados e insaturados introduciendo una insaturación en *cis*. De la misma forma, la transcripción del gen *fabR* disminuye 53 % respecto a su homólogo en la cepa silvestre, este codifica para el represor de la transcripción de los genes *fabB* y *fabA*. En este sentido, en la cepa W3110 Δ -35*fabI*::Cm el nivel de transcripción de los genes *gpsA* y *plsB* disminuye 41 y 25 % respectivamente, las enzimas codificadas por estos genes participan en la biosíntesis de fosfolípidos. Estos resultados sugieren que de manera general, la tasa de biosíntesis de lípidos en la cepa W3110 Δ -35*fabI*::Cm está disminuyendo (figura 18).

Por otro lado, los transcritos del gen *fabB* aumentan 78 % respecto a su gen homólogo en la cepa silvestre. La enzima codificada por este gen es esencial en la biosíntesis de ac. grasos de cadena corta. El nivel de transcripción del gen *fabG* tiene una desviación estándar muy alta, por lo que no podemos determinar si cambia respecto a la cepa silvestre (figura 18).

V.2.3 Efecto de la eliminación de la región intergénica y del hexámero -35 del promotor del gen *fabI* sobre la producción de pinosilvina en *Escherichia coli*

V.2.3.1 Producción de pinosilvina con la cepa W3110Δ-35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS en medio M9

La eliminación de la región intergénica y del hexámero -35 del gen *fabI* aumenta el título de producción de pinosilvina así como el $Y_{\text{pino/gpcs}}$ en *E. coli*. El aumento ocurre tanto en medio M9 GLC 10 g/L como en medio M9 GLY 10 g/L, ambos suplementados con ac. cinámico 3mM. En la figura 19 se muestran los títulos de producción de pinosilvina alcanzados con la cepa W3110Δ-35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS, ésta tiene eliminada la región intergénica y el elemento -35 del gen *fabI* (apartado V.1.1), además posee el plásmido pSc4CL_(M)AhSTS a partir del cual se expresan las enzimas heterólogas Sc4CL_(M) y AhSTS.

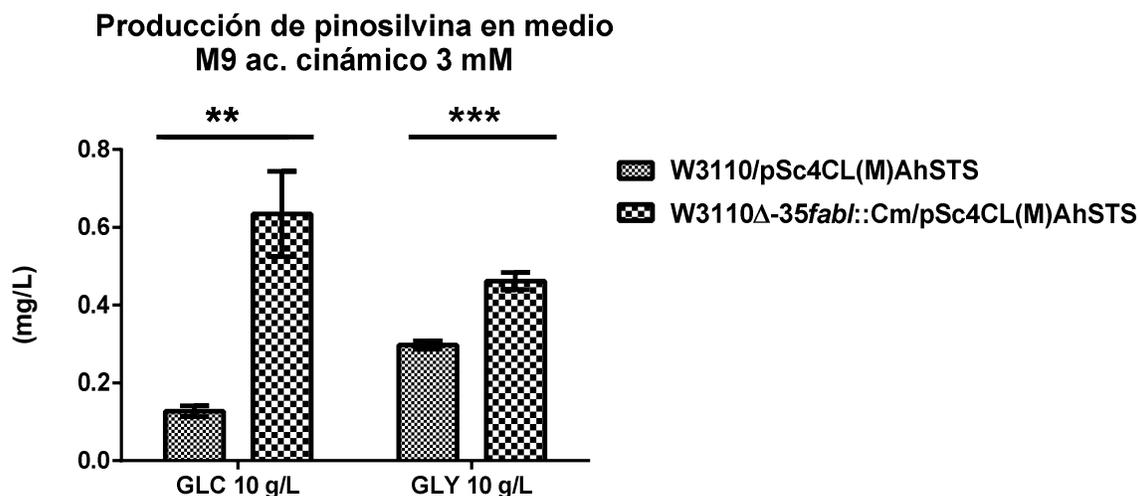


Figura 19. Producción de pinosilvina 20 h después de inducir la expresión de las enzimas de la ruta de producción de pinosilvina. Se utilizó la cepa W3110Δ-35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS en medio M9 GLC 10 g/L y M9 GLY 10 g/L. Las barras con los cuadros pequeños representan el título de producción de pinosilvina que alcanzó la cepa W3110/pSc4CL_(M)AhSTS en M9 con cada una de las fuentes de carbono (GLC y GLY). Las barras con los cuadros grandes representan el título de producción de pinosilvina que alcanzó la cepa W3110Δ-35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS en M9 con cada una de las fuentes de carbono (GLC y GLY). La línea horizontal sobre las barras

indica que los promedios y las desviaciones estándar de los datos de dicho par de barras fueron utilizados en un análisis de t de student individual. ** Indican que $0.01 > p \geq 0.001$ y *** Indican que $0.001 > p \geq 0.0001$. Entre más asteriscos se asignen más significativa es la diferencia.

En M9 GLC 10 g/L la cepa *W3110Δ-35fabI::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS* alcanzó una producción de pinosilvina de 0.63 ± 0.10 mg/L, mientras que la cepa *W3110/pSc4CL_(M)AhSTS* alcanzó una producción de 0.12 ± 0.012 mg/L. Con estos datos se puede calcular una diferencia de 0.51 mg/L de pinosilvina entre los títulos alcanzados por cada cepa en M9 GLC 10 g/L (figura 19). En M9 GLY 10 g/L la cepa *W3110Δ-35fabI::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS* alcanzó una producción de pinosilvina de 0.46 ± 0.02 mg/L, mientras que la cepa *W3110/pSc4CL_(M)AhSTS* alcanzó una producción de 0.29 ± 0.010 mg/L. Con estos datos se puede calcular una diferencia de de 0.17 mg/L de pinosilvina entre los títulos alcanzados por cada cepa en M9 GLY 10 g/L (figura 19). El valor de p calculado para la diferencia entre los títulos de producción de las cepa *W3110Δ-35fabI::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS* y la cepa *W3110/pSc4CL_(M)AhSTS* en M9 GLC 10 g/L es de 0.0013. Mientras que el valor de p calculado para la diferencia entre los títulos de producción de las cepa *W3110Δ-35fabI::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS* y la cepa *W3110/pSc4CL_(M)AhSTS* en M9 GLY 10 g/L es de 0.0003 (figura 15). De acuerdo con estos valores, la diferencia en los títulos de producción de pinosilvina entre la cepa *W3110Δ-35fabI::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS* y la cepa *W3110/pSc4CL_(M)AhSTS*, observadas en medio M9 GLC 10 g/L y en M9 GLY 10 g/L son estadísticamente significativas.

Dado que la biomasa alcanzada por las cepas afecta directamente el título de producción de pinosilvina, se calculó un $Y_{\text{pino/gpcs}}$. Con este valor se puede determinar si las diferencias observadas en los títulos de producción de pinosilvina se deben a la disminución en los niveles de transcripción del gen *fabI* o se deben a que alguna de las cepas alcanzó una biomasa mayor que la otra. En medio M9 GLC 10 g/L la cepa *W3110Δ-35fabI::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS* generó una biomasa de 3.48 ± 0.045 D.O., mientras que la cepa *W3110/pSc4CL_(M)AhSTS* generó una biomasa de 4.40 ± 0.113 D.O. Por otro lado, en medio M9 GLY 10 g/L la cepa *W3110Δ-35fabI::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS* generó una biomasa de 2.17 ± 0.056 D.O.,

mientras que la cepa W3110/pSc4CL_(M)AhSTS generó una biomasa de 2.87 ± 0.065 D.O.

En la figura 20 se compara el $Y_{\text{pino/gpcs}}$ calculado para la cepa W3110Δ-35fabI::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS con el $Y_{\text{pino/gpcs}}$ calculado para la cepa W3110/pSc4CL_(M)AhSTS.

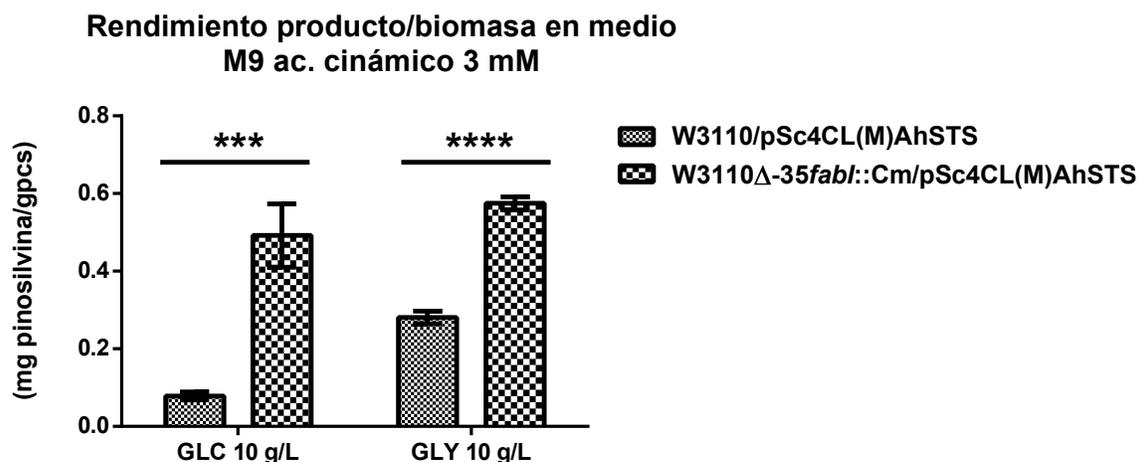


Figura 20. Rendimiento producto/biomasa de la cepa W3110Δ-35fabI::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS en medio M9 GLC 10 g/L y M9 GLY 10 g/L. Las barras con los cuadros pequeños representan el $Y_{\text{pino/gpcs}}$ calculado para la cepa W3110/pSc4CL_(M)AhSTS en M9 con cada una de las fuentes de carbono (GLC y GLY). Las barras con los cuadros grandes representan el $Y_{\text{pino/gpcs}}$ calculado para la cepa W3110Δ-35fabI::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS en M9 con cada una de las fuentes de carbono (GLC y GLY). La línea horizontal sobre las barras indica que los promedios y las desviaciones estándar de los datos de dicho par de barras fueron utilizados en un análisis de t de student individual. *** Indican que $0.001 > p \geq 0.0001$ y **** Indica que $p < 0.0001$. Entre más asteriscos se asignen más significativa es la diferencia.

En M9 GLC 10 g/L el $Y_{\text{pino/gpcs}}$ calculado para la cepa W3110Δ-35fabI::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS es de 0.49 ± 0.081 mg pino/gpcs, mientras que el $Y_{\text{pino/gpcs}}$ calculado para la cepa W3110/pSc4CL_(M)AhSTS es de 0.078 ± 0.010 mg pino/gpcs (figura 20). Con estos datos se puede calcular una diferencia de 0.41 mg pino/gpcs entre los $Y_{\text{pino/gpcs}}$ de cada cepa en M9 GLC 10 g/L. Por otro lado, en M9 GLY 10 g/L el $Y_{\text{pino/gpcs}}$ calculado para la cepa W3110Δ-35fabI::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS es de 0.57 ± 0.016 mg pino/gpcs, mientras que el $Y_{\text{pino/gpcs}}$ calculado para la cepa W3110/pSc4CL_(M)AhSTS es de 0.28 ± 0.016 mg

pino/gpcs (figura 20). Con estos datos se puede calcular una diferencia de 0.29 mg pino/gpcs entre los $Y_{\text{pino/gpcs}}$ de cada cepa en M9 GLC 10 g/L.

El valor de p calculado para las diferencias entre los $Y_{\text{pino/gpcs}}$ de la cepa W3110 Δ -35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS y la cepa W3110/pSc4CL_(M)AhSTS en medio M9 GLC 10 g/L es de 0.0010. Mientras que el valor de p calculado para las diferencias entre los $Y_{\text{pino/gpcs}}$ de la cepa W3110 Δ -35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS y la cepa W3110/pSc4CL_(M)AhSTS en M9 GLY 10 g/L es menor que 0.0001. De acuerdo con estos datos, las diferencias entre los $Y_{\text{pino/gpcs}}$, de la cepa W3110 Δ -35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS y la cepa W3110/pSc4CL_(M)AhSTS, son estadísticamente significativa tanto en medio M9 GLC 10 g/L como en medio M9 GLY 10g/L. Una vez que se determinó que las diferencias son estadísticamente significativas, se calculó que en la cepa W3110 Δ -35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS el $Y_{\text{pino/gpcs}}$ aumentó 5.26 y de 1.04 veces en medio M9 GLC 10 g/L y en medio M9 GLY 10 g/L respectivamente.

V.2.3.2 Producción de pinosilvina con la cepa W3110 Δ -35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS en medio LB

La eliminación de la región intergénica y del hexámero -35 del gen *fabI* aumenta el título de producción de pinosilvina así como el $Y_{\text{pino/gpcs}}$ en *E. coli* tanto en medio LB GLC 10 g/L como en medio LB GLY 10 g/L, ambos suplementados con ac. cinámico 3mM.

En LB GLC 10 g/L la cepa W3110 Δ -35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS alcanzó una producción de pinosilvina de 0.32 ± 0.023 mg/L, mientras que la cepa W3110/pSc4CL_(M)AhSTS alcanzó una producción de 0.27 ± 0.0094 mg/L. De acuerdo con estos datos hay una diferencia de 0.50 mg/L de pinosilvina entre los títulos alcanzados por cada cepa en LB GLC 10 g/L (figura 21). En LB GLY 10 g/L la cepa W3110 Δ -35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS alcanzó una producción de pinosilvina de 3.72 ± 0.58 mg/L, mientras que la cepa W3110/pSc4CL_(M)AhSTS alcanzó una producción de 0.49 ± 0.141 mg/L. Estos datos indican que hay una

diferencia de 3.23 mg/L de pinosilvina entre los títulos alcanzados por cada cepa en LB GLY 10 g/L (figura 21).

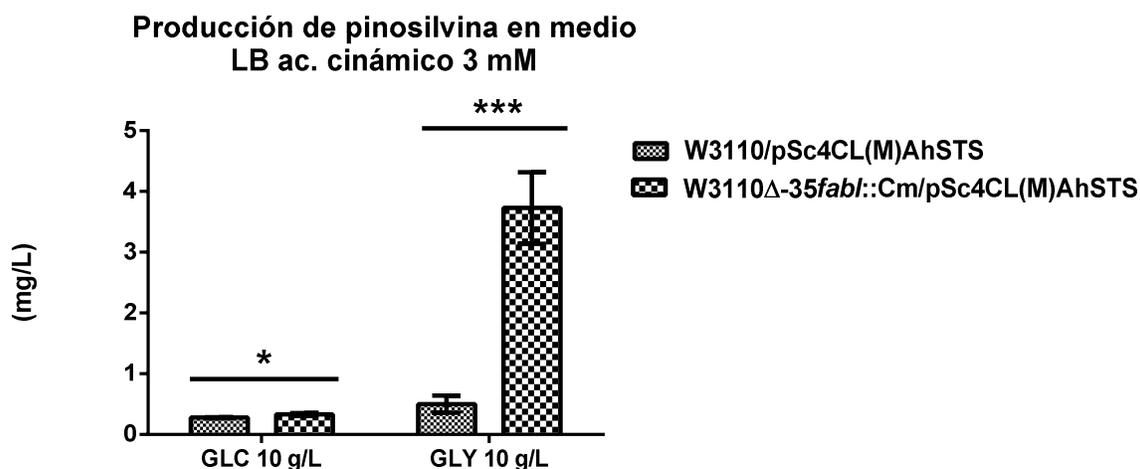


Figura 21. Producción de pinosilvina con la cepa W3110Δ-35fabI::Cm/ pSc4CL_(M)AhSTS en medio LB GLC 10 g/L y LB GLY 10 g/L. Las barras con los cuadros pequeños representan el título de producción de pinosilvina que alcanzó la cepa W3110/pSc4CL_(M)AhSTS en LB con cada una de las fuentes de carbono (GLC y GLY respectivamente). Las barras con los cuadros grandes representan el título de producción de pinosilvina que alcanzó la cepa W3110Δ-35fabI::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS en LB con cada una de las fuentes de carbono (GLC y GLY respectivamente). La línea horizontal sobre las barras indica que los promedios y las desviaciones estándar de los datos de dicho par de barras fueron utilizados en un análisis de t de student individual. * Indica que 0.05 < p ≤ 0.01 y *** Indican que 0.001 < p ≤ 0.0001. Entre más asteriscos se asignen más significativa es la diferencia.

El valor de p calculado para la diferencia entre los títulos de producción de la cepa W3110Δ-35fabI::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS y la cepa W3110/pSc4CL_(M)AhSTS en LB GLC 10 g/L es de 0.022, mientras que el valor de p calculado para la diferencia entre los títulos de producción de la cepa W3110Δ-35fabI::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS y la cepa W3110/pSc4CL_(M)AhSTS en LB GLY 10 g/L es de 0.0008. Esto indica que la diferencia en los títulos de producción de pinosilvina entre la cepa W3110Δ-35fabI::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS y la cepa W3110/pSc4CL_(M)AhSTS, tanto en medio LB GLC 10 g/L como en LB GLY 10 g/L son estadísticamente significativas.

Para determinar si las diferencias que observadas en los títulos de producción de pinosilvina se deben a la disminución en el nivel de la transcripción del gen *fabI* o se deben a que alguna de las cepas alcanzó una biomasa mayor que la otra se calculó un $Y_{\text{pino/gpcs}}$. En medio LB GLC 10 g/L la cepa W3110 Δ -35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS generó una biomasa de 3.09 ± 0.055 D.O., mientras que la cepa W3110/pSc4CL_(M)AhSTS generó una biomasa de 3.18 ± 0.235 D.O. Por otro lado, en medio LB GLY 10 g/L la cepa W3110 Δ -35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS generó una biomasa de 8.65 ± 0.336 D.O., mientras que la cepa W3110/pSc4CL_(M)AhSTS generó una biomasa de 8.75 ± 0.119 D.O. En la figura 22 se compara el $Y_{\text{pino/gpcs}}$ calculado para la cepa W3110 Δ -35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS con el $Y_{\text{pino/gpcs}}$ calculado para la cepa W3110/pSc4CL_(M)AhSTS.

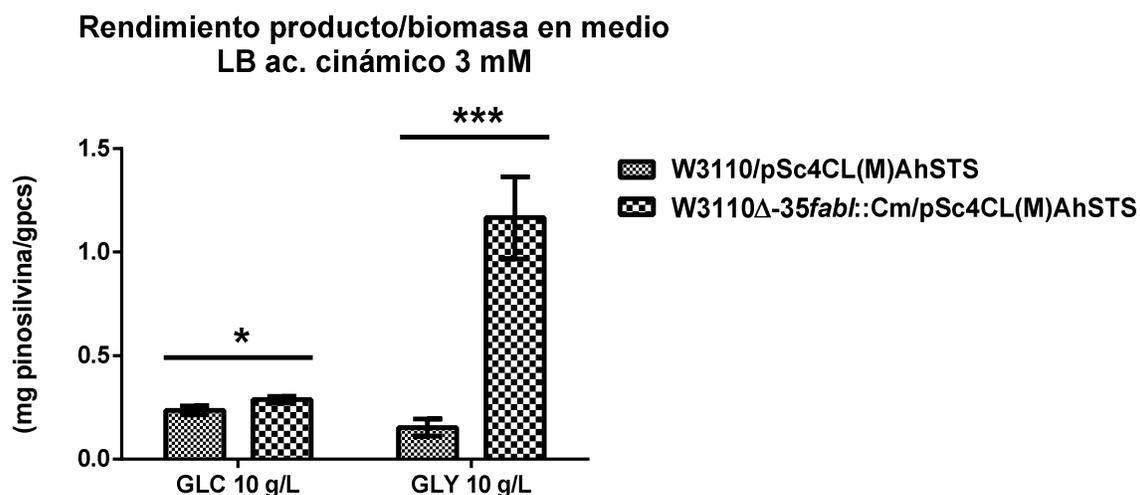


Figura 22. Rendimiento producto/biomasa con la cepa W3110 Δ -35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS en medio LB GLC 10 g/L y LB GLY 10 g/L. Las barras con los cuadros pequeños representan el $Y_{\text{pino/gpcs}}$ calculado para la cepa W3110/pSc4CL_(M)AhSTS en LB con cada una de las fuentes de carbono (GLC y GLY). Las barras con los cuadros grandes representan el $Y_{\text{pino/gpcs}}$ calculado para la cepa W3110 Δ -35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS en LB con cada una de las fuentes de carbono (GLC y GLY). La línea horizontal sobre las barras indica que los promedios y las desviaciones estándar de los datos de dicho para de barras fueron utilizados en un análisis de t de student individual. * Indica que $0.05 > p \geq 0.01$ y *** Indican que $0.001 > p \geq 0.0001$. Entre más asteriscos se asignen más significativa es la diferencia.

En LB GLC 10 g/L el $Y_{\text{pino/gpcs}}$ calculado para la cepa W3110 Δ -35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS es de 0.28 ± 0.015 mg pino/gpcs, mientras que el $Y_{\text{pino/gpcs}}$ calculado para la cepa W3110/pSc4CL_(M)AhSTS es de 0.23 ± 0.021 mg pino/gpcs (figura 22). Con base en estos datos se puede observar una diferencia de 0.05 mg pino/gpcs entre los $Y_{\text{pino/gpcs}}$ de las cepas en LB GLC 10 g/L. Por otro lado, en LB GLY 10 g/L el $Y_{\text{pino/gpcs}}$ de la cepa W3110 Δ -35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS es de 1.16 ± 0.19 mg pino/gpcs, mientras que el $Y_{\text{pino/gpcs}}$ de la cepa W3110/pSc4CL_(M)AhSTS es de 0.15 ± 0.041 mg pino/gpcs (figura 22). Con estos datos se observa una diferencia de 0.86 mg pino/gpcs entre los $Y_{\text{pino/gpcs}}$ calculados para cada cepa en LB GLY 10 g/L.

El valor de p calculado para la diferencia entre los $Y_{\text{pino/gpcs}}$ de la cepa W3110 Δ -35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS y la cepa W3110/pSc4CL_(M)AhSTS en medio LB GLC 10 g/L es de 0.0287, mientras que el valor de p calculado para la diferencia entre los $Y_{\text{pino/gpcs}}$ de la cepa W3110 Δ -35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS y la cepa W3110/pSc4CL_(M)AhSTS en medio LB GLY 10 g/L es de 0.0010. Con base en estos valores, las diferencias entre los $Y_{\text{pino/gpcs}}$, entre la cepa W3110 Δ -35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS y la cepa W3110/pSc4CL_(M)AhSTS, son estadísticamente significativa tanto en medio LB GLC 10 g/L como en medio LB GLY 10 g/L. Dado que las diferencias son estadísticamente significativas, es posible calcular que el $Y_{\text{pino/gpcs}}$ aumentó en la cepa W3110 Δ -35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS, respecto a su control, 0.21 y 6.61 veces en medio LB GLC 10 g/L y en medio LB GLY 10 g/L respectivamente.

Hasta este punto se ha demostrado que la cepa W3110 Δ -35*fabI*::Cm aumenta la producción de pinosilvina en 4 medios de cultivo diferentes cuando se utiliza el plásmido de producción heteróloga pSc4CL_(M)AhSTS. Para determinar si la eliminación de la región intergénica y el hexámero -35 del gen *fabI* también aumenta la producción de pinosilvina utilizando otros plásmidos, se comparó la producción entre las cepas W3110 Δ -35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)VvSTS y W3110/pSc4CL_(M)VvSTS.

V.2.3.3 Producción de pinosilvina con la cepa W3110Δ-35fabl::Cm/pSc4CL_(M)VvSTS en medio LB

La eliminación de la región intergénica y del hexámero -35 del gen *fabI* aumenta el título de producción de pinosilvina así como el $Y_{\text{pino/gpcs}}$ en la cepa de *E. coli* W3110Δ-35fabl::Cm/pSc4CL_(M)VvSTS en medio LB GLY 10 g/L suplementado con ac. cinámico 3mM. La producción de pinosilvina que alcanzó la cepa W3110Δ-35fabl::Cm/pSc4CL_(M)VvSTS es de 52.671 ± 2.953 mg/L, mientras que la cepa W3110/pSc4CL_(M)VvSTS alcanzó una producción de pinosilvina de 34.89 ± 4.809 mg/L. Con estos datos podemos calcular una diferencia de 17.78 mg/L de pinosilvina entre los títulos de producción alcanzados con cada una de las cepas.

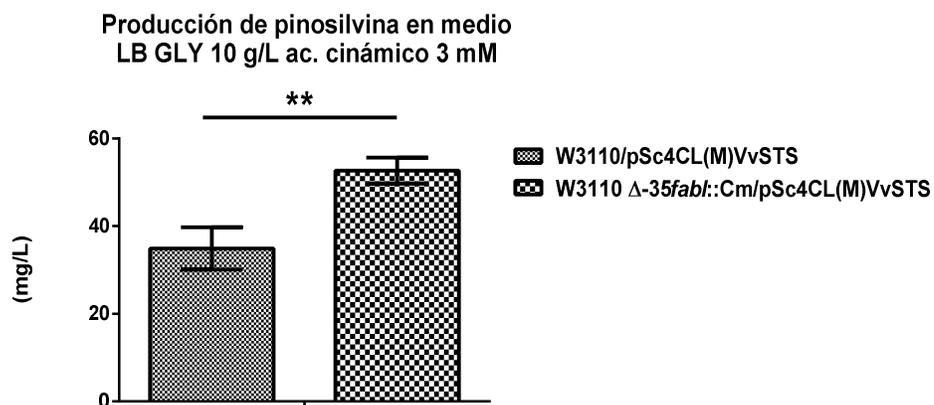


Figura 23. Producción de pinosilvina en medio LB GLY ac. cinámico 3 mM con la cepa W3110Δ-35fabl::Cm/pSc4CL_(M)VvSTS. La línea horizontal sobre las barras indica que los promedios y las desviaciones estándar de los datos de dicho para de barras fueron utilizados en un análisis de t de student individual. ** Indican que $0.01 < p \leq 0.001$.

El valor de p calculado para las diferencias de los títulos de producción entre la cepa W3110Δ-35fabl::Cm/pSc4CL_(M)VvSTS y W3110/pSc4CL_(M)VvSTS es de 0.0055, esto significa que la diferencia entre los títulos de producción es estadísticamente significativa.

Como ya se mencionó, la biomasa alcanzada por las cepas afecta directamente el título de producción de pinosilvina. En medio LB GLY 10 g/L la cepa W3110Δ-35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)VvSTS generó una biomasa de 9.49 ± 0.18 D.O., mientras que la cepa W3110/pSc4CL_(M)VvSTS generó una biomasa de 11.26 ± 0.27 D.O.

En la figura 24 se compara el $Y_{\text{pino/gpcs}}$ calculado para la cepa W3110Δ-35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)VvSTS con el $Y_{\text{pino/gpcs}}$ calculado para la cepa W3110/pSc4CL_(M)VvSTS.

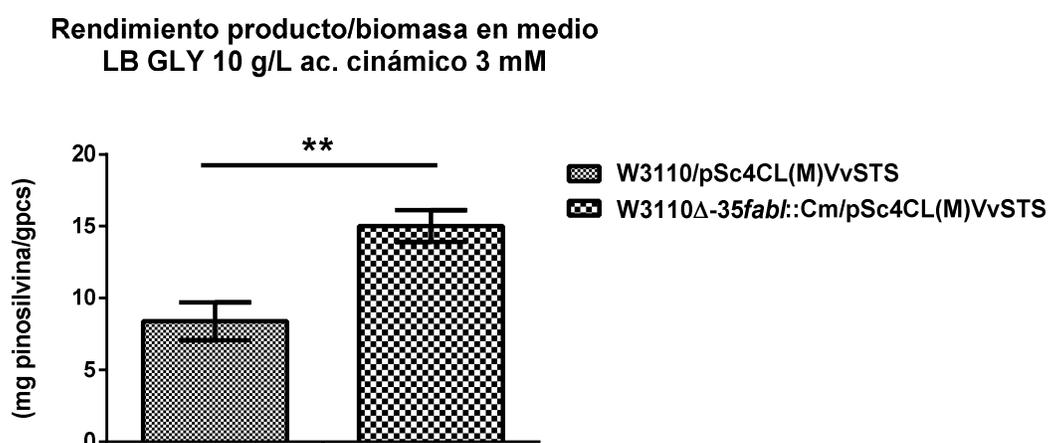


Figura 24. Rendimiento producto/biomasa en medio LB GLY ac. cinámico 3 mM con la cepa W3110Δ-35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)VvSTS. La línea horizontal sobre las barras indica que los promedios y las desviaciones estándar de los datos de dicho para de barras fueron utilizados en un análisis de t de student individual. ** Indican que 0.01 > p ≥ 0.001.

El $Y_{\text{pino/gpcs}}$ alcanzado con la cepa W3110Δ-35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)VvSTS es de 15.01 ± 1.10 mg pino/gpcs, mientras que el $Y_{\text{pino/gpcs}}$ alcanzado con la cepa W3110/pSc4CL_(M)VvSTS es de 8.39 ± 1.32 mg pinosilvina/gpcs. Con estos datos es posible calcular una diferencia de 6.62 mg pinosilvina/gpcs entre los $Y_{\text{pino/gpcs}}$ obtenidos con cada una de las cepas. El valor de p calculado para la diferencia entre estos datos es de 0.0026, esto significa que la diferencia entre los $Y_{\text{pino/gpcs}}$ es estadísticamente significativa.

Una vez que se determinó que las diferencias son estadísticamente significativas, se calculó que hay un aumento de 0.78 veces en el $Y_{\text{pino/gpcs}}$ de la W3110Δ-35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)VvSTS respecto a la W3110/pSc4CL_(M)VvSTS.

Con estos resultados se ha demostrado que la cepa W3110Δ-35*fabI*::Cm aumenta la producción de pinosilvina en los medios y con los plásmidos que se probaron hasta el momento. Se sabe que es posible aumentar la producción heteróloga de otros estilbenos aumentando el malonil-CoA en las cepas productoras. Para determinar si la estrategia de eliminar la región intergénica y el hexámero -35 del gen *fabI* puede aumentar la producción de otros estilbenos, se caracterizó la producción de resveratrol utilizando la cepa W3110Δ-35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS y la cepa W3110Δ-35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)VvSTS.

V.2.3.4 Producción de resveratrol en medio LB GLY 10 g/L ac. cumárico 3 mM

Eliminar la región intergénica y el elemento -35 del promotor del gen *fabI* aumenta la producción de resveratrol en medio LB GLY 10 g/L suplementado con ac. cumárico 3 mM. La producción de resveratrol que alcanzó la cepa W3110Δ-35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS es de 18.57 ± 2.38 mg/L, mientras que la cepa W3110/pSc4CL_(M)AhSTS alcanzó una producción de resveratrol de 13.21 ± 0.53 mg/L (figura 25). Es posible calcular una diferencia de 5.36 mg/L de resveratrol entre los títulos de producción de estas cepas. Por otro lado, la cepa W3110Δ-35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)VvSTS alcanzó una producción de resveratrol de 213.58 ± 15.21 mg/L, mientras que la cepa W3110/pSc4CL_(M)VvSTS alcanzó una producción de resveratrol de 196.97 ± 3.22 mg/L (figura 25). Existe una diferencia de 16.61 mg/L de resveratrol entre los títulos de producción de estas cepas. En la figura 25 se muestra la comparación entre el título de producción alcanzado con las cepas W3110Δ-35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS y W3110Δ-35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS con el título de producción alcanzado por sus respectivas cepas control.

**Producción de resveratrol en medio
LB GLY 10 g/L ac. cumárico 3 mM**

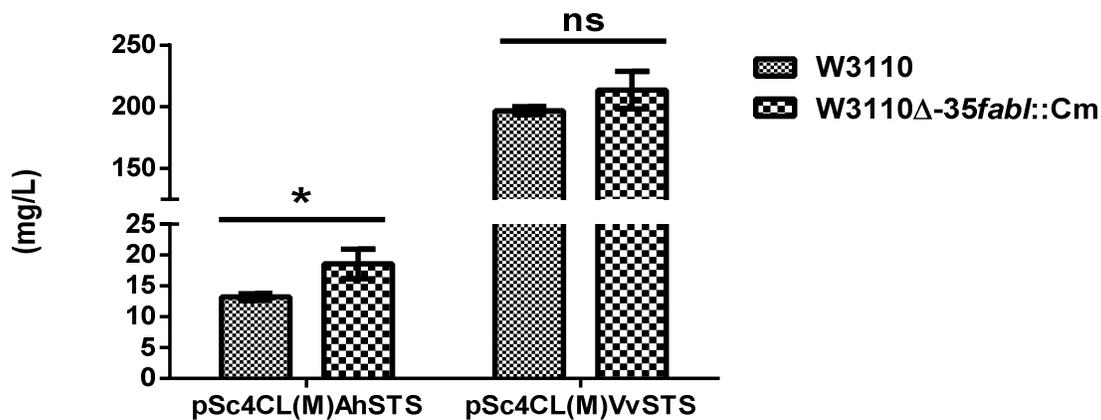


Figura 25. Producción de resveratrol con la cepa W3110Δ-35fabI::Cm/ pSc4CL_(M)AhSTS en medio LB GLC 10 g/L y LB GLY 10 g/L. Las barras con los cuadros pequeños representan el título de producción de pinosilvina que alcanzó la cepa W3110 transformada con el plásmido pSc4CL_(M)AhSTS y con el plásmido pSc4CL_(M)AhSTS. Las barras con los cuadros grandes representan el título de producción de pinosilvina que alcanzó la cepa W3110Δ-35fabI::Cm transformada con el plásmido pSc4CL_(M)AhSTS y con el plásmido pSc4CL_(M)AhSTS. La línea horizontal sobre las barras indica que los promedios y las desviaciones estándar de los datos de dicho para de barras fueron utilizados en un análisis de t de student individual. * Indica que 0.05 > p ≥ 0.01 y ns indica que la diferencia no es estadísticamente significativa.

El valor de p calculado para las diferencias entre los títulos de producción para las cepas transformadas con el plásmido pSc4CL_(M)AhSTS es de 0.0193. La diferencia entre los títulos de producción resveratrol observada con estas cepas es estadísticamente significativa. Por otro lado, el valor de p para las cepas transformadas con el plásmido pSc4CL_(M)VvSTS es de 0.138, lo que indica que la diferencia en los títulos de producción observada con estas cepas no es estadísticamente significativa.

Dado que el título de resveratrol es afectado por la biomasa alcanzada se calculó un **rendimiento producto/biomasa** ($Y_{resv/gpcs}$). La biomasa que generó la cepa W3110Δ-35fabI::Cm/pSc4CL_(M)AhSTS es de 6.70 ± 0.34 D.O., mientras que su cepa control generó una biomasa de 8.81 ± 0.23 D.O. Por otro lado, la cepa W3110Δ-35fabI::Cm/pSc4CL_(M)VvSTS generó una biomasa de 10.70 ± 0.50 D.O., mientras que su cepa control generó una biomasa de 11.68 ± 0.42 D.O.

El $Y_{\text{resv/gpcs}}$ de la cepa $W3110\Delta\text{-}35\text{fabI}::\text{Cm/pSc4CL}_{(M)}\text{AhSTS}$ es de 7.46 ± 0.58 mg resv/gpcs, mientras que el $Y_{\text{resv/gpcs}}$ de la cepa $W3110/\text{pSc4CL}_{(M)}\text{AhSTS}$ es de 4.05 ± 0.14 mg resv/gpcs (figura 26). Con estos datos es posible calcular una diferencia de 3.41 mg resveratrol/gpcs. El valor de p calculado para las diferencias entre los $Y_{\text{resv/gpcs}}$ de estas cepas es de 0.0006, lo que indica que la diferencia es estadísticamente significativa. Con estos valores de $Y_{\text{resv/gpcs}}$ es posible calcular un aumento de 0.84 veces de la cepa $W3110\Delta\text{-}35\text{fabI}::\text{Cm/pSc4CL}_{(M)}\text{AhSTS}$ respecto a su cepa control.

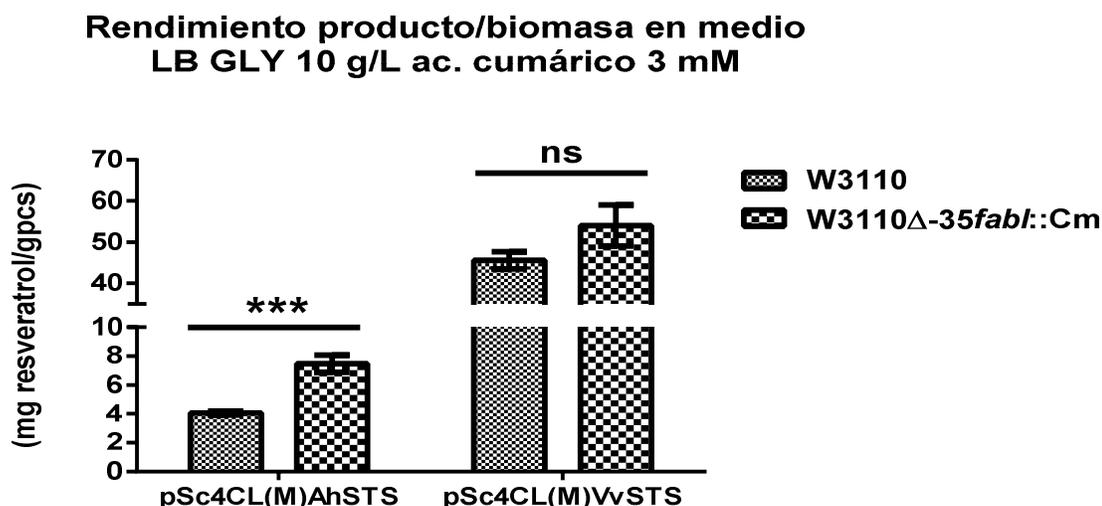


Figura 26. Rendimiento producto/biomasa con la cepa $W3110\Delta\text{-}35\text{fabI}::\text{Cm/pSc4CL}_{(M)}\text{AhSTS}$ en medio LB GLC 10 g/L y LB GLY 10 g/L. La línea horizontal sobre las barras indica que los promedios y las desviaciones estándar de los datos de dicho para de barras fueron utilizados en un análisis de t de student individual. *** Indica que $0.001 > p \geq 0.0001$ y ns indica que la diferencia no es estadísticamente significativa.

Por otra parte, el $Y_{\text{resv/gpcs}}$ alcanzado con la cepa $W3110\Delta\text{-}35\text{fabI}::\text{Cm/pSc4CL}_{(M)}\text{VvSTS}$ fue de 54.02 ± 4.97 mg resv/gpcs, mientras que con la cepa $W3110/\text{pSc4CL}_{(M)}\text{VvSTS}$ el $Y_{\text{resv/gpcs}}$ es de 45.59 ± 2.03 mg resv/gpcs. Existe una diferencia de 8.43 mg resv/gpcs entre los $Y_{\text{resv/gpcs}}$ alcanzados por estas cepas. El valor de p calculado para las diferencias entre los $Y_{\text{resv/gpcs}}$ de estas

cepas es de 0.053, lo que indica que la diferencia no es estadísticamente significativa.

V.3 Discusión

Se logró generar una cepa de *E. coli* en la que se eliminó la región intergénica y el hexámero -35 del gen *fabI* (*W3110Δ-35fabI::Cm*). Éste fue uno de los principales retos del presente estudio, dado que el gen *fabI* porque esencial para el crecimiento celular, obtener cepas en las que en las que se disminuya el nivel de la transcripción de dicho gen es una tarea complicada (Bergler et al., 1996; Baba et al., 2006). La eliminación de la región intergénica y el hexámero -35 de la región promotora del gen *fabI* disminuye el nivel de transcripción de dicho gen un 79 % en medio M9 GLC 10 g/L. Esta disminución en el nivel de transcripción del gen *fabI* disminuye la síntesis de uno de los precursores de la síntesis de biotina. La biotina es un cofactor esencial en reacción catalizada por la ACC. Esta reacción controla el flujo de carbono hacia la FAB, lo que puede explicar que el nivel de transcripción de los genes de las rutas de biosíntesis de ácidos grasos y biosíntesis de fosfolípidos, en general, disminuyan respecto a la cepa silvestre. Sin embargo, la metodología del RT-qPCR tiene implícitos supuestos, simplificaciones, así como errores intrínsecos asociados a la propia metodología (como al procesamiento de las muestras y de los resultados), que llevan a impresiones en los resultados. Se ha determinado que para tener resultados en los que se disminuyan los errores asociados a estas variaciones y que tengan significancia estadística se deben hacer una cantidad de replicas por experimento que no son metodológicamente viables, esto aplica particularmente para diferencias pequeñas. Se ha determinado qué, para que los resultados tengan un grado de confianza aceptable, la diferencia entre dos muestras de RT-qPCR debe ser del doble o más (Karlen, McNair, Perseguers, Mazza, & Mermod, 2007). Por lo que en el presente trabajo se tomaron como confiables aquellos datos que están por debajo de 0.5 y por arriba de 1. Esto indica que solo el gen *fabI* presenta un

cambio en el nivel transcripción dentro del un rango confiable. El resto de los genes que se analizaron presentan también un cambio en el nivel de la transcripción, sin embargo, estos no se encuentran dentro del rango confiable, por lo que deben tomarse solo como resultados preliminares y deben realizarse más replicas para determinar si estas diferencias se mantienen.

Por otra parte, cabe mencionar que el objetivo general del presente trabajo fue determinar si las estrategias aplicadas para disminuir la expresión del gen *fabI* aumentaban la producción de pinosilvina. Optimizar el proceso de producción de dicho compuesto está fuera de los alcances de este estudio. En este sentido, la disminución en el nivel de transcripción del gen *fabI* aumenta los títulos de producción y los $Y_{\text{producto/biomasa}}$ de pinosilvina y resveratrol con las dos cepas y en los medios de cultivo que se probaron. Este aumento en los $Y_{\text{pino/gpcs}}$ sugiere que hay un aumento en la disponibilidad intracelular de malonil-CoA en la cepa de *E. coli* W3110 Δ -35*fabI*::Cm. Sin embargo, en el caso del $Y_{\text{resv/gpcs}}$ de resveratrol con la cepa W3110 Δ -35*fabI*::Cm/pSc4CL_(M)VvSTS no se observa un aumento. Esto sugiere que el efecto que tiene la mutación en el promotor del gen *fabI* sobre el aumento de la poza de malonil-CoA tiene límites. Al usar la VvSTS para la síntesis de resveratrol, se desvía un mayor flujo de carbono del metabolismo central hacia la síntesis de malonil-CoA. Esto se debe a que las enzimas 4CL tienen eficiencias catalíticas más altas usando ac. cumárico que usando ac. cinámico como sustrato. De la misma forma, las enzimas STS tienen eficiencias catalíticas más altas usando cumaroil-CoA cinamolil-CoA como sustratos (Kaneko et al., 2003). Esta redirección hace que el efecto de la mutación se vuelva irrelevante en la producción de resveratrol con esta cepa. Lo que indica que el malonil-CoA generado por la redirección del flujo de carbono es mayor que el malonil-CoA que se aumenta debido a la disminución en el nivel de transcripción del gen *fabI*. También es importante resaltar que la enzima VvSTS por si misma aumenta los $Y_{\text{producto/biomasa}}$ de producción de estilbenos. En el caso de la pinosilvina, el $Y_{\text{pino/gpcs}}$ que se obtiene con la cepa W3110/pSc4CL_(M)VvSTS es 54.93 veces mayor que el que se alcanza con la cepa W3110/pSc4CL_(M)AhSTS. En el caso de resveratrol la

cepa W3110/pSc4CL_(M)VvSTS aumenta el $Y_{\text{resv/gpcs}}$ 10.26 veces comparado con el $Y_{\text{resv/gpcs}}$ de la cepa W3110/pSc4CL_(M)AhSTS. Esto confirma que la optimización de los codones del gen que codifica para la VvSTS tiene un efecto positivo sobre la producción de estilbenos.

Por otra parte, se observa que el mejor medio de cultivo (de los que se probaron en este estudio) para producir pinosilvina es el medio LB GLY 10 g/L ac. cinámico 3 mM. Esto se debe a que la enzima STS se expresa mejor cuando se utiliza GLY como fuente de carbono. También se sabe que la glucosa inhibe los genes responsables del transporte de los ácidos fenil-propanoicos (Watts et al., 2006). Este puede ser uno de los motivos por los cuales se alcanzan títulos de producción más alto cuando se usa GLY como fuente de carbono.

Finalmente, la cepa W3110 Δ -35fabI::Cm/pSc4CL_(M)VvSTS es la cepa de *E. coli* más eficiente para producir pinosilvina reportada hasta el momento. El título de pinosilvina más alto reportado en este trabajo es de 52.67 ± 2.95 mg/L y un $Y_{\text{pino/gpcs}}$ es de 15.01 ± 1.10 mg pino/gpcs, este rendimiento es el mejor reportado hasta el día de hoy.

CONCLUSIONES GENERALES

- i. La expresión del RNAn f abl en *E. coli* retrasa el inicio de la fase exponencial del crecimiento tanto en medio LB como en M9 GLC 10 g/L.
- ii. La expresión del RNAn f abl en *E. coli* no aumenta la producción de pinosilvina en medio LB GLY 10 g/L ac. cinámico 3 mM.
- iii. Es posible disminuir la transcripción del gen *f*abl eliminando elementos de su propia región promotora.
- iv. Disminuir el nivel de la transcripción del gen *f*abl aumenta la producción de pinosilvina en *E. coli*. Este hecho sugiere que la poza intracelular de malonil-CoA está aumentada en la cepa W3110 Δ -35*f*abl::Cm.
- v. El gen *f*abl es un blanco susceptible de diferentes estrategias de ingeniería metabólica para aumentar la producción de estilbenos en *E. coli*.
- vi. Hasta el día de hoy, la cepa W3110 Δ -35*f*abl::Cm/pSc4CL_(M)VvSTS tiene el mejor $Y_{\text{pinosilvina/biomasa}}$ para la producción fermentativa de pinosilvina.

PERSPECTIVAS

- i. Realizar un ensayo western blot con las cepas que expresan el RNAn c *fabI* para determinar cuánto baja la síntesis de la enzima FabI.
- ii. Integrar en el cromosoma de *E. coli* la unidad transcripcional que codifica para el nuevo RNAn c que bloquea la traducción del mRNA del gen *fabI* junto con la secuencia consenso reconocida por la chaperona Hfq, así como la unidad transcripcional que codifica para el represor TetR para caracterizar su efecto sobre el crecimiento celular y la producción de pinosilvina.
- iii. Realizar análisis de RT-qPCR con la cepa W3110 Δ -35*fabI*::Cm/Sc4CL $_{(M)}$ VvSTS en medio LB GLY 10 g/L ac. cinámico 3mM, para determinar cuantitativamente la disminución de la transcripción del gen *fabI* y si esta disminución afecta la transcripción de otros genes del metabolismo de lípidos en este medio cultivo.
- iv. Medir el malonil-CoA en la cepa W3110 Δ -35*fabI*::Cm en M9 GLC 10 g/L y en la cepa W3110 Δ -35*fabI*::Cm/Sc4CL $_{(M)}$ VvSTS en medio LB GLY 10 g/L ac. cinámico 3 mM, para determinar cuánto aumenta respecto a sus respectivas cepas control.
- v. Caracterizar los ac. grasos y fosfolípidos de la cepa W3110 Δ -35*fabI*::Cm en medio M9 GLC 10 g/L y en la cepa W3110 Δ -35*fabI*::Cm/Sc4CL $_{(M)}$ VvSTS en medio LB GLY 10 g/L ac. cinámico 3 mM, para determinar si la mutación en el promotor del gen *fabI* repercute en la proporción de ac. grasos y fosfolípidos de la membrana celular en cada caso.
- vi. Hacer cinéticas de producción con las cepa W3110 Δ -35*fabI*::Cm/pSc4CL $_{(M)}$ VvSTS , W3110 Δ -35*fabI*::Cm/pSc4CL $_{(M)}$ AhSTS y sus respectivas cepas control muestreando cada dos horas para determinar los consumos de sustratos y la producción de pinosilvina. Esto ayudará a generar nuevas estrategias para redirigir el flujo de carbono hacia la producción de pinosilvina o de otros fenilpropanoides.

- vii. Generar una mutación más severa en la región promotora del gen *fabI*. Esta mutación junto con otras estrategias que aumenten la poza intracelular de malonil-CoA ayudaran a obtener un título de producción de pinosilvina más alto que el reportado en el presente estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, C., Flores, N., Riveros-McKay, F., Sahonero-Canavesi, D., Carmona, S. B., Geiger, O., Bolívar, F. (2015). Deletion of the 2-acyl-glycerophosphoethanolamine cycle improve glucose metabolism in *Escherichia coli* strains employed for overproduction of aromatic compounds. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 194. <http://doi.org/10.1186/s12934-015-0382-6>
- Amann, E., Ochs, B., & Abel, K. (1988). Tightly regulated *tuc* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. 69, 301–315.
- Angov, E., Hillier, C. J., Kincaid, R. L., & Lyon, J. A. (2008). Heterologous protein expression is enhanced by harmonizing the codon usage frequencies of the target gene with those of the expression host. *PLoS ONE*, 3(5), 1–10. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0002189>
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., ... Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2, 2006.0008. <http://doi.org/10.1038/msb4100050>
- Bachmann, B. J. (1973). Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12, 36(4), 525–557.
- Beckett, D. O. R. O. T. H. Y. (1998). [21] Energetic Methods to Study Bifunctional Biotin Operon Repressor By, 295, 424–450.
- Bergler, H., Fuchsbichler, S., Högenauer, G., & Turnowsky, F. (1996). The enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase (FabI) of *Escherichia coli*, which catalyzes a key regulatory step in fatty acid biosynthesis, accepts NADH and NADPH as cofactors and is inhibited by palmitoyl-CoA. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 242(3), 689–694. <http://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0689r.x>
- Bhan, N., Xu, P., Khalidi, O., & Koffas, M. A. G. (2013). Redirecting carbon flux into

- malonyl-CoA to improve resveratrol titers: Proof of concept for genetic interventions predicted by OptForce computational framework. *Chemical Engineering Science*, 103, 109–114. <http://doi.org/10.1016/j.ces.2012.10.009>
- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Cultures*, 7(6), 1513. Retrieved from <http://nar.oxfordjournals.org/content/7/6/1513.short>
- Broussard, T. C., Price, A. E., Laborde, S. M., & Waldrop, G. L. (2013). Complex formation and regulation of escherichia coli acetyl-CoA carboxylase. *Biochemistry*, 52(19), 3346–3357. <http://doi.org/10.1021/bi4000707>
- Camacho-Zaragoza, J. M., Hernández-Chávez, G., Moreno-Avitia, F., Ramírez-Iñiguez, R., Martínez, A., Bolívar, F., & Gosset, G. (2016). Engineering of a microbial coculture of *Escherichia coli* strains for the biosynthesis of resveratrol. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 163. <http://doi.org/10.1186/s12934-016-0562-z>
- Chong, J., Poutaraud, A., & Hugueney, P. (2009). Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science*, 177(3), 143–155. <http://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.05.012>
- Conde, E., Fang, W., Hemming, J., Willför, S., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2014). Recovery of bioactive compounds from *Pinus pinaster* wood by consecutive extraction stages. *Wood Science and Technology*, 48(2), 311–323. <http://doi.org/10.1007/s00226-013-0604-1>
- Cronan, J. E., & Thomas, J. (2009). Chapter 17 Bacterial Fatty Acid Synthesis and its Relationships with Polyketide Synthetic Pathways. *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 459). Elsevier Inc. [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)04617-5](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)04617-5)
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6640–5. <http://doi.org/10.1073/pnas.120163297>

- Eisenberg, M. A., Prakash, O., & Hsiung, S.-C. (1982). Purification and Properties of the Biotin Repressor, *257*(24), 15167–15173.
- Fowler, Z. L., Gikandi, W. W., & Koffas, M. A. G. (2009). Increased malonyl coenzyme A biosynthesis by tuning the *Escherichia coli* metabolic network and its application to flavanone production. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(18), 5831–5839. <http://doi.org/10.1128/AEM.00270-09>
- Heath, R. J., & Rock, C. O. (1995). Regulation of malonyl-CoA metabolism by acyl-acyl carrier protein and ketoacyl-acyl carrier protein synthases in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. <http://doi.org/10.1074/jbc.270.26.15531>
- Hernández-Montalvo, V., Martínez, A., Hernández-Chavez, G., Bolivar, F., Valle, F., & Gosset, G. (2003). Expression of galP and glk in a *Escherichia coli* PTS mutant restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation products. *Biotechnology and Bioengineering*, *83*(6), 687–694. <http://doi.org/10.1002/bit.10702>
- Jackowski, S., & Rock, C. O. (1983). Ratio of active to inactive forms of acyl carrier protein in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, *258*(24), 15186–15191.
- Jančinová, V., Nosál, R., Lojek, A., Číž, M., Ambrožová, G., Mihalová, D., Perečko, T. (2010). Formation of reactive oxygen and nitrogen species in the presence of pinosylvin - An analogue of resveratrol. *Neuroendocrinology Letters*, *31*(SUPPL. 2), 79–83. <http://doi.org/NEL31S210A13> [pii]
- Jancinova, V., Perecko, T., Nosal, R., Harmatha, J., Smidrkal, J., & Drabikova, K. (2012). The natural stilbenoid pinosylvin and activated neutrophils: effects on oxidative burst, protein kinase C, apoptosis and efficiency in adjuvant arthritis. *Acta Pharmacol Sin*, *33*(10), 1285–1292. <http://doi.org/10.1038/aps.2012.77>
- Kaneko, M., Ohnishi, Y., & Horinouchi, S. (2003). Cinnamate : Coenzyme A Ligase from the Filamentous Bacterium *Streptomyces*. *Journal of Bacteriology*, *3*(2), 20–27. <http://doi.org/10.1128/JB.185.1.20>

- Karlen, Y., McNair, A., Perseguers, S., Mazza, C., & Mermod, N. (2007). Statistical significance of quantitative PCR. *Bioinformatics*, 8(131).
- Katz, M., Förster, J., David, H., Peter Schmidt, Hans Sendelius, M., & Bjorn, Sara Peterson Thomasen Durhuus, T. (2013). (12) United States Patent.
- Lee, J. W., Na, D., Park, J. M., Lee, J., Choi, S., & Lee, S. Y. (2012). Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals. *Nature Chemical Biology*, 8(6), 536–546. <http://doi.org/10.1038/nchembio.970>
- Leonard, E., Runguphan, W., O'Connor, S., & Prather, K. J. (2009). Opportunities in metabolic engineering to facilitate scalable alkaloid production. *Nature Chemical Biology*, 5(5), 292–300. <http://doi.org/nchembio.160> [pii]r10.1038/nchembio.160
- Leonard, E., Yan, Y., Fowler, Z., & Li, Z. (2008). Strain Improvement of Recombinant *Escherichia coli* for Efficient Production of Plant Flavonoids. *Mol Pharmac*, 5(2), 257–265.
- Liang, J. long, Guo, L. qiong, Lin, J. fang, He, Z. qi, Cai, F. ji, & Chen, J. fei. (2016). A novel process for obtaining pinosylvin using combinatorial bioengineering in *Escherichia coli*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(6). <http://doi.org/10.1007/s11274-016-2062-z>
- Lim, C. G., Fowler, Z. L., Hueller, T., Schaffer, S., & Koffas, M. A. G. (2011). High-yield resveratrol production in engineered *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(10), 3451–3460. <http://doi.org/10.1128/AEM.02186-10>
- Lin, S., Hanson, R. E., & Cronan, J. E. (2010). Biotin synthesis begins by hijacking the fatty acid synthetic pathway. *Nature Chemical Biology*, 6(9), 682–8. <http://doi.org/10.1038/nchembio.420>
- Lit, S., & Cronan, J. E. (1993). Growth rate regulation of *Escherichia coli* acetyl

coenzyme A carboxylase , which catalyzes the first committed step of lipid biosynthesis . *175*(2), 332–340.

- Meades, G., Benson, B. K., Grove, A., & Waldrop, G. L. (2009). A tale of two functions: Enzymatic activity and translational repression by carboxyltransferase. *Nucleic Acids Research*, *38*(4), 1217–1227. <http://doi.org/10.1093/nar/gkp1079>
- Na, D., Yoo, S. M., Chung, H., Park, H., Park, J. H., & Lee, S. Y. (2013). Metabolic engineering of *Escherichia coli* using synthetic small regulatory RNAs. *Nature Biotechnology*, *31*(2), 170–4. <http://doi.org/10.1038/nbt.2461>
- Park, S. R., Yoon, J. A., Paik, J. H., Park, J. W., Jung, W. S., Ban, Y. H., ... Yoon, Y. J. (2009). Engineering of plant-specific phenylpropanoids biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*. *Journal of Biotechnology*, *141*(3–4), 181–188. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.03.013>
- Roupe, K. a, Remsberg, C. M., Yáñez, J. a, & Davies, N. M. (2006). Pharmacometrics of stilbenes: segueing towards the clinic. *Current Clinical Pharmacology*, *1*, 81–101. <http://doi.org/10.2174/157488406775268246>
- Stephanopoulos, G., & Valino, J. J. (1991). Network Rigidity and Metabolic Engineering in Metabolite Overproduction.
- Sutton, M. R., Fall, R. R., Nervi, A. M., Alberts, A. W., Vagelos, P. R., & Bradshaw, R. A. (1977). Amino acid sequence of *Escherichia coli* biotin carboxyl carrier protein (9100). *Journal of Biological Chemistry*, *252*(11), 3934–3940.
- van Summeren-Wesenhagen, P. V., & Marienhagen, J. (2015). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the synthesis of the plant polyphenol pinosylvin. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(3), 840–849. <http://doi.org/10.1128/AEM.02966-14>
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, *3*(1), 2–20. <http://doi.org/10.1093/mp/ssp106>

- Watts, K., Lee, P., & Schmidt-Dannert, C. (2006). Biosynthesis of plant-specific stilbene polyketides in metabolically engineered *Escherichia coli*. *BMC Biotechnology*, 6(1), 22. <http://doi.org/10.1186/1472-6750-6-22>
- Xu, P., Ranganathan, S., Fowler, Z. L., Maranas, C. D., & Koffas, M. A. G. (2011). Genome-scale metabolic network modeling results in minimal interventions that cooperatively force carbon flux towards malonyl-CoA. *Metabolic Engineering*, 13(5), 578–587. <http://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.06.008>
- Yoo, S. M., Na, D., & Lee, S. Y. (2013). Design and use of synthetic regulatory small RNAs to control gene expression in *Escherichia coli*. *Nature Protocols*, 8(9), 1694–707. <http://doi.org/10.1038/nprot.2013.105>