



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

Producción de ácido cafeico por un sistema de co-cultivo de *Escherichia coli*

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
Bióloga

PRESENTA:
Jimena Barrientos Parás

DIRECTOR DE TESIS:
Guillermo Gosset Lagarda

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2020

Facultad de Ciencias





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A mi familia por ser fuente de inspiración.

Para mis hermanas, mi papá y Fer. Gracias por su apoyo constante y por tanto amor.

Especial dedicatoria a mi mamá:

Tu guía ha sido invaluable, te llevo siempre conmigo y te amo infinitamente.

Gracias Mabis, te extraño siempre.



Agradecimientos

A mi tutor Guillermo Gosset por su asesoría y sus consejos.

A Luz María Martínez por su apoyo técnico en la construcción de cepas, y en técnicas de microbiología y biología molecular. Gracias por ser guía.

A Georgina Hernández por su apoyo técnico en equipos de cromatografía.

Andrés Martín Saralegui por su apoyo técnico en el equipo de citometría de flujo.

A Manuel Saucedo y Aurelia Gonzalez por efficientar el trabajo de todos en el laboratorio.

Al apoyo del donativo PAPIIT IT200217

A mis amigos de la Facultad de Ciencias y del laboratorio IVM por su cariño y su retroalimentación.

ÍNDICE GENERAL

I. RESUMEN	9
II. INTRODUCCIÓN	10
III. ANTECEDENTES	11
III.1 METABOLITOS SECUNDARIOS EN PLANTAS	11
III.2 PROPIEDADES E IMPORTANCIA DEL ÁCIDO CAFEICO	12
III.3 BIOSÍNTESIS DEL ÁCIDO CAFEICO	13
III.3.1 Vía de producción de ácido cafeico en plantas	13
III.3.2 Función del ácido cafeico en plantas	13
III.3.3 Extracción de ácido cafeico en plantas	14
III.4 PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE ÁCIDO CAFEICO	14
III.5 SISTEMAS DE PRODUCCIÓN BASADOS EN CO-CULTIVOS	16
III.6 PROTEÍNA FLUORESCENTES COMO HERRAMIENTA PARA EL MONITOREO DE CEPAS DE PRODUCCIÓN	17
III.7 GLICEROL COMO FUENTE DE CARBONO	18
III.8 INGENIERÍA DE VÍAS METABÓLICAS EN <i>Escherichia coli</i> PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CAFEICO EN UN SISTEMA DE CO-CULTIVO	18
IV. JUSTIFICACIÓN	20
V. HIPÓTESIS	21
VI. OBJETIVO	21
VI.1 OBJETIVO GENERAL	21
VI.2 OBJETIVOS PARTICULARES	21
VII. DISEÑO EXPERIMENTAL	22
VII.1 CEPAS Y PLÁSMIDOS	22
VII.2 MEDIOS DE CULTIVO	23
VII.3 CINÉTICA DE CRECIMIENTO	23
VII.4 REACCIONES EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCRs) Y OLIGONUCLEÓTIDOS	24
VII.5 TRANSFORMACIÓN CON PLÁSMIDOS DE PRODUCCIÓN	25
VII.6 CLONACIÓN E INTEGRACIÓN AL CROMOSOMA DEL GEN TagRFP657 A <i>E. coli</i>	26
VII.7 CITOMETRÍA DE FLUJO EN CEPAS PRODUCTORAS, FLUORESCENTES	28
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
VIII.1 CARACTERIZACIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS EN MONOCULTIVO Y CO-CULTIVO	30
VIII.2 CEPAS FLUORESCENTES Y PRODUCTORAS	35
VIII.3 CITOMETRÍA DE FLUJO EN CEPAS FLUORESCENTES Y PRODUCTORAS	36
IX. CONCLUSIONES	42
X. PERSPECTIVAS	43
XI. LITERATURA CITADA	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.

Metabolismo primario y secundario del carbono en plantas.

Figura 2.

Estructura química del AC con un anillo bencénico doblemente hidroxilado.

Figura 3.

Flujo del carbono, que a partir de la vía de las pentosas fosfato y la glucólisis lleva a la vía del ácido shikímico.

Figura 4.

Biosíntesis de lignina a partir de tirosina o fenilalanina, teniendo como intermediario al AC.

Figura 5.

Biosíntesis heteróloga de AC.

Figura 6.

Sistema de co-cultivo de *E. coli* para la producción de resveratrol.

Figura 7.

Cepa productora de ácido cumárico y cepa productora de AC construidas para ser probadas en co-cultivo.

Figura 8.

Modelo utilizado en este proyecto.

Figura 9.

Clonación de gen TagRFP657 en el plásmido pLoxGentrc.

Figura 10.

Producto de PCR con genes codificantes para la proteína FRFP y la resistencia a Gm.

Figura 11.

Fragmento de DNA cromosomal con el fragmento de DNA lineal proveniente de la PCR sustituyendo el gen *lacZ* en el cromosoma de *E. coli*.

Figura 12.

Esquema del sistema de integración al cromosoma.

Figura 13.

Cinética de crecimiento, consumo de glicerol y producción de ácido cumárico de la cepa WpheA- en medio mineral M9 con 10 g/L de glicerol como fuente de carbono.

Figura 14.

Cinética de crecimiento, consumo de glicerol y ácido cumárico y producción de AC de la cepa WhpaBC en medio mineral M9 con 10 g/L de glicerol como fuente de carbono y con 0.58 g/L de ácido cumárico suplementado al medio.

Figura 15.

Cinética de crecimiento, consumo de glicerol y producción de ácido cumárico y de AC del co-cultivo con proporción 1:1 de las cepas WpheA- y WhpaBC, en medio mineral M9 y 10 g/L de glicerol.

Figura 16.

Cinética de crecimiento, consumo de glicerol y producción de ácido cumárico y de AC del co-cultivo con proporción 17:1, en medio mineral M9 y 10 g/L de glicerol.

Figura 17.

Comprobación genética de cepa WpheA-/*lacZ*::TagRFP657.

Figura 18.

Comprobación genética de cepa WhpaBC/*lacZ*::*gfp*.

Figura 19.

Comprobación fenotípica de cepa fluorescente en rojo lejano empleando citometría de flujo.

Figura 20.

Comprobación fenotípica de cepa fluorescente en verde empleando citometría de flujo.

Figura 21.

Poblaciones formadas en el citómetro de flujo AMNIS al graficar la intensidad en el canal 11 vs. la intensidad en el canal 2.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.

Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

Tabla 2.

Medios de cultivo utilizados en cinéticas de crecimiento y especificaciones.

Tabla 3.

Oligonucleótidos empleados para este trabajo.

Tabla 4.

Título de ácido cumárico, AC y su suma obtenidos en los monocultivos y co-cultivos.

Tabla 5.

Velocidad específica de producción de ácido cumárico por medio de la cepa WpheA-.
Velocidad específica de consumo de ácido cumárico y de producción de AC por medio de la cepa WhpaBC.

Tabla 6.

Trabajos con los mayores títulos de AC y las características de sus condiciones.

I. RESUMEN

El ácido cafeico (AC) es un compuesto de alto potencial en la industria farmacéutica por su capacidad de reducir daño por estrés oxidativo y poseer propiedades antivirales, anticancerígenas, antiinflamatorias, entre otras. Dicho compuesto se encuentra naturalmente en plantas, pero su extracción es escasa, costosa y dañina para el ambiente. Una alternativa para contender con estas problemáticas es la biosíntesis heteróloga de AC en *Escherichia coli* a partir de la expresión del gen *hpaBC* que codifica para la enzima 4-hidroxifenilacetato 3-hidroxilasa la cual utiliza como sustrato al ácido cumárico. El ácido cumárico puede ser sintetizado en *E. coli* mediante la expresión de los genes que no se encuentran naturalmente en la bacteria y que codifican para la fenilalanina/tirosina amonio liasa (PAL/TAL) de *Rhodotorula glutinis*, la cual utiliza como sustrato a los aminoácidos aromáticos tirosina o fenilalanina en cepas donde además el flujo del carbono se ha dirigido hacia la vía del shikimato mediante la expresión de los genes *tktA* y *aroG^{fbr}*. La expresión de una ruta metabólica heteróloga en *E. coli* para producir compuestos que naturalmente dicho microorganismo no produce puede resultar en cuellos de botella o carga metabólica. El sistema de co-cultivo es una estrategia utilizada para incrementar la producción de compuestos vía fermentación que permite reducir el estrés dentro de las células. En este trabajo se realizó un co-cultivo de cepas de *E. coli* donde una de las cepas sintetiza ácido cumárico y la segunda lo utiliza como sustrato para la producción de AC, con glicerol como fuente de carbono que además de ser sustentable no utiliza fosfoenolpiruvato (PEP) para su internalización, dejando PEP disponible para ser canalizado en mayor proporción a la vía del shikimato. El co-cultivo alcanzó un título de AC de 79.7 ± 6.1 mg/L que es competitivo respecto a otros reportes, tomando en cuenta que este trabajo se realizó a nivel de matraz y es posible escalarlo a fermentador. Además, se mejoró el sistema de co-cultivo al hacer fluorescentes a las cepas productoras para permitir el análisis de parámetros cinéticos de cada cepa por separado y así conocer su dinámica en el co-cultivo.

II. INTRODUCCIÓN

Los ácidos hidroxicinámicos, como el ácido cafeico (AC), producidos por plantas, comenzaron a recibir interés por ser metabolitos secundarios con diversas propiedades. Se ha determinado que el AC tiene propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antivirales, antidiabéticas y antidepresivas (Rodríguez *et al.*, 2015), por lo cual es un producto relevante para la industria farmacéutica. El AC es un compuesto que se encuentra naturalmente en plantas y funge como intermediario en la formación de una de las tres subunidades que conforman a la lignina (Guo *et al.*, 2001).

La concentración de AC en plantas es aproximadamente de 107 µg/g (Tyszczuk *et al.*, 2011); ésta es tan baja debido a que este compuesto es un intermediario que no se acumula. La baja concentración provoca que su extracción sea difícil, ineficiente, cara y ecológicamente no sustentable (Rodríguez *et al.*, 2017). Para contender con este problema se ha optado por la producción heteróloga de AC empleando microorganismos.

La producción de AC puede llevarse a cabo en bacterias a partir de diversas fuentes de carbono, en las cuales es necesario dirigir el flujo de las moléculas con átomos de carbono hacia la vía del shikimato para lograr la producción de aminoácidos aromáticos como la tirosina, el triptófano y la fenilalanina. La tirosina por esta vía produce ácido cumárico y éste a su vez, al ser hidroxilado, produce AC (Hernández-Chávez *et al.*, 2019).

Existen muchos microorganismos que pueden utilizar el glicerol naturalmente como única fuente de carbono, por lo que es posible utilizarlo como materia prima para procesos de fermentación industriales (Papanikolaou y Aggelis, 2009). El glicerol es una fuente de carbono que otorga diversos beneficios, por ejemplo, al ser subproducto en la generación de biodiesel y también de la transesterificación de aceites vegetales y grasas animales, es una fuente de carbono ambientalmente amigable y sustentable (Da Silva *et al.*, 2009). Por otro lado, al compararlo con la glucosa como fuente de carbono, éste es menos costoso en términos energéticos para la célula porque no utiliza al fosfoenolpiruvato (PEP) en su internalización dejando disponible el compuesto para iniciar la vía del shikimato.

Algunos grupos de investigación suplementan intermediarios de rutas metabólicas para alcanzar un alto título de un compuesto de interés. Para lograr una elevada producción de AC se han adicionado al medio de cultivo intermediarios como la tirosina o el ácido cumárico, que resultan costosos.

En este proyecto se propone utilizar un sistema de co-cultivo con dos cepas de *E. coli*, una de ellas productora de ácido cumárico y la otra productora de AC. Esta estrategia permite dividir las rutas metabólicas para la producción de AC, lo que reduce la carga metabólica en cada cepa, permitiendo optimizar los procesos enzimáticos en cada una por separado (Zhang *et al.*, 2015a). En este sistema se utilizará el glicerol como única fuente de carbono y se evita la suplementación de precursores de la vía del shikimato.

III. ANTECEDENTES

III.1 METABOLITOS SECUNDARIOS EN PLANTAS

Todos los compuestos en organismos vivos provienen del metabolismo primario o del secundario. El metabolismo primario es altamente conservado en todos los organismos y da lugar a los compuestos necesarios para desarrollar las actividades esenciales como la respiración, la fotosíntesis, formación de azúcares, intermediarios del ciclo de Krebs, proteínas, etc. Por otro lado, los metabolitos secundarios se generan por rutas derivadas del metabolismo primario. En plantas los productos del metabolismo primario entran en distintas vías que comienzan la producción de metabolitos secundarios y forman productos nitrogenados, terpenos y compuestos fenólicos (**Fig. 1**) (Lincoln y Zeiger, 2006).

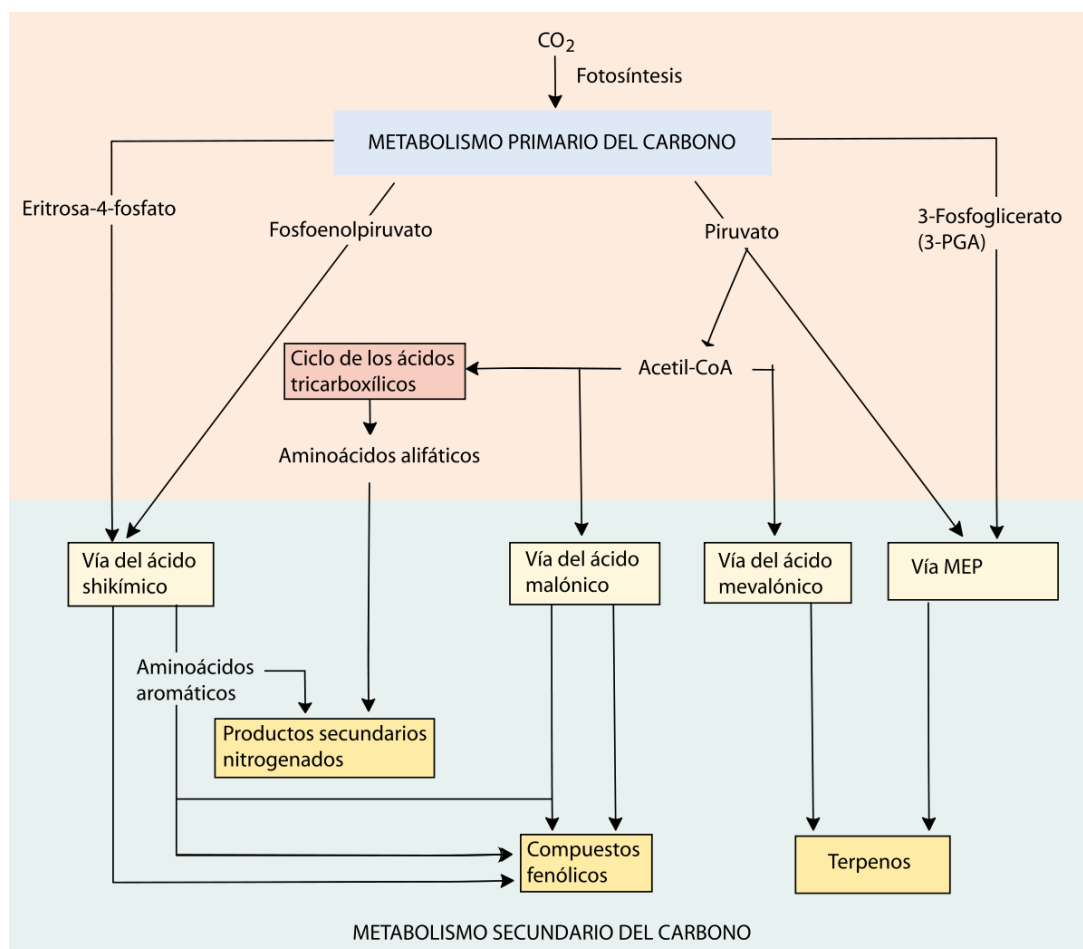


Figura 1. Metabolismo primario y secundario del carbono en plantas. La producción de compuestos fenólicos se da cuando el carbono llega del metabolismo primario a la vía del ácido shikímico y del ácido malónico. En algunos casos después de la vía del shikimato el carbono se dirige a la vía de los aminoácidos aromáticos para la posterior formación de compuestos fenólicos. (Vía MEP= vía del metileritritol fosfato) (Tomado de Lincoln y Zeiger, 2006).

Los ácidos fenólicos poseen un anillo que tiene al menos un ácido carboxílico funcional y dan lugar al metabolismo de los fenilpropanoides, de los que se forman compuestos como pigmentos, antibióticos, protectores contra UV, moléculas de señalización y compuestos con funciones complejas que forman estructuras de soporte para las plantas como la suberina y la lignina. Estos metabolitos secundarios se derivan de la fenilalanina y tirosina producidas en la vía del shikimato. La fenilalanina genera ácido cinámico a través de una reacción enzimática y éste a su vez genera ácido cumárico al ser hidroxilado. Estos son precursores para la producción de los compuestos ya mencionados que proporcionan estructura y protección (Hahlbrock y Scheel, 1989).

Se ha determinado que los ácidos fenólicos son compuestos comúnmente bioactivos entre los metabolitos secundarios y tienen efectos beneficiosos en la salud del ser humano. Los ácidos fenólicos tienen propiedades neuroprotectoras, hepatoprotectoras, antiinflamatorias, anticancerígenas, antidiabéticas, antimicrobianas y cardioprotectoras (Saibabu *et al.*, 2015). Dentro de estos ácidos hay dos subgrupos: los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos y se encuentran principalmente en plantas como el arándano, pera, manzana, mora azul, naranja, uva, café, cereza, durazno, papa y lechuga (Ozcan *et al.*, 2014).

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que las plantas requieren para su adaptación al ecosistema, por lo cual se sintetizan cuando son necesarios para la supervivencia de la planta. Para la formación de dichos compuestos es necesaria la síntesis de fenilalanina y tirosina, compuestos aromáticos que se producen posterior a la vía del shikimato, esta vía se presenta en plantas y algunos microorganismos (Maeda y Dudareva, 2012).

III.2 PROPIEDADES E IMPORTANCIA DEL ÁCIDO CAFEICO

El AC es un ácido hidroxicinámico; un compuesto aromático con una cadena lateral de tres carbonos. Las propiedades del AC derivan de su capacidad de reducir daño por estrés oxidativo. Al contar con un anillo de benceno el AC es capaz de producir un radical fenoxi que puede terminar la cadena de reacción de radicales libres. Por otro lado, tiene una cadena de uniones insaturadas que ofrecen un sitio adicional para interactuar con especies reactivas de oxígeno (Fig. 2) (Razzaghi-Asl *et al.*, 2013).

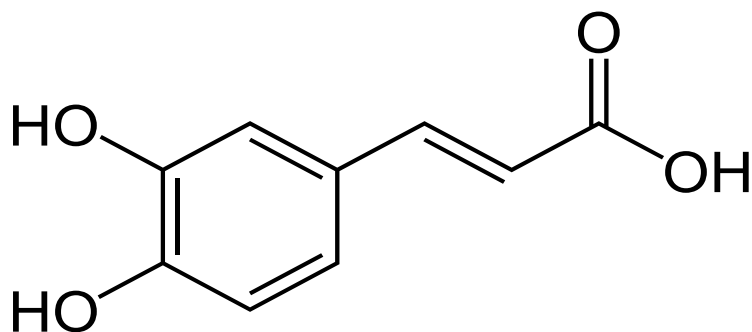


Figura 2. Estructura química del AC con un anillo bencénico doblemente hidroxilado.

III.3 BIOSÍNTESIS DEL ÁCIDO CAFEICO

III.3.1 Vía de producción de ácido cafeico en plantas

En plantas la vía del shikimato se encuentra en el cloroplasto en donde a partir de PEP (proveniente de la vía glicolítica) y el carbohidrato D-eritrosa-4-fosfato (proveniente del ciclo de las pentosas fosfato) comienza la primera de siete reacciones enzimáticas que producen fenilalanina, tirosina y triptófano. La fenilalanina es desaminada por medio de una enzima fenilalanina amonoliasa (PAL, por sus siglas en inglés) y produce ácidos hidroxicinámicos con un esqueleto de fenilpropano C₆C₃, dentro de los cuales se encuentra el AC (**Fig. 3**) (Dixon *et al.*, 2002).

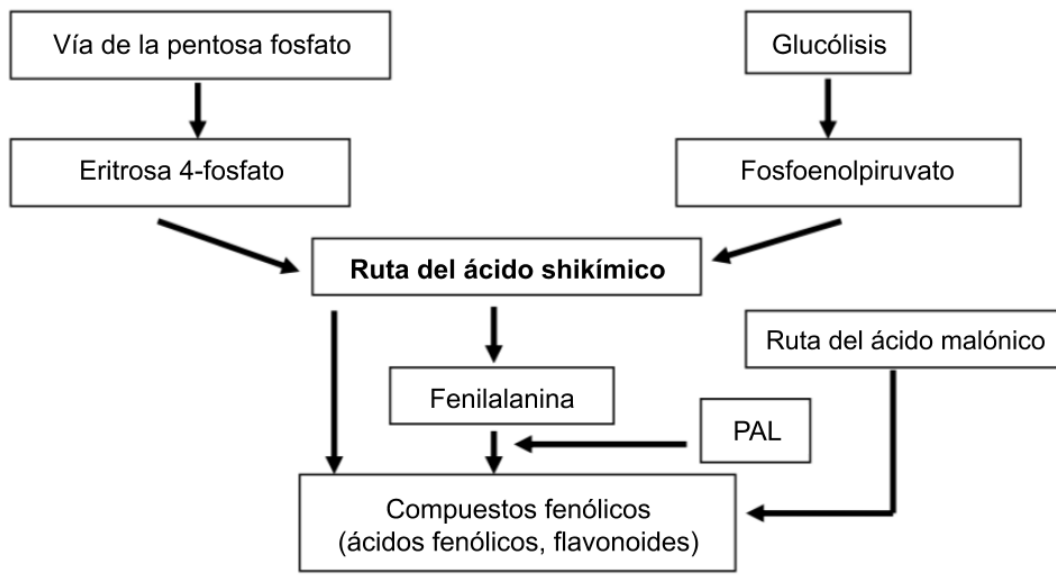


Figura 3. Flujo del carbono, que a partir de la vía de las pentosas fosfato y la glucólisis lleva a la vía del ácido shikímico. En esa vía se produce fenilalanina y a partir de una enzima PAL es posible la producción de compuestos fenólicos (Modificado de Ghasemzadeh, 2011).

III.3.2 Función del ácido cafeico en plantas

El AC está implicado en la formación de la lignina, que está conformada por un gran número de polímeros que resultan de los 4-hidroxifenilpropanoides y se depositan en las paredes de células secundarias volviéndolas más rígidas (Vanholme *et al.*, 2010). La lignina está compuesta por 3 subunidades, la unidad hidroxifenil (denominada H), la guaiacil (G) y la siringil (S). El AC en plantas se produce a partir de ácido cumárico que puede ser producido a partir de tirosina o fenilalanina, cuando proviene de la fenilalanina tiene como intermediario al ácido cinámico (**Fig. 4**). El AC es intermediario necesario para la formación de las subunidades G y S de la lignina (Guo *et al.*, 2001).

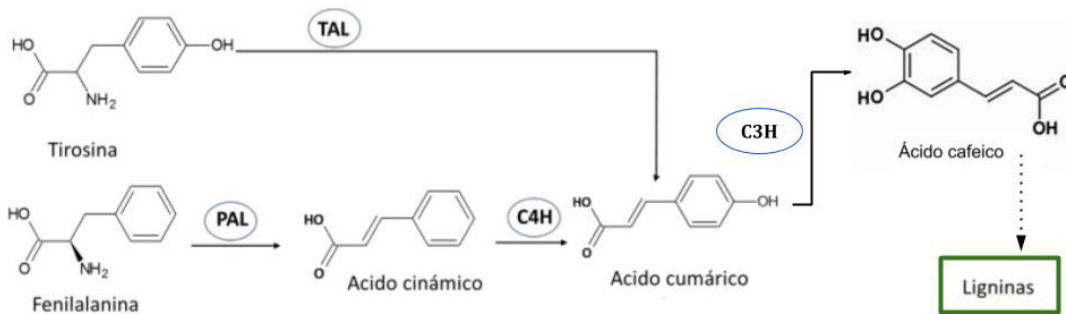


Figura 4. Biosíntesis de lignina a partir de tirosina o fenilalanina, teniendo como intermediario al ÁC.

III.3.3 Extracción de ácido cafeico en plantas

Los compuestos acumulados en plantas se encuentran poco concentrados y su extracción es ineficiente, compleja, costosa y con impacto negativo para el ambiente (Rodrigues *et al.*, 2017). El AC es un intermediario para la producción de lignina, por lo que no se acumula en las células y se requiere una enorme cantidad de biomasa vegetal para recuperar una cantidad pequeña del compuesto. Así mismo, el AC se encuentra mayormente concentrado en plantas de consumo humano como los frutos rojos, los cítricos, el café, tubérculos, entre otros; por lo que ocupar una gran cantidad de biomasa para su extracción no es factible.

El AC se encuentra en los cloroplastos de las plantas, lo que requiere métodos de extracción complejos. Es necesario utilizar un solvente con afinidad al AC y con una baja toxicidad para su uso en la industria (Njila *et al.*, 2017). Al hacer una extracción de compuestos en plantas se obtienen un amplio número de moléculas que son afines al solvente, por lo que es necesario purificar el metabolito de interés. Este es un procedimiento que vuelve muy costosa e ineficiente su obtención a nivel industrial (Ye *et al.*, 2010).

III.4 PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE ÁCIDO CAFEICO

Para contender con las complicaciones presentadas anteriormente se ha optado por la producción heteróloga de metabolitos secundarios, procedimiento logrado al realizar ingeniería metabólica en microorganismos. La producción de AC se ha realizado en bacterias y levaduras, utilizando como fuente de carbono la glucosa, el glicerol e hidrolizados de celulosa y se han obtenido títulos de hasta 56.6 mM (Hernández-Chávez *et al.*, 2019).

Para llegar a producir AC a partir de una fuente de carbono como las ya mencionadas, es necesario dirigir el flujo del carbono a la vía del shikimato y producir tirosina (**Fig. 5**). La tirosina es el sustrato necesario para la producción de ácido cumárico, compuesto que se produce a partir de la expresión heteróloga de una enzima con actividad de fenilalanina/tirosina amonio liasa (PAL/TAL) presente en plantas y algunos hongos. El ácido cumárico es hidroxilado para producir AC, proceso que puede ser llevado a cabo por la enzima cumarato 3-hidroxilasa y la 4-hidroxifenil acetato 3-hidroxilasa (Zhang y Stephanopoulos, 2013).

La ruta metabólica para la producción de AC en *E. coli* a partir de glicerol inicia cuando el glicerol es internalizado a la célula y produce glicerol-3-fosfato. El glicerol-3-fosfato se incorpora a la vía de las pentosas fosfato y es intermediario en la síntesis de PEP. De estas dos fuentes se

produce 3-desoxi-D-arabino-heptuselulosonato-7-fosfato (DAHP) que es un precursor de la vía del shikimato. En la vía del shikimato suceden diversas reacciones que llevan a la producción de ácido prefénico y comienza la vía de síntesis de la tirosina y fenilalanina. Solamente a partir de tirosina por medio de una enzima con actividad de PAL/TAL (que es poco específica) se puede producir ácido cumárico. La sobreexpresión de enzimas hidroxilasas como cumarato 3-hidroxilasa y la 4-hidroxifenil acetato 3-hidroxilas lleva a la producción de AC (Hernández-Chávez *et al.*, 2019).

Se han utilizado precursores como la tirosina y el ácido cumárico para la producción de AC en microorganismos, agregándolos al medio de cultivo para reducir los procesos necesarios para obtener el compuesto de interés. Sin embargo, el uso de precursores resulta costoso, por ejemplo, el costo de la tirosina es de \$262.00 pesos mexicanos por cada 10 g y el del ácido cumárico es de \$1,306.00 pesos mexicanos por cada 10 g (precios de Sigma-Aldrich, 2019), por lo que adicionarlos al cultivo no representa una ventaja ya que elevaría los costos de producción.

Para producir AC sin precursores es necesario la sobreexpresión de genes como *tktA* que codifica para la enzima transcetolasa que utiliza el carbono proveniente de la ruta de las pentosas fosfato (PPP por sus siglas en inglés) para producir eritrosa-4-fosfato (E4P) y el gen *aroG^{fbr}* (fbr:feedback-inhibition resistance) que codifica para una versión mutante de la enzima DAHP sintasa que es insensible a inhibición alostérica. Esta enzima utiliza como sustrato el PEP y el E4P para producir DAHP, necesario para iniciar la vía del shikimato. Por otro lado, se debe inactivar el gen *pheA* que es necesario para la producción de fenilalanina; al eliminarse este gen se produce principalmente tirosina como resultado de la vía de los aminoácidos aromáticos. En conjunto esto provoca que el flujo de carbono se dirija a la producción de tirosina lo que resulta en una alta disponibilidad para buscar mayores títulos de AC (Fig. 5).

También es necesario expresar heterológamente la enzima PAL/TAL para obtener ácido cumárico y la expresión de una hidroxilasa para la obtención de AC. Para esto se deben expresar genes en varios plásmidos o plásmidos muy grandes, lo cual puede representar una carga metabólica alta para el microorganismo productor e incluso podría ser ineficiente (Millan y Maclean, 2017).

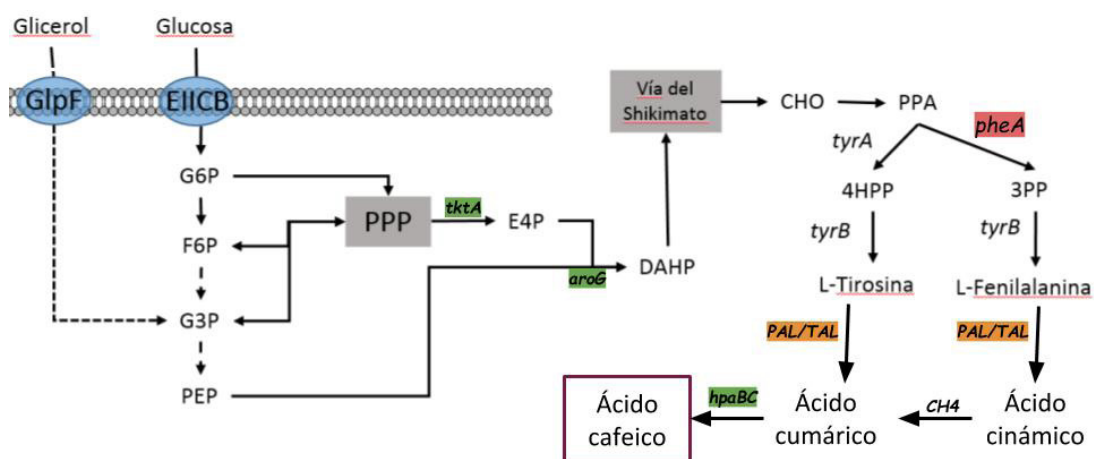


Figura 5. Biosíntesis heteróloga de AC. Se observa la posible entrada de glucosa o del glicerol a la célula, la vía de las pentosas fosfatos (PPP) y la vía del shikimato. Posteriormente en la vía de los aminoácidos aromáticos se producen tirosina, permitiendo la producción de AC a través de hidroxilaciones, teniendo como intermediario el ácido cumárico. En verde se muestran los genes que se sobreexpresan, en rojo los genes que se inactivan y en naranja los genes que se expresan heterológamente; todos necesarios para producir un alto título de AC (Modificado de Camacho-Zaragoza *et al.*, 2016).

III.5 SISTEMAS DE PRODUCCIÓN BASADOS EN CO-CULTIVOS

Los co-cultivos de microorganismos representan una estrategia que permite el diseño independiente de dos cepas, de una o de distintas especies, que permitan la expresión de rutas metabólicas en módulos y con la posibilidad de su optimización paralela. Se pueden utilizar para balancear rutas biosintéticas, reducir la carga metabólica y optimizar por separado pasos biosintéticos lentos que llevan a bajos rendimientos. De esta forma es posible contender con la ineficiencia biosintética que puede resultar del estrés metabólico generado por sobreexpresar rutas complejas y largas (Jones y Wang, 2018).

La bacteria *E. coli* representa un excelente modelo en ciencia básica y aplicada al ser un organismo muy estudiado, con genoma totalmente secuenciado y con crecimiento rápido (Blount, 2015). El sistema de co-cultivo con cepas de *E. coli* ha sido utilizado por diversos grupos de investigación para la producción de compuestos de interés, por ejemplo, se ha utilizado para la producción de glicósidos (Liu *et al.*, 2018), resveratrol (Camacho-Zaragoza *et al.*, 2016), ácido mucónico (Zhang *et al.*, 2015) y ácido 3-aminobenzoico (Zhang y Stephanopoulos, 2016), entre otros. En los estudios mencionados se obtuvieron títulos satisfactorios de los compuestos de interés, por ejemplo, en la producción de flavonoides en *E. coli* se reporta que al utilizar co-cultivos se incrementó 970 veces la producción al compararlo con los previos esfuerzos en monocultivos (Jones *et al.* 2016). Estos antecedentes sugieren que el sistema de co-cultivo en cepas de *E. coli* puede resultar útil para la producción de AC.

En la naturaleza existen consorcios en los que microorganismos forman interacciones para lograr procesos complejos al dividir labores. Los co-cultivos sintéticos presentan una manera de explorar la interacción que puede ser benéfica entre los distintos miembros (Zhou *et al.*, 2015). Al realizar co-cultivos se han encontrado ventajas como la posibilidad de reducir la toxicidad o inhibición generada por la acumulación de intermediarios (**Fig. 6**) (Camacho-Zaragoza *et al.*, 2016). También, la modularidad permite identificar de manera efectiva y rápida la mejor cepa para una enzima particular o módulo de la ruta metabólica (Zhang y Stephanopoulos, 2016). Se siguen explorando y encontrando ventajas al realizar co-cultivos biosintéticos, por lo cual, utilizar dicho sistema para producir AC puede resultar en interacciones benéficas que permitan una producción más eficiente.

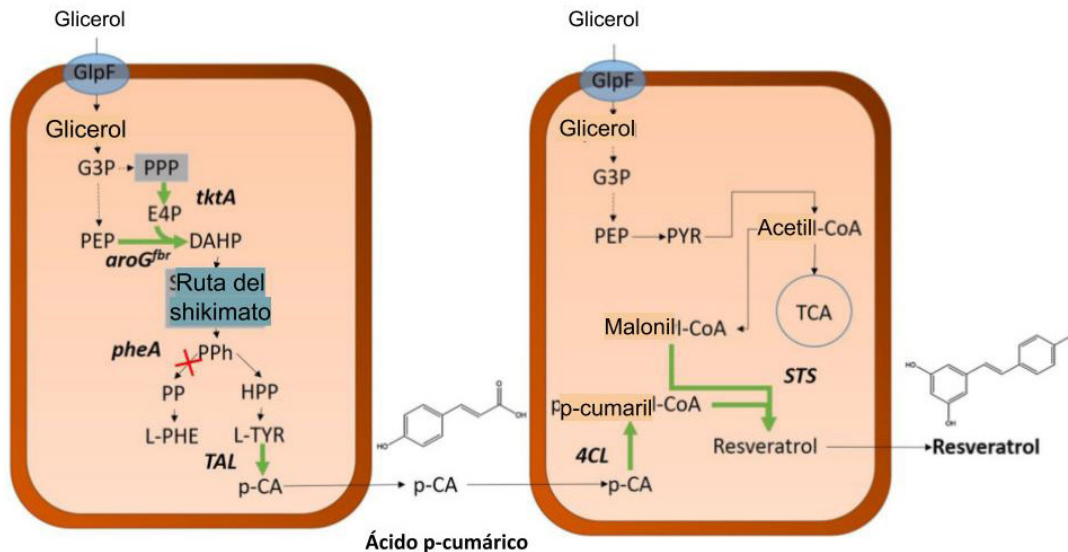


Figura 6. Sistema de co-cultivo de *E. coli* para la producción de resveratrol. Se observa que la primera cepa libera ácido cumárico al medio y la segunda lo introduce para producir resveratrol. El ácido cumárico puede ser tóxico en altas concentraciones, por lo cual liberarlo al medio y no acumularlo representa una ventaja para la cepa productora (Modificado de Camacho-Zaragoza et al., 2016).

III.6 PROTEÍNAS FLUORESCENTES COMO HERRAMIENTA PARA EL MONITOREO DE CEPAS DE PRODUCCIÓN

Una de las desventajas de los co-cultivos es que complica el monitoreo y control de cada población, lo cual es necesario para entender su dinámica. Como alternativa para resolver dicho problema se pueden emplear proteínas fluorescentes (FPs por sus siglas en inglés) para monitorear cada cepa del co-cultivo. Las FPs se han utilizado como herramienta en muchas aplicaciones por ser marcadores no invasivos y no tóxicos que permiten la visualización y cuantificación de proteínas, así como el análisis de su localización y movimiento en células vivas. Se han utilizado también para monitorear interacción entre proteínas, como biosensores que describen eventos biológicos y estudios de movimientos de poblaciones de proteínas en las células, entre otros (Lippincott-Schwartz y Patterson, 2003). En este proyecto se propone integrar FPs diferentes en el cromosoma de cada cepa del co-cultivo para monitorear cada una por separado.

La primera proteína fluorescente en ser purificada fue la proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés) que se descubrió en la medusa *Aequorea victoria*. El gen *gfp* fue clonado y se comenzó a utilizar para el análisis de organismos transgénicos y para estudios en biología aplicada. Se han realizado mutaciones para optimizar la GFP y para realizar cambios que lleven a la producción de FPs con diferentes longitudes de onda que sean distinguibles en el análisis. Se ha logrado la creación de FPs azules y amarillas (BFP y YFP respectivamente) a partir de la GFP, aunque también se ha ampliado el descubrimiento de FPs buscando en otros organismos marinos. El estudio de FPs puede llevarse a cabo por la observación con equipos simples o especializados como fluorómetros, espectrofotómetros o citómetros de flujo (Stewart Jr, 2006).

La FP en rojo lejano (FRFP por sus siglas en inglés) codificada por el gen *TagRFP657* se obtuvo realizando mutagénesis aleatoria en una proteína roja fluorescente denominada mKate que fue

purificada de la anémona *Entacmaea quadricolor*. Esta FRFP tiene el pico de excitación a 600nm y el de emisión a 650nm y es posible detectarla mediante el uso de un láser rojo presente en algunos citómetros de flujo (Morozova *et al.*, 2010). Por otro lado, la GFP tiene dos picos de excitación y dos de emisión (395-508nm y 470-503nm), que son diferentes y alejados al que tiene la FRFP por lo que es posible distinguir entre ambas FPs con citómetro de flujo u otros instrumentos de detección (Chalfie, 1995).

III.7 GLICEROL COMO FUENTE DE CARBONO

Existen muchos microorganismos que pueden utilizar el glicerol naturalmente como única fuente de carbono, por lo que es un excelente sustituto para procesos industriales de fermentación (Papanikolaou y Aggelis, 2009). El glicerol, al ser subproducto de la transesterificación de aceites vegetales y grasas animales, representa una fuente de carbono sustentable ambientalmente. Así mismo en procesos industriales, principalmente en la producción de biodiesel, se está sobreproduciendo glicerol por lo cual utilizarlo para producir metabolitos de interés representa una valorización del producto. El precio estimado del glicerol es de \$2.60 a \$4.40 pesos mexicanos por kilogramo, mientras que la glucosa se estima en \$12.00 pesos mexicanos por kilogramo (Quispe *et al.*, 2013).

El metabolismo de la glucosa depende del sistema de fosfotransferasa (PTS, por sus siglas en inglés) necesario para su internalización a la célula. El sistema PTS utiliza PEP, que provee de fosfato al sistema para transportar la glucosa y de esta manera poder internalizarla a la célula (Nelson *et al.*, 2008). Cuando el glicerol está presente como única fuente de carbono, entra a la célula por medio de difusión simple, sin consumir PEP, por lo que más del PEP producido en el metabolismo se puede utilizar para la vía del shikimato, con lo que se aumenta considerablemente el rendimiento para producir compuestos aromáticos y metabolitos derivados de éstos. Por los beneficios presentados se propone utilizar glicerol como fuente de carbono en los cultivos de este trabajo.

III.8 INGENIERÍA DE VÍAS METABÓLICAS EN *Escherichia coli* PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CAFEICO EN UN SISTEMA DE CO-CULTIVO

La ruta metabólica para la producción de AC en *E. coli* a partir de glicerol inicia cuando el glicerol es internalizado a la célula por medio del transportador de membrana GlpF y se produce glicerol-3-fosfato. El glicerol-3-fosfato se utiliza para comenzar la vía de las pentosas fosfato y para la producción de PEP. De estas dos fuentes se produce 3-deoxy-D-arabinoheptulosonato-7-P (DAHP, por sus siglas en inglés), que es un precursor de la vía del shikimato. En la vía del shikimato suceden diversas reacciones que llevan a la síntesis de corismato, posteriormente se da la producción de ácido prefénico y comienza la vía de síntesis de la tirosina y fenilalanina. Solamente a partir de tirosina por medio de las enzimas PAL o TAL (que son poco específicas) se puede producir ácido cumárico y la sobreexpresión de enzimas hidroxilasas mencionadas anteriormente lleva a la producción de AC a partir de ácido cumárico (Hernández-Chávez *et al.*, 2019).

En este trabajo se busca la producción heteróloga de AC en *E. coli* al sobreexpresar los genes *tktA* y *aroG^{fbr}* que codifican para las enzimas transcetolasas y DAHP sintasa, respectivamente, con el fin dirigir el flujo metabólico a la vía del shikimato. La inactivación del gen *pheA* que codifica para la enzima corismato mutasa-prefenato deshidratasa interrumpe la vía de síntesis de fenilalanina, lo que ocasiona que en la vía de los compuestos aromáticos se produzca principalmente tirosina.

Así mismo, se expresará heterológamente la enzima PAL/TAL de la levadura *Rhodotorula glutinis* para lograr la producción de ácido cumárico, el ácido cumárico se produce en una cepa que lo libera al medio de cultivo. Por último, se sobreexpresarán los genes *hpaBC* de la cepa W de *E. coli* que codifican para la enzima 4-hidroxifenil acetato 3-hidroxisilasa que produce el AC. En la figura se muestra al transportador de ácido cumárico AaeXAB (**Fig. 7**).

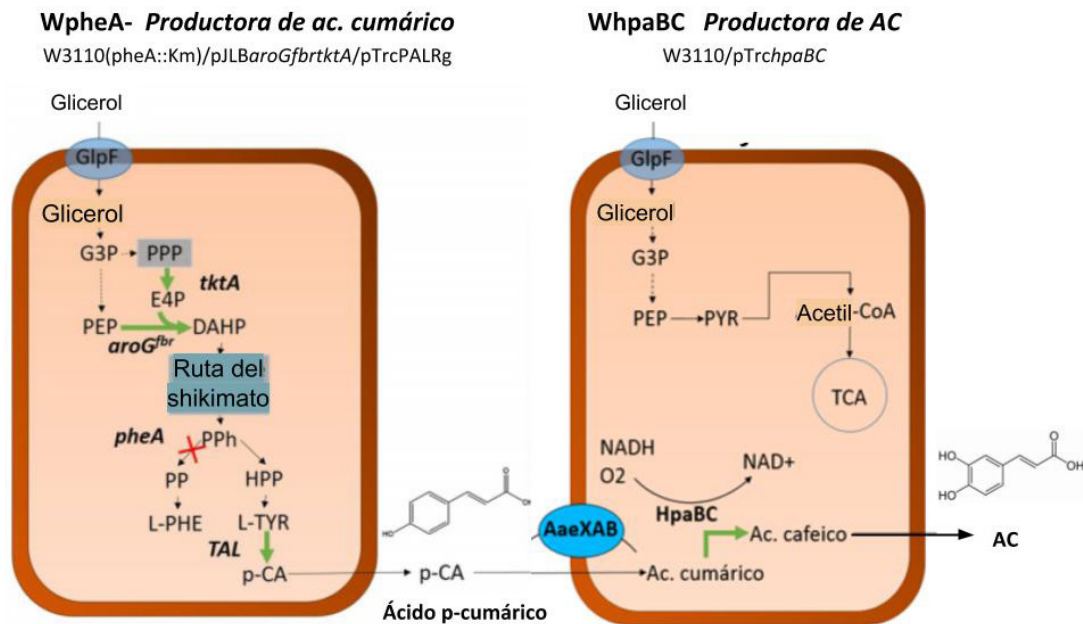


Figura 7. Cepa productora de ácido cumárico y cepa productora de AC construidas para ser probadas en co-cultivo.

IV. JUSTIFICACIÓN

El AC es un compuesto que se encuentra naturalmente en plantas y tiene propiedades de interés farmacéutico y comercial. Su extracción es un proceso costoso, ambientalmente dañino e ineficiente, por lo que es importante producirlo a través de microorganismos en sistemas de fermentación y utilizando ingeniería metabólica. *E. coli* se ha utilizado para producir AC en cantidades limitadas. Una opción para aumentar los niveles de producción es dividir las rutas metabólicas para la producción de AC en dos cepas cultivadas de manera simultánea. Una de ellas especializada para generar ác. cumárico y una segunda para transformarlo en AC, en medio simple con glicerol como fuente de carbono. Además, cada cepa puede ser modificada genéticamente en el cromosoma con la inserción de genes reporteros que codifican para las proteínas fluorescentes FRFP ó GFP de tal manera que se pueda estudiar la dinámica individual y de conjunto de las cepas durante el co-cultivo. Con este sistema se busca establecer la base para contar con un proceso biotecnológico de producción sustentable y escalable, que permita la obtención de AC evitando así la costosa extracción de tejidos vegetales (**Fig. 8**).

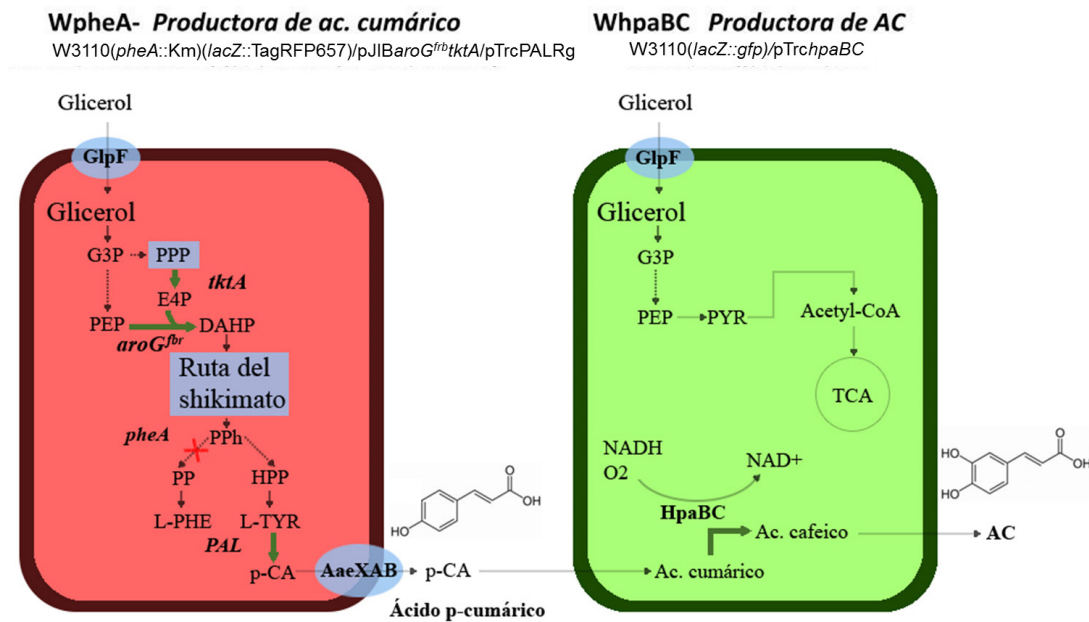


Figura 8. Modelo utilizado en este proyecto. Muestra la cepa WpheaA- productora de ácido cumárico a partir de glicerol, las enzimas sobreexpresadas (marcadas con una flecha verde) y las mutaciones (marcadas con un tache rojo). También se muestra la cepa WhpaBC productora de AC, que introduce ácido cumárico a la célula para producir AC por medio de la enzima hidrolasa codificada con el gen *hpaBC*. La cepa WpheaA- se esquematiza en rojo al tener el gen codificante para la proteína TagRFP657 en cromosoma mientras que la cepa WhpaBC se muestra en verde ya que tiene el gen codificante para la GFP insertada en cromosoma.

V. HIPÓTESIS

Al cultivar simultáneamente la cepa (WpheA-) productora de ácido cumárico con la cepa (WhpaBC) productora de AC, será posible desarrollar un sistema de co-cultivo para sintetizar AC a partir de glicerol. Así mismo, al generar un fondo genético con inserción de FPs en cromosoma, permitirá detectar la proporción de cada cepa del co-cultivo para su análisis individual.

VI. OBJETIVO

VI.1 OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar y utilizar estrategias para el mejoramiento del sistema de co-cultivo para la producción de AC a partir de glicerol con las cepas de *E. coli* WpheA- y WhpaBC.

VI.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar monocultivos en medio M9 con glicerol de las cepas: WpheA- productora de ácido cumárico y WhpaBC productora de AC.
- Caracterizar co-cultivos en medio M9 con glicerol de las cepas: WpheA- productora de ácido cumárico y WhpaBC productora de AC.
- Modificar la cepa WpheA- productora de ácido cumárico con la inserción del gen TagRFP657 en cromosoma para generar la cepa WpheA-/lacZ::TagRFP657.
- Generar la cepa WhpaBC/lacZ::gfp a partir de colonias W3110 que contienen la inserción del gen *gfp* en el cromosoma y transformarla con el plásmido de producción de AC.
- Analizar la fluorescencia de las cepas generadas (WpheA-/lacZ::TagRFP657 y WhpaBC/lacZ::gfp) en el citómetro de flujo.

VII. DISEÑO EXPERIMENTAL

VII.1 CEPAS Y PLÁSMIDOS

Las cepas de *E. coli* y plásmidos empleados y construidos en este trabajo se describen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

Cepa	Característica	Referencia
WpheA-	W3110 (pheA::Km)/pJLBaro ^{fbr} tkA y pTrcPALRg Km ^R , Tc ^R y Cb ^R ,	Vargas-Tah <i>et al.</i> , 2015
WhpaBC	W3110/pTrchpaBC.Cb ^R .	Sánchez-Andrade, n.d.
WpheA-//lacZ::TagRFP657	W3110 (pheA::FRT)(lacZ::TagRFP657)/pJLBaro ^{G^{fbr}tkA} y pTrcPALRg Km ^S , Gm ^R , Tc ^R y Cb ^R .	Este trabajo
Wf13/lacZ::gfp	W3110 (lacZ::gfp) Cm ^R .	Ruiz-Guerrero, n.d.
WhpaBC/lacZ::gfp	W3110 (lacZ::gfp)/pTrchpaBC Cm ^R y Cb ^R .	Este trabajo
Plásmido	Característica	Referencia
pJLBaro ^{G^{fbr}tkA}	aro ^{G^{fbr}} bajo la regulación de lacUV5 y tktA bajo su promotor nativo Tc ^R .	Balderas-Hernández <i>et al.</i> , 2009
pTrcPALRg	Gen PAL de <i>R. glutinis</i> clonado en el vector pTrc99A Cb ^R .	Vargas-Tah <i>et al.</i> , 2015
pTrchpaBC	Genes hpaBC de <i>E. coli</i> clonados en el vector pTrc99A Cb ^R .	Sánchez-Andrade y Gosset, n.d.
pKD46	Genes γ , β y exo de la recombinasa Red del fago λ bajo regulación de ParaB y con replicación termo-sensibles del plásmido pSC101. Cb ^R .	Datsenko y Wanner, 2000.
pTrcTagRFP657	Gen TagRFP657 clonado en el vector pTrc99A. Cb ^R	Martínez-Mejía, n.d.
pLoxGentrc	Gen aacC1 (Gm ^R) entre las secuencias loxP con gen represor lacI, secuencia P _{trc} y terminador rrnB. Gm ^R .	Sabido <i>et al.</i> , 2009
pLoxGentrcTagRFP657	Derivado de pLoxGentrc con el gen TagRFP657. Gm ^R .	Este trabajo

n.d.= sin publicación o fecha de publicación.

VII.2 MEDIOS DE CULTIVO

Composición de los medios de cultivo empleados para cinéticas de crecimiento y técnicas moleculares:

- Medio mineral M9: 6 g/L de Na_2HPO_4 , 3 g/L de KH_2PO_4 , 0.5 g/L de NaCl, 1 g/L de NH_4Cl , 2 mM de MgSO_4 , 0.1 mM de CaCl_2 , 0.01 g/L de vitamina B1 y 10 g/L de glicerol.
- Medio Luria-Bertani (LB): 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de NaCl.
- Medio YENB: 7.5 g/L de extracto de levadura y 8 g/L de caldo nutritivo.
- Medio SOC: 20 g/L de bactotriptona, 5 g/L de extracto de levadura, 2.5 g/L de MgSO_4 , 2 g/L de MgCl_2 , 0.58 g/L NaCl, 93.18 mg/L de KCl.

Medios de cultivo utilizados en las cinéticas de crecimiento:

Tabla 2. Medios de cultivo utilizados en cinéticas de crecimiento y especificaciones. Con los antibióticos, Carbenicilina₁₀₀ (Cb), Tetraciclina₃₀ (Tc) y Kanamicina₃₀ (Km) a concentración de 30 µg/mL

Cepa(s)	Pre-Inóculo	Inóculo	Cultivo
WpheA-	LB, Cb, Tc, Km	Medio M9, Cb, Tc	Medio M9, Cb, Tc, IPTG 0.1 mM, L-fenilalanina 0.3 mM
WhpaBC	LB, Cb	Medio M9, Cb	Medio M9, Cb, IPTG 0.1 mM, ácido p-cumárico 3 mM
WpheA- y WhpaBC (co-cultivo)	LB, Cb	Medio M9, Cb	Medio M9, Cb, IPTG 0.1mM, L-fenilalanina 0.3 mM

VII.3 CINÉTICA DE CRECIMIENTO

Pre-inóculo

Se inoculó una asada de la cepa conservada en glicerol (WpheA- o WhpaBC) en un tubo de ensayo con 4 mL de medio LB y los antibióticos de selección. Los tubos fueron incubados por 8 h, a 37°C y 300 rpm.

Inóculo

Se determinaron las unidades de densidad óptica (a 600_{nm} unidades de absorbancia) (D.O.) del preinóculo en un espectrofotómetro para calcular el volumen necesario para iniciar el inóculo en 25 mL de medio mineral M9 a una D.O. de 0.1 en matraces de 125 mL. El inóculo fue incubado por 12 h a 37°C y 300 rpm.

Cultivo

Se inició el cultivo a una D.O. de 0.1 en 50 mL de medio mineral M9 y en matraces de 250 mL, realizando cuadruplicados de cada cultivo. Los cultivos fueron incubados a 37°C y 300 rpm. Se muestreó 1 mL del cultivo a las 0 y 2 h, 0.5 mL a las 4, 6 y 8 h y 0.1 mL a las 10, 24, 36 y 50 h y se cuantificó la D.O. multiplicando por el factor de dilución, así mismo la D.O. se multiplicó por 0.37 (factor de conversión de D.O. a peso seco (p.s.) estandarizado para la cepa W3110) para determinar la biomasa en p.s. con unidades de g/L. Así mismo, se colectó 1 mL de cultivo para analizar por cromatografía líquida de alta presión (HPLC por sus siglas en inglés) en los tiempos 0, 4, 8, 24, 36

y 50 h, colocándolos en microtubos y centrifugando por 3 min para recuperar el medio libre de células y conservar en congelación.

La cuantificación del glicerol se llevó a cabo en un sistema de HPLC Waters, empleando una columna Aminex HPX-87H y con fase móvil de H₂SO₄ 5 mM a un flujo de 0.5 mL/min a 50°C. La cuantificación de ácido cumárico y AC se llevó a cabo en un sistema HPLC Agilent 100 en una columna Phenomenex Synergi Hydro RP C18 y fase móvil A de 0.1% TFA en metanol con fase móvil B de 0.1% TFA en agua, con un flujo de 1 mL/min a 45°C. Las muestras fueron filtradas con membranas de nylon de 0.45 µm y la cuantificación de las muestras se realizó por interpolación de una curva estándar construida con estándares de los compuestos a determinar.

VII.4 REACCIONES EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCRs) Y OLIGONUCLEÓTIDOS

Las PCRs realizadas en este trabajo se llevaron a cabo con la Taq polimerasa recombinante (Thermo Fisher) con un volumen de reacción de 50 µL. La reacción se llevó a cabo con 0.2 mM de dNTP's, 0.3 µM del Primer Forward (Fw), 0.3 µM del Primer Reverse (Rv), 1X BufferTaq, MgCl₂ 2 mM, 0.9 µL de la enzima TaqDNA polimerasa y del DNA templado se agregó el volumen necesario para obtener de 50-100 ng (cuantificado por nanodrop). La reacción se llevó a cabo en el equipo BioRad Thermal Cycler C1000 usando un programa con las siguientes etapas:

1. Un ciclo de pre-desnaturalización a 94°C por 5 minutos.
2. 30 ciclos de amplificación, cada uno con un paso de desnaturalización a 94°C por 45 segundos, alineamiento con temperatura variable dependiendo de los oligos utilizados de 54-60°C por 1 minuto y polimerización a 72°C por 1 minuto por cada kpb
3. Un ciclo de extensión final a 72°C por 7 minutos.

Los oligonucleótidos utilizados para amplificar mediante PCR el DNA cromosomal, DNA plasmídico y para realizar las comprobaciones de integraciones en cromosoma se describen en la **Tabla 3:**

Tabla 3. Oligo-empleados para este trabajo:

Nombre del oligo	Secuencia 5'-3'	Uso
trcmelA/lacZfwd	GAGTGCATCTTCCTGAGGCCGA-TACTGTCGTCGTCCCCTCAAAC-GCTTATCATCGACTGCACGG	Amplificación de pLoxGentrcFRFP e integración cromosomal
trcmelA/lacZrvs	GACATGGCCTGCCCGGTTATTAT-TATTTTTGACACCAGACCAACTG-CACAGATGCGTAAGGAGAA	Amplificación de pLoxGentrcFRFP e integración cromosomal
pheA- Fw	GACGCCACAATCAATACACC	Comprobación de genotipo pheA-
pheA- Rv	CGTCGAGCACGATCAGAATA	Comprobación de genotipo pheA-

Nombre del oligo	Secuencia 5'-3'	Uso
MCS down	GCAAGCAGATTACGGTGACG	Comprobación de sustitución de <i>frfp</i> por <i>lacZ</i> en cromosoma. Fw
pLoxGentrc up	TGTGCTGCAAGGCGATTAAG	Comprobación de sustitución de <i>frfp</i> por <i>lacZ</i> en cromosoma. Rv
gfp F	GACCCGCCACAACATTGAAG	Comprobación de sustitución de <i>gfp</i> por <i>lacZ</i> en cromosoma. Fw
<i>LacZ</i> ::tcm	GTGGCGAACGATGAGCCAAT	Comprobación de sustitución de <i>gfp</i> por <i>lacZ</i> en cromosoma. Rv

VII.5 TRANSFORMACIÓN CON PLÁSMIDOS DE PRODUCCIÓN

Se realizaron transformaciones bacterianas en las cuales se introdujeron plásmidos a las cepas para la producción de ácido cumárico y AC. Se comenzó realizando una mini-preparación de plásmido por lisis alcalina en la cual se incubó la cepa que contiene el plásmido en 4 mL del medio LB con el antibiótico de resistencia a 37°C por toda la noche. Posteriormente 1.5 mL del cultivo saturado se transfirió a un microtubo que se centrifugó a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente (TA) y se eliminó el sobrenadante. Se lavó la pastilla con una solución SET (Sacarosa, EDTA y Tris), se centrifugó en las mismas condiciones y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió la pastilla en solución SET con 5 µL RNAasa (a 0.0001 g/L), SDS 2% y NaOH 0.4 N, incubando en hielo por 8 minutos. Posteriormente se agregó acetato de sodio 3 M y se dejó incubando en hielo por 20 min. Se centrifugó por 5 minutos a TA y se recuperó el sobrenadante, se agregó isopropanol y se agitó, posteriormente se centrifugó por 5 minutos a TA. Se lavó la pastilla con etanol al 70%, se centrifugó por 5 minutos se eliminó el sobrenadante y se dejó secar por 15 minutos. Así se obtuvo el plásmido purificado para la transformación.

De las cepas a transformar se prepararon células electrocompetentes de la siguiente forma: A partir del glicerol de la cepa conservada a -70°C se inocularon las cepas en un tubo con 4 mL de medio YENB por toda la noche a 37°C y 300 rpm. Posteriormente se inoculó 0.25 mL de ese cultivo saturado en 50 mL de medio YENB dentro de un matraz de 500 mL bajo las mismas condiciones.

Cuando el cultivo llegó a una D.O. entre 0.5 y 0.9 el cultivo se pasó a tubos cónicos y se centrifugó a 8,000 rpm y 4°C por 5 minutos. Se lavó la pastilla 2 veces en agua desionizada para finalmente resuspender en glicerol al 10%, haciendo alícuotas de 50 µL en microtubos y conservando en hielo seco para su almacenamiento a -70°C.

Con las células electrocompetentes se llevó a cabo la electrotransformación, se descongeló una alícuota y se le agregó de 1-4 µL del DNA obtenido en la mini-preparación de plásmido. Se transfirió la suspensión en una cubeta de electroporación de 0.2 mm y se electroporó a 2500 V. Se añadieron 950 µL de medio SOC y se transfirió a un tubo de cultivo para incubar 1 h a 37°C y 300 rpm. Se platearon las células en cajas con LB y el antibiótico de selección con la resistencia

codificada en el plásmido y se incubaron toda la noche a 37°C. Se probaron 5 colonias realizando una mini-preparación de plásmido de cada una, digiriéndolo con enzimas de restricción y corriendo un gel de agarosa para comprobar el tamaño del plásmido.

En este trabajo se transformó la cepa *WpheA-//lacZ::TagRFP657*, que tiene el gen que codifica para la FRFP sustituyendo a *lacZ* en cromosoma, con los plásmidos pJLBaroG^{fbt}tkA y pTrcPALRg que permiten la producción de ácido cumárico a partir de glicerol. Así mismo se transformó la cepa *Wf13 lacZ::gfp*, que contiene el gen que codifica para la proteína GFP en cromosoma, con el plásmido pTrc*hpaBC* que permite la producción de AC a partir de ácido cumárico. Así se obtuvieron las cepas productoras fluorescentes para poder analizar en citómetro de flujo.

VII.6 CLONACIÓN E INTEGRACIÓN AL CROMOSOMA DEL GEN TagRFP657 A *E. coli*

El gen TagRFP657 se integró en un vector pTrc y se obtuvo el plásmido pTrcTagRFP657, vector de clonación que permite la digestión con enzimas de restricción que cortan el plásmido en sitios únicos. Dicho plásmido se digirió con las enzimas *NcoI* y *HindIII* para liberar el fragmento del gen TagRFP657, dicha digestión se llevó a cabo con el buffer 1 XTango con el doble de enzima *HindIII* que de *NcoI*, a 37°C por 3 h y se inactivaron las enzimas a 80°C por 20 min.

El gen TagRFP657 se clonó en el plásmido pLoxGentrc, que contiene el gen de resistencia a gentamicina (Gm) y sitios de reconocimiento a los oligos de amplificación. El plásmido pLoxGentrc se digirió con las enzimas *NcoI* y *HindIII* con las mismas condiciones de la digestión mencionada anteriormente. Posteriormente se realizó la ligación del plásmido y el gen TagRFP657 con 1 unidad de ligasa T4 a 22°C por 15 h y se inactivó a la ligasa a 65°C por 10 min, la ligación se transformó en células electrocompetentes de *E. coli* y así se obtuvo como producto el plásmido pLoxGentrcTagRFP657 plásmido que posibilita amplificar un fragmento de PCR con el marcador de selección por resistencia a Gm y el fragmento codificante al gen de interés TagRFP657 (**Fig. 9**).

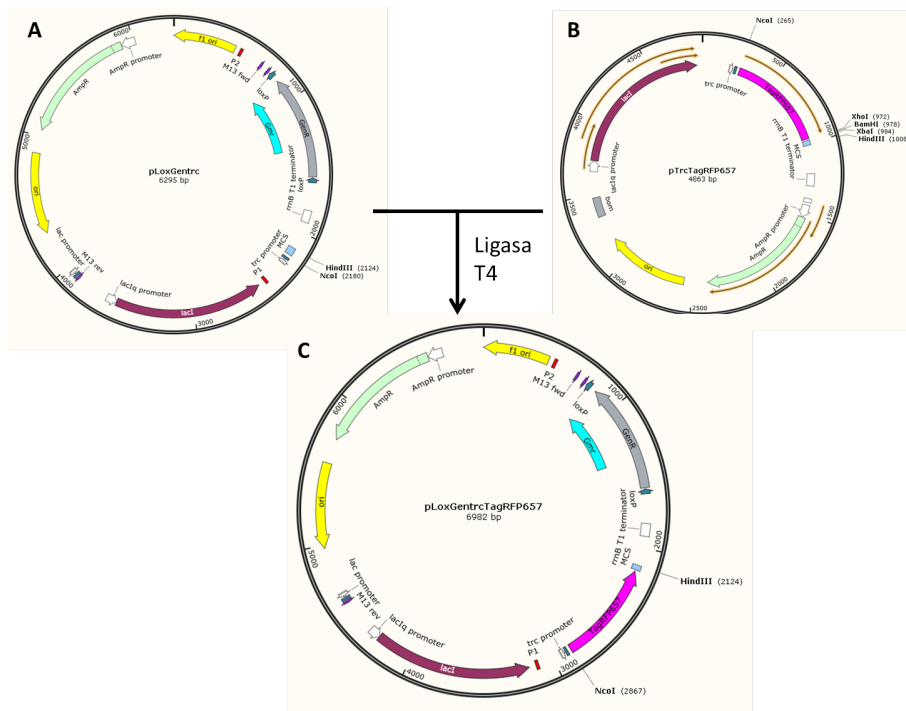


Figura 9. Clonación de gen TagRFP657 en el plásmido pLoxGentrc. A) Plásmido pTrcTagRFP657. B) Plásmido pLoxGentrc, ambos plásmidos se digirieron con las enzimas *NcoI* y *HindIII*. C) Plásmido producido pLoxGentrcTagRFP657.

Posteriormente se generó un producto de PCR utilizando los siguientes oligos:

- **trcmelA/lacZfwd**

5'GAGTGCATCTTCTGAGGCCGATACTGTCGTCGTCCCCTCAAAC**gcttatcatcgactgcacgg3'**

H1

P1

- **trcmelA/lacZrvs**

5'GACATGGCCTGCCCGTTATTATTATTTTTGACACCAGACCAACT**gcacagatgcgtaaggagaa3'**

H2

P2

Donde P1 y P2 tienen homología al plásmido molde pLoxGentrcTagRFP657 y H1 y H2 tienen homología al gen *lacZ* (Sabido *et al.*, 2009). El producto de PCR se digirió con *DpnI*, que reconoce sitios metilados y corta plásmidos y no productos de PCR ya que es el producto el que se busca incorporar al DNA. Se corrió un gel preparativo de agarosa con el producto de la digestión y se purificó la banda que contiene el DNA lineal para la integración al cromosoma (**Fig. 10**).

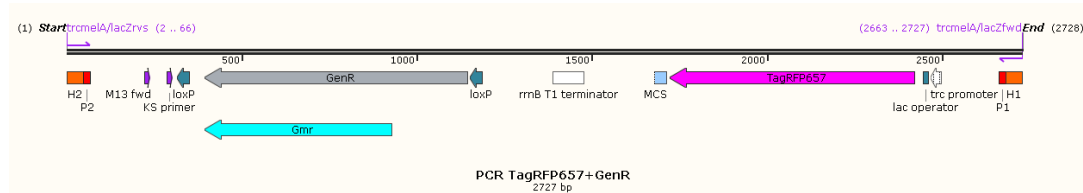


Figura 10. Producto de PCR con genes codificantes para la FRFP y la resistencia a Gm. Se observan las regiones H1 y P1, así como H2 y P2 de los oligos para la amplificación.

Se transformó la cepa W3110 (*pheA::FRT*) con el plásmido pKD46 que contiene las recombinasas del sistema Lambda red. Se prepararon células electrocompetentes de dicha cepa y se transformaron con 100 ng del DNA lineal producto de PCR, esto se realizó para la integración del DNA lineal al cromosoma y se dejó recuperando por 4 h en la incubadora a 30°C. En dicho tiempo el DNA lineal se recombinó con el DNA cromosomal de la cepa, reconociendo la secuencia de homología al gen *lacZ* y sustituyéndolo por el gen de resistencia a Gm y TagRFP657 provenientes del DNA lineal (**Fig. 11**). Posteriormente se plaqueó en medio LB con Gm, para la recuperación.

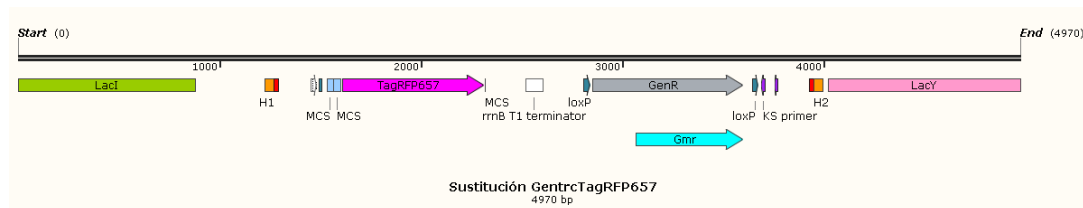


Figura 11. Fragmento de DNA cromosomal con el fragmento de DNA lineal proveniente de la PCR sustituyendo el gen *lacZ* en el cromosoma de *E. coli*.

La integración del gen TagRFP657 en el cromosoma provoca la eliminación del gen *lacZ*, esto permite seleccionar las colonias de las candidatas positivas por su color blanco en una placa que contiene X-gal porque perdieron la actividad beta galactosidasa codificada por el gen *lacZ*. El fenotipo negativo se observa en las colonias azules que muestran este color por la reacción de la beta galactosidasa con el X-gal.

El sistema completo se presenta a continuación (Fig. 12):

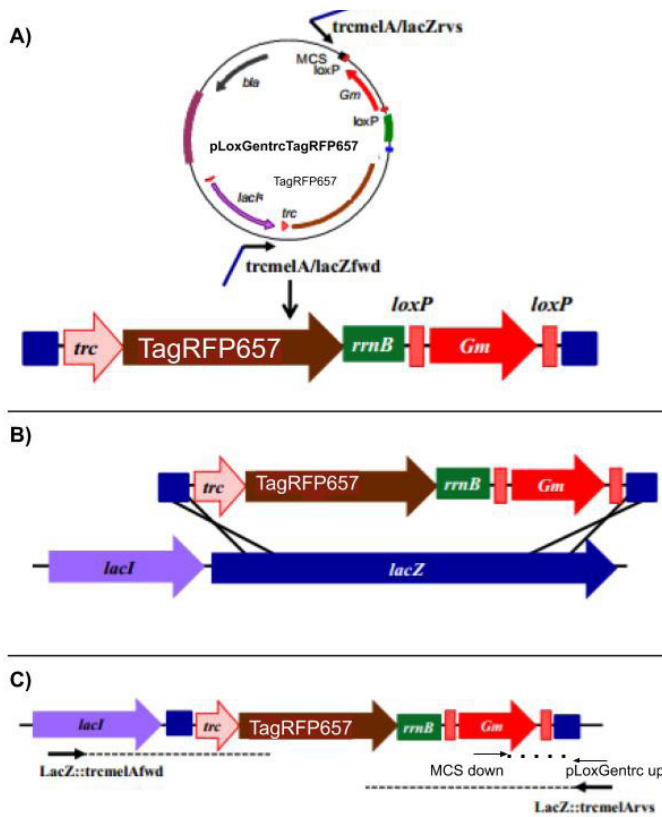


Figura 12. Esquema del sistema de integración al cromosoma. A) Generación del producto de PCR a partir del pLoxGentrcTagRFP657, los *primers* utilizados para amplificar (*trcmelA/lacZfwd* y *trcmelA/lacZrvs*) llevan identidad con el plásmido templado y con *lacZ*. B) Recombinación homóloga entre el DNA lineal y *lacZ* cromosomal mediada por el sistema λ -Red. C) Selección de las transformantes por su resistencia a *Gm* y fenotipo de colonia blanca. Confirmación por PCR con oligos *MCS down* y *pLoxGentrc up*. (Modificado de Sabido *et al.*, 2009).

VII.7 CITOMETRÍA DE FLUJO EN CEPAS PRODUCTORAS, FLUORESCENTES

Se realizaron pre-inóculos, inóculos y cultivos de las cepas *WpheA-//lacZ::TagRFP657* y *WhpaBC/lacZ::gfp* con los mismos medios utilizados en las cinéticas de crecimiento. Los cultivos se dejaron en incubación por 8 h y se tomaron muestras de 1 mL en microtubos.

Las muestras se procesaron al centrifugar a 13 Krpm por 3 minutos y después se eliminó el sobrenadante. Se agregó 1 mL de PBS para frenar el crecimiento celular, analizar en citómetro de flujo AMNIS y determinar la fluorescencia de las células en la muestra. Se utilizó el citómetro de flujo AMNIS ImageStream MKII con flujo a velocidad de 44 mm/segundo y diámetro de 7

micrones. Para detectar la fluorescencia en rojo se utilizó el láser a 592_{nm} con intensidad de 300 mW y para detectar la fluorescencia en verde se utilizó el láser a 488_{nm} con intensidad de 200 mW.

Al observar conglomerados en las muestras se agregó un lavado con Tritón X-100 al procesamiento de muestras. Se colocó 1 mL de la muestra en un microtubo, se centrifugó por 3 minutos y se eliminó el sobrenadante, se agregó 1 mL de PBS + Tritón X-100 al 0.1%, y se agitó en vórtex por 1 min y posteriormente se centrifugó a 13 Krpm por 3 minutos, eliminando el sobrenadante y conservando las muestras en 1 mL de PBS para analizar en el AMNIS.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VIII.1 CARACTERIZACIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS EN MONOCULTIVO Y CO-CULTIVO

Para cumplir los objetivos del proyecto se comenzó caracterizando individualmente la cepa WpheA-, productora de ácido cumárico (**Fig. 13**) y la cepa WhpaBC, productora de AC (**Fig. 14**). De cada una se determinó el crecimiento en peso seco (p.s.), el consumo de glicerol y la producción de ácido cumárico por la cepa WpheA- y AC por la cepa WhpaBC.

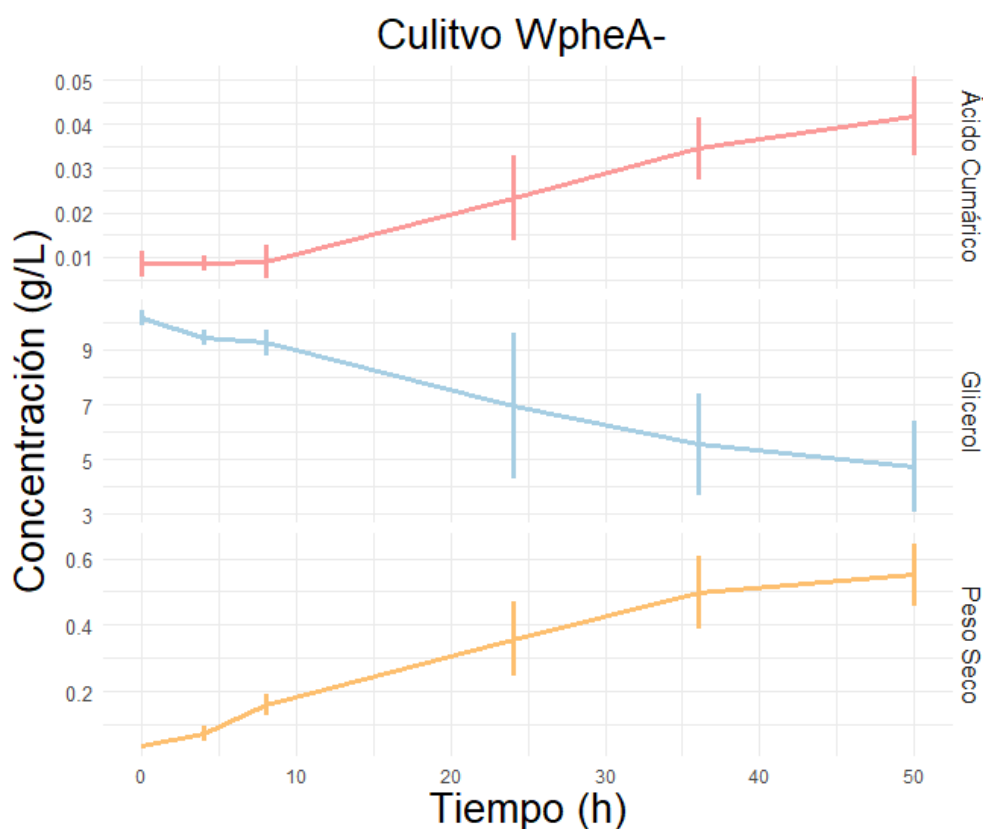


Figura 13. Cinética de crecimiento, consumo de glicerol y producción de ác. cumárico de la cepa WpheA- en medio mineral M9 con 10 g/L de glicerol como fuente de carbono. El crecimiento se expresa en p.s. con concentración dada en g/L. La concentración del glicerol y el ác. cumárico está dada en g/L.

La cepa WpheA- consumió aproximadamente 6 g/L de glicerol en 50 h, llegó a un peso seco de 0.551 ± 0.009 g/L y a la fase estacionaria en dicho tiempo. La producción de ácido cumárico por esta cepa fue de 0.042 ± 0.009 g/L en 50 h comenzando la producción a las 8 h del cultivo.

Cultivo WhpaBC

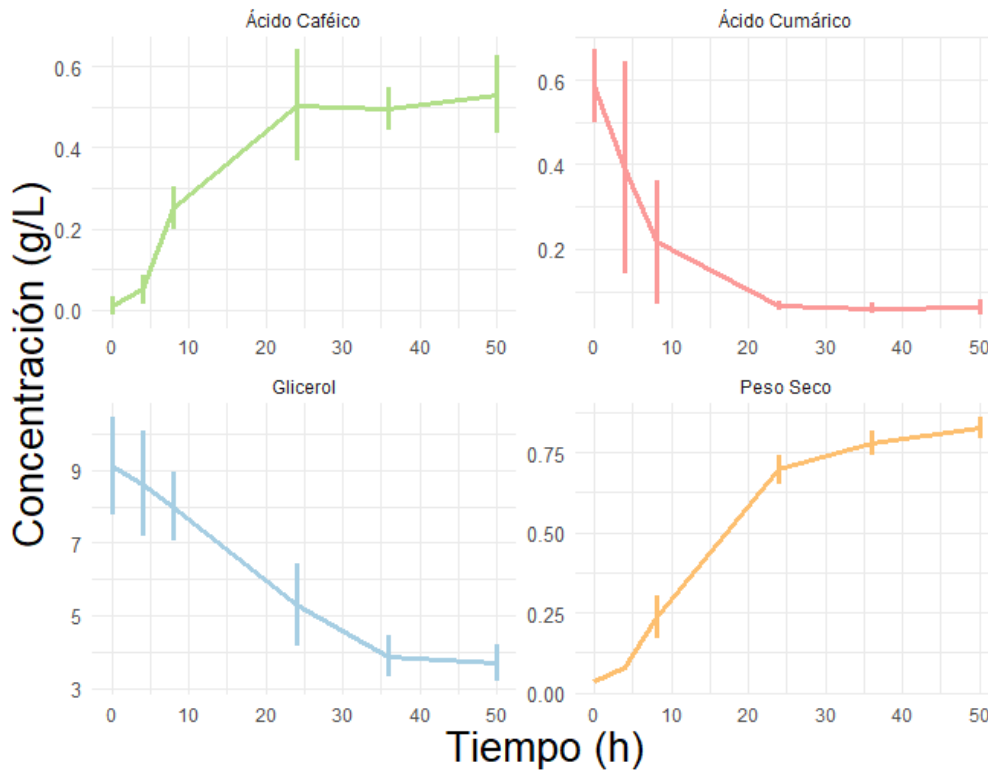


Figura 14. Cinética de crecimiento, consumo de glicerol y ac. cumárico y producción de AC de la cepa WhpaBC en medio mineral M9 y 10 g/L de glicerol como fuente de carbono y con 0.58 g/L de ac. cumárico suplementado al medio. El crecimiento se expresa en p.s. con concentración dada en g/L. La concentración del glicerol, el ác. cumárico y el AC está dada en g/L.

La cepa WhpaBC también consumió aproximadamente 6 g/L de glicerol en 50 h y llega a la fase estacionaria en ese tiempo con un peso seco de 0.826 ± 0.003 g/L. La cepa consumió prácticamente todo el ácido cumárico suministrado (0.586 ± 0.085 g/L) y la conversión de ácido cumárico a AC fue del 90%, produciendo 0.530 ± 0.096 g/L de AC. La conversión de ácido cumárico a AC se lleva a cabo mayormente a partir de las 4 h y hasta las 24 h, ya que el sustrato se agota en ese tiempo. La velocidad de crecimiento (μ) de las cepas en monocultivo obtenidas fue de 0.11 ± 0.005 (h^{-1}) para la cepa Wphea- y de 0.14 ± 0.008 (h^{-1}) para la cepa WhpaBC siendo estadísticamente distintas ($P=0.0108$). Al ser más lenta la cepa productora de ácido cumárico, tarda más tiempo (42 h aprox.) en llegar a fase estacionaria, mientras que la cepa productora de AC llega a dicha fase a las 24 h de iniciado el cultivo.

El análisis de la velocidad de producción (q_p) de ácido cumárico por la cepa Wphea- y la velocidad de consumo (q_s) del mismo por la cepa WhpaBC muestran la $q_p = 0.0099$ g ac. cumárico/g células*h y la $q_s = 0.169$ g ac. cumárico/g células*h durante la fase exponencial (de 0 a 8 h). Los cálculos de la razón q_s/q_p en el rango de las 0 a las 8 h muestran que en fase exponencial la velocidad de consumo de ácido cumárico es 17 veces mayor que la velocidad de su producción. Con estos cálculos y teniendo en cuenta que la cepa productora de AC tiene una mayor velocidad de crecimiento que la cepa productora de ácido cumárico, se decidió hacer dos co-cultivos variando la proporción de células al iniciar el experimento. El co-cultivo 1:1 se preparó como

experimento control para explorar el comportamiento de los parámetros cinéticos estando las dos cepas acopladas y se planeó un co-cultivo 17:1, buscando que al estar 17 veces más concentrada la cepa WpheA- la velocidad de producción y de consumo de ácido cumárico puedan aproximarse y así lograr el mayor título de AC.

Los resultados mostraron que tanto en el co-cultivo con proporción 1:1 (**Fig. 15**) como el de proporción 17:1 (**Fig. 16**) el consumo de glicerol fue más del 90% y el peso seco alcanzado a las 50 h fue de 0.739 ± 0.014 g/L y de 0.736 ± 0.005 g/L respectivamente. El co-cultivo 1:1 no alcanzó la fase estacionaria en 50 h, mientras que el co-cultivo 17:1 alcanzó la fase estacionaria a partir de las 36 h. En el co-cultivo de proporción 1:1 se llevó a cabo la conversión de la mayor parte del ácido cumárico a AC, llegando a producir 0.042 ± 0.004 g/L de AC. En comparación, en el co-cultivo de proporción 17:1, a pesar de acumular notoriamente el ácido cumárico, se observa menor producción de AC alcanzando 0.028 ± 0.002 g/L.

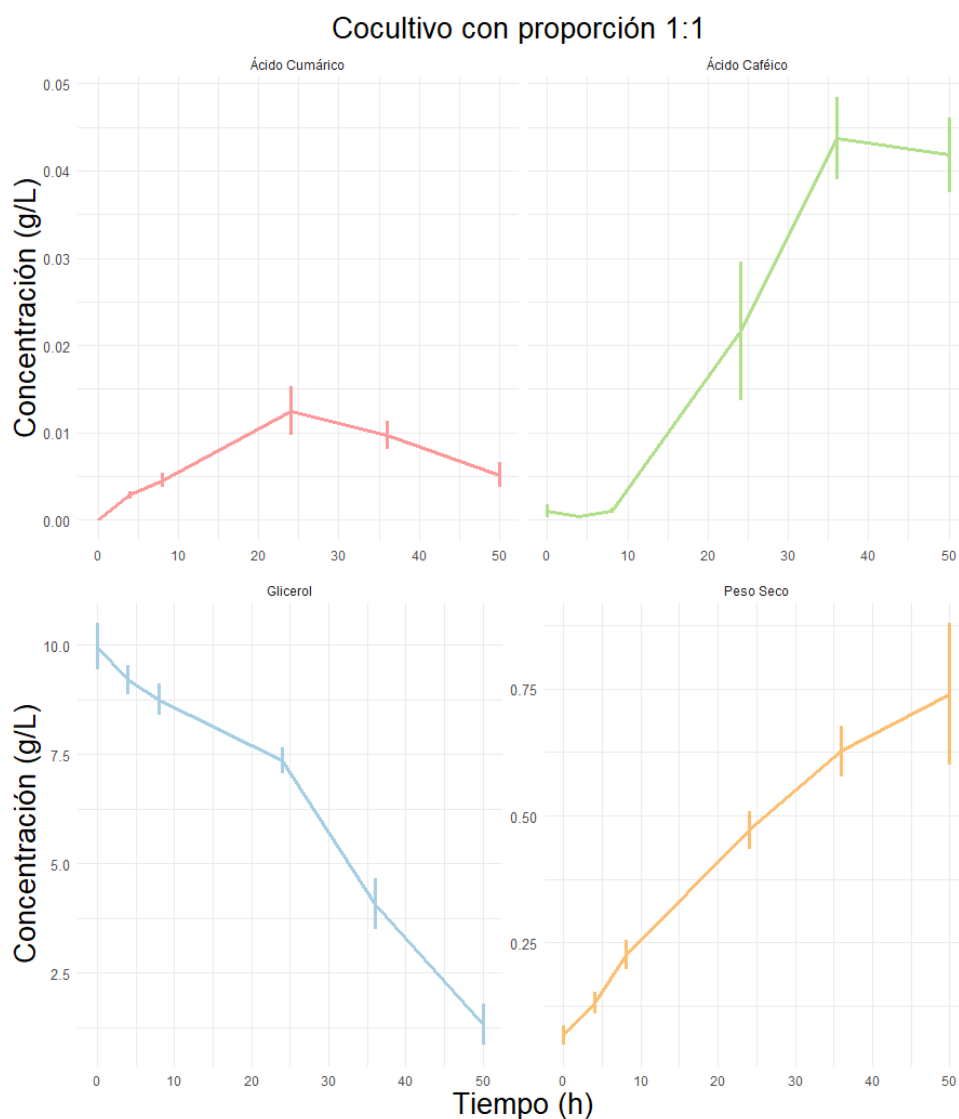


Figura 15. Cinética de crecimiento, consumo de glicerol y producción de ác. cumárico y AC de co-cultivo con proporción 1:1 de las cepas WpheA- y WphaBC, en medio mineral M9 y 10 g/L de glicerol. El crecimiento se expresa en p.s. con concentración dada en g/L. La concentración del glicerol, el ác. cumárico y el AC está dada en g/L.

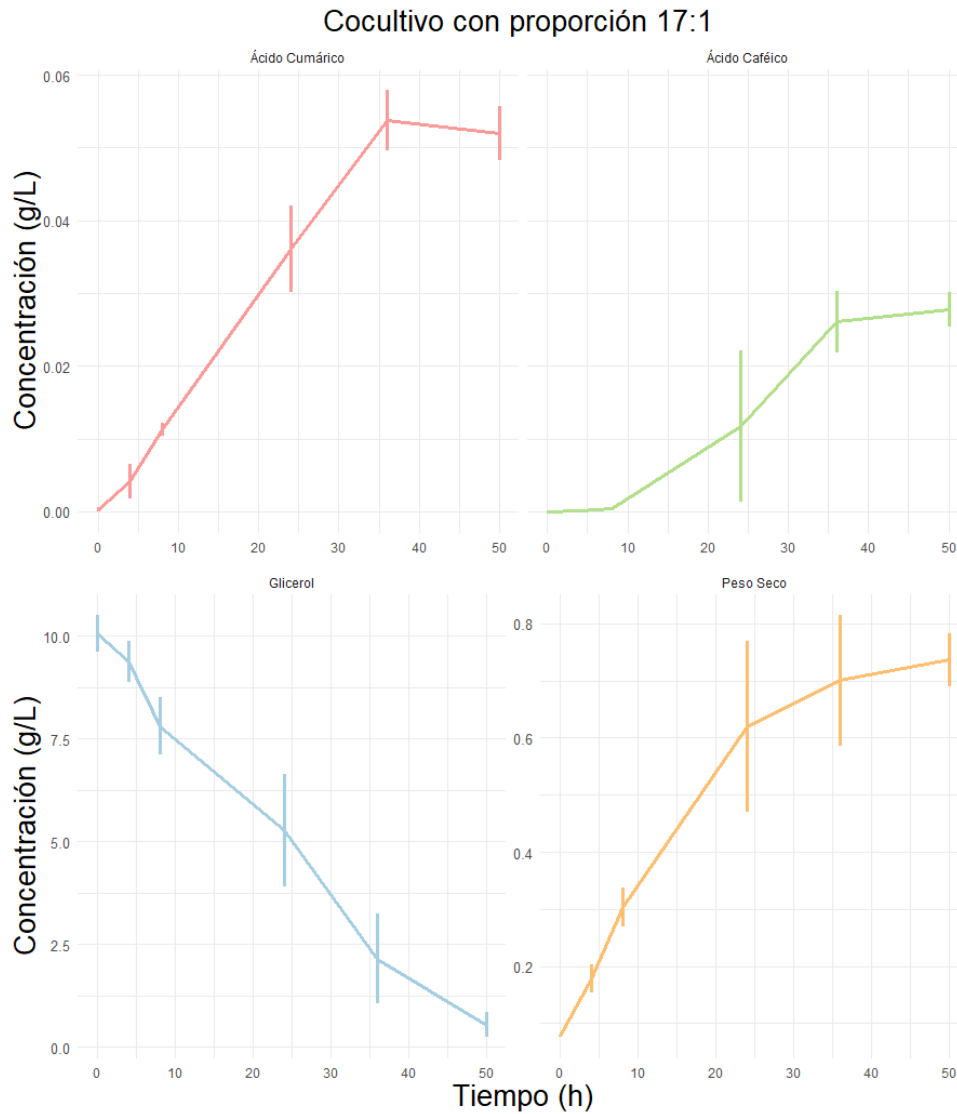


Figura 16. Cinética de crecimiento, consumo de glicerol y producción de ac. cumárico y AC del co-cultivo con proporción 17:1, en medio mineral M9 y 10 g/L de glicerol. Co-cultivo con 16 veces más concentrada la cepa Wphea- que la WhpaBC al iniciar el cultivo (0 h). El crecimiento se expresa en p.s. con concentración dada en g/L. La concentración del glicerol, el ác. cumárico y el AC está dada en g/L.

La bioconversión de ácido cumárico a AC observada en el monocultivo de la cepa WhpaBC es cercana al 100%, es decir, por cada molécula de ácido cumárico se obtiene una molécula de AC. Por eso es de esperarse que en los co-cultivos, eventualmente cada molécula de ácido cumárico sea convertida a una molécula de AC si se extiende el tiempo del cultivo. Por lo tanto, si sumamos la cantidad de ácido cumárico y AC en todos los cultivos, obtendremos la cantidad total capaz de ser producida de AC en cada co-cultivo (**Tabla 4**).

Tabla 4. Título de ácido cumárico, AC y su suma obtenidos en los monocultivos y co-cultivos.

	Título ac. cumárico (mg/L)	Título ac. cafeico (mg/L)	Título ac. cumárico + ac. cafeico (mg/L)
WpheA-	41.8 ± 8.9		
WhpaBC		530 ± 95.7*	
Co-cultivo 1:1	5.2 ± 1.4	41.8 ± 4.3	47 ± 5.7
Co-cultivo 17:1	51.9 ± 3.7	27.8 ± 2.4	79.7 ± 6.1

*En este experimento se adicionaron 600 mg/L de ácido cumárico al medio de cultivo.

En el co-cultivo 1:1 se alcanza un título de AC mayor que en el de 17:1, pero sumando la concentración de ácido cumárico y AC se obtiene un título total de AC de 79.7 ± 6.1 mg/L en el co-cultivo con proporción 17:1, siendo mayor que en el co-cultivo 1:1 que llegó a 47 ± 5.7 g/L. Este análisis indica que el sistema de co-cultivo desarrollado en este trabajo tiene potencial para sintetizar simultáneamente los dos productos de interés y que es muy importante ajustar la relación de las cepas para conseguir que el ácido cumárico producido sea consumido para llevar a la producción de AC. El reto al que nos enfrentamos es de optimizar el sistema de bioconversión de manera eficiente para mejorar la producción de AC. Una alternativa será escalar los cultivos de matraz a fermentador para aumentar la producción hasta diez veces más, como ha sucedido al escalar otros productos. Entonces, reitero que llevar a cabo el escalamiento ascendente es de sumo interés para el co-cultivo desarrollado en esta tesis.

Además de pretender escalar el sistema, para conocer la proporción óptima entre las cepas del co-cultivo que conduzca a la mejor producción de ácido cumárico y que sea convertido eficientemente a AC, se realizaron los cálculos para conocer la velocidad específica de producción de ácido cumárico de la cepa WpheA- así como la velocidad específica de consumo de ácido cumárico y de producción de AC por medio de la cepa WhpaBC durante las 50 h del cultivo, y no solamente durante la fase estacionaria ya que la producción de ácido cumárico no sucede de las 0 a las 8 horas, sino que comienza a las 8 h y continúa hasta las 50 h (**Tabla 5**).

Con estos cálculos, al hacer una comparación entre la velocidad específica de producción de ácido cumárico y la velocidad específica de consumo del mismo compuesto en los monocultivos durante las 50 h, se obtuvo que la velocidad de consumo es 8 veces mayor que la de producción. Tomando en cuenta este resultado se sugiere que realizar un co-cultivo con proporción 8:1, con 8 veces más concentrada la cepa WpheA- productora de ácido cumárico podríamos optimizar la producción de AC, evitando la acumulación de ácido cumárico, pero con una cantidad que permita un mayor título de AC.

Tabla 5. Velocidad específica de producción de ácido cumárico por medio de la cepa WpheA- (qp ac. cumárico WpheA-). Velocidad específica de consumo de ácido cumárico (qs ac. cumárico WhpaBC) y de producción de AC por medio de la cepa WhpaBC (qp AC WhpaBC). Todos los datos calculados de los monocultivos a las 50 h.

qp ac. cumárico WpheA-*	qs ac. cumárico WhpaBC*	qp AC WhpaBC**
0.0016 ± 0.0003	0.0133 ± 0.0024	0.0134 ± 0.0022

*g ac. cumárico/g células*h ** g AC/g células*h

VIII.2 CEPAS FLUORESCENTES Y PRODUCTORAS

A pesar de conocer la velocidad de crecimiento y los parámetros cinéticos de las cepas en monocultivo, no podemos afirmar que en co-cultivo se conserven los mismos valores. La actividad biológica de las cepas en el mismo cultivo podría modificarse con respecto a los monocultivos, por lo que el análisis de los co-cultivos se dificulta al no conocer la proporción de cada cepa durante la cinética. Para seguir el comportamiento de cada cepa en el co-cultivo se puede rastrear cada una durante la cinética por cuentas viables, donde cada colonia corresponde a una célula. Esto es posible cuando las cepas tienen diferentes marcadores de selección como en el caso de este trabajo, sin embargo, se probó la técnica y resultó muy laboriosa y presentó mucha disparidad en las 4 repeticiones realizadas. Otra manera de resolver dicha problemática es poniendo marcadores de genes fluorescentes en el cromosoma de cada cepa, en esta tesis se propuso realizar integraciones en el cromosoma para generar cepas fluorescentes, codificantes para dos distintas FPs y así poder determinar por fluorescencia la proporción de cada cepa en los tiempos de cultivo analizados. Esta estrategia permite entender la dinámica de crecimiento de cada una de las cepas presentes en el co-cultivo.

La cepa *WpheA-//lacZ::TagRFP657* se generó en un fondo genético W3110 y se realizó la inserción a cromosoma del gen *TagRFP657* que sustituyó al gen *lacZ*. Se transformó dicha cepa con los plásmidos para producción de ácido cumárico, *pJLBaroG^{fbr}tkA* y *pTrcPALRg* (**Fig. 17**).



Figura 17. Comprobación genética de cepa *WpheA-//lacZ::TagRFP657*. 1) Marcador de peso molecular 1 kb de Thermo. 2) Comprobación de mutación de *pheA* (850 pb). 3) Comprobación de inserción de *TagRFP657* (329 pb). 4) Dos plásmidos de producción *pJLBaroG^{fbr}tkA* (9745 pb) y *pTrcPALRg* (6404 pb) con digestión simple.

La cepa *WhpaBC/lacZ::gfp* se generó con un fondo genético W3110, con la sustitución del gen *lacZ* por *gfp* en el cromosoma. Así mismo se transformó con el plásmido de producción de AC, pTrchpaBC (**Fig. 18**).

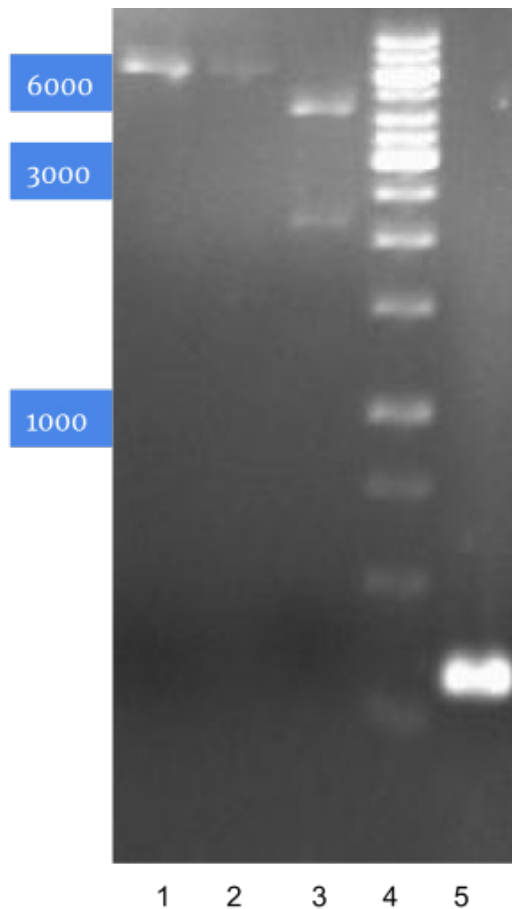


Figura 18. Comprobación de cepa *WhpaBC/lacZ::gfp*. 1 y 2) Digestión simple de plásmido pTrchpaBC (6465 pb). 3) Digestión doble de plásmido pTrchpaBC (Fragmento de 2340 pb y fragmento de 4125 pb). 4) Marcador de peso molecular 1 kb de Thermo. 5) Comprobación de inserción de *gfp* (303 pb).

VIII.3 CITOMETRÍA DE FLUJO EN CEPAS FLUORESCENTES Y PRODUCTORAS

Se realizaron cultivos tanto de las cepas fluorescentes generadas: *WpheA-//lacZ::TagRFP657* y *WhpaBC//lacZ::gfp* como de las cepas *WpheA-* y *WhpaBC* sin fluorescencia tomando las últimas como control. Se tomaron muestras a las 8 h de cultivo, se analizaron en citómetro de flujo AMNIS y se graficó la intensidad de fluorescencia de cada una.

Se cuantificó la intensidad de fluorescencia de la cepa *WpheA-//lacZ::TagRFP657* en el canal 11 del citómetro que tiene el láser que permite cuantificar la fluorescencia en rojo. El láser se puso a la máxima potencia. Comparada con el control (A), que tiene un pico de fluorescencia debajo de 0, se observa que la intensidad de la cepa fluorescente en rojo lejano tiene un pico de fluorescencia entre 0 y 1000 (**Fig. 19**). Con estos resultados se determinó que la cepa era fluorescente y que puede reconocerse en co-cultivo con alguna cepa que no tenga el gen que codifique para la FRFP.

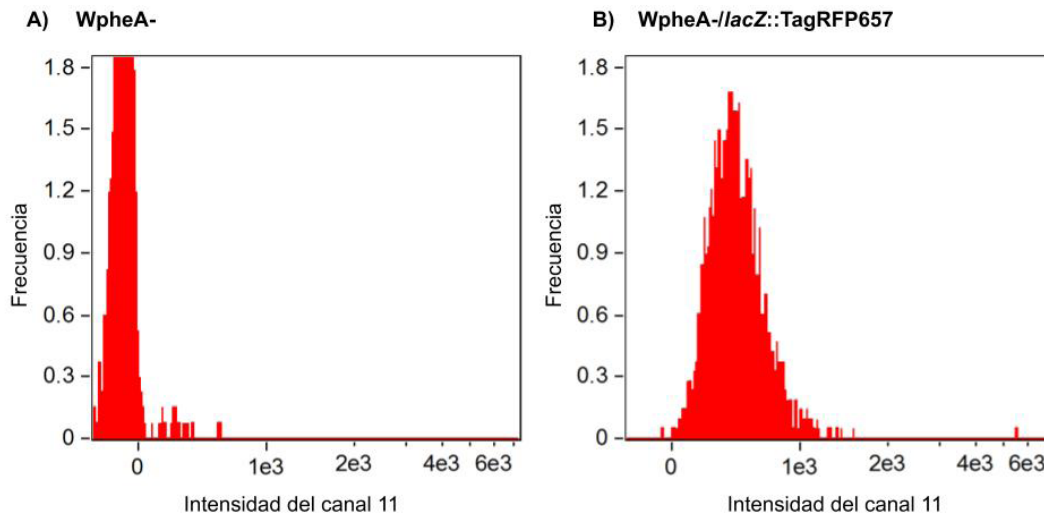


Figura 19. Comprobación fenotípica de cepa fluorescente en rojo lejano empleando citometría de flujo. A) Control: WpheA-. B) Cepa con proteína fluorescente en rojo lejano (FRFP) en cromosoma: WpheA-/lacZ::TagRFP657.

Por otro lado se cuantificó la intensidad de fluorescencia de la cepa WhpaBC/lacZ::gfp en el canal 2 del citómetro que tiene el láser que permite cuantificar la fluorescencia en verde. En este caso vemos que en la fluorescencia del control (A) los valores van del 0 al 400 contando con un pico en el 200. Esto se debe a que todas las células tienen autofluorescencia en la longitud de onda verde. Sin embargo se observa que la cepa WhpaBC/lacZ::gfp cuenta con una fluorescencia mayor, con un pico de intensidad en el 400, por lo cual se puede separar de las células que solo presentan autofluorescencia (**Fig. 20**).

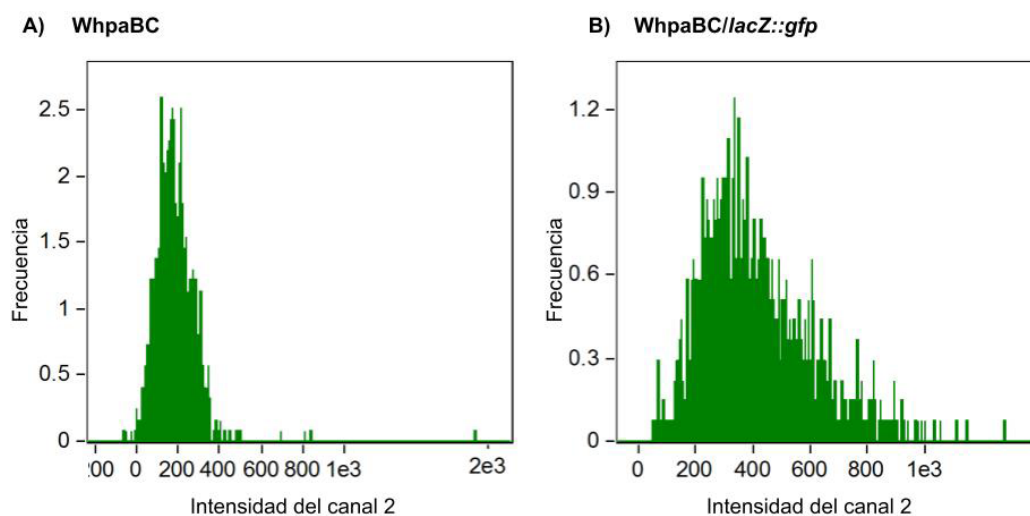


Figura 20. Comprobación fenotípica de cepa fluorescente en verde empleando citometría de flujo. A) Control: WhpaBC. B) Cepa con proteína fluorescente en verde (GFP) en cromosoma: WhpaBC/lacZ::gfp.

Se presentó una dificultad al analizar las cepas en el citómetro, ya que las cepas en cultivo formaron agregados que no permiten una corrida rápida para analizar célula por célula en el citómetro. El tritón es un detergente capaz de cambiar la polaridad de las membranas sin dañar la integridad de la célula y se utiliza para desintegrar biofilms (Chen y Stewart, 2000), por lo cual se probó para ver su eficiencia para disgregar conglomerados. Se realizó un cultivo de la cepa *WhpaBC/lacZ::gfp* y se realizó un tratamiento con Tritón X-100 al 0.1%. Se analizó dicho tratamiento y una muestra sin el tratamiento como control. Se obtuvo que la muestra sin tratamiento de Tritón X-100 tuvo tan solo 20.77% de células únicas, mientras que la muestra con tratamiento contó con 46.92% de células únicas. Teniendo más del doble de células únicas se determinó que el tratamiento con Tritón X-100 facilita el análisis de los cultivos que forman agregados.

Las dos cepas fluorescentes se utilizaron para realizar un análisis comparativo de la longitud de onda de cada cepa y no tener errores generados por la autofluorescencia de las células. Para comprobar que se pueda distinguir la proporción de cada cepa durante una cinética se realizaron mezclas de las cepas y se analizaron en el citómetro AMNIS. El análisis se realizó comparando la intensidad del canal 11 que se utiliza para analizar la fluorescencia del color rojo y la intensidad del canal 2 que se utiliza para analizar la fluorescencia del color verde.

Se obtuvieron poblaciones de células fluorescentes en rojo y células fluorescentes en verde (**Fig. 21**). Al utilizar un control de cada cepa fluorescente, se determinó la distribución de cada población al graficar la intensidad del canal 11 vs. la intensidad del canal 2 y se eliminaron las células que no tienen ninguna fluorescencia definida. Así se logró determinar el porcentaje de células fluorescentes verdes y rojas en proporciones predeterminadas, lo que nos permitirá realizar co-cultivos y determinar la proporción de cada cepa en distintos tiempos para así estudiar su dinámica.

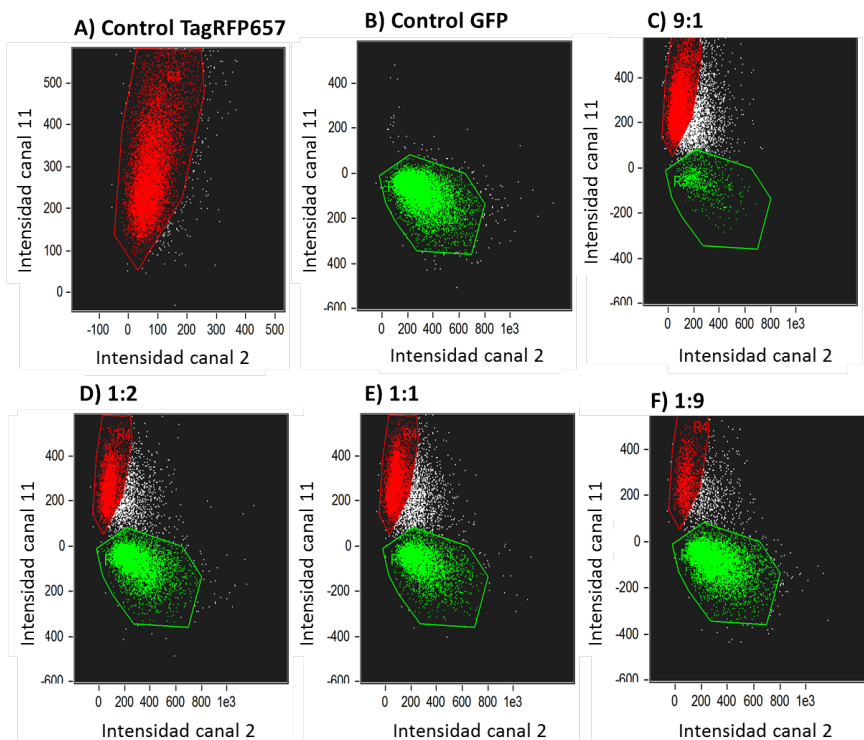


Figura 21. Poblaciones formadas en el citómetro de flujo AMNIS al graficar la intensidad en el canal 11 vs. la intensidad en el canal 2. **A)** Población generada de la cepa *WpheA-/lacZ::TagRFP657*. **B)** Población generada de la cepa *WhpaBC/lacZ::gfp*. **C, D, E y F)** Mezclas de cultivos de las cepas *WpheA-/lacZ::TagRFP657* y *WhpaBC/lacZ::gfp*, cuantificación de la proporción de cada población por la distribución obtenida en los controles. **C)** Mezcla con 9 veces más concentración de la cepa *WpheA-/lacZ::TagRFP657* que de la cepa *WhpaBC/lacZ::gfp*. **D)** Mezcla con dos veces más concentración de la cepa *WhpaBC/lacZ::gfp* que de la cepa *WpheA-/lacZ::TagRFP657*. **E)** Mezcla con la misma concentración de cada cepa. **F)** Mezcla con 9 veces más concentración de la cepa *WhpaBC/lacZ::gfp* que de la cepa *WpheA-/lacZ::TagRFP657*. En rojo se representa el porcentaje de la cepa *WpheA-/lacZ::TagRFP657* y en verde se representa el porcentaje de la cepa *WhpaBC/lacZ::gfp*.

En este trabajo se alcanzó un título de 79.7 ± 6.1 mg/L de AC en un sistema de co-cultivo de *E. coli*. Al comparar con otros trabajos de grupos de investigación que han producido AC por medio de microorganismos y sin suplementar ningún intermediario al cultivo, encontramos que todos lo han hecho en monocultivos con las siguientes características y títulos:

Tabla 6. Trabajos con los mayores títulos de AC y las características de sus condiciones.

Título	Fuente de carbono	Tiempo de cultivo	Inducción	Referencia
766.6 mg/L	Glucosa + glicerol	72 h	A las 3 h	Huang <i>et al.</i> , 2013
233 mg/L	Celulosa	310 h	A las 4 h	Kawaguchi <i>et al.</i> , 2017
150 mg/L	Glucosa	36 h	D.O. de 0.6	Kang <i>et al.</i> , 2012

Título	Fuente de carbono	Tiempo de cultivo	Inducción	Referencia
106 mg/L	Glucosa	96 h	Desde el inicio	Zhang y Stephanopolos, 2013
50.2 mg/L	Glucosa + glicerol	48 h	D.O. de 0.4 a 0.5	Lin y Yan, 2012

Todos los trabajos mencionados utilizan otras fuentes de carbono adicionales al glicerol o en lugar de glicerol, por lo que no son exactamente comparables con el trabajo presentado. La glucosa tiene 6 carbonos mientras que el glicerol tiene 3 carbonos por lo que el importe de carbono es menor con la fuente de carbono utilizada en este trabajo, que se utilizó por ser sustentable y más económica.

En dos de los trabajos donde se obtiene un alto título de AC se utilizan cepas sobreproductoras de tirosina, lo que sugiere que los pasos que llevan a la generación de tirosina son importantes para la producción de AC. Esto es relevante para optimizar el sistema en este trabajo ya que a partir de la tirosina las reacciones enzimáticas necesarias para producir AC son eficientes y pocas. La capa que se buscaría modificar es la WpheA- para lograr una mayor producción de tirosina que pueda ser hidroxilada a ácido cumárico y éste pueda ser convertido a AC por la cepa WhpaBC. Se propone sobreexpresar genes de la vía del shikimato que aumenten la producción de corismato y/o sobreexpresar los genes *tyrA* y/o *tyrB* que codifican para las enzimas que llevan a la producción de tirosina cuando el flujo del carbono sale de la vía del shikimato.

En algunos de los trabajos con altos títulos de AC el cultivo se extiende muchas horas y se suplementan altas cantidades de fuentes de carbono, si se buscara obtener un mayor título de AC con el sistema de este trabajo se podría probar suplementar el medio de cultivo con más glicerol y extender las horas del co-cultivo. Así mismo, la mayoría de los trabajos con los que se ha comparado inducen los plásmidos de producción tiempo después de iniciar el cultivo y no al inicio del cultivo como en este trabajo. Llevar a cabo la inducción a las 3 h, tomando como antecedente el trabajo que alcanza los mayores títulos de AC, puede beneficiar el sistema utilizado.

Por otro lado, este sistema se trabajó a nivel de matraz, se ha determinado que escalar los cultivos de matraz a biorreactor puede llevar a un aumento de hasta diez veces en la producción de un compuesto, por lo que llevar a cabo el escalamiento ascendente es de interés para el co-cultivo generado ya que resultaría ser mucho más competitivo.

Un resultado importante de este trabajo fue que las cepas se benefician de estar en co-cultivo. El ácido cumárico es un compuesto tóxico para las células bacterianas y se ha reportado que tiene efectos negativos tanto fuera de las células (en el medio), provocando cambios en la permeabilidad de la membrana impidiendo que la célula pueda mantener macromoléculas en el citoplasma, como dentro de la célula, al unirse al DNA e inhibir funciones celulares (Lou *et al.*, 2012). Al estar en co-cultivo la cepa WpheA- está produciendo ácido cumárico y la cepa WhpaBC está internalizando el ácido cumárico y transformándolo a AC, por lo que al ser internalizado se reducen los niveles de ácido cumárico en el medio reduciendo la toxicidad que tiene y el efecto del cambio en la permeabilidad de la membrana. Así mismo, la reducción de la concentración de ácido cumárico en el medio podría facilitar la salida del compuesto al estar más concentrado

dentro de la célula que en el medio y así propiciar su rápida salida, reduciendo el efecto inhibitorio de funciones celulares.

Por último, para mejorar la cepa WpheA- es posible sobreexpresar el transportador que exporta el ácido cumárico de la célula al medio. Dicho transportador está codificado por el operón *aaeXAB* y al sobreexpresar los genes del operón se esperaría que la concentración de ácido cumárico dentro de la célula disminuya, reduciendo los efectos tóxicos que produce en bacterias para que así pueda haber un mejor crecimiento de la cepa en el cultivo que lleve a una mayor producción de ácido cumárico y en consecuencia de AC en el co-cultivo (Camacho-Zaragoza *et al.*, 2016). Así mismo, la cepa WhpaBC podría mejorarse si se elimina el operón *aaeXAB*, evitándose de esta manera que el ácido cumárico sea expulsado del citoplasma y no esté disponible para ser transformado en AC por la enzima hidroxilasa.

IX. CONCLUSIONES

- Se caracterizaron monocultivos de las cepas WpheA- y WhpaBC, observándose la producción de 41.8 ± 8.9 y de 530 ± 95.7 mg/L de ac. cumárico y AC, respectivamente.
- Se realizaron co-cultivos que permitieron la producción de AC a partir de glicerol, teniendo como intermediario el ácido cumárico y obteniendo una cantidad de 79.7 ± 6.1 mg/L de AC.
- Los resultados de este trabajo demuestran que el co-cultivo con proporción 1:1 es más eficiente al tener una conversión casi completa de ácido cumárico a AC. El co-cultivo con proporción 17:1 permitió más producción de ácido cumárico incluso que en los monocultivos. Esto demuestra que una mayor concentración de la cepa WhpaBC favorece al co-cultivo y es posible ajustar la proporción para eficientar la conversión de ácido cumárico a AC.
- Al realizar co-cultivos con proporción 17:1 se observó que la producción de ácido cumárico incrementa, aunque es una proporción que lleva a una acumulación de ácido cumárico y que no permite una conversión eficiente a AC.
- Se integró al cromosoma el gen que codifica para la proteína fluorescentes FRFP sustituyendo el gen *lacZ* en una cepa WpheA- obteniendo la cepa fluorescente en rojo lejano (comprobado al observar la expresión por citometría de flujo) y productora de ácido cumárico WpheA-/*lacZ*::TagRFP657.
- Se transformó la cepa Wf13/*lacZ*::gfp con el plásmido *pTrchpaBC*, teniendo una cepa fluorescente en verde (comprobado al observar la expresión por citometría de flujo) y productora de ácido cafeico WhpaBC-/*lacZ*::gfp.
- Se distinguieron las cepas fluorescentes generadas en este trabajo por medio de citometría de flujo.
- Se analizaron poblaciones de las cepas fluorescentes generadas en este trabajo en cada longitud de onda, obteniendo porcentajes de cada cepa.
- Las cepas en cultivo formaron conglomerados que dificultan el análisis por citometría, lavar las muestras con Tritón X-100 permitió disgregar conglomerados para facilitar el análisis.

X. PERSPECTIVAS

- Se probará la condición de 8:1 de las cepas en co-cultivo ya que parece tener mayor eficiencia para la producción de AC. Así mismo dicha condición se probará cuantificando la proporción de cada cepa en distintos tiempos al contar con las cepas fluorescentes distinguibles en poblaciones.
- Probar el sistema de co-cultivo con tiempo de cultivo más largo, aumentando la concentración de la fuente de carbono y cambiando el tiempo de inducción podría llevar a un título mayor de AC.
- Probar el sistema de co-cultivo en biorreactor, con condiciones a definir, para así escalar el sistema y alcanzar títulos mayores de AC.
- Buscar mejorar la cepa WpheA-, lo cual se puede lograr sobreexpresando genes que lleven a una mayor producción de tirosina, así como sobreexpresando los genes del transportador AaeXAB para que el ácido cumárico sea exportado de la célula al medio con mayor rapidez, disminuyendo los efectos tóxicos de dicho compuesto.
- Buscar mejorar la cepa WhpaBC, lo que se puede lograr al eliminar la expresión del transportador AaeXAB, evitando que se exporte el ácido cumárico para dejarlo disponible en la célula para su conversión a AC.
- Al contar con las cepas fluorescentes y un método para disgregar los conglomerados, será posible realizar co-cultivos y determinar la proporción de cada cepa en cada tiempo, permitiendo un análisis de la dinámica de las cepas en co-cultivo.

XI. LITERATURA CITADA

1. Balderas-Hernández, V. E., Sabido-Ramos, A., Silva, P., Cabrera-Valladares, N., Hernández-Chávez, G., Báez-Viveros, J. L., Gosset, G. (2009). Metabolic engineering for improving anthranilate synthesis from glucose in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 8(1), 19.
2. Blount, Z. D. (2015). The natural history of model organisms: The unexhausted potential of *E. coli*. *Elife*, 4, e05826.
3. 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.
4. Chalfie, M. (1995). Green fluorescent protein. *Photochemistry and Photobiology*, 62(4), 651-656.
5. Chen, X. y Stewart, P. S. (2000). Biofilm removal caused by chemical treatments. *Water Research*, 34(17), 4229-4233.
6. Da Silva, G. P., Mack, M., Contiero, J. (2009). Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, 27(1), 30-39.
7. Datsenko K y Wanner B. (2000). One step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (12), 6640-6645.
8. Dixon, R. A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C. J., Reddy, M. S., Wang, L. (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology*, 3(5), 371-390.
9. Ghasemzadeh, A. y Ghasemzadeh, N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(31), 6697-6703.
10. Guo, D., Chen, F., Inoue, K., Blount, J. W., Dixon, R. A. (2001). Downregulation of caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase in transgenic alfalfa: impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin. *The Plant Cell*, 13(1), 73-88.
11. Hahlbrock, K. y Scheel, D. (1989). Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Biology*, 40(1), 347-369.
12. Hernández-Chávez, G., Martínez, A., Gosset, G. (2019). Metabolic engineering strategies for caffeic acid production in *Escherichia coli*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 38, 19-26.
13. Huang, Q., Lin, Y., & Yan, Y. (2013). Caffeic acid production enhancement by engineering a phenylalanine over-producing *Escherichia coli* strain. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(12), 3188-3196.
14. Jones, J. A., Wang, X. (2018). Use of bacterial co-cultures for the efficient production of chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*, 53, 33-38.
15. Jones, J. A., Vernacchio, V. R., Sinkoe, A. L., Collins, S. M., Ibrahim, M. H., Lachance, D. M., ... Koffas, M. A. (2016). Experimental and computational optimization of an *Escherichia coli* co-culture for the efficient production of flavonoids. *Metabolic Engineering*, 35, 55-63.
16. Kang, S. Y., Choi, O., Lee, J. K., Hwang, B. Y., Uhm, T. B., & Hong, Y. S. (2012). Artificial biosynthesis of phenylpropanoic acids in a tyrosine overproducing *Escherichia coli* strain. *Microbial Cell Factories*, 11(1), 153.
17. Kawaguchi, H., Katsuyama, Y., Danyao, D., Kahar, P., Nakamura-Tsuruta, S., Teramura, H., ... &

- Ohnishi, Y. (2017). Caffeic acid production by simultaneous saccharification and fermentation of kraft pulp using recombinant *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(13), 5279-5290.
18. Lincoln, T. y Zeiger, E. (2006). Secondary metabolites and plant defense. *Plant Physiology. Fourth Edition. Sinzuer Asociado. Cap, 13*.
 19. Lin, Y., & Yan, Y. (2012). Biosynthesis of caffeic acid in *Escherichia coli* using its endogenous hydroxylase complex. *Microbial Cell Factories*, 11(1), 42.
 20. Lippincott-Schwartz, J. y Patterson, G. H. (2003). Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science*, 300(5616), 87-91.
 21. Liu, X., Li, X. B., Jiang, J., Liu, Z. N., Qiao, B., Li, F. F., Zhao, G. R. (2018). Convergent engineering of syntrophic *Escherichia coli* coculture for efficient production of glycosides. *Metabolic Engineering*, 47, 243-253.
 22. Lou, Z., Wang, H., Rao, S., Sun, J., Ma, C., & Li, J. (2012). p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. *Food Control*, 25(2), 550-554.
 23. Maeda, H. y Dudareva, N. (2012). The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 73-105.
 24. Millan, A. y Maclean, R. (2017). Fitness costs of plasmids: a limit to plasmid transmission. *Microbiology*, 5(5).
 25. Morozova, K. S., Piatkevich, K. D., Gould, T. J., Zhang, J., Bewersdorf, J., Verkhusha, V. V. (2010). Far-red fluorescent protein excitable with red lasers for flow cytometry and superresolution STED nanoscopy. *Biophysical Journal*, 99(2), L13-L15.
 26. Nelson, D. L., Lehninger, A. L., Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan.
 27. Njila, M. N., Mahdi, E., Lembe, D., Nde, Z., Nyonseu, D. (2017). Review on extraction and isolation of plant secondary metabolites. *In 7th Int'l Conference on Agricultural, Chemical, Biological and Environmental Sciences*.
 28. Ozcan, T., Akpınar-Bayızit, A., Yılmaz-Ersan, L., Delikanlı, B. (2014). Phenolics in human health. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 5(5), 393.
 29. Papanikolaou, S., Aggelis, G. (2009). Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. *Lipid Technology*, 21(4), 83-87.
 30. Quispe, C. A., Coronado, C. J., Carvalho Jr, J. A. (2013). Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 475-493.
 31. Razzaghi-Asl, N., Garrido, J., Khazraei, H., Borges, F., Firuzi, O. (2013). Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure-activity relationships. *Current Medicinal Chemistry*, 20(36), 4436-4450.
 32. Rodrigues, J. L., Araújo, R. G., Prather, K. L., Kluskens, L. D., Rodrigues, L. R. (2015). Heterologous production of caffeic acid from tyrosine in *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, 71, 36-44.
 33. Rodrigues, J. L., Couto, M. R., Araújo, R. G., Prather, K. L., Kluskens, L., Rodrigues, L. R. (2017). Hydroxycinnamic acids and curcumin production in engineered *Escherichia coli* using heat shock promoters. *Biochemical Engineering Journal*, 125, 41-49.
 34. Ruiz-Guerrero K. A., Martínez L. M., Morales S., Gosset, G. (n.d.). Expresión del gen gfp bajo dos variantes de secuencias reguladoras en plásmidos y en el cromosoma de *Escherichia coli*. Universidad Politécnica del Estado de Morelos.
 35. Sabido, A., Martínez, A., Bolívar, F., Gosset, G. (2009). Construcción y caracterización de un sistema para la expresión cromosomal de genes en *Escherichia coli*. Universidad Nacional

36. Saibabu, V., Fatima, Z., Khan, L. A., Hameed, S. (2015). Therapeutic potential of dietary phenolic acids. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2015.
37. Sánchez-Andrade J., Gosset, G. (n.d.). Generación y caracterización de cepas de *Escherichia coli* para la producción de ácido cafeico. Instituto Tecnológico Superior de la Sierra Norte de Puebla
38. Stewart Jr, C. N. (2006). Go with the glow: fluorescent proteins to light transgenic organisms. *Trends in Biotechnology*, 24(4), 155-162.
39. Tyszczyk, K., Skalska-Kamińska, A., Woźniak, A. (2011). Voltammetric method using a lead film electrode for the determination of caffeic acid in a plant material. *Food Chemistry*, 125(4), 1498-1503.
40. Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W. (2010). Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology*, 153(3), 895-905.
41. Vargas-Tah, A., Martínez, L. M., Hernández-Chávez, G., Rocha, M., Martínez, A., Bolívar, F., Gosset, G. (2015). Production of cinnamic and p-hydroxycinnamic acid from sugar mixtures with engineered *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 6.
42. Ye, J. C., Hsiao, M. W., Hsieh, C. H., Wu, W. C., Hung, Y. C., Chang, W. C. (2010). Analysis of caffeic acid extraction from *Ocimum gratissimum* Linn. by high performance liquid chromatography and its effects on a cervical cancer cell line. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 49(3), 266-271.
43. Zhang, H., Stephanopoulos, G. (2013). Engineering *E. coli* for caffeic acid biosynthesis from renewable sugars. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(8), 3333-3341.
44. Zhang, H., Stephanopoulos, G. (2016). Co-culture engineering for microbial biosynthesis of 3-amino-benzoic acid in *Escherichia coli*. *Biotechnology Journal*, 11(7), 981-987.
45. Zhang, H., Li, Z., Pereira, B., Stephanopoulos, G. (2015a). Engineering *E. coli*-*E. coli* cocultures for production of muconic acid from glycerol. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 134.
46. Zhang, H., Pereira, B., Li, Z., & Stephanopoulos, G. (2015b). Engineering *Escherichia coli* coculture systems for the production of biochemical products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(27), 8266-8271.
47. Zhou, K., Qiao, K., Edgar, S., Stephanopoulos, G. (2015). Distributing a metabolic pathway among a microbial consortium enhances production of natural products. *Nature Biotechnology*, 33(4),