



Estudio del efecto de la fuente de carbono sobre la producción de L-valina en *Escherichia coli* mediante estrategias de ingeniería metabólica de sistemas

Darwin Carranza Saavedra

Una disertación presentada en satisfacción de los requisitos para optar el grado de Doctor en
Biotecnología

Tutor:

José Edgar Zapata Montoya, PhD en Biotecnología

Cotutora:

Claudia Patricia Sánchez Henao, PhD en Ingeniería

Universidad de Antioquia
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Doctorado en Biotecnología
Medellín
Diciembre 2022

Cita	(Carranza-Saavedra, Sánchez Henao & Zapata Montoya, 2018)
Referencia	Carranza-Saavedra, D., Sánchez Henao, C.P. & Zapata Montoya, J.E. (2022). <i>Estudio del efecto de la fuente de carbono sobre la producción de L-valina en Escherichia coli mediante estrategias de ingeniería metabólica de sistemas</i> [Tesis doctoral]. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
Estilo APA 7 (2020)	



Doctorado en Biotecnología, Cohorte VI.

Grupo de Investigación Nutrición y Tecnología de Alimentos.

Centro de Investigación en Ciencias Exactas y Naturales (CIEN).



Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Agradecimientos

Agradecerle a toda mi familia, mi novia Sara y mis amigos por darme ánimo y apoyo durante este proceso.

A mis docentes de la Universidad de Antioquia y en especial a mis directores: el Dr. José Edgar Zapata Montoya y la Dra. Claudia Patricia Sánchez Henao, por su ayuda, paciencia y dedicación.

A los integrantes de mi comité tutorial, los Doctores Henry Váquiro Herrera y Howard Ramírez Malule, por su tiempo y dedicación.

A la Universidad de Antioquia por facilitar laboratorios y apoyar con investigadores. A mis compañeros del Grupo de Investigación en Nutrición y Tecnología de Alimentos. A la Dr. Zulma (directora programa Doctorado en Biotecnología), quién fue la única persona que estuvo pendiente de nosotros en época de pandemia, velando por nuestra salud mental y ayudándonos en lo que necesitáramos, mil gracias.

A la Gobernación del Tolima y al Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación de Colombia (MINCIENCIAS) por la beca y apoyo financiero [Número de contrato: FP44842-397].

Al Departamento de Biología de Sistemas del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC) en Madrid (España), en especial al Grupo de Biotecnología de Sistemas del Dr. Juan Nogales, por facilitar los laboratorios y apoyar con investigadores.

Contenido

Lista de Tablas	8
Resumen	11
Capítulo 1. Capítulo introductorio	14
1.1 Introducción general	15
1.2 Marco teórico	17
1.2.1 Lactosuero	17
1.2.2 Biología de <i>Escherichia coli</i>	18
1.2.2.1 Características y generalidades de <i>E. coli</i>	18
1.2.2.2 Requerimientos nutricionales para crecimiento celular	19
1.2.3 Modos de operación y modelado cinético	21
1.2.3.1 Operación en lote	23
1.2.3.2 Operación en lote alimentado y continuo	24
1.2.4 Aminoácidos y su importancia industrial	26
1.2.5 Importancia de L-valina	28
1.2.6 Biosíntesis de L-valina	28
1.2.7 Ingeniería metabólica de sistemas	30
1.2.7.1 Ingeniería metabólica	30
1.2.7.2 Construcción de plataformas – ingeniería genética	36
1.2.8 Antecedentes	39
1.2.8.1 Uso del Lactosuero en fermentaciones para obtener productos químicos	39
1.2.8.2 Producción de L-valina por <i>E. coli</i>	42
1.2.8.3 Producción de 2-cetoisovalerato	43
1.3 Planteamiento del problema y justificación	45
1.4 Hipótesis	47
1.5 Objetivos	47
1.5.1 Objetivo general	47
1.5.2 Objetivos específicos	48
1.6 Metodología	48
1.6.1 Cepas y reactivos	48
1.6.2 Medios de cultivo	49
1.6.3 Condiciones de cultivo	50
1.6.4 Técnicas analíticas	51
1.6.5 Modelos cinéticos	52
1.6.5.1 Estimación de parámetros cinéticos	53
1.6.5.2 Análisis estadístico	53
1.6.6 Modelamiento metabólico <i>in silico</i>	54

1.6.6.1 Determinación de flujos metabólicos	54
1.6.6.2 Identificación de mapas metabólicos de <i>E. coli</i> W para la producción de L-valina	55
1.6.6.3 Modelamiento <i>in silico</i> de flujos metabólicos	56
1.6.7 Modificaciones genéticas	60
1.6.8 Sobreexpresión de genes	60
1.6.9 Diseño experimental	60
Capítulo 2. Análisis cinético y ajuste de modelos para la producción de L-valina en fermentación en lote de <i>Escherichia coli</i> usando glucosa, lactosa y suero como fuentes de carbono	62
2.1 Introducción	62
2.2 Materiales y métodos	62
2.2.1 Cultivo y crecimiento de cepa	62
2.2.2 Cultivo por lote	64
2.2.3 Técnicas analíticas	64
2.2.3.1 Caracterización del suero	64
2.2.3.2 Cuantificación de biomasa	64
2.2.3.3 Cuantificación de sustrato	65
2.2.3.4 Cuantificación de L-valina	65
2.2.4 Determinación de parámetros cinéticos	65
2.2.5 Modelos cinéticos	66
2.2.5.1 Modelos de crecimiento celular	66
2.2.5.2 Modelo de consumo de sustrato	67
2.2.5.3 Modelo de formación de productos	67
2.2.6 Estimación y validación de parámetros del modelo	68
2.3 Resultados y discusión	68
2.3.1 Caracterización bromatológica del suero	68
2.3.2 Efecto de la fuente de carbono en el comportamiento cinético de <i>E. coli</i>	69
2.3.3 Análisis metabólico de la biosíntesis de L-valina	72
2.3.4 Simulación de crecimiento celular, consumo de sustrato y producción de L- valina bajo diferentes fuentes de carbono utilizadas	74
2.3.5 Validación de modelo	77
2.4 Conclusiones	78
Capítulo 3. Identificación de mapas metabólicos en <i>Escherichia coli</i> utilizando como fuentes de carbono, glucosa y lactosa	79
3.1 Introducción	79
3.2 Metodología	80
3.2.1 Identificación mapas metabólicos en <i>E. coli</i> para la producción de L-valina	80
3.2.2 Modelo metabólico a usar	80
3.3 Resultados	81

3.3.1 Microorganismo de estudio: <i>E. coli</i> W	81
3.3.2 Metabolismo de <i>E. coli</i> para la producción de L-valina	82
3.3.2.1 Transporte activo para carbohidratos	84
3.3.2.2 Vía Embden-Meyerhof-Parnas o glucólisis	87
3.3.2.3 Vía de Entner-Doudoroff	89
3.3.2.4 Vía Pentosa fosfato	90
3.3.2.5 Ciclo del ácido tricarboxílico (TCA)	91
3.3.2.6 Biosíntesis de L-valina	93
3.3.2.7 Transporte de L-valina al exterior de la célula	95
3.3.3 Estudios de regulación transcripcional y mutaciones en <i>E. coli</i> para favorecer producción de L-valina	95
3.4 Conclusiones	98
Capítulo 4. Estudio metabólico <i>in silico</i> de <i>Escherichia coli</i> W utilizando glucosa y lactosa como fuente de carbono para la producción de 2-cetoisovalerato y L-valina	100
4.1 Introducción	100
4.2 Metodología	101
4.2.1 Esquema de trabajo	101
4.2.2 Cepa y reactivos	102
4.2.3 Medios de cultivo y condiciones de cultivo	102
4.2.4 Procedimientos analíticos	103
4.2.5 Cinética de crecimiento	103
4.2.6 Modelo metabólico	104
4.2.7 Cálculo de flujos metabólicos	104
4.2.8 Tasa de crecimiento específico	105
4.2.9 Análisis <i>in silico</i>	105
4.2.10 Análisis de balance de flujos metabólicos	105
4.2.11 Maximización de rendimiento de ATP por sustrato	106
4.2.12 Robustez	106
4.2.13 Análisis de reacciones esenciales	107
4.3 Resultados	107
4.3.1 Análisis cinético	107
4.3.2 Validación del modelo mediante análisis de balance de flujo metabólico	109
4.3.3 El metabolismo inicial de la lactosa es compatible con el catabolismo simultáneo de galactosa y glucosa en <i>E. coli</i> W	110
4.3.4 Aumento del flujo de carbono en las rutas de la glicólisis y TCA en <i>E. coli</i> W	112
4.3.5 Rendimiento de ATP por sustrato	115
4.3.6 Sensibilidad de los flujos	116
4.3.7 Evaluación de diferentes funciones objetivo por FBA	118

4.3.8 Análisis de reacciones esenciales	121
4.4 Conclusiones	122
Capítulo 5. <i>Escherichia coli</i> W modificada metabólicamente para incrementar la producción de 2-cetoisovalerato y L-valina usando glucosa, lactosa y lactosuero como fuentes de carbono	124
5.1 Introducción	124
5.2 Materiales y métodos	125
5.2.1 Cepa, plásmidos, cebadores y ADN utilizados	125
5.2.2 Reactivos y Medios de cultivo	126
5.2.3 Manipulación del ADN	127
5.2.4 Cultivo en matraces	127
5.2.5 Análisis a nivel de sistemas de azúcares	128
5.2.6 Análisis de flujo metabólico	128
5.2.7 Diseño de <i>E. coli</i> W1262	129
5.2.7.1 Construcción de mutantes (inactivación génica)	131
5.2.7.2 Construcción de sistemas de expresión sintética	133
5.2.8 Técnicas analíticas	135
5.2.9 Parámetros cinéticos	136
5.3 Resultados	137
5.3.1 Análisis a nivel de sistema de metabolismo complejo de azúcares en <i>E. coli</i> W	137
5.3.2 Diseño de <i>E. coli</i> basado en un modelo de sobreproducción de 2-KIV	140
5.3.3 Construcción y fenotipado de una cepa de <i>E. coli</i> W que carece de <i>mdh</i> y <i>aceF</i>	148
5.3.4 Reabastecimiento de pyr a 2-KIV a través de biología sintética	150
5.3.5 Eliminación de la inhibición por retroalimentación de L-valina en <i>E. coli</i> W1294	151
5.3.6 Redireccionamiento del flujo de carbono de Pyr hacia 2-KIV con eliminación de la inhibición por retroalimentación de L-valina en <i>E. coli</i> W1262	153
5.3.7 Producción de 2-KIV por <i>E. coli</i> W1288, <i>E. coli</i> W1294 y <i>E. coli</i> W1262 utilizando lactosuero como fuente de carbono	155
5.4 Conclusiones	158
Capítulo 6. Discusión y conclusiones	159
6.1 Lactosuero es mejor fuente de carbono que los sustratos químicamente definidos para producir biomasa	159
6.2 Lactosuero es mejor fuente de carbono que los químicamente definidos para producir L-valina, potenciando la ruta de biosíntesis de 2-cetoisovalerato	159
6.3 Diseño racional metabólico de mutantes, evidenció el efecto de las diferentes fuentes de carbono	161
6.4 Conclusiones	162
Referencias	163

Lista de Tablas

Tabla 1.1 Productos obtenidos por cultivo de diferentes microorganismos empleando lactosuero como sustrato	40
Tabla 1.2 Tabla comparativa de <i>E. coli</i> en la producción de L-valina	43
Tabla 1.3 Microorganismos usados en la sobreproducción de 2-KIV	44
Tabla 1.4 Cepas utilizadas en este trabajo	49
Tabla 1.5 Base de datos consultada para la obtención de información de reacciones y genes	55
Tabla 2.1 Parámetros cinéticos en la fermentación de <i>E. coli</i> con diferentes fuentes de carbono	71
Tabla 2.2 Estimación de parámetros y validación de modelos establecidos para la producción de L-valina en fermentación discontinua con <i>E. coli</i> utilizando diferentes fuentes de carbono obtenidas por simulación	76
Tabla 3.1 Relación de ácidos orgánicos producidos por aminoácidos como precursores en el TCA	92
Tabla 4.1 Tasa de crecimiento y flujos metabólicos en <i>E. coli</i> W al usar glucosa y lactosa	109
Tabla 4.2 Distribución de flujos metabólicos principales por FBA con funciones objetivo μ , 2-KIV y L-valina en <i>E. coli</i> W usando como fuente de carbono glucosa y lactosa	119
Tabla 5.1 Cepa, plásmidos y ADN utilizados en este estudio	126
Tabla 5.2 Reacciones evaluadas en el Muestreo de Monte Carlo en <i>E. coli</i> W	129
Tabla 5.3 Velocidades de crecimiento específica en fase exponencial de <i>E. coli</i> W en diferentes sustratos puros y combinados con glucosa a una concentración final de 2 g/L	140
Tabla 5.4 Estudios de redirección del flujo de carbono hacia pyr para la sobreproducción de 2-KIV y L-valina	141
Tabla 5.5 Producción de 2-KIV por diferentes cepas	157

Lista de Figuras

Figura 1.1 Diagrama de flujo general en la producción de queso	17
Figura 1.2 Esquema resumido de la biosíntesis de L-valina en <i>E. coli</i>	30
Figura 1.3 Ejemplo simple de red metabólica con ilustración de flujo metabólico	32
Figura 1.4 Análisis de Balance de Flujo	34
Figura 1.5 Análisis de Flujo Metabólico (MFA)	35
Figura 1.6 Descripción del procedimiento para las fermentaciones	50
Figura 2.1 Cinética de fermentación por lote con <i>E. coli</i> para crecimiento de biomasa (a), consumo de sustrato (b) y formación de L-valina (c)	70
Figura 2.2 Rutas biosintéticas de <i>E. coli</i> para la producción de L-valina	73
Figura 2.3 Cinética de fermentación de <i>E. coli</i> en cultivo por lote, comparación de datos experimentales Vs valores predichos por el modelo	75
Figura 3.1 Rutas metabólicas en <i>E. coli</i> W con énfasis en la biosíntesis de L-valina	83
Figura 3.2 Mapa metabólico del transporte y catabolismo de diferentes carbohidratos en <i>E. coli</i> W hacia glucosa-6-fosfato	85
Figura 3.3 Transporte de glucosa en <i>E. coli</i>	86
Figura 3.4 Vía Embden-Meyerhof-Parnas o glucólisis en <i>E. coli</i> W	88
Figura 3.5 Vías Entner-Doudoroff y Pentosa fosfatos en <i>E. coli</i> W	89
Figura 3.6 Representación esquemática de anaplerosis y cataplerosis en el TCA	92
Figura 3.7 Ruta resumida de la biosíntesis de L-valina en <i>E. coli</i> W	94
Figura 3.8 Reacciones de transporte de L-valina en <i>E. coli</i> W	95
Figura 3.9 Esquemas de la inhibición de biosíntesis de L-valina	97
Figura 4.1 Procedimiento para análisis de balances de flujos de <i>E. coli</i> W para la producción de 2-KIV y L-valina	102
Figura 4.2 Cinéticas de crecimiento celular, consumo de sustrato y producción de ácidos orgánicos en <i>E. coli</i> W	110
Figura 4.3 Cinéticas de crecimiento celular y consumo de sustrato de <i>E. coli</i> W al concertar glucosa y lactosa (1 g/L:1 g/L) en el medio	110
Figura 4.4 Distribución de flujos metabólicos en <i>E. coli</i> W de glucosa y lactosa hasta glucosa-6-fosfato	112
Figura 4.5 Distribución de flujos metabólicos de la cepa <i>E. coli</i> W empleando lactosa (color rojo) y glucosa (color verde) como fuentes de carbono	114
Figura 4.6 Rendimiento de mol de ATP, NADH y NADPH usando glucosa y lactosa como fuente de carbono	115
Figura 4.7 Análisis de sensibilidad de la velocidad específica de crecimiento al variar el consumo de O ₂ , fuente de carbono, NH ₄ , PI y secreción de 2-KIV y L-valina	117

Figura 4.8 Análisis de genes esenciales para la maximización de la producción de L-valina	122
Figura 4.9 Análisis de robustez de la producción de 2-KIV y L-valina mientras se varía el consumo de NH ₄	122
Figura 5.1 Esquema resumen de <i>E. coli</i> W modificada para la sobreproducción de 2-cetoisovalerato (2-KIV) y L-valina	130
Figura 5.2 Esquema resumen de la estrategia para delección de genes realizados en <i>E. coli</i>	132
Figura 5.3 Esquema por niveles en la construcción de un sistema de sobre expresión de genes por método de Golden Estándar	134
Figura 5.4 Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> W usando diferentes tipos de azúcares	138
Figura 5.5 Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> W en mezcla de azúcares con glucosa para el estudio del crecimiento diauxico	139
Figura 5.6 Muestreo de Monte Carlo en <i>E. coli</i> W para frecuencia de flujo y variabilidad en reacciones principales	144
Figura 5.7 Distribuciones de flujo metabólico por FBA en <i>E. coli</i> W (a) y <i>E. coli</i> W $\Delta mdh-aceF$ (b)	146
Figura 5.8. Electroforesis en gel para verificar la eliminación de genes <i>mdh</i> y <i>aceF</i> en <i>E. coli</i> W	148
Figura 5.9 Cinéticas de crecimiento, consumo de sustrato y producción de 2-cetoisovalerato y L-valina en <i>E. coli</i> W (a) y <i>E. coli</i> W1288 (b) en experimentos en matraz usando glucosa y lactosa	149
Figura 5.10 Estructura del plásmido pSEVA681-kiv para producir 2-KIV	150
Figura 5.11 Cinéticas de crecimiento, consumo de sustrato y producción de 2-cetoisovalerato y L-valina de <i>E. coli</i> W1288 (a), <i>E. coli</i> W1294 (b) en experimentos en matraz usando glucosa y lactosa	152
Figura 5.12 Cinética de crecimiento de biomasa, consumo de sustrato y producción de 2-cetoisovalerato y L-valina de <i>E. coli</i> W1294 (a), <i>E. coli</i> W1262 (b) en experimentos en matraz usando glucosa y lactosa	154
Figura 5.13 Cinética de crecimiento de biomasa, consumo de lactosa y producción de 2-cetoisovalerato y L-valina en <i>E. coli</i> W1288, <i>E. coli</i> W1294 y <i>E. coli</i> W1262 en experimentos en matraces utilizando lactosuero	156

Resumen

En los últimos años, el lactosuero ha despertado un gran interés como subproducto agroindustrial en los procesos de fermentación microbiana. Debido a su bajo costo y su alta concentración de nutrientes, especialmente la lactosa como fuente principal de carbono, se ha convertido en un objeto de investigación para obtener diversos bio-productos. Sin embargo, el conocimiento sobre el efecto de la lactosa en el metabolismo bacteriano y su capacidad para producir metabolitos esenciales, como los aminoácidos, específicamente la L-valina, es limitado. Por lo tanto, se requieren estudios que utilicen enfoques de ingeniería metabólica de sistemas para comprender mejor el metabolismo de la lactosa y contribuir a la mejora de la producción.

En este contexto, se realizó un estudio para evaluar el impacto de diferentes fuentes de carbono (glucosa, lactosa y lactosuero) en la producción de L-valina utilizando *Escherichia coli* mediante enfoques de ingeniería metabólica y genética. Para ello, se emplearon metodologías de ajuste de modelos de cinéticas de fermentación con las diferentes fuentes de carbono, lo que permitió identificar parámetros cinéticos relevantes. Además, se realizaron análisis de flujo metabólico, variabilidad de flujos, robustez y muestreo de Monte Carlo para comprender en detalle cómo las diferentes fuentes de carbono afectan el metabolismo de *E. coli*. Basándose en los resultados obtenidos *in silico*, se diseñó una plataforma que combinó estrategias de delección y sobreexpresión génica mediante biología sintética de vanguardia con el objetivo de maximizar la producción de 2-cetoisovalerato (2-KIV), precursor clave en la producción de L-valina.

Los resultados demostraron que el lactosuero beneficia la biosíntesis de L-valina (36% superior) con respecto a la glucosa y lactosa puras. Posteriormente se aplicaron conceptos de ingeniería metabólica como son el análisis de balance de flujos con los sustratos puros (glucosa y lactosa), donde se evidenció que la lactosa desencadena un mejor flujo de carbono por simultaneo consumo de glucosa y galactosa al hidrolizarse en el citoplasma, proporcionando máxima velocidad específica de crecimiento (0.82 h^{-1}), unas producciones de moles de ATP, NADH, y NADHP por mol de lactosa de 55.3, 22.1 y 20.7, respectivamente. En efecto, gracias a los resultados *in silico*, se construyó una plataforma de *E. coli* W, donde primero fueron delecionados los genes *mdh* y *aceF* y posteriormente se sobreexpresaron los genes *alsS*, *ilvC* e *ilvD* para

confirmar los supuestos generados en los análisis de flujo metabólico y lograr obtener titulaciones de 3.22 g 2-KIV/L y 1.39 g L-valina/L al emplear lactosuero como fuente de carbono, con el más alto rendimiento encontrado por sustrato en la producción de 2-KIV (0.81 g/g sustrato), destacando en rendimientos previamente reportados en la literatura y superando los desafíos asociados con la inhibición por producto y transporte en la producción de L-valina por fermentación.

En resumen, este estudio destaca el potencial del lactosuero como materia prima altamente beneficiosa en medios de cultivo para la producción de L-valina y otros bioproductos. La aplicación de enfoques de ingeniería metabólica y genética no solo ha profundizado nuestra comprensión del metabolismo de la lactosa, sino que también ha permitido la creación de cepas mejoradas de *E. coli* W.

Palabras claves: Aminoácidos esenciales, Análisis de flujos metabólicos, Biología de sistemas, Ingeniería metabólica, Modelado cinético, Modelado metabólico, Piruvato, subproducto lácteo, 2-cetoisovalerato.

Abstract

In recent years, whey has garnered significant interest as an agro-industrial byproduct in microbial fermentation processes. Due to its low cost and high nutrient concentration, particularly as a carbon source rich in lactose, it has become a subject of investigation for obtaining diverse bio-products. However, knowledge regarding the effect of lactose on bacterial metabolism and its capacity to produce essential metabolites, such as amino acids, specifically L-valine, is limited. Therefore, studies utilizing systems metabolic engineering approaches are required to gain a better understanding of lactose metabolism and contribute to production improvement.

In this context, a study was conducted to evaluate the impact of different carbon sources (glucose, lactose, and whey) on L-valine production using *Escherichia coli* through metabolic and genetic engineering approaches. Kinetic fermentation models were employed, adjusting them with the various carbon sources to identify relevant kinetic parameters. Additionally, metabolic flux analysis, flux variability analysis, robustness analysis, and Monte Carlo sampling were performed to gain detailed insights into how different carbon sources affect *E. coli* metabolism. Based on the

in silico results obtained, a platform was designed that combined gene deletion and overexpression strategies using cutting-edge synthetic biology to maximize the production of 2-ketoisovalerate (2-KIV), a key precursor in L-valine production.

The results demonstrated that whey significantly enhanced L-valine biosynthesis (36% higher) compared to pure glucose and lactose. Furthermore, concepts of metabolic engineering were applied, such as flux balance analysis with pure substrates (glucose and lactose), revealing that lactose triggers a superior carbon flux by simultaneous consumption of glucose and galactose upon hydrolysis in the cytoplasm, providing maximum specific growth rate (0.82 h⁻¹), and yields of ATP, NADH, and NADPH per mole of lactose of 55.3, 22.1, and 20.7, respectively. Indeed, based on the *in silico* results, a platform of *E. coli* W was constructed, where *mdh* and *aceF* genes were first deleted and subsequently *alsS*, *ilvC*, and *ilvD* genes were overexpressed to confirm the assumptions generated in the metabolic flux analysis. This led to achieving titers of 3.22 g 2-KIV/L and 1.39 g L-valine/L using whey as the carbon source, with the highest substrate-to-product yield of 0.81 g/g for 2-KIV, surpassing previously reported yields in the literature and overcoming challenges associated with product inhibition and transport in L-valine fermentation.

In summary, this study highlights the potential of whey as a highly beneficial raw material in culture media for the production of L-valine and other bio-products. The application of metabolic and genetic engineering approaches has not only deepened our understanding of lactose metabolism but also enabled the creation of enhanced strains of *E. coli* W.

Keywords: Essential amino acids, Metabolic flux analysis, Systems biology, Metabolic engineering, Kinetic modeling, Metabolic modeling, Pyruvate, Dairy by-product, 2-Ketoisovalerate.

Capítulo 1 Capítulo introductorio

1.1 Introducción general

En la producción de queso se genera un residuo correspondiente al 90 % de la leche usada, conocido como suero o lactosuero, el cual contiene aproximadamente el 55 % de la carga nutricional de la leche fresca (R. Sharma, 2019). Este se caracteriza por tener una alta concentración de lactosa (aproximadamente 45 g/L), alrededor de 6-10 g/L de proteínas (Singh & Geetanjali, 2016), además de minerales (Önür et al., 2020). La producción global de lactosuero es por millones de toneladas al año (Ryan & Walsh, 2016), gran parte del cual es sometido a tratamiento para su aprovechamiento o disposición final, pero otra parte carece de tratamientos adecuados para su utilización, por lo que es vertido a ríos o arrojado directamente a suelos (Prazeres et al., 2012), lo que representa un importante problema ambiental debido a su alta Demanda Química y Bioquímica de Oxígeno (Menchik et al., 2019).

Debido al contenido proteico del lactosuero, este ha sido utilizado en la industria de suplementos alimenticios, cosméticos y farmacéuticos (R. Sharma, 2019; Singh & Geetanjali, 2016). Sin embargo, estas opciones no son suficientes para absorber la gran cantidad que se produce y por ende mitigar la carga contaminante que ocasiona su vertimiento (Królczyk & Janiszewska-Turak, 2016), por lo que se hace necesario seguir investigando nuevas aplicaciones o mejorando los procesos ya existentes.

Una aplicación es emplearlo como fuente de carbono en fermentaciones (Zotta et al., 2020), ya que es menos costoso que otras fuentes de carbono tradicionales (Królczyk & Janiszewska-Turak, 2016). Esto se enmarca en el contexto de la última década, en la que se ha despertado el interés a nivel mundial por el aprovechamiento de residuos agroindustriales como fuentes de carbono o nitrógeno en los medios de fermentación a nivel industrial con el fin de disminuir costos de producción e incrementar productividades (Zotta et al., 2020).

Otras aplicaciones son: la obtención de bioestimulantes para suelos y plantas (Caballero et al., 2019), ácidos orgánicos (Lagoa-Costa et al., 2020), bioalcoholes (Novak et al., 2020) y la producción de proteínas recombinantes (Hausjell et al., 2019). Son escasos los estudios en los que

se emplea lactosuero para la producción de aminoácidos (AA) vía fermentativa. Entre los reportes se encontraron algunos ensayos preliminares para la obtención de L-lisina y treonina (Ko & Chipley, 1983) y más recientemente se ha encontrado como una promisorio fuente de carbono para obtener L-valina (Carranza-Saavedra et al., 2021). El cual es un aminoácido esencial para la nutrición humana por servir para la síntesis de péptidos de interés biológico (Ewa Janus et al., 2020; Kawaguchi et al., 2011), además de tener aplicación en cosméticos (Saraf et al., 2019), entre otras.

Además, la falta de estudios sistemáticos y a nivel de sistemas incluyendo lactosuero como fuente de carbono y de energía en bioprocesos, no permite diseños de plataformas a través de técnicas de ingeniería genética, con *E. coli*. Por lo que se hace necesario emplear herramientas de ingeniería metabólica, tales como el análisis de flujos metabólicos *in silico*, para demostrar el uso del lactosuero como fuente de carbono en *E. coli*.

Por lo tanto, se requiere del estudio del uso de la lactosa como fuente de carbono sobre el metabolismo de *E. coli* en la producción de L-valina a través de técnicas de ingeniería metabólica y genética. Por lo cual se deben establecer los parámetros cinéticos, identificar los mapas metabólicos, realizar análisis de flujos metabólicos y fomentar la producción 2-cetoisovalerato (2-KIV) como precursor de etapa final de biosíntesis de L-valina.

En el presente trabajo se realizó el estudio del efecto de la fuente de carbono sobre la producción de L-valina en *E. coli*, mediante análisis de flujos metabólicos y construcción de un chasis bacteriano capaz incrementar la producción al asimilar lactosuero y mitigar los efectos de inhibición por producto. Para lograr esto se desarrollaron varias etapas en forma consecutiva, las cuales se presentan por capítulos así: capítulo 2. Análisis cinético y ajuste de modelos para la producción de L-valina en fermentación en lote de *E. coli* usando glucosa, lactosa y suero como fuentes de carbono; Capítulo 3. identificación y deducción de mapas metabólicos en *E. coli* W utilizando como fuentes de carbono, glucosa y lactosa; Capítulo 4. estudio metabólico *in silico* de *E. coli* W utilizando glucosa y lactosa como fuente de carbono para la producción de 2-KIV y L-valina; Capítulo 5 *E. coli* W diseñada metabólicamente para incrementar la producción de 2-KIV y L-valina usando glucosa, lactosa y suero como fuentes de carbono y un Capítulo 6, análisis y conclusiones generales.

En el capítulo dos se pudo comprobar que el lactosuero potencializa la producción de L-valina a diferencia de los sustratos químicamente definidos como glucosa y lactosa. En el tercer capítulo se empleó un microorganismo (*E. coli* W) con secuenciación genómica completa, que permitió identificar y establecer mapas metabólicos para estudiar la producción de L-valina al considerar como fuentes de carbono, glucosa y lactosa.

En el capítulo cuatro, se pudieron estudiar los comportamientos metabólicos que estarían interviniendo en la asimilación de azúcares (glucosa y lactosa) y en la etapa final de biosíntesis de L-valina a partir de *E. coli* W, mediante el análisis de flujos metabólicos *in silico*. Se encontró que usar lactosa pura como fuente de carbono mejora la velocidad específica de crecimiento e incrementa la producción de moléculas de energía como el ATP. Otro hallazgo importante fue el aumento del flujo de carbono hacía piruvato por la delección del gen *mdh*, lo cual favoreció el aprovechamiento de este metabolito mediante la sobreexpresión de genes de la ruta de biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada, encontrando que el incremento en el pool de 2-KIV es importante para el incremento en la producción de L-valina.

Con la información metabólica obtenida sobre el uso de lactosa para la producción de 2-KIV y L-valina, se estructuró el quinto capítulo donde se estudió metabólicamente y genéticamente la generación de una plataforma de *E. coli* W reconstruida óptimamente (sin auxotrofia), con el fin de maximizar la producción de 2-KIV y evaluar el efecto sobre este compuesto al usar glucosa, lactosa y lactosuero. En los estudios realizados se observó también que al maximizar la producción de 2-KIV, había producción de L-valina, sin necesidad de sobre expresión de los genes involucrados en la biosíntesis final de este aminoácido.

Por último, un capítulo de análisis y discusión de todos los resultados obtenidos, donde se afirma que el lactosuero resulta ser una fuente de carbono promisoría en la producción de L-valina en fermentaciones con *E. coli* modificada genéticamente, presentando así una alternativa más de uso de lactosuero en fermentaciones para la producción de L-valina y de 2-KIV.

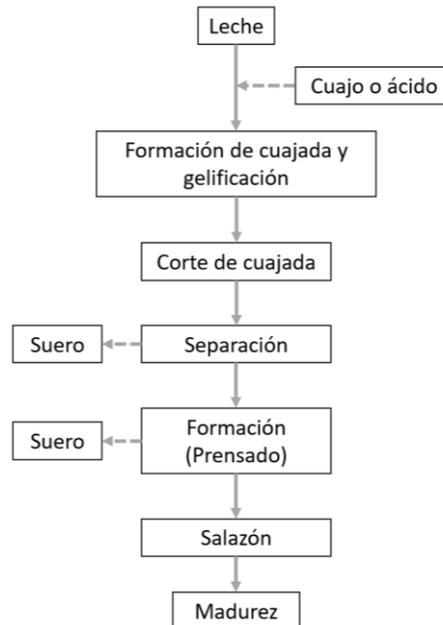
1.2 Marco teórico

1.2.1 Lactosuero

El lactosuero es la fracción líquida obtenida durante la coagulación de la leche en el proceso de fabricación del queso, después de la separación del coágulo o fase micelar, en la denominada fase de deshidratación en la que la grasa y la caseína se concentran entre 6 y 12 veces (Panikuttira et al., 2018). Los pasos básicos de producción son comunes para todos los productos queseros (Figura 1.1) (Panikuttira et al., 2018). Se requieren 10 litros de leche para obtener un kilogramo de queso, produciendo 9 litros de lactosuero. Este contiene, 45-50 g/L de lactosa, 6-8 g/L proteínas solubles, 4-5 g/L lípidos y sales minerales, con 8-10 % en peso seco (Singh & Geetanjali, 2016), lo cual le confiere cerca de 40 y 30 g O₂/L, de demanda bioquímica (DBO) y química de oxígeno (DQO), respectivamente (Menchik et al., 2019), es decir un alto impacto ambiental.

Figura 1.1

Diagrama de flujo general en la producción de queso



Nota. Fuente Panikuttira et al., 2018

El grado de expulsión de lactosuero están influidos por la composición de la leche, especialmente la concentración de calcio (Ca^{2+}) y caseína, el pH, la temperatura de cocción, la velocidad de agitación de la mezcla de requesón y por supuesto, el tiempo (Panikuttira et al., 2018).

Gracias a su composición nutricional, el lactosuero se convierte en un subproducto susceptible para recibir valor agregado, por ejemplo en la adición de productos para mejorar los parámetros reológicos (Soukoulis et al., 2019), para microencapsulación de bio-compuesto (Rojas et al., 2020), como suplemento proteico y energético (Fassina et al., 2019) y en el aprovechamiento de la lactosa, como fuente de carbono (FC) en procesos fermentativos (Zotta et al., 2020). A pesar de las múltiples aplicaciones que se tienen, solo se aprovecha el 30% de las 190 billones de kg/año de lactosuero que se producen en el mundo, el resto se vierte al ambiente (Asunis et al., 2020).

1.2.2 Biología de *Escherichia coli*

1.2.2.1 Características y generalidades de *E. coli*

E. coli es una bacteria miembro de la familia de las enterobacterias, bacilo gram negativo y anaerobio facultativo que crece óptimamente a temperatura de 37 °C, su movilidad es llevada a cabo por flagelos peritricos (Edwards & Ewing, 1972), y aunque por naturaleza es un microorganismo patógeno ha sido una de las primeras bacterias aprobada y regulada para la generación de biofármacos (Berlec & Štrukelj, 2013).

Este microorganismo ha sido utilizado en laboratorio por mucho tiempo como un modelo a trabajar, por su velocidad de crecimiento, pocos requerimientos nutricionales para desarrollarse y porque existe abundante información genética (Yang et al., 2020). Siendo así *E. coli*, base de trabajos para el diseño y clonamiento de plásmidos y ADN, bacteriófagos, entre otras técnicas genéticas usadas (Pontrelli et al., 2018). Además, del desarrollo de herramientas y estrategias de ingeniería metabólica con modelos metabólicos a escala genómica (GEMs) (Kim et al., 2017).

Se puede señalar, que con *E. coli* se puede lograr altos rendimientos en producción, tiempos reducidos de fermentación, facilidad en la extracción y purificación de metabolitos de interés y bajas inhibiciones por sustrato o producto para la biosíntesis óptima de productos naturales, esto

conlleva a bajos costos de fermentación. Entre los productos naturales obtenidos están: terpenoides, policétidos, fenilpropanoides, alcaloides, opioides, carotenoides, hemo, taxol, esveratrol, eritromicina, aminoácidos esenciales, entre otros compuestos potencializados y comercializados por las industrias de aditivos de alimentos, farmacéuticas, nutraceuticas y cosméticas (Yang et al., 2020).

1.2.2.2 Requerimientos nutricionales para crecimiento celular

Siendo *E. coli* un organismo heterótrofo, requiere de nutrientes esenciales en su medio de crecimiento, entre las que se destaca fuentes de carbono, nitrógeno, oxígeno, fosforo y azufre (Peterson et al., 2005; Sezonov et al., 2007). Aunque, se puede establecer dos categorías de nutrientes esenciales (macronutrientes y micronutrientes), *E. coli* puede desarrollar un crecimiento celular con tan sólo tener en cantidad suficiente estos nutrientes esenciales (Peterson et al., 2005). En cuanto al uso de fuentes de carbono para la producción de L-valina, sólo se han encontrado estudios con glucosa y por ende, en este apartado se discutirá características importantes a tener en cuenta en *E. coli*, en cuanto a su efecto con algunas fuentes de carbono como de nitrógeno, que permitirían dilucidar en posteriores estudios de esta tesis doctoral su comportamiento al utilizar lactosa y glucosa en los medios de fermentación y en estudios *in silico* de modelamiento metabólico.

Efecto fuente de carbono. El metabolismo central de carbono de *E. coli* favorece la generación de energía. Siendo así de importancia por su conexión en la disponibilidad de nutrientes con la velocidad de crecimiento celular y su tamaño (Westfall & Levin, 2017). Por tanto, el tipo de fuente de carbono es crucial en el desarrollo de su morfología, puesto que, esta fuente de carbono podría impactar en óptimo desarrollo de su ciclo celular (Hill et al., 2013), en la síntesis de lípidos (Vadia et al., 2017) y a nivel genético que implican procesos respiratorios (Campos et al., 2018).

Por un lado, aunque la fuente de carbono, en principio ayudaría en la generación de energía, se ha evidenciado participación alguna en la construcción de la pared celular para los procesos de transporte y generación de transportadores lipídicos (Irnov et al., 2017). Por otro lado, si se tienen en cuenta, el primer punto de ramificación de la glucólisis, la vía de las pentosas-fosfato y el

metabolismo de acetil-CoA, la fuente de carbono a utilizar, atribuiría vías importantes para la disponibilidad de nutrientes, el crecimiento y el tamaño celular (Westfall & Levin, 2017).

Otra particularidad interesante de *E. coli* es la jerarquización por el uso de diferentes fuentes de carbono en un mismo medio de crecimiento. La glucosa es la fuente de carbono preferida por este microorganismo y su mecanismo radica en la activación de genes de represión catabólica, generando crecimientos diaúxico y baja productividad de productos deseados (X. Wang et al., 2019). Además, la glucosa se ha encontrado como una fuente de carbono que genera tasas de crecimiento bajas en medios de crecimiento pobres en nitrógeno, en comparación con otros azúcares. Esto es debido al desequilibrio metabólico generado en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), disminuyendo la producción de Monofosfato de Adenosina Cíclico (cAMP), molécula reguladora clave para el crecimiento en condiciones de estrés (Aidelberg et al., 2014; Bren et al., 2016).

Por otro lado, el piruvato participa en la absorción de glucosa y secreción de acetato, lo que ha indicado que el catabolismo de aminoácidos y glucosa está regulado por niveles altos de α -cetoácidos, en especial piruvato y oxaloacetato que en respuesta a limitaciones de nitrógeno la absorción de glucosa se ve limitada (Bren et al., 2016). Además, los aminoácidos no sólo son fuente de energía y de crecimiento celular, si no también muchos de ellos son necesarios para los compuestos intermediarios en el ciclo del TCA a partir de la conversión de piruvato (discutidos en un apartado posterior).

Efecto fuente de nitrógeno. El nitrógeno es fundamental en *E. coli* como parte estructural de proteínas, ADN, ARN y ATP (van Heeswijk et al., 2013). Dos tipos de fuentes de nitrógeno pueden ser asimiladas por *E. coli*, una como nitrógeno orgánico (proteínas, quitinas, peptidoglicanos) que requieren degradación y conversión a moléculas más pequeña como aminoácidos para ser aprovechados y otra como nitrógeno inorgánico (amonio y nitrato) que son directamente asimilados (van Heeswijk et al., 2013). Algunos estudios realizados con serina, aspartato y glicina han demostrado que estos aminoácidos de bajo costo, proporcionan energía y biomasa desde sus carbonos y nitrógenos pero confiriéndole a *E. coli* una baja velocidad de consumo de glucosa en fase de crecimiento exponencial (Zampieri et al., 2019). Ahora bien, *E. coli* bajo limitación de nitrógeno, activa las proteínas reguladoras que controlan los niveles de expresión

génica implicados en la captura de nitrógeno, mejorando el transporte de nitrógeno en el metabolismo de la bacteria (Warsi et al., 2018).

Respiración y fermentación. *E. coli* en condiciones aeróbicas y anaeróbicas puede tener un crecimiento con diferente metabolismo y generación de metabolitos secundarios. Por un lado, el oxígeno es favorable para su crecimiento por que permite una eficiente generación de ATP, por otro lado, en medios pobres en oxígeno el microorganismo es capaz de utilizar varios aceptores de electrones terminales como nitrato, dimetilsulfóxido, trimetilamina-N-óxido y fumarato para su respiración anaeróbica (Tran & Uden, 1998).

Dependiendo del suministro de oxígeno en el medio de cultivo, se inducen cambios fisiológicos en *E. coli* por dos principales reguladores en la respiración: ArcAB (control redox anóxico) y el regulador transcripcional de unión al ADN FNR. El primero regula la expresión génica de algunos procesos metabólicos en los cuales se encuentra el ciclo del TCA, derivación de glioxilato y degradación de ácidos grasos (Alexeeva et al., 2003). El segundo, contiene un grupo de hierro azufrado sensible al oxígeno, que puede detectar directamente las concentraciones de oxígeno para así alterar sus capacidades reguladoras, como también la represión de genes utilizados durante la respiración aeróbica. (Kiley & Beinert, 2003)

Cuando no hay presencia de oxígeno la producción de ATP es limitada, lo que produce un aumento del flujo a través de la ruta de la glucólisis (Koebmann et al., 2002), conllevando, a una oxidación incompleta del carbono afectando el ciclo del TCA, generando subproductos como el acetato, formiato, succinato, lactato y etanol. Estos metabolitos son capaces de generar dentro de la célula una regulación del equilibrio redox (NADH) y la formación de ATP, para alcanzar un desarrollo y crecimiento microbiano (Tran & Uden, 1998).

1.2.3 Modos de operación y modelado cinético

El crecimiento de una célula microbiana es el resultado de cientos de reacciones catalizadas enzimáticamente, muchas de las cuales están cuidadosamente reguladas por la célula para asegurar que los nutrientes no se desperdicien y que las reservas claves de metabolitos estén disponibles (Hill et al., 2013). Modelar todas estas reacciones sería una tarea formidable, pero en la mayoría

de los casos las descripciones más simples de la cinética son suficientes para el desarrollo y la optimización del proceso. No sólo se producen las reacciones dentro del complejo celular, sino que deben superponerse las variaciones de una célula a otra en una población (Panikov, 1995). Por lo tanto, no es sorprendente que los modelos de crecimiento microbiano comiencen con modelos agrupados que describan las principales variables bióticas y abióticas (Panikov, 1995).

La idea de la cinética del crecimiento microbiano ha estado dominada por un modelo empírico (Ecuación 1.1) originalmente propuesto por Monod (Okpokwasili & Nweke, 2016). El modelo Monod introdujo el concepto de un sustrato limitante del crecimiento.

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} \quad (1.1)$$

Donde μ = velocidad de crecimiento específica, μ_{max} = velocidad máxima de crecimiento específica, S = concentración de sustrato, K_s = constante de saturación del sustrato (es decir, concentración de sustrato a la mitad μ_{max}). En el modelo de Monod, la tasa de crecimiento está relacionada con la concentración de un único sustrato limitante del crecimiento a través de los parámetros μ_{max} y K_s . Además de esto, Monod también relacionó el coeficiente de rendimiento ($Y_{X/S}$) (Ecuación 1.2) con la tasa específica de crecimiento de la biomasa (μ) y la tasa específica de utilización del sustrato (q) (Ecuación 1.3) (Okpokwasili & Nweke, 2016).

$$Y_{X/S} = \frac{dX}{dS} \quad (1.2)$$

$$\mu = \frac{Y_{X/S}}{X} \frac{dS}{dt} = Y_{X/S} q \quad (1.3)$$

Por otro lado, el biorreactor es el centro de todo proceso biotecnológico, el diseño y análisis del comportamiento cinético de un microorganismo en un biorreactor depende del conocimiento de las reacciones biológicas y de los balances de materia y energía y del modo de operación. Un biorreactor debe proveer todos los servicios que son necesarios para homogenizar y garantizar la

asepsia del cultivo, tales como mezclado, termostatación, suministro de oxígeno, entradas para adición de nutrientes, control del pH y hermeticidad. Por otra parte, cuando se habla de sistemas de cultivo o, también métodos de cultivo, se hace referencia al modo de operar el biorreactor, esto en forma continua, semicontinua (lote alimentado) o discontinua (lote) (Pauline, 2012).

Para un componente cualquiera de cultivo, incluida la biomasa, se puede plantear una expresión matemática proveniente del balance de materia en el biorreactor como se describe en la Ecuación 1.4 (Pauline, 2012):

$$\frac{d(VC_i)}{dt} = F_1 C_{i1} - F_2 C_i + Vr_i - Vr_{ei} \quad (1.4)$$

Velocidad de
Acumulación de i

Velocidad de
Ingreso i

Velocidad de
salida i

Velocidad de
formación i

Velocidad de
Consumo i

Donde:

V = volumen del medio en el biorreactor(L)

C_i = concentración de componente (i) (g/L)

F₁ = flujo de entrada (L/h)

F₂ = flujo de salida (L/h)

r_i = velocidad de reacción de aparición de componente (i), r_i = μ c_i; μ: tasa de crecimiento específica, i: cantidad de componente (i) (g/L.h)

r_{ei} = velocidad de reacción de consumo de componente (i) (g_{ei}/L.h)

1.2.3.1 Operación en lote

El crecimiento de microorganismos en lote se refiere a que las células se cultivan en un recipiente con una concentración inicial, sin que esta sea alterada por nutrientes adicionales o el lavado celular ocasionado por altas tasas de dilución, por lo que el volumen permanece constante y sólo las condiciones ambientales del medio (pH, temperatura, velocidad de agitación, etc.) son controladas por el operador (Moreno Grau & Bayo Bernal, 1996; Pauline, 2012). El balance de

materia descrito en la Ecuación 1.5 se ve modificado ya que los términos de entrada y salida se anulan, (Velocidad de acumulación) = (Velocidad de Formación), obteniéndose el balance para el crecimiento microbiano como se muestra en Ecuación 9 (Gordeeva et al., 2017; Sainz et al., 2003):

$$\frac{d(VX)}{dt} = Vr_x \quad (1.5)$$

Teniendo en cuenta que el volumen es constante, y el análisis se realiza cuando la reacción está en fase exponencial e integrando se obtendría la Ecuación 1.6, que describe concentración de biomasa en función del tiempo, la cual se puede linealizar (Ecuación 1.7) y obtener la velocidad de crecimiento μ , que es igual a μ_{max} en cultivo en lote (Gordeeva et al., 2017; Moreno Grau & Bayo Bernal, 1996; Sainz et al., 2003).

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (1.6)$$

Linealizando:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t \quad (1.7)$$

1.2.3.2 Operación en lote alimentado y continuo

En un cultivo semicontinuo o lote alimentado, los nutrientes son alimentados al biorreactor de forma continua o semicontinua, mientras que no hay efluente en el sistema (Moreno Grau & Bayo Bernal, 1996; Pauline, 2012). Esta manera de operar hace posible el control de la concentración de nutrientes en el medio, y así se da una mejora en el rendimiento respecto al modo de operar en lote del biorreactor (Moreno Grau & Bayo Bernal, 1996). El sustrato se va añadiendo a medida que hay un consumo por parte del microorganismo, manteniéndose una concentración en valores que permitan alcanzar velocidades de reacción aceptables, buscando un equilibrio entre el aumento de velocidad por incremento de concentración de nutrientes y disminución causada por la inhibición del producto (Moreno Grau & Bayo Bernal, 1996; Pauline, 2012).

Realizando un balance de materia para operación del biorreactor como lote alimentado se obtendría la expresión descrita en Ecuación 1.8 y la cual derivatizando los términos se obtiene la Ecuación 1.9 (Zelić et al., 2004):

$$\frac{d(C_i V)}{dt} = V r_i + F_1 C_{i1} \quad (1.8)$$

$$V \frac{dC_i}{dt} + C_i \frac{dV}{dt} = V r_i + F_1 C_{i1} \quad (1.9)$$

Si se supone que la densidad celular es suficientemente baja como para que la densidad del fluido en el biorreactor y en la corriente de entrada sean iguales, se podría decir que en sistemas con alimentación continua, el caudal alimentado es igual a la variación de volumen con el tiempo en el biorreactor, por tanto, se puede expresar como la Ecuación 1.10 (Zelić et al., 2004):

$$\frac{d(V)}{dt} = F_1 \quad (1.10)$$

Así, del balance de materia (Ecuación 1.9) al reemplazar (Ecuación 1.10) quedaría:

$$V \frac{dC_i}{dt} + C_i F_e = V r_i + F_1 C_{i1} \quad (1.11)$$

Simplificando,

$$\frac{dC_i}{dt} = r_i + \frac{F_1}{V} (C_i - C_{i1}) \quad (1.12)$$

La Ecuación 1.12 es genérica para cualquier metabolito, al ajustar C_i por la concentración de biomasa X , se tiene la Ecuación 1.13 (Zelić et al., 2004).

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - \frac{F_1}{V} X \quad (1.13)$$

siendo $D = F/V$, Donde, D es la tasa de dilución en h^{-1} y para este caso es variable con el tiempo,

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - D) X \quad (1.14)$$

Siguiente con ajustes de términos, al cambiar C_i por la concentración de sustrato (S) en 1.14, se obtiene la Ecuación 1.15 (Zelić et al., 2004) con el grado de importancia en cuanto al consumo de sustrato, que vendría siendo la ecuación que representa un sistema de lote alimentado, en el cual hay variación de la concentración de sustrato, biomasa y volumen a través del tiempo:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F_1}{V} (S_1 - S) - \frac{1}{Y_{X/S}} \mu X \quad (1.15)$$

1.2.4 Aminoácidos y su importancia industrial

De los veinte aminoácidos (AAs) de origen proteínico, hay ocho que deben suministrarse en la dieta, ya que el organismo los sintetiza en cantidades despreciables. Estos se denominan AAs esenciales y corresponden a leucina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina, en adultos y en niños se incluye también histidina (G. Wu, 2013).

La deficiencia de AA en la dieta puede ser suplida a través de la suplementación de AAs libres, y se hace necesario controlar las cantidades, puesto que un exceso puede producir antagonismo aminoacídico (autodegradación) o efectos tóxicos. Por otro lado, cuando se agota un AA, inmediatamente se detiene la síntesis de proteínas (Badui & Badui, 2006). Con respecto a la alimentación animal, el suministro de AA es indispensable para un óptimo crecimiento, reducción de enfermedades cardíacas, aumento de la vida útil y de la calidad de la carne como producto final (Carcò et al., 2018).

Los procesos de producción de AAs se clasifican en tres tipos: extracción, síntesis química y métodos biotecnológicos. Los métodos biotecnológicos se dividen en fermentación y síntesis

enzimática. Las ventajas de cada método dependen de muchos factores como la economía del proceso, la situación de las materias primas disponibles, el tamaño del mercado, la regulación ambiental, entre otros. Siendo la fermentación el proceso más usado a nivel industrial por sus ventajas económicas y ambientales (D'Este et al., 2018) y por permitir obtener los AAs individuales en forma levógiro (L), configuración espacial de los AAs esencial para su asimilación en el cuerpo (Wendisch, 2020). Puesto que, por vía de síntesis química, se producen cantidades iguales de AA L y dextrógiro (D) y, por tanto, un paso adicional en el proceso se debe complementar para convertir los AAs D en L, generando mayores costos.

Los bioprocesos para la producción de AA son desarrollados desde 1950. Al comienzo la tecnología servía solo a un pequeño mercado, pero a través de los años la demanda ha crecido dadas las nuevas aplicaciones que se han encontrado de ellos. Con el crecimiento del mercado, el tamaño de las plantas y de los biorreactores ha ido incrementando gradualmente (Ikeda, 2003; Wendisch, 2020). Es así, como actualmente hay biorreactores de 50 a 500 m³ estandarizados para producción de AA (dependiendo del producto) (Hermann, 2003).

Es de mencionar que, los primeros estudios fermentativos para la producción de aminoácidos, fueron trabajos basados en la producción de glutamato a partir de *Corynebacterium glutamicum*, siendo trabajos cruciales en el desarrollo de fermentaciones para la producción de AA mediante procesos de optimización de biosíntesis y análisis a nivel metabólico (Hoischen & Kramer, 1990; Hoischen & Krämer, 1989; Slowinski & Charm, 1973).

Debido a que el método de fermentación es el más aplicado para la producción industrial de la mayoría de los AA. La economía de este método cuando se habla a gran escala depende principalmente del costo del medio de cultivo, siendo la fuente de carbono un aspecto muy importante para tener en cuenta. También son importantes los rendimientos de biomasa y producto, la eficiencia en los procesos de purificación y concentración, además del incremento en la productividad del proceso global (Leuchtenberger et al., 2005, D'Este et al 2017). Debido a los avances tecnológicos y de mejoras en los procesos fermentativos, esta técnica de biosíntesis de AA lo hace económico y viable a diferencia de los demás métodos de obtención de AA (Ikeda, 2003; Wendisch, 2020).

1.2.5 Importancia de L-valina

L-valina es uno de los tres AAs de cadena ramificada (BCA), es alifático y es un nutriente esencial tanto para animales como para humanos. Por tal razón, tiene aplicación como compuesto puro en la industria farmacéutica por su función como sintón químico para la producción de antibióticos y medicamentos (Eggeling et al., 2001). Además, es utilizado como componente humectante de la piel y como promotor de síntesis de colágeno en la industria cosmética (Saraf et al., 2019). También es utilizado en la industria alimentaria como suplemento en productos dietéticos y nutricionales (Karau & Grayson, 2014). La importancia de la L-valina ha radicado principalmente en su participación en la alimentación de aves y cerdos, con el fin de acelerar su crecimiento y desarrollo (Barea et al., 2009).

1.2.6 Biosíntesis de L-valina

En la producción de L-valina mediante fermentación, son usadas principalmente cepas recombinantes de: *E. coli* y *Corynebacterium glutamicum*. *E. coli* es un microorganismo modelo en el que la regulación de las vías se ha descrito de forma más exhaustiva, mientras que *C. glutamicum* es el microorganismo industrial frecuentemente utilizado para la producción de aminoácidos mediante procesos de fermentación. En la Figura 1.2 se muestra un esquema resumido de la biosíntesis de L-valina en *E. coli*. Se conoce que la biosíntesis de L-valina tanto en plantas como en bacterias, se bifurca del piruvato obtenido del metabolismo central, se obtiene mediante cuatro reacciones catalizadas por las enzimas acetohidroxiácido sintasa (AHAS), acetohidroxiácido isomeroeductasa (AHAIR), dihidroxiácido deshidratasa (DHAD) y transaminasa B (TA), las cuales inician la ruta de biosíntesis con el consumo de dos moléculas de piruvato (Kaplun et al., 2006). En muchos organismos estas cuatro enzimas catalizan también la biosíntesis de L-isoleucina, partiendo de piruvato y 2 cetobutirato (Pátek, 2007).

AHAS es una de las enzimas con importancia para la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (L-valina, L-isoleucina y L-leucina) (Oldiges et al., 2014; Pátek, 2007). *E. coli* se caracteriza por poseer tres isoenzimas AHAS (I, II y III), las cuales difieren en su regulación y

propiedades bioquímicas. AHAS I (codificada por *ilvBN*) es inhibida por L-valina, AHAS II (codificada por *ilvGM*) es resistente a L-valina, AHAS III (codificada por *ilvIH*), muy similar a AHAS de *C. glutamicum* (que sólo posee una sola) (Kaplun et al., 2006). De las tres isoenzimas, AHAS III es la responsable de la unión de este complejo (AHAS I, II y III) con L-valina (Kaplun et al., 2006). Además, se ha demostrado que AHAS II y III poseen mayor afinidad por 2-cetobutirato que piruvato, conllevando a una mayor biosíntesis de L-isoleucina en presencia de 2-cetobutirato (Pátek, 2007).

AHAIR (codificada por *ilvC*) cataliza la conversión de acetohidoxiácidos a dihidroxiácidos; esta enzima es inducida transcripcionalmente en presencia de concentraciones altas de 2-acetolactato, generando 2,3-dihydroxy-3-methylbutanoato, para lo cual requiere equivalentes de reducción en forma de NADPH (Pátek, 2007).

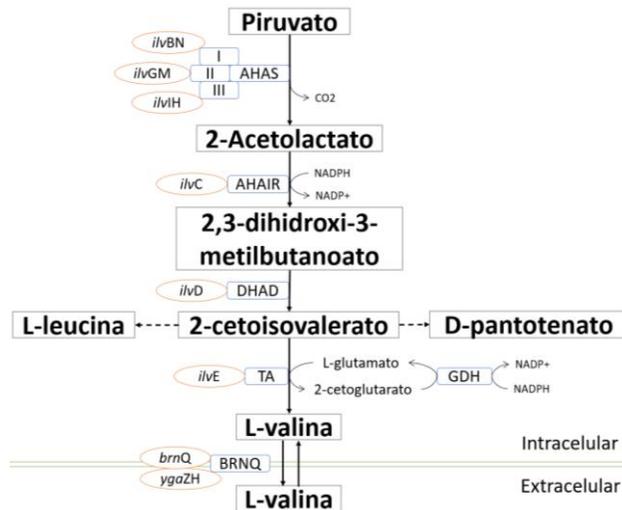
La tercera etapa de biosíntesis de L-valina y de L-isoleucina es la conversión de dihidroxiácidos a 2-cetoácidos, catalizados por DHAD. Para el caso específico de L-valina, 2,3-dihydroxy-3-methylbutanoato es convertido a 2-KIV (Pátek, 2007; Tadrowski et al., 2016).

2-KIV es el último intermediario en la biosíntesis de L-valina, y también es precursor de L-leucina y D-pantotenato (Pátek, 2007). TA es la principal enzima que cumple la función de conversión final de los tres aminoácidos de cadena ramificada. TA convierte 2-KIV y L-glutamato a L-valina y 2-cetoglutarato, ácido orgánico que interviene en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (Frank et al., 2008). La reacción de glutamato deshidrogenasa (GDH) es la que provee el grupo amino para la reacción de transaminación de 2-KIV a L-valina catalizada por TA. La reacción de GDH se ha caracterizado por ser la mejor reacción de asimilación de nitrógeno bajo condiciones de exceso de N, generalmente aplicada la producción de AA (Oldiges et al., 2014).

Además, se ha encontrado que el gen *brnQ* es responsable de la importación de los aminoácidos de cadena ramificada, mientras que el operón *YgaZH* es responsable de exportar principalmente L-valina, L-leucina y L-isoleucina (Park et al., 2007).

Figura 1.2

Esquema resumido de la biosíntesis de L-valina en *E. coli*. Acetohidroxiácido sintasa (AHAS), acetohidroxiácido isomero-reductasa (AHAIR), dihidroxiácido deshidratasa (DHAD), transaminasa B (TA), glutamato deshidrogenasa (GDH), transportador reversible de L-valina a través del simporte de protones (periplasma) (BRNQ). Operon: *ilvBN*, *ilvGM*, *ilvIH*, *ygaZH*. Gene: *ilvC*, *ilvD*, *ilvE*, *brnQ*



1.2.7 Ingeniería metabólica de sistemas

La ingeniería metabólica de sistemas integra la ingeniería metabólica tradicional con la biología de sistemas, la biología sintética y la ingeniería evolutiva, esto ha permitido el desarrollo de nuevos microorganismos que serían capaces de producir de manera eficiente una variedad de productos químicos, polímeros, aminoácidos y medicamentos. Esta área de trabajo permite a través de diferentes herramientas y estrategias cumplir con el objetivo de la optimización en la producción del metabolito deseado cita.

1.2.7.1 Ingeniería metabólica

Las rutas metabólicas se definen como la secuencia de reacciones bioquímicas que ocurren en la célula con el propósito de lograr el transporte de nutrientes, proporcionar energía y los metabolitos necesarios para cumplir con las funciones vitales (Kim et al., 2020). La ingeniería metabólica (IM) es el mejoramiento dirigido de las propiedades celulares para entender e

incrementar la producción de metabolitos deseados a través de la modificación de una o varias rutas metabólicas realizado de forma sistémica y racional mediante el empleo de herramientas computacionales (Nielsen, 2001).

Su esencia radica en el uso de los conocimientos sobre el metabolismo celular in vivo e in vitro y algunos modelos matemáticos, con el fin de establecer los cuellos de botella en las rutas metabólicas y orientar el trabajo a realizar con la ingeniería genética (IG) (Schurman et al., 2003).

En la actualidad, estas metodologías matemáticas para estudiar el metabolismo se conocen como enfoques de modelado basado en restricciones (Constraint-based modeling), o métodos COBRA (Antoniewicz, 2021), los cuales han estado en constante desarrollo gracias a los avances en técnicas analíticas y computacionales que han incrementado la capacidad de cuantificar gran cantidad de biomoléculas de la célula, por medio de las tecnologías ómicas, que permiten capturar moléculas de diferentes niveles biológicos como el genoma (genes), transcriptoma (RNA mensajero), metaboloma (metabolitos), y el proteoma (proteínas) con una amplia precisión (Sánchez Henao et al., 2021).

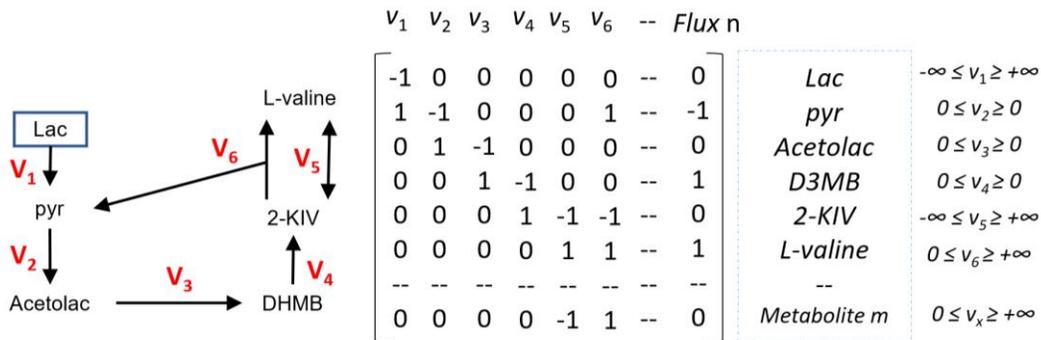
Tipos de enfoques en análisis de flujos metabólicos. El sistema algebraico de reacciones bioquímicas representa el modelo metabólico, siendo una matriz compleja (ver Figura 1.3), la cual puede resolverse por programación lineal. Dependiendo de las variables y los grados de libertad. Como principales técnicas en estudios de distribución de flujos metabólicos son identificados tres enfoques de modelado basado en restricciones ampliamente utilizados: Análisis de Balance de Flujo (FBA), Análisis de Flujo Estequiométrico o Metabólico (MFA) y Análisis de Flujo Basado en Isótopos (^{13}C) (Antoniewicz, 2015).

El modelo de la red metabólica se representa matemáticamente como una matriz estequiométrica (**S**) de tamaño ($m \times n$), donde m y n son el número de metabolitos y el número de reacciones (flujos), respectivamente. Los elementos al interior de la matriz indican los coeficientes estequiométricos de los metabolitos en cada reacción, los cuales son negativos para reactivos y positivos para productos. Esta matriz corresponde al planteamiento de las reacciones estequiométricas del metabolismo (n), en el cual se tendrá en cuenta la gluconeogénesis, ruta de las pentosas fosfato, ciclo de los ácidos tricarboxílicos, síntesis de biomasa y síntesis de AA, entre otras. Un ejemplo, en el cual se tiene en cuenta los productos (E), metabolitos intermediarios (B,

C y D productos que se generan o consumen) y el sustrato (A) con sus respectivas velocidades específicas de reacción (v), como se muestra en la Figura 1.3.

Figura 1.3

Ejemplo simple de red metabólica en la biosíntesis de L-valina con ilustración de restricciones de velocidad y matriz de flujo metabólico. Glu, PYR, Acetolac, D3MB, 2-KIV, L-valina: metabolitos consumidos o producidos por microorganismos; V1, V2, V3, V4, V5, V6: flujos metabólicos



S

Bajo la suposición de estado pseudo-estable para el metabolismo intracelular, es decir, sin acumulación neta o agotamiento de los metabolitos intracelulares (Qian et al., 2003). El balance puede escribirse como la Ecuación 1.16.

$$S \cdot V = 0 \tag{1.16}$$

Los flujos determinados experimentalmente (que se pueden obtener por alguna técnica analítica) se utilizan para reducir el posible espacio de solución dado en la Ecuación 1.16. Por lo tanto, el vector de reacciones (V) puede ser dividido en dos, un vector de flujos medidos (V_m) y Vector de flujos a calcular (V_c); considerando esta división, la matriz de la Ecuación 1.16 puede reorganizarse como se muestra en la Ecuación 1.17.

$$S \cdot V = S_u \cdot V_u + S_m \cdot V_m = 0 \tag{1.17}$$

$$\mathbf{Su} * \mathbf{Vu} = - \mathbf{Sm} * \mathbf{Vm} = \mathbf{0} \quad (1.18)$$

Al resolver el sistema matricial de Ecuación 1.18 se pueden presentar tres escenarios al momento de solucionarlo, relacionado con los grados de libertad (GL) de la matriz, el cual se define como Ecuación 1.19.

$$GL = n - \text{rango}(\mathbf{S}) \quad (1.19)$$

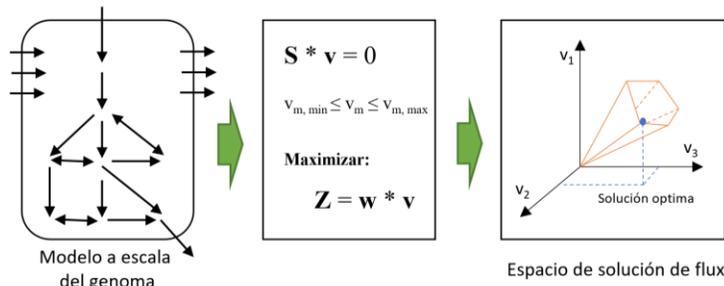
Donde el rango de \mathbf{S} proporciona el número de filas o columnas linealmente independientes. Si el GL es igual a cero, implica que el sistema es determinado y tiene una única solución, es decir, existen un número de flujos medidos tal que permite calcular los flujos desconocidos: este caso se conoce como enfoque MFA.

En el caso de obtener un GL mayor que cero, se considera el sistema subdeterminado y el sistema tiene infinitas soluciones. Para este caso se requiere agotar los grados de libertad tratando el sistema como un problema de optimización donde es posible aplicar métodos de programación lineal (LP, por sus siglas en inglés) para encontrar la solución. Este caso se conoce como FBA. Al aplicar el enfoque FBA es posible determinar la distribución de flujos más probable en la red metabólica (Sánchez Henao et al., 2021).

El más utilizado y de mayor aplicación en el campo de la ingeniería metabólica y genética es el FBA. Este tipo de técnica se establece en sí para cuantificar los flujos metabólicos *in silico* que podrían estar reaccionando en el microorganismo (Antoniewicz, 2015). Como se ilustra en la Figura 1.4, en FBA se aplican restricciones a las tasas extracelulares medidas, se establecen restricciones como límites superiores e inferiores en los flujos y se impone una función objetivo (Z) a maximizar o minimizar, que puede ser maximización de biomasa, minimización del potencial redox, minimización del consumo de nutrientes, etc. (Feist & Palsson, 2010; García Sánchez & Torres Sáez, 2014). Al maximizar o minimizar la función objetivo, se obtienen puntos óptimos dentro del espacio de solución.

Figura 1.4

Análisis de Balance de Flujo. Matriz estequiométrica (S); v indica el vector de flujos; v_m, el vector de flujos medidos, que se encuentra entre un mínimo (min) y un máximo (max); Z es la función objetivo a maximizar; w es el vector de reacciones ponderadas



Nota. Fuente Antoniewicz (2015, 2021).

Asimismo, la gran ventaja del FBA es su capacidad de interactuar con diferentes tipos de metodologías (deleciones simples o compuestas de genes) con modelos metabólicos a gran escala, el cual se puede observar que genes interactúan en las reacciones intracelulares del microorganismo (García Sánchez & Torres Sáez, 2014). A nivel de escala genómica, es útil en FBA para la eliminación de una o varias reacciones para hacer el análisis de la relación gen-proteína-reacción de la red usada, como también puede servir para la evaluación de medios de crecimiento atípicos o complejos, los cuales emplean fuentes de carbono y nitrógeno de residuos agroindustriales, permitiendo entender su efecto sobre el metabolismo del microorganismo (Rangel et al., 2020).

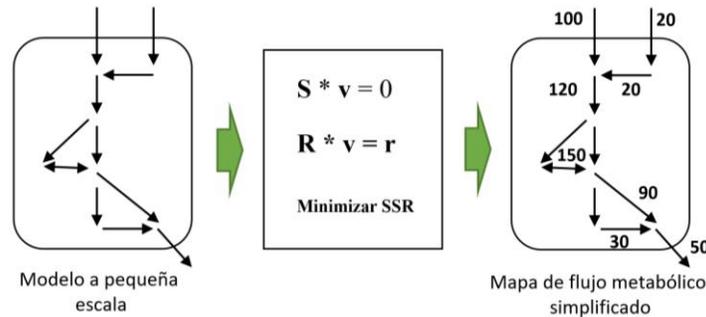
El MFA es una técnica que analiza el sistema biológico como un modelo de red bioquímica integrada, basándose en equilibrar los flujos de los metabolitos intracelulares en el modelo de red metabólica propuesto (Antoniewicz, 2021).

Su base de funcionamiento es similar a FBA (Figura 1.5): utilizando este enfoque, los flujos metabólicos se pueden estimar en sistemas que están completamente determinados (es decir, que contienen todas las mediciones de la tasa externa necesarias), y hasta sobredeterminados (que contienen un conjunto redundante de mediciones de flujos externos). La principal ventaja de MFA es que es fácil de aplicar y, por lo tanto, accesible para muchos investigadores, ya que solo requiere álgebra lineal simple y depende de mediciones relativamente sólidas de los metabolitos extracelulares (Lee et al., 2011). Una limitación de MFA para el análisis de muchos sistemas biológicos es que el número de restricciones (mediciones estequiométricas y de velocidad) a

menudo es insuficiente para observar todas las vías metabólicas intracelulares importantes (pero sirve como una primera aproximación al modelo metabólico).

Figura 1.5

Análisis de Flujo Metabólico (MFA). La matriz estequiométrica es S ; el vector de flujos es v ; Z es la función objetivo; w es el conjunto de reacciones ponderadas; r es la suma de los flujos o reacciones medidas de cada uno de los metabolitos; suma de los cuadrados residuales (SSR)



Nota. Fuente Antoniewicz (2015, 2021).

Aplicaciones en bioprocesos. El conocimiento de las rutas metabólicas en los microorganismos permite modificar algunos de sus requerimientos en sustratos, logrando alterar su cinética para obtener una mayor titulación del producto deseado. En algunos casos se requiere hacer modificaciones genéticas, en donde el mejoramiento es guiado por el conocimiento que se tenga del metabolismo del microorganismo, así como de su genética molecular, de tal forma que se puedan emplear técnicas de biología molecular y tecnología del DNA recombinante para lograr avances. Estas estrategias impactan favorablemente los sectores farmacéutico, agrícola, alimentación, y ambiental (Liu & Nielsen, 2019; A. N. Yadav et al., 2019).

Una de las más importantes aplicaciones de IM en los bioprocesos es el mejoramiento del rendimiento de producto con respecto al sustrato, que impacta principalmente el costo de materias primas y demuestra cómo este es favorecido por el redireccionamiento de los flujos metabólicos hacia la biosíntesis del producto de interés (Y. Chen & Nielsen, 2016; X.-D. Ren et al., 2014). Además, la productividad es un factor clave en el costo de equipamiento de los bioprocesos y puede mejorarse por el aumento de flujo metabólico. Algunos ejemplos de trabajos en los cuales se ha hecho uso de IM para aumentar productividad y rendimiento están la producción de bioalcoholes

(Dien, 2016), de amino ácidos (Wendisch, 2020), ácidos orgánicos (Y. Chen & Nielsen, 2016), antibióticos (Mohite et al., 2019), entre otros productos naturales (Yang et al., 2020).

En recientes años, la tecnología de cultivo microbiano junto con la IM ha demostrado su potencial superior para la producción de L-valina. La producción se ha orientado a la producción microbiana, lo que indica beneficios económicos y ecológicos sobre las otras tecnologías con las que compete. Los microorganismos son principalmente recombinantes de *E. coli* y *C. glutamicum*. La producción biotecnológica presenta su énfasis en Sistemas de Producción Microbiano con aplicación combinada de IM e IG, Modelado de Redes, Tecnologías Omicas y herramientas novedosas para la ingeniería de cepas y bioprocesos de L-valina (Oldges et al 2014). De acuerdo con esta tendencia, se ha incrementado el estudio de las ocho enzimas que interfieren en la biosíntesis de los tres aminoácidos de cadena ramificada: L-isoleucina, L-leucina y L-valina empleando conjuntamente IM con IG, dado su alta demanda para utilización en fármacos como antibióticos y productos químicos (Amorim Franco & Blanchard, 2017).

1.2.7.2 Construcción de plataformas – ingeniería genética

Clonación celular de moléculas de DNA. El objetivo central de la clonación celular es la producción de un gran número de copias de una región de ácido desoxirribonucleico (DNA, fragmentos o genes) o de DNA complementario (formado a partir de un ácido ribonucleico mensajero (mRNA)). Esta clonación se basa al igual que la PCR (siglas en inglés de 'Reacción en Cadena de la Polimerasa') en la realización de múltiples replicas catalizadas por la DNA polimerasa propia de la célula huésped. Se suele utilizar un vector de clonación, en el cual el fragmento de DNA a clonar se une a este, obteniéndose una molécula de DNA recombinante que luego es incorporada en la célula anfitriona donde tiene lugar la amplificación por replicación (Lodge et al., 2007; Luque & Herráez, 2000).

Un vector de clonación (plásmido) es una molécula de DNA de tamaño pequeño, fácil de aislar y caracterizar, además de ser de fácil introducción en la célula a trabajar y con capacidad de replicación autónoma. Su especificidad y manejo, viene de tener sitios de restricción convenientes y estratégicamente posicionados, para adherir más de un fragmento de ADN que se quiere clonar

y así mediante técnicas de expresión genética poder sobreexpresar genes propios o adquiridos de otras células, cómo también la mutación de genes a través de técnicas de recombinación homóloga de DNA (Lodge et al., 2007; Luque & Herráez, 2000).

Con este sistema de clonación se puede realizar amplificación de DNA para estudios de secuenciación, estudio de la estructura de ácidos nucleicos, estudio de especies homologas, identificación de mutaciones. Además de la expresión de genes o fragmentos de ADN, en el cual se utilizarían estudios de procesos de transcripción, traducción y regulación (Lodge et al., 2007; Luque & Herráez, 2000).

En estudios de mejoramiento celular, se han encontrado rendimientos bajos en cepas deterioradas (por mutaciones); aunque teóricamente la distribución de flujos por dichas intervenciones genéticas son los indicados, sus niveles de expresión y óptima interacción entre las vías metabólicas no lo son (Gilman et al., 2021; Jessop-Fabre & Sonnenschein, 2019). Por lo tanto, se debieron hacer otros estudios más rigurosos en cuanto al análisis de expresión metabólica, pudiéndose obtener la regulación metabólica real-ideal en el microorganismo a trabajar, generando un nivel de expresión de enzimas que intervinieron racionalmente en la vía de producción de metabolitos deseados (Damalas et al., 2020; Zobel et al., 2015).

Una de estas técnicas experimentales es la construcción de bibliotecas de promotores para observar los diferentes sistemas de expresión para *E. coli*. Estas aplicaciones requieren la combinación de múltiples elementos genéticos como promotores, sitios de unión ribosomal (RBS) y región de codificación de un gen (CDS) (Ellis et al., 2011). Estos sistemas pueden ser constitutivos o inducibles, en los cuales la expresión en este último es controlada por la concentración de inductor añadido.

Actualmente se realiza un sistema de clonación modular y jerárquico, que permite ensamblar cualquier construcción multigénica eucariótica y procariótica deseada a partir de conjuntos de módulos genéticos estandarizados prefabricados, incluidos promotores, regiones no traducidas, péptidos señal, secuencias codificantes y terminadores (Weber et al., 2011). Este sistema de clonación se basa en la tecnología de clonación Golden Gate, un método que permite un ensamblaje direccional altamente eficiente de múltiples fragmentos de DNA en una sola reacción (Blázquez et al., 2022; Weber et al., 2011). Este tipo de sistema de clonación se ha llevado

a cabo en los últimos años a través de la plataforma Standard European Vector Architecture (SEVA) (Damalas et al., 2020; Martínez-García et al., 2022), es un recurso basado en la web <http://seva-plasmids.com/> y un depósito de material clonado para ayudar a elegir los vectores plásmidos óptimos para deconstruir y reconstruir fenotipos procarióticos complejos.

La base de datos SEVA (SEVA-DB) es un recurso para la implementación de un estándar para el ensamblaje físico de plásmidos vectoriales, así como el índice para un depósito de secuencias funcionales y construcciones reales disponibles para la comunidad. La base de datos fue diseñada para simplificar la elección de un determinado vector en aras de aplicaciones específicas, de tal forma que el usuario pueda decidir fácilmente la mejor configuración de orígenes de replicación, resistencia antibiótica y segmentos de DNA requerido. Todos los vectores de expresión construidos se han probado tanto en *E. coli* DH α como en *Pseudomonas putida* KT2440 (Damalas et al., 2020; Martínez-García et al., 2022).

Recombinación homóloga de ADN en E. coli. Las técnicas utilizadas con más frecuencia para la modificación genética de *E. coli* y *Salmonella* entérica son el método de recombinación en dos pasos (Kim et al., 2014) y el método de “gene gorging” (Herring et al., 2003). Ambos métodos utilizan el sistema de recombinación del bacteriófago λ para promover el reemplazo de genes en cepas con una baja tasa de recombinación intrínseca. Los genes red de λ pueden realizar un intercambio genético entre dos moléculas de ADN con regiones homólogas muy pequeñas, de aproximadamente 50 pares de bases (pb) o menos, comparado con otros procesos mediados por la proteína RecA, que utiliza fragmentos de mayor tamaño para poder lograr una alta eficiencia (Kim et al., 2014). Esto se debe a que el genoma de λ contiene los genes de recombinación Red; *exo*, *bet* y *gam*, encontrándose localizados dentro del operón PL del fago λ (Pines et al., 2015).

Los genes Red de λ se han clonado en plásmidos que contienen orígenes de replicación diversos, esto para facilitar su uso en bacterias gram-negativas, diferentes a *E. coli*. Además de que se han expresado bajo diferentes promotores (Kim et al., 2014). Así, su expresión transcripcional es regulada para evitar inestabilidad de los plásmidos, rearrreglos genómicos y efectos tóxicos de proteínas.

1.2.8 Antecedentes

1.2.8.1 Uso del Lactosuero en fermentaciones para obtener productos químicos

Desde hace 4 décadas hasta la fecha, se presentan muchas aplicaciones sobre la utilización del lactosuero como medio de cultivo para fermentación para la obtención de diversos productos químicos (Tabla 1.1). Dichos resultados demuestran que el lactosuero es una buena fuente de carbono para cultivos fermentativos orientados a la producción de diversos metabolitos de interés como ácidos orgánicos, bacteriocinas, biopolímeros, bioalcoholes y biogás. Ko & Chipley (1983) utilizaron el lactosuero permeado (ultrafiltrado por membrana) con hidrólisis de su contenido de lactosa para ser fermentado entre 4 y 7 días por *Brevibacterium lactofermentum* y *E. coli* para la producción de L-lisina y L-treonina,

Con todos los ejemplos presentados, se observa que el lactosuero se ha utilizado de manera deshidratada en la mayoría de los estudios realizados, pues su manejo y conservación además de su alta concentración de lactosa, lo convierte en un material de fácil manejo en la preparación de medios de cultivo. Aunque se evidencian estudios en los cuales utilizan lactosuero permeado, desproteinizado y hasta hidrolizado su contenido de lactosa, es evidente que incluir etapas de pretratamiento para hacer uso de los residuos agroindustriales como el lactosuero encarecerían ésta como materia prima a utilizar.

Tabla 1.1

Productos obtenidos por cultivo de diferentes microorganismos empleando lactosuero como sustrato

Presentación del lactosuero	Especie microbiana	Producto	Producción g/L	Referencia
Proteínas				
En polvo	<i>K. fragilis</i>	Proteína microbial		(Meiering et al., 1978)
Aminoácidos				
Permeado con lactosa hidrolizada	<i>B. lactofermentum</i>	L-lisina	3.3	(Ko & Chipley, 1983)
	<i>E. coli</i>	L-treonina	3.6	
Ácidos orgánicos				
Ultrafiltrado	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Ácido láctico	35.00	(Roy et al., 1986)
En polvo	<i>Lacticasei bacillus casei</i>		44.23	(Catone et al., 2021)
En polvo	<i>Actinobacillus succinogenes</i>	Ácido succínico	13.46	(Louasté & Eloutassi, 2020)
Dulce en polvo	<i>Lactobacillus buchneri</i>	Ácido acético	25.00	(Veeravalli & Mathews, 2018)
Sin tratamiento	Comunidad microbiana de lodos de depuradora	Ácido caproico	2.87	(Iglesias-Iglesias et al., 2021)
		Ácido iso-butírico	0.30	
		Ácido butírico	0.60	
Sin tratamiento	<i>Propionibacterium freundenreichii</i> <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. Paracasei	Ácido propiónico	23.00	(Ngome et al., 2021)
Bacteriocinas				
Permeado	<i>Pediococcus acidiluctici</i>	Pediocina PO ₂	12800 AU/mL	(Liao et al., 1993)
En polvo	<i>Lactococcus lactis</i>	Biomasa probiótica Nisina	5.98 258.47 BU/mL	(Malvido et al., 2019)
Sin tratamiento	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Pediocina	12800 AU/mL	(Pandey et al., 2019)

Continuación Tabla 1.1

Permeado hidrolizado	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Ácido láctico Plantaricina	17.69 462.32 AU/mL	(A. Sharma et al., 2021)
Sin tratamiento	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Termofilina T	40960 AU/mL	(Kaminarides et al., 2018)
Biopolímeros				
En polvo	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Exopolisacáridos	6.10	(Dlamini & Peiris, 1997)
Desproteínizado	<i>Alcaligenes latus</i>	Ácido polihidroxibutírico	0.16	(Berwig et al., 2016)
Desproteínizado con lactosa hidrolizada	<i>Xanthomonas campestris</i>	Xantano	28.00	(Nitschke et al., 2001)
Dulce desproteínizado	<i>Azotobacter chroococcum</i>	Alginato	5.65	(Hendawy et al., 2019)
En polvo	<i>Sphingomonas azotifigens</i>	Gellan	33.75	(D. Wang et al., 2020)
En polvo con lactosa hidrolizada	<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	Ácido hialurónico	4.00	(Amado et al., 2016)
En polvo	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Exopolisacáridos	2.10	(Li et al., 2020)
En polvo con lactosa hidrolizada	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Pululano	12.40	(Hafez et al., 2007)
Permeado y desproteínizado	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Dextrano	16.35	(Esmailnejad-Moghadam et al., 2019)
Bioalcoholes				
Desproteínizado	<i>Candida pseudotropicalis</i>	Etanol	97.8	(Izaguirre & Castillo, 1982)
Agrio secado por aspersión	<i>Escherichia coli</i> W	Isobutanol	20.00	(Novak et al., 2020)
Sin pretratamiento	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Butanol	4.18	(Kallarakkal et al., 2021)
En polvo	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,3-butanediol	74.90	(Meng et al., 2020)
Sin pretratamiento	<i>Neolentinus lepideus</i>	Etanol	32.60	(Okamoto et al., 2019)
Biogas				
Desproteínizado y deslipidado	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Hidrógeno	3853.20 cm ³	(Rao & Basak, 2021)

En polvo	Comunidad microbiana de lodos de depuradora	Metano Hidrógeno	1434.63 cm ³ 6071.50 cm ³	(Ramos et al., 2019)
----------	---	---------------------	--	----------------------

Nota. BU: Unidad de Bacteriocina; AU: Unidad de Actividad

1.2.8.2 Producción de L-valina por *E. coli*

Se han realizado diferentes tipos de estudios en *E. coli* orientados a entender y mejorar la producción de L-valina. En la Tabla 1.2 se muestra la comparación en la evolución que ha tenido para la producción de este aminoácido en los últimos años en *E. coli*, es de aclarar que, según la revisión, todos los estudios han usado glucosa como fuente de carbono y que sus deleciones han llevado a generar auxotrofías en aminoácidos como L-treonina, vitaminas y pantotenato. Vartak et al. fueron quienes realizaron los primeros estudios sobre la biosíntesis de L-valina; esto fue por accidente, ya que los estudios estaban orientados hacia entender la biosíntesis de leucina, por lo que encontraron que para la biosíntesis de L-leucina era necesaria también la biosíntesis de L-valina y pantotenato, principalmente comparten el direccionamiento de flujo de carbono desde piruvato hasta el intermediario 2-KIV en dicha vía de biosíntesis (Vartak et al., 1991). Además, de demostrar que la valina-piruvato aminotransferasa (transaminasa C) codificada por *avtA*, catalizaba la reacción de transaminación que convierte el 2-KIV en L-valina y L-alanina en piruvato.

Estudios comprendidos entre el año 2007 y el 2011 por Park et al., donde empleando *E. coli* W3110 y *E. coli* W reportaron una sobreproducción de 32.3 y de 60.7 g/L de L-valina por lote alimentado, respectivamente, implementando glucosa como fuente de carbono y redireccionando el flujo de carbono hacia el incremento de producción intracelular de moléculas como piruvato y 2-KIV (precursor de L-valina), mediante la aplicación de ingeniería metabólica y su posterior modificación genética (Park et al., 2007; Park, Jang, et al., 2011; Park, Kim, et al., 2011).

Uno de los principales problemas en la producción de L-valina por fermentación ha sido la inhibición por producto, para esto se han trabajado en diferentes estrategias, una ha sido el desarrollo de un autoinductor artificial, denominado módulo de retroalimentación positiva que aumentó en un 52 % la titulación de L-valina (Geraskina et al., 2019). Otros desarrollos para mitigar esa inhibición se han dado por la introducción del gene *alsS* de *Bacillus subtilis* a *E. coli* W3110 y

con modificaciones genéticas racionales e implementando estrategias de producción por lote alimentado, alcanzando 84 g/L de L-valina en 36 h de producción (Hao et al., 2020).

Tabla 1.2

Tabla comparativa de E. coli en la producción de L-valina

Cepa	Mutaciones (Δ) y sobreexpresión de genes	Tipo de Fermentación	L-valina (g/L)	Referencia
<i>E. coli</i> K-12	<i>ilvE, avtA</i>	Lote	No reportan	Vartak et al., 1991
<i>E. coli</i> W3110	<i>\Delta ilvA, \Delta leuA, \Delta panB, \Delta aceF, \Delta mdh</i> y <i>\Delta pfkA</i> <i>ilvB, ilvN, ilvC, ilvE, ilvD, lrp</i> y <i>ygaZH</i>	Lote	7.55	Park, et al., 2007
<i>E. coli</i> W3110	<i>\Delta ilvA, \Delta leuA, \Delta panB, \Delta aceF, \Delta mdh</i> y <i>\Delta pfkA</i> <i>ilvB, ilvN, ilvC, ilvE, ilvD, lrp</i> y <i>ygaZH</i>	Lote alimentado	32.30	Park, Kim et al., 2011
<i>E. coli</i> W	<i>\Delta ilvA, \Delta lacI</i> <i>ilvB, ilvN, ilvC, ilvE, ilvD, lrp</i> y <i>ygaZH</i>	Lote Lote alimentado	10.00 60.70	Park, Jank et al., 2011
<i>E. coli</i> K-12	<i>cat-ilvY-ilvB-ilvN-ilvC</i> - basado en elemento regulador de retroalimentación positiva	Lote	6.1	Geraskina et al. 2019
<i>E. coli</i> W3110	<i>\Delta pflB, \Delta adhE</i> y <i>\Delta dhA</i> <i>alsS, ilvC, ilvE, ilvD, lrp</i> y <i>ygaZH</i>	Lote alimentado (2 etapas)	84	Hao et al., 2020

1.2.8.3 Producción de 2-cetisovalerato

En la producción de 2-KIV se han encontrado tres estudios acerca de su sobreproducción usando glucosa como fuente de carbono en cultivos de *C. glutamicum* (Tabla 1.3). Sin embargo, es de mencionar que, aunque no hay trabajos en *E. coli* para la generación de 2-KIV como producto final, si existen varios estudios acerca de la producción de alcoholes y otros metabolitos que tienen como precursor el 2-KIV. En ellos se evidencia que la delección de genes es primordial para el

aumento de producción de piruvato, mutando genes que intervienen en la biosíntesis de otros metabolitos como acetyl-CoA, ácido láctico, ácido acético, entre otros, que aprovecha moléculas de piruvato (Hao et al., 2020; Novak et al., 2020).

Tabla 1.3

Microorganismos usados en la sobreproducción de 2-KIV

Cepa	Mutaciones (Δ) y sobreexpresión de genes	Tipo de Fermentación	2-KIV (g/L)	Referencia
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	$\Delta aceE$, Δpqo , $\Delta ilvE$ <i>ilvB</i> , <i>ilvN</i> , <i>ilvC</i> , <i>ilvD</i>	Lote alimentado	25.56	(Krause et al., 2010)
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	$\Delta aceE$, Δpqo , $\Delta ilvE$; Δpqo , Δppc , $\Delta ilvE$ <i>ilvB</i> , <i>ilvN</i> , <i>ilvC</i> , <i>ilvD</i>	Lote alimentado	35.00	(Buchholz et al., 2013)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$\Delta budA$, $\Delta ldhA$, $\Delta budA$ - <i>ldhA</i> , $\Delta budA$ - <i>ldhA</i> - <i>udB</i> <i>kivd</i>	Lote	17.40	(Gu et al., 2017)

En *C. glutamicum* se ha redireccionado el flujo de carbono delecionando las reacciones de producción de L-valina (gen *ilvE*) por su competencia directa y primordial en el consumo de 2-KIV. Otra estrategia de redireccionamiento de los flujos de carbono es el incremento de la disponibilidad de piruvato, por ende, la delección de genes como *aceE*, *pqo* y *ppc* fue realizada en este microorganismo, para luego sobre expresar los genes de producción de aminoácidos de cadena ramificadas (*ilvBNCD*) (Buchholz et al., 2013; Krause et al., 2010).

En *K. pneumoniae* se ha realizado la delección de los genes *budA*, *ldhA* y *udB* con el fin también de incrementar el flujo de carbono hacia piruvato y 2-KIV, ya que este último es precursor para la obtención de isobutanol, evaluando así la sobreexpresión de descarboxilasas en este microorganismo (Gu et al., 2017).

1.3 Planteamiento del problema y justificación

Tanto a nivel global como local, se ha dado prioridad al aprovechamiento de subproductos como materia prima, buscando obtener productos de valor agregado que disminuyan costos de producción y mitiguen el impacto ambiental (Comité-Nacional-De-Paro, 2019; MinAmbiente, 2010; Naciones-Unidas, 2015)

La producción industrial genera residuos de forma permanente, cuyo nivel de contaminación dependerá de la tecnología invertida para el proceso y para disponer de esos residuos generados (Soliman & Moustafa, 2020). Así, en el contexto de la economía circular y verde (Gregorio et al., 2018), los residuos deberán ser tratados para darles valor agregado o para desecharlos al medio ambiente, buscando reducir su impacto (Usmani et al., 2021).

La explotación láctea es una de las industrias de mayor inversión en investigación y tecnología (Feil et al., 2020), que tienen un papel importante en la economía (Ahmad et al., 2019). Uno de sus principales residuos es el lactosuero (Talbot-Walsh et al., 2018), el cual es equivalente al 90% de la leche empleada en la producción de queso (R. Sharma, 2019). En el mundo se producen 190 billones de kg lactosuero/año, donde el 30% es aprovechado y el resto es vertido a ríos, lagos, acuíferos y subsuelo (Asunis et al., 2020; Sebastián-Nicolás et al., 2020). Dado los volúmenes que se producen de lactosuero, aún se requiere seguir investigando para mitigar la contaminación que produce su vertimiento (Asunis et al., 2020; Królczyk & Janiszewska-Turak, 2016; Sebastián-Nicolás et al., 2020).

Hay que detallar que en muchas regiones de Colombia no hay un desarrollo que permita el aprovechamiento del lactosuero, siendo este subproducto utilizado como aditivo de alimentos en algunos casos (MINPROTECCIÓN, 2007) y aunque es prohibida su utilización en la adulteración de leche (MINAGRICULTURA & MINPROTECCIÓN, 2006), se han encontrado casos en que el lactosuero es usado para revertirlo o venderlo como leche fresca (Colombia-Productiva & MINCOMERCIO, 2020). La falta de alternativas hace que este tipo de empresas no den valor agregado al lactosuero, lo que provoca su vertimientos directos a suelos y ríos (Colombia-Productiva & MINCOMERCIO, 2020; Prazeres et al., 2012). Esto representa un problema ambiental importante debido a la alta demanda química y bioquímica de oxígeno, que dependiendo

del tipo de suero, puede superar los 40.000 y 30.000 mg O₂/L, respectivamente (Menchik et al., 2019).

El lactosuero cuenta con el 55% de los nutrientes de la leche, alta concentración de lactosa (45-52 g/L aprox.), proteínas (6-10 g/L), minerales y vitaminas, entre otros (Önür et al., 2020; Singh & Geetanjali, 2016). Todas estas características lo hacen una materia prima altamente demandada por la industria de alimentos (Soukoulis et al., 2019), también en la obtención de suplementos proteicos y energéticos (Fassina et al., 2019) y en la generación de microencapsulados de bio-compuestos (Rojas et al., 2020). Sin embargo, la lactosa, como principal compuesto del lactosuero, presenta limitaciones comerciales, debido a que aproximadamente el 70 % de la población mundial es intolerante a este azúcar (B.N.F., 2013; Bayless et al., 2017; Forsgård, 2019). No obstante, en la última década se ha venido encontrando aplicación a este residuo como potencial materia prima para la producción de diversos productos, mediante procesos de fermentación (Zotta et al., 2020).

Es así como entre otros residuos agrícolas y agroindustriales, el suero lácteo ha sido utilizado en procesos de fermentación microbiana con el fin de disminuir los costos de producción, mediante la sustitución de materias primas tradicionales como la glucosa (Singh et al., 2021). En tal sentido, se ha utilizado lactosuero con cepas mejoradas genéticamente, para obtener productos tales como: ácidos orgánicos (Catone et al., 2021; Ngome et al., 2021), bacteriocinas (Pandey et al., 2019; A. Sharma et al., 2021), biopolímeros (Li et al., 2020; D. Wang et al., 2020), biogas (Ramos et al., 2019; Rao & Basak, 2021) y bioalcoholes (Kallarakkal et al., 2021; Novak et al., 2020). Con respecto a la producción de biocombustibles, se ha logrado la optimización en la biosíntesis de un precursor importante como el 2-KIV usando glucosa como fuente de carbono (Buchholz et al., 2013; Gu et al., 2017). La importancia de 2-KIV prevalece en la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) como L-valina, entre otras moléculas como pantotenato, coenzima A y glucosinolato, importantes en el metabolismo bacteriano de *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Klebsiella pneumoniae*, entre otros (Buchholz et al., 2013; Gu et al., 2017; Noda et al., 2019). La L-valina, es de gran interés en las industrias farmacéutica (Kawaguchi et al., 2011), alimentaria y de piensos (Karau y Grayson, 2014).

Por otro lado, la generación de bacterias sobreproductoras a través de técnicas de biología de sistemas e ingeniería metabólica es un auge en los últimos tiempos (Dien, 2016). Estas técnicas han utilizado como caballo de batalla a *E. coli* por poseer óptimos crecimientos en diferentes sustratos, metabolizar compuestos bajo estrés de pH y temperaturas, en comparación con otros microorganismos (Yang et al., 2020). Estas técnicas tienen por objetivo la mejora de las propiedades celulares, los rendimientos y las productividades de productos de interés (Dien, 2016; Katz et al., 2018) y han sido herramientas valiosas para la generación de alternativas de uso de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, provenientes de residuos agroindustriales (Wendisch, 2020).

Por las razones antes expuestas, esta investigación se orientó hacia la evaluación del lactosuero como fuente de carbono para obtener L-valina; entender el efecto que tienen diferentes fuentes de carbono sobre el metabolismo de *E. coli*, empleando análisis de balances de flujos metabólicos para mejorar genéticamente el microorganismo mediante técnicas de biología sintética de vanguardia y así optimizar la producción de L-valina.

1.4 Hipótesis

El lactosuero sirve como fuente de carbono alterna a glucosa en fermentaciones en las cuales se emplea cepas de *E. coli* sobre productoras de L-valina y es posible hacer modificaciones genéticas para incrementar los rendimientos del producto con respecto al sustrato.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivos generales

Estudio del efecto de la fuente de carbono sobre la producción de L-valina empleando *E. coli* mediante fermentaciones, análisis de flujos metabólicos y la construcción de plataformas por biología sintética.

1.5.2 Objetivos específicos

- Establecer los parámetros cinéticos de *E. coli* en fermentación por lote, evaluando diferentes fuentes de carbono, glucosa y lactosa.
- Evaluar análisis de flujos metabólicos para entender el efecto que tiene sobre la producción de L-valina el empleo de diferentes fuentes de carbono, glucosa y lactosa.
- Construir una plataforma de *E. coli* para maximizar la producción de 2-cetoisovalerato como precursor de L-valina.

1.6 Metodología

1.6.1 Cepas y reactivos

En la Tabla 1.4 se muestran las diferentes cepas de *E. coli* que se usaron, adquiridas desde colecciones certificadas y reconstruidas durante el desarrollo de este trabajo.

El polvo de lactosuero secado por aspersión que contenía 88 % de lactosa y 12 % de proteína p/p y el antiespumante de silicona, se adquirieron de Cimpa S.A.S. (Bogotá, Colombia) y Protokimica S.A.S. (Medellín, Colombia), respectivamente. Todos los demás reactivos utilizados fueron los siguientes: monohidrato de glucosa y ácido fórmico (Merck Millipore, Alemania), cloruro de sodio (NaCl) (VWR International, EE. UU.), monohidrato de lactosa, fosfato disódico anhidro (Na₂HPO₄), fosfato dibásico de potasio (KH₂PO₄), cloruro de amonio (NH₄Cl), sulfato de hierro (II) heptahidratado (FeSO₄*7H₂O), cloruro de manganeso (II) tetrahidratado (MnCl₂*4H₂O), cloruro de cobalto (II) hexahidratado (CoCl₂*6H₂O), cloruro de calcio dihidratado (CaCl₂*2H₂O), sulfato cobre (II) pentahidratado (CuSO₄*5H₂O), sulfato de zinc heptahidratado (ZnSO₄*7H₂O), ácido clorhídrico fumante (HCl) al 37%, 2-KIV y caldo de lisogenia (LB), todos de Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Alemania) y ácido acético de Carlos Erba (Carlos Erba, Brasil).

Tabla 1.4

Cepas utilizadas en este trabajo

Cepa	Genotipo	Recurso
<i>E. coli</i> 13005	ATCC 13005 (CECT 877), cepa patentada que fue modificada genéticamente a través de tratamientos ultravioletas para producir L-valina	(Huang, 1961)
<i>E. coli</i> DH5α	Anfitriona de clonación, “High Efficiency”	BioLabs Inc.
<i>E. coli</i> W	Tipo silvestre (WT) - (ATCC 9637)	www.atcc.org
WT Δ <i>mdh-aceF</i>	<i>E. coli</i> W, Δ <i>mdh-aceF</i>	Modificada en este estudio
<i>E. coli</i> W1288	<i>E. coli</i> W, Δ <i>mdh-aceF</i> , pSEVA681	Modificada en este estudio
<i>E. coli</i> W1294	<i>E. coli</i> W, pSEVA681-kiv	Modificada en este estudio
<i>E. coli</i> W1262	<i>E. coli</i> W, Δ <i>mdh-aceF</i> , pSEVA681-kiv	Modificada en este estudio

Nota. ATCC: American Type Culture Collection, CECT: Colección Española de Cultivos Tipo, Δ : Delección, pSeva: tipo de vector.

1.6.2 Medios de cultivo

Se preparó una solución madre de lactosuero desproteínizado reconstituyendo 80 g de lactosuero en polvo a un volumen final de 100 mL de agua destilada, esterilizando en autoclave a 112 °C. Posteriormente, esta solución se centrifugó a 5500 rpm durante 20 min a 18 °C para eliminar la proteína precipitada (Hausjell et al., 2019).

El medio de cultivo empleado que contiene lactosa de lactosuero se preparó a partir de una solución madre en concentración de 10 % (p/v) de lactosa de lactosuero. Para la preparación de los medios de cultivo, se utilizó como referente un medio mínimo M9, al cual se le modificó la fuente de carbono (glucosa por lactosa o lactosuero), mientras que los demás componentes del medio se mantuvieron constantes. Las cantidades empleadas (g/L) de solución fueron: 6.78 g Na₂HPO₄, 3.00 g KH₂PO₄, 0.50 g NaCl, 1.00 g NH₄Cl y 1 mL de solución de metales trazas. La solución de metales trazas estaba conformada por litro de solución de HCl 1 N: 2.78 mg FeSO₄*7H₂O, 1.98 mg MnCl₂*4H₂O, 2.38 mg CoCl₂*6H₂O, 1.47 mg CaCl₂*2H₂O, 0.25 mg CuSO₄*5H₂O, 0.29 mgZnSO₄*7H₂O.

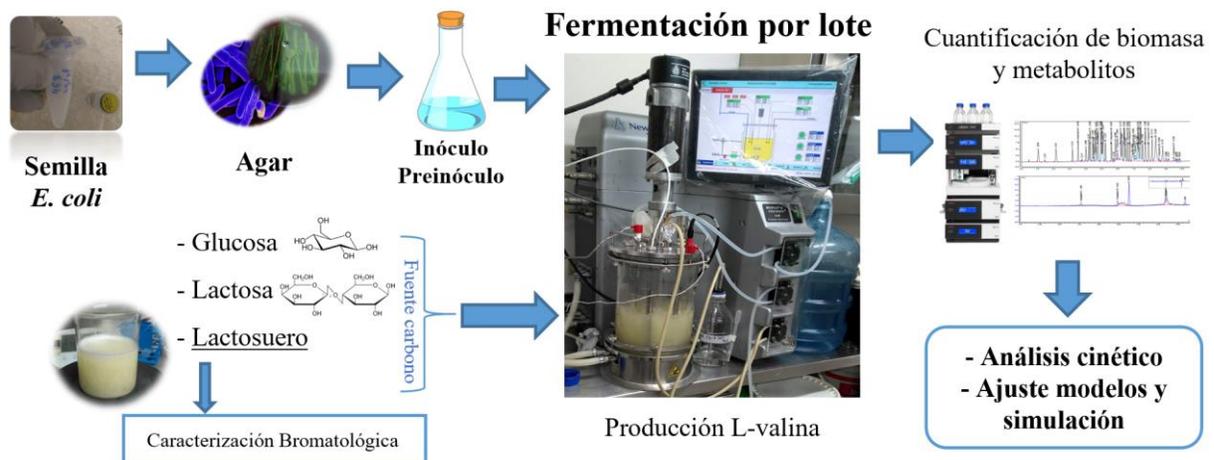
Todos los medios y soluciones se esterilizaron a 121 °C durante 15 min antes de su uso, excepto los metales trazas.

1.6.3 Condiciones de cultivo

Todas las cepas se activaron en agar de caldo de Lisogenia (LB) y agar Levine's Eosin Methylene Blue (EMB) para confirmación a 37 °C durante 24 h. Las cepas se inocularon en caldo nutritivo o caldo LB (cultivo semilla) y luego se incubaron 15 h aproximadamente a 37 °C a 250 rpm en un shaker MaxQ 4000 (Thermo Scientific, U.S.A). Los cultivos semillas se centrifugaron (5200 g) y se lavaron con NaCl (0.85 % p/v), para ser inoculados en medio de cultivo (preinóculo) a 37 °C y 250 rpm durante 24 h. El preinóculo se lavó con NaCl y se transfirió a un matraz con medio de fermentación, incubándose a 37 °C con agitación a 250 rpm durante 24 h a una densidad óptica (OD₆₀₀) de 0.1 (Ver figura 1.7).

Figura 1.6

Descripción del procedimiento para las fermentaciones



Las fermentaciones en biorreactor de 7.5 L (New Brunswick Scientific, Eppendorf, U.S.A) se realizaron a 37 °C con control de pH a 6.9, ajustado con NaOH (2 M). La aireación se realizó logrando mantener el nivel de oxígeno disuelto al 20 % de saturación por modificación de la velocidad de agitación entre 300 y 600 rpm durante 24 h (Shimizu et al., 1995; Wanga et al., 2014).

1.6.4 Técnicas analíticas

El crecimiento bacteriano se determinó por densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) utilizando un espectrofotómetro Ubet-30 (Jasco, Japan). Los valores de OD_{600} medidos se correlacionaron con el peso seco de la célula por litro (g DCW/L) mediante las siguientes relaciones: para *E. coli* 13005: (g DCW/L) = $(OD_{600} + 0.161)/1.51$ (determinada en este trabajo doctoral mediante la relación de OD_{600} y peso de célula seca); para *E. coli* W: (g DCW/L) = $OD_{600} \times 0.452$, relación hallada en literatura (Erian et al., 2018).

La concentración de azúcar (glucosa o lactosa) en los medios de fermentación se cuantificó mediante un espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, EE. UU.) utilizando el método DNS (Carranza-Saavedra et al., 2021; Miller, 1959). Además se empleó para la cuantificación de azúcares y de ácidos orgánicos (ácido acético y fórmico) un sistema de HPLC Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, USA) (Zaky et al., 2017).

Las concentraciones de L-valina y 2-KIV se determinaron por un sistema HPLC Thermo Ultimate 3000 (Thermo Scientific, EE. UU.) cuya cuantificación se llevó a cabo siguiendo la metodología de Cigić et al. (Cigić et al., 2008) para el caso de aminoácidos. Para la cuantificación de 2-KIV, se utilizó una columna Zorbax Bonus-RP 4.6x250 mm (Agilent Technologies, EE. UU.) y su determinación se llevó a cabo siguiendo la metodología de Kerem et al. (Kerem et al., 2004).

1.6.5 Modelos cinéticos

La tasa de crecimiento específica (μ) se calculó mediante la regresión lineal del logaritmo natural de concentración celular (g DCW/L) y tiempo (Ecuación 1.7). El cálculo de los rendimientos (Ecuación 1.20) de sustrato en biomasa ($Y_{X/S}$), biomasa en el producto ($Y_{P/X}$) y sustrato en el producto ($Y_{P/S}$), se realizó mediante regresión lineal de concentración de biomasa seca, de glucosa y producto, respectivamente. Los valores se tomaron desde los obtenidos en la fase exponencial hasta el tiempo final del proceso cuando se alcanzó el valor más alto del producto (Carranza-Saavedra et al., 2021; Long et al., 2017).

$$\ln X = \ln X_0 + \mu \cdot t \quad (1.7)$$

$$Y_{X/S} = \frac{dX}{dS} ; Y_{P/X} = \frac{dP}{dX} ; Y_{P/S} = \frac{dP}{dS} \quad (1.20)$$

La descripción del comportamiento celular se hace mediante las ecuaciones 1.21 y 1.22, siendo esta última el denominado modelo de Contois, donde la velocidad específica de crecimiento es inversamente proporcional a la biomasa (Öktem, 2019).

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (1.21)$$

$$\mu = \mu_{max} \cdot \left(\frac{S}{K_s \cdot X + S} \right) \quad (1.22)$$

Para describir el comportamiento del sustrato, se estableció un balance de conservación de masa (glucosa o lactosa) donde la velocidad de consumo de S se representa como una función directa de la velocidad de crecimiento microbiano e inversa al rendimiento de biomasa en sustrato ($Y_{X/S}$) (Ecuación 1.23) (Zhang et al., 2018).

$$\frac{dS}{dt} = - \left(\frac{1}{Y_{X/S}} \right) \cdot \frac{dX}{dt} \quad (1.23)$$

La producción de L-valina se describió con 2 modelos diferentes, uno basado en el balance de conservación de masa del producto (Ecuación 1.24) (Sánchez et al., 2012) y otro basado en el modelo cinético propuesto por Luedeking-Piret (Ecuación 1.25) (Zhang et al., 2018), en ambos casos se representa como una función aditiva de la velocidad de crecimiento microbiano y la concentración de biomasa, es decir, se representa como un metabolito producido con un aporte del metabolismo primario y un aporte del metabolismo secundario.

$$\frac{dP}{dt} = \left(\frac{1}{Y_{XP}} \right) \cdot \frac{dX}{dt} - \beta \cdot X \quad (1.24)$$

$$\frac{dP}{dt} = \left(\alpha \cdot \frac{dX}{dt} \right) - \beta \cdot X \quad (1.25)$$

Donde P es la concentración de L-valina (g/L); α es un parámetro de formación de producto asociado al crecimiento celular (g L-valina/g DCW); y β es un parámetro de formación de producto sin asociación con el crecimiento celular (g L-valina/g DCW.h). El cual puede cambiar de signo, (+) si se está formando producto o (-) si se está consumiendo. Si la tasa de formación de producto depende únicamente de la tasa de crecimiento de la biomasa y no de la biomasa como tal, $\beta=0$ (Aktypis et al., 2007; Vázquez & Murado, 2008).

1.6.5.1 Estimación de parámetros cinéticos

La estimación de los parámetros cinéticos de los modelos propuestos y la solución numérica de las ecuaciones diferenciales (1.21-1.25), se realizaron simultáneamente empleando la función de optimización “fmincon” de MATLAB R2016a (MathWorks, EE. UU.). Se realizaron en dos bloques, uno con las ecuaciones (1.21, 1.22, 1.23 y 1.24) y otro con las mismas ecuaciones, pero en lugar de la ecuación 1.24 se empleó la ecuación 1.25; esto se hizo con el fin de establecer cual modelo representa mejor la formación de producto, entre ambas ecuaciones. Los modelos fueron resueltos simultáneamente por ODE45 de MATLAB R2016a Fórmula explícita de Runge-Kutta con análisis de dispersión de residuos.

1.6.5.2 Análisis estadístico

Todos los experimentos en matraces de agitación se realizaron por triplicado o duplicado y los datos obtenidos se expresaron como la media \pm error estándar. Los parámetros cinéticos obtenidos a partir de los resultados experimentales se analizaron entre sí, mediante comparación múltiple de Duncan (Duncan, 1955) con un nivel de confianza del 95 %, con la intención de determinar si existían diferencias significativas o no entre los valores obtenidos en los diferentes medios de cultivo, al emplear diferente fuente de carbono.

Se usaron expresiones matemáticas para el coeficiente de determinación (R^2) (Ecuación 1.26) y el error cuadrático medio (MSE) (Ecuación 1.27) para testear la desviación de los datos experimentales obtenidos con respecto a los datos de las simulaciones (Zhang et al., 2018).

- Coeficiente de determinación (R^2)

$$R^2 = 1 - \frac{\sum(y_i - f_i)^2}{\sum(y_i - \bar{y})^2} \quad (1.26)$$

- Error cuadrático medio MSE

$$MSEj = \frac{\sum_{i=1}^{NT}(y_i - f_i)^2}{n_t} \quad (1.27)$$

Donde f_i , y_i , \bar{y} , y n_t representa: la predicción del modelo, el dato experimental, el promedio de los datos experimentales, y el número de datos experimentales, respectivamente.

1.6.6 Modelamiento metabólico *in silico*

1.6.6.1 Determinación de flujos metabólicos

Los flujos metabólicos extracelulares de consumo de sustrato y producción de L-valina como de ácidos orgánicos se calcularon mediante la tasa de síntesis específica o consumo de metabolitos por unidad de biomasa (Ecuación 1.29) durante la fase de crecimiento exponencial en lote (Varma & Palsson, 1994). Se tiene en cuenta la fase exponencial, ya que en esta etapa de máxima velocidad de crecimiento, éste es constante al igual que los rendimientos.

$$r_i = \frac{1}{x} \frac{dC_i}{dt} \quad (1.29)$$

Donde r_i es la tasa de síntesis específica o de consumo de metabolitos (mmol i/g DCW.h), X es la concentración de biomasa (g DCW/L) y C_i es la concentración de metabolitos (mmol metabolito i/L).

1.6.6.2 Identificación de mapas metabólicos de *E. coli* W para la producción de L-valina

La identificación, construcción y análisis de mapas metabólicos de *E. coli* W fueron realizadas mediante una revisión bibliográfica exhaustiva, apoyados en las bases de datos bioinformáticas que se muestran en la Tabla 1.5. Lo que permitió no sólo conocer las reacciones metabólicas involucradas en los análisis de flux metabólicos, sino también los genes y reacciones indicados para los debidos procesos de ingeniería genética a realizar (diseño óptimo de oligonucleótidos, plásmidos y cassetes de ADN) y tener la certeza de las modificaciones y sobre expresión de genes adecuadas en el microorganismo.

Tabla 1.5

Base de datos consultada para la obtención de información de reacciones y genes

Base de datos	Página web
UniProt	http://uniprot.org
BiGG Models	http://bigg.ucsd.edu
BioCyc	http://biocyc.org/
BioMet ToolBox 2.0	http://biomet-toolbox.chalmers.se/
Blast	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Brenda	http://brenda-enzymes.org/
EcoCyc	http://ecocyc.org/
Ecoliwiki	https://ecoliwiki.org
GeneOntology	http://geneontology.org/
Kegg	http://genome.jp/kegg/
MicrobesOnline	http://microbesonline.org/
NCBI	http://ncbi.nlm.nih.gov/
Smart	http://smart.embl-heidelberg.de/
String	http://string-db.org
TCDB	http://tcdb.org/
PubChem	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov
TransportDB	http://membranetransport.org/index.html

Seguida de la propuesta de una ruta bioquímica de biosíntesis de L-valina en *E. coli*, para lo cual se tuvo en cuenta los reportes de trabajos realizados acerca de la biosíntesis de aminoácidos (AA) de la familia de cadena ramificada y la información existente de ruta metabólica para *E. coli* (Amorim Franco & Blanchard, 2017; Hao et al., 2020; X. Hou et al., 2012; S. Y. Lee & Kim, 2015; Park et al., 2007; Park, Jang, et al., 2011; Pospíšil et al., 1999). Paralelamente se obtuvo información de los modelos encontrados en *E. coli* W para la identificación, entendimiento y análisis de las rutas metabólicas en la producción de L-valina ajustada para las diferentes fuentes de carbono.

1.6.6.3 Modelamiento *in silico* de flujos metabólicos

Para el análisis *in silico* se utilizó el modelo MODEL1507180010 (iCA_1273) de la base de datos BioModels (<https://www.ebi.ac.uk/biomodels/>), que representa un modelo metabólico a escala genómica de *E. coli* W, modelo que cuenta con 2.477 reacciones y 1.111 metabolitos, codificados por 1.273 genes. Este modelo ha sido validado mediante la secuenciación genómica completa del microorganismo (Archer et al., 2011). Se ajustó de acuerdo a la fuente de carbono utilizada, y se incluyó en el modelo el flujo extracelular para la producción de 2-KIV, dejándolo en 2480 reacciones.

Para los capítulos 4 y 5 se describirán en detalle las restricciones y análisis *in silico* realizado, sin embargo, aquí se mostrarán el fundamento de cada análisis de flujo metabólico. El análisis *in silico* se realizó en MATLAB R2018a con COBRA Toolbox v.3.0 y solucionador Gurobi (versión 9.5.1). Para los análisis *in silico* de la distribución de flujo metabólico, validación de modelo metabólico y efecto del uso de las diferentes fuentes de carbono, se aplicaron metodologías como: FBA (Heirendt et al., 2019), maximización del rendimiento de ATP por sustrato (Toro et al., 2018), análisis de variabilidad de flujo (FVA), análisis de robustez (Immanuel et al., 2018), estudio de reacciones esenciales (FBA parsimonioso) (Anand et al., 2020; Schellenberger et al., 2011), y muestreo de Monte Carlo (Heirendt et al., 2019), los cuales metodológicamente y matemáticamente se representan de la siguiente manera:

- FBA:

$$\text{Max } Z = f(v_j)$$

Sujeto a: $S * v = 0$

$$V_{j\text{m\u00e1s_bajo}} \leq v_j \leq V_{j\text{m\u00e1s_alto}}; v_j = v_{\text{exp}}$$

D\u00f3nde Z es la funci\u00f3n objetivo de los flujos metab\u00f3licos. Las restricciones est\u00e1n compuestas por la ecuaci\u00f3n b\u00e1sica del modelado estequiom\u00e9trico, restricciones de desigualdad obtenidas de la irreversibilidad de las reacciones metab\u00f3licas (j), informaci\u00f3n sobre las tasas de flujos (v_j) m\u00ednimas y m\u00e1ximas ($V_{\text{m\u00e1s_bajo}}$, $V_{\text{m\u00e1s_alto}}$) y restricciones de igualdad que se utilizan para introducir datos de entrada en el modelo, es decir, para indicar algunos flujos metab\u00f3licos (v_{exp}), representando tanto las condiciones ambientales (producci\u00f3n de 2-KIV y L-valina) como las de crecimiento.

- Maximizaci\u00f3n del rendimiento de ATP por mol sustrato:

Se calcul\u00f3 utilizando FBA siguiendo metodolog\u00edas *in silico* para la maximizaci\u00f3n de rendimiento por en diferentes tipos de medios (Schuetz et al., 2007; Toro et al., 2018). La metodolog\u00eda empleada responde tambi\u00e9n a la optimizaci\u00f3n del desempe\u00f1o energ\u00e9tico, donde la c\u00e9lula busca que se reduzca el n\u00famero de reacciones oxidativas para conservar su energ\u00eda o utilizar esa energ\u00eda de manera m\u00e1s eficiente; por lo que se realiz\u00f3 tambi\u00e9n el rendimiento de cofactores de NADH y NADPH. Este m\u00e9todo est\u00e1 regido por las siguientes caracter\u00edsticas:

Maximizar: Z (ATP, NADH o NADPH)

Definici\u00f3n matem\u00e1tica:
$$\text{m\u00e1x } \frac{v_{\text{cofactor}}}{\sum v_{\text{sustrato}}}$$

D\u00f3nde v_{cofactor} son los flujos hallados en la soluci\u00f3n de la maximizaci\u00f3n por FBA y v_{sustrato} es el flujo de consumo de sustrato como restricci\u00f3n.

- FVA:

Se llevaron a cabo utilizando la función fastFVA() con optimizador CPLEX (versión 12.9.0) (Armingol et al., 2018; Schellenberger et al., 2011).

Maximizar: Z

Sujeto a: $\mathbf{S} * \mathbf{v} = 0$

$$V_{j\text{m}\acute{a}s_bajo} \leq v_j \leq V_{j\text{m}\acute{a}s_alto}$$

Maximizar v_j

Sujeto a: $\mathbf{S} * \mathbf{v} = 0$

$$V_{j\text{m}\acute{a}s_bajo} \leq v_j \leq V_{j\text{m}\acute{a}s_alto}$$

- Análisis de Robustez:

El análisis de robustez se aplica para estimar y visualizar cómo los cambios en la concentración de un parámetro ambiental (tasa de cambio) o una reacción interna afectan la función objetivo.

Maximizar Z

Sujeto a: $k = 1, \dots, I$

$$\mathbf{S} * \mathbf{v} = 0$$

$$v_j = v_{j,min} + \frac{k-1}{I-1} * (v_{j,max} - v_{j,min})$$

$$v_{i,min} \leq v_i \leq v_{i,max}, i = 1, \dots, n, i \neq j$$

Dónde: v_j flujo variado entre dos valores ($v_{j,min}$ y $v_{j,max}$) resueltos en problemas de optimización lineal (I).

- FBA parsimonioso (pFBA):

pFBA es un método utilizado para clasificar genes en función del uso de vías específicas de la condición predicha *in silico*. Utiliza una optimización de dos niveles en la que la tasa de

crecimiento (biomasa) utilizando FBA, seguida de la minimización del flujo de todas las reacciones asociadas a los genes (Lewis et al., 2010).

$$\min \sum_{j=1}^m v_{irrev,j}$$

$$\text{Maximización } v_{biomasa} = v_{biomasa,lb}$$

$$\begin{aligned} \text{Sujeto a: } \quad & \mathbf{S}_{irrev} * \mathbf{v}_{irrev} = 0 \\ & 0 \leq v_{irrev} \leq v_{max} \end{aligned}$$

Dónde: \mathbf{S}_{irrev} : en la que todas las reacciones reversibles se dividen en dos reacciones irreversibles, \mathbf{v}_{irrev} : Cada reacción está obligada a llevar un flujo de estado estacionario no negativo, m es el número de reacciones irreversibles asociadas a genes en la red, $v_{biomass}$ se aproxima a la tasa de crecimiento y $v_{biomass,lb}$ es el límite inferior de la tasa de biomasa.

- Muestreo Monte Carlo:

El método de muestreo de Monte Carlo es una técnica matemática que se utiliza para estimar los posibles resultados de un evento incierto. Crea un modelo de posibles resultados aprovechando una distribución de probabilidades, como una distribución uniforme o normal, para cualquier variable que tenga una incertidumbre inherente. Posteriormente, vuelve a calcular los resultados una y otra vez, cada vez utilizando un conjunto diferente de números aleatorios entre los valores mínimo y máximo. El algoritmo explora el espacio multidimensional de las elasticidades de concentración, es decir, la fuerza de las reacciones enzimáticas hacia las concentraciones de los reactivos y el espacio multidimensional de los pesos relativos entre las concentraciones de metabolitos independientes y dependientes (L. Wang & Hatzimanikatis, 2006).

En este estudio fue llevado un muestreo de Monte Carlo, en el cual se utilizó por defecto las restricciones propias del modelo metabólico a usar, maximizando como función objetivo la producción de 2-KIV, por tanto, no fue necesario los flujos hallados experimentalmente. Los

conjuntos de restricciones que se utilizan para definir el espacio de solución de estado estacionario son las tasas de flujo mínimas (V_{jmin}) y máximas V_{jmax}) a través de cada una de las reacciones, donde el flujo, v_j , a través de cada reacción j , debe estar entre V_{jmin} y V_{jmax} para esa reacción. Estas restricciones de V_{jmax} y V_{jmin} segmentan el espacio nulo definido por $S * v = 0$ (Price et al., 2004).

Maximizar: Z

Sujeto a: $S * v = 0$

$$V_{jmin} \leq v_j \leq V_{jmax}$$

1.6.7 Modificaciones genéticas

La delección de genes se realizó mediante mutación cromosómica completa según la metodología de Kim et al. (2014). El plásmido pSLTS que contenía genes recombinantes lambda Red (*exo*, *bet* y *gam*) fue introducido mediante electroporación en *E. coli* W, así como los casetes pSEVA182_aceF_Arm1y2 y pSEVA182_mdh_Arm1y2 (Información detallada en capítulo 5).

1.6.8 Sobreexpresión de genes

Se construyó un sistema de expresión sintética a través de vectores SEVA 4.0 y el sistema de clonación modular basado en Golden Standar (Blázquez et al., 2022; Martínez-García et al., 2022), que permitió realizar un ensamblaje estandarizado de construcciones multigénicas. La estructura del plásmido pSEVA681-kiv se realizó con el sistema de expresión XylS/Pm, activado con 3-metil-benzoato (3MB) (Información detallada en capítulo 5).

1.6.9 Diseño experimental

Cada uno de los experimentos realizados, se llevaron a cabo mediante un diseño experimental completamente al azar, evaluados de la siguiente manera:

Fueron realizados cinéticas con *E. coli* 13005 para evaluar la producción de L-valina en diferentes sustratos. A una sola concentración (2 g/L) y 4 diferentes fuentes de carbono: glucosa, lactosa, lactosuero y lactosuero desproteinizado por triplicado, muestreando cada 3 horas durante 24 h, evaluando OD₆₀₀, consumo de fuente de carbono y producción de L-valina.

Se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento con *E. coli* W para la obtención de parámetros de flujos metabólicos, usando glucosa y lactosa puros como fuentes de carbono por duplicado a una concentración de 2 g/L, muestreando cada hora durante 13 h, y evaluando OD₆₀₀, consumo de fuente de carbono y producción de ácido acético y fórmico.

Para el análisis de azúcares en medios químicamente definidos y medios complejos, se realizaron cinéticas de crecimiento con *E. coli* W, evaluando OD₆₀₀ cada hora por 12 h utilizando glucosa, lactosa, galactosa, sacarosa, fructosa y maltosa como fuente de carbono, se realizaron por triplicado y con una concentración de 2 g/L. Con el fin de observar posibles crecimientos diáuxicos, fueron llevado a cabo una mezcla de todos los azúcares y mezcla de cada azúcar utilizado con glucosa en una proporción de 25:75 y 50:50 (glucosa:otro azúcar).

En las fermentaciones con diferentes cepas modificadas genéticamente (*E. coli* W1288, *E. coli* W1294 y *E. coli* W1262) y cepa control (*E. coli* W) se evaluaron la producción de 2-KIV y L-valina, en el cual se realizaron fermentaciones por triplicado usando glucosa, lactosa y lactosuero como fuentes de carbono a una concentración de 10 g/L, el muestreo se realizó cada 12 h por 24 h, cuantificando OD₆₀₀, consumo de fuente de carbono, producción de L-valina y producción de 2-KIV.

Capítulo 2. Análisis cinético y ajuste de modelos para la producción de L-valina en fermentación en lote de *Escherichia coli* usando glucosa, lactosa y suero como fuentes de carbono

2.1 Introducción

El desarrollo de modelos cinéticos es una herramienta útil para el diseño y escalado de biorreactores (Mears et al., 2017) como también, se podría establecer un análisis completo sobre el efecto de la fuente de carbono en la cinética de producción de L-valina usando *E. coli* modificada genéticamente con estas estrategias. Dado que el metabolismo para el crecimiento microbiano y la formación de productos es un proceso bioquímico complejo, el ajuste de datos experimentales a modelos cinéticos nos da una idea de lo que ocurre dentro de tal complejidad metabólica para comprender su comportamiento (Zhang et al., 2018).

El objetivo de este capítulo fue implementar modelos matemáticos que representen el crecimiento celular (Contois), el consumo de sustratos (glucosa, lactosa, suero y suero desproteínizado (DPW)) (Mass Conservation Balance) y la producción de L-valina (Mass Conservation Balance y Luedeking- Piret) para evaluar los efectos de las diferentes fuentes de carbono en el fenotipado y biosíntesis de L-valina. Todo esto anteriormente establecido fue realizado también, con el fin de cumplir con el objetivo específico: “Establecer los parámetros cinéticos de *E. coli* en fermentación por lote, evaluando diferentes fuentes de carbono, glucosa y lactosa”.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Cultivo y crecimiento de cepa

La cepa *E. coli* (CECT 877), la cual es una cepa no patógena, corresponde a la cepa ATCC® 13005™ obtenida de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Esta cepa patentada fue

modificada genéticamente mediante tratamientos ultravioleta para mejorar la producción de L-valina (Huang, 1961).

La activación de la cepa se realizó en caldo nutritivo a 37 °C durante 24 h. En microtubos estériles individuales (tubos de siembra), se mezclaron 500 µL de la solución de cepa activada con 500 µL de glicerol (99,7 %) y se almacenaron a -80 °C para uso futuro (Pasotti et al., 2017). Para garantizar la pureza del tubo de siembra, los cultivos se llevaron a cabo en agar Eosina Azul de Metileno de Levine (EMB, Merck) (P. Sharma & Melkania, 2017).

Suero en polvo (Cimpa S.A.S., Bogotá, Colombia) fue grado alimenticio, mientras que todos los demás reactivos utilizados fueron grado analítico. Los medios de producción (PM) con glucosa, lactosa o suero se prepararon a partir de polvo excepto DPW. Se preparó una solución madre de DPW suspendiendo 80 g de suero en polvo a un volumen final de 100 ml de agua destilada y esterilizando en autoclave la solución homogeneizada a 112 °C. Posteriormente, la solución se centrifugó a 5500 rpm durante 20 min a 18 °C para eliminar la proteína precipitada (Hausjell et al., 2019).

La fuente de carbono fue la única variable en los 4 diferentes medios de producción (PM) que se prepararon, conservando concentraciones de carbono equivalentes a 0.13 mol C/L. Los componentes comunes en 1 L de PM fueron 1.505 g de sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7 H_2O$) y 0.014 g de cloruro de calcio ($CaCl_2$). El contenido de fuente de carbono en los medios fue: PM1- 4 g de Glucosa, PM2- 3.8 g de Lactosa, PM3- 4.3 g de Suero y PM4- 5.4 mL de solución madre de DPW. Un volumen final de 1 L de solución salina (SS) contiene: 6 g de fosfato disódico (Na_2HPO_4), 3 g de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), 0.5 g de sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$) y 0.5 g de cloruro de sodio (NaCl) (W. Wu, 2013). La concentración final de DPW en PM se calculó a partir de la concentración inicial de lactosa en la solución madre de DPW preparada (70 % p/v). Todos los medios y soluciones se esterilizaron a 121 °C durante 15 min antes de su uso.

2.2.2 Cultivo por lote

Se inoculó una colonia de *E. coli* en agar EMB en 400 mL de caldo nutritivo, cultivándose a 37 °C y 250 rpm en un Agitador orbital MaxQ 4000 (Thermo Scientific, EE. UU.) durante 15-18 h (fase exponencial). Luego se añadió asépticamente a un biorreactor New Brunswick Scientific G628-011 de 7.5 L (Eppendorf, EE. UU.) que contenía 3.2 L de PM1, PM2, PM3 o PM4 y 400 mL de SS. Los volúmenes se ajustaron para que la concentración de inóculo fuera de 0.2 g de peso de células secas/L (g DCW/L) al comienzo de la fermentación. La fermentación en el biorreactor se realizó a 37 °C con control de pH a 6.9, ajustado con NaOH (2 M); el nivel de oxígeno disuelto se mantuvo aproximadamente al 20 % de saturación ajustando la velocidad de agitación entre 300 rpm y 600 rpm (Shimizu et al., 1995; Wanga et al., 2014) durante 24 h. El muestreo se realizó cada 3 h para medir la densidad óptica (OD) y el posterior análisis de azúcar (glucosa y lactosa) y L-valina después de la centrifugación a 10.000 rpm durante 9 min a 4 °C.

2.2.3 Técnicas analíticas

2.2.3.1 Caracterización del suero

Se realizó una caracterización bromatológica del lactosuero mediante los métodos AOAC (AOAC, 2000), determinando porcentaje de humedad (método 925.10), proteína (método 955.04), extracto etéreo (método 963.15) y minerales (método 941.12), por triplicado.

2.2.3.2 Cuantificación de biomasa

La cuantificación de la biomasa (X) se llevó a cabo mediante la medición de la OD a 600 nm (OD_{600}) con un espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis (Thermo Scientific, EE. UU.).

2.2.3.3 Cuantificación de sustrato

La concentración de azúcares (glucosa y lactosa) se cuantificó mediante técnicas espectrofotométricas utilizando el método DNS (Miller, 1959) con algunas modificaciones. Se mezclaron 0.1 mL de muestra con 0.2 mL de DNS y se incubaron a 95 °C durante 5 min. Luego de detener la reacción por impacto térmico, se agregó 1.5 mL de agua destilada y se atemperó por 5 min; Posteriormente, se midió la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis (Thermo Scientific, EE. UU.) (J. S. S. Yadav et al., 2013). Se utilizaron concentraciones de glucosa y lactosa en el intervalo 0.5 a 8 g/L para obtener una curva de calibración para cada tipo de azúcar.

2.2.3.4 Cuantificación de L-valina

La concentración de L-valina se determinó por HPLC siguiendo el método descrito por Cigić et al. (2008) con algunas modificaciones. Todas las muestras se filtraron cuidadosamente utilizando un filtro de jeringa de nitrato de celulosa de 0.2 µm antes de inyectarlas en la HPLC. Se utilizó una curva estándar de AA (0.5, 0.4, 0.3, 0.2 y 0.1 µmol/mL) para la cuantificación (estándar externo). Los análisis se realizaron en un sistema HPLC Thermo Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) equipado con una bomba cuaternaria, un inyector automático, un termostato de columna fijado a 40 °C y un detector de disposición de diodos con detección UV a 338 nm para la cuantificación de AA primarios prederivatizados *in situ* con ortoftalaldehído y ácido 3-marcaptopropiónico (OPA/3-MPA). La separación se realizó en una columna Zorbax Eclipse AAA-C18 4.6 x 75 mm (Agilent, EE. UU.), tamaño de partícula 3.5 µm, con precolumna Zorbax Eclipse AAA 4.6 x 12.5 mm (Agilent, EE. UU.), tamaño de partícula 5 µm.

2.2.4 Determinación de parámetros cinéticos

La Ecuación (1) se obtiene considerando un cultivo discontinuo y volumen constante, el cual presenta limitación por sustrato. Esta Ecuación describe el aumento de la concentración

celular. Al reorganizar los términos en la Ecuación 2.1 y aplicando una solución analítica, es posible obtener la tasa de crecimiento específica (μ) (Ecuación 2.2) siendo μ igual a la tasa de crecimiento específica máxima (μ_{max}) en fase exponencial. El cálculo de los rendimientos (Ecuación 2.3) de sustrato en biomasa ($Y_{X/S}$), biomasa en el producto ($Y_{P/X}$) y sustrato en el producto ($Y_{P/S}$) se realizó mediante la relación de concentración de biomasa seca producida, concentración de glucosa consumida y valores de concentración de producto total, respectivamente. Los valores fueron tomados de los obtenidos en la fase exponencial hasta el tiempo final del proceso cuando se alcanzó el mayor valor del producto (Long et al., 2017).

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (2.1)$$

$$\ln X = \ln X_0 + \mu \cdot t \quad (2.2)$$

$$\text{Rendimientos: } Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} ; Y_{P/X} = \frac{\Delta P}{\Delta X}; Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (2.3)$$

Donde X es la concentración de biomasa en peso celular seco por litro (g DCW/L), S es la concentración de sustrato (glucosa o lactosa, g/L) y μ es la tasa de crecimiento específica (h^{-1}).

2.2.5 Modelos cinéticos

2.2.5.1 Modelos de crecimiento celular

Los modelos cinéticos no estructurados, no segregados para crecimiento de biomasa consumo de sustrato y formación de producto evaluados se trabajaron en conjunto, ya que estos procesos ocurren de forma simultánea. Los modelos empleados para biomasa corresponden al presentado en la Ecuación 2.1 y Monod modificado (modelo Contois) como se describe en Ecuación 2.4 (Öktem, 2019).

$$\mu = \mu_{max} \cdot \left(\frac{S}{K_s \cdot X + S} \right) \quad (2.4)$$

Donde K_s es la constante de saturación de Monod, a la cual la velocidad de crecimiento es igual a la mitad de la velocidad de creciente máxima.

2.2.5.2 Modelo de consumo de sustrato

Se estableció un balance de conservación de masa de sustrato (glucosa, lactosa) basado en la biomasa en el rendimiento del sustrato (Y_{XS}), como se muestra en la Ecuación 2.5, considerando que el sustrato se usa solo para el crecimiento y es despreciable la cantidad usada para producto (P. Xu & Peng Xu, 2020; Zhang et al., 2018).

$$\frac{dS}{dt} = - \left(\frac{1}{Y_{XS}} \right) \cdot \frac{dX}{dt} \quad (2.5)$$

2.2.5.3 Modelo de formación de producto

La producción de L-valina se estudió con dos modelos diferentes, uno soportado en el balance de masa de producto (Ecuación 2.6) en función del rendimiento de biomasa con respecto al producto (Y_{XP}) (Sánchez et al., 2012) y otro soportado en el modelo cinético propuesto por Luedekin-Piret, que corresponde a la Ecuación 2.7 (Zhang et al., 2018).

$$\frac{dP}{dt} = \left(\frac{1}{Y_{XP}} \right) \cdot \frac{dX}{dt} - \beta \cdot X \quad (2.6)$$

$$\frac{dP}{dt} = \left(\alpha \cdot \frac{dX}{dt} \right) - \beta \cdot X \quad (2.7)$$

Donde, P es la concentración de L-valina (g/L), α es un parámetro de formación de producto asociado al crecimiento celular (g/g). β es un parámetro de formación de producto no asociado al crecimiento celular (g L-valina/g DCW.h) (Aktypis et al., 2007; Vázquez & Murado, 2008).

2.2.6 Estimación y validación de parámetros del modelo

Se utilizó un método no lineal de mínimos cuadrados para estimar los parámetros cinéticos de los modelos descritos en las ecuaciones 2.1, 2.4, 2.5, 2.6 y 2.7 por medio de la función de optimización “fmincon” de Matlab R2016a. Los modelos fueron resueltos simultáneamente por el método de Runge-Kutta utilizando la función ODE45 de Matlab R2016a. Las expresiones matemáticas de coeficiente de determinación (R^2) (Ecuación 2.8) y error cuadrático medio (MSE) (Ecuación 2.9), fueron usadas para evaluar la desviación de los datos experimentales con respecto a datos obtenidos en la simulación. Los valores obtenidos de los parámetros cinéticos a partir de resultados experimentales se analizaron por medio de comparación múltiple de Duncan (Duncan, 1955), con un nivel de confianza del 95%, con el fin de determinar la existencia de diferencias significativas entre los valores obtenidos entre los diferentes sustratos.

$$R^2 = 1 - \frac{\sum(y_i - f_i)^2}{\sum(y_i - \bar{y})^2} \quad (2.8)$$

$$MSE = \frac{\sum_{i=1}^{NT} (y_i - f_i)^2}{n_t} \quad (2.9)$$

Donde f_i , y_i , \bar{y} , y n_t son los datos del modelo, datos experimentales, media de los datos experimentales y número de datos experimentales respectivamente.

2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Caracterización bromatológica del suero

El análisis bromatológico del suero arrojó los siguientes valores de humedad, cenizas y grasa, respectivamente: 3.12 ± 0.00 % (p/p); 0.07 ± 0.00 % (p/p); y 1.46 ± 0.25 % (p/p). Es importante resaltar que el material utilizado presentó un alto contenido de lactosa (88.08 ± 1.93 %) y proteína (4.16 ± 0.12 %). Así, el medio de fermentación preparado a una concentración aproximada de 4.3 g

de suero/L contiene una concentración de proteína de alrededor de 0.18 g de proteína/L, siendo esta una fuente extra de nitrógeno para la fermentación.

2.3.2 Efecto de la fuente de carbono en el comportamiento cinético de *E. coli*

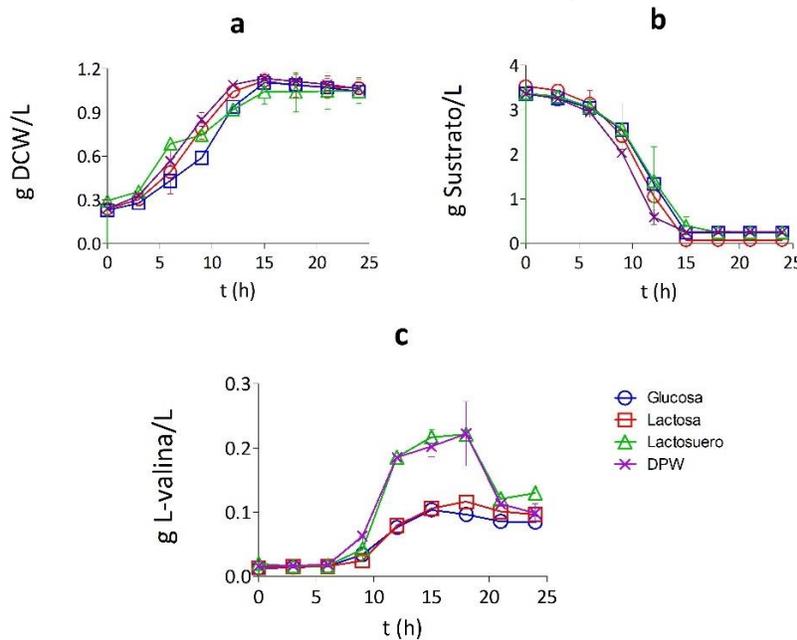
La Figura 2.1 muestra el comportamiento de la concentración de biomasa, sustrato y producto a lo largo del tiempo, durante la producción de L-valina por fermentación con *E. coli* utilizando cuatro fuentes de carbono diferentes. En ella se observa que la fuente de carbono tiene un marcado efecto sobre el comportamiento de estas variables en la biosíntesis de L-valina. La concentración máxima de biomasa fue de 1.1 g/L a las 15 h, sin existir diferencias significativas entre los sustratos. En todos los casos se observó un desfase entre 0 y 3 h (Figura 2.1a), seguido por un crecimiento diáuxico y mayor concentración de biomasa en el suero a las 6 h. Además, no hubo diferencias significativas al final del proceso (15 h) entre todas las fuentes de carbono para biomasa. Aunque se ha reportado que la glucosa es superior en comparación con otros sustratos (Aidelberg et al., 2014; Bren et al., 2016), tales diferencias no fueron del todo notorias en este caso. El tiempo para llegar a la fase estacionaria fue similar en todos los casos. Para DPW, se alcanzó aproximadamente a las 13 h, seguido de glucosa (14 h), lactosa y suero (15 h). El cultivo se mantuvo en esta fase estacionaria para observar la producción de L-valina en el tiempo, considerando que la generación de este AA está asociada al crecimiento celular. El proceso se detuvo cuando se agotó el sustrato y no hubo evidencia de un aumento en la biosíntesis del producto. Curiosamente, fue observado una disminución significativa en la concentración de L-valina al final de la curva de crecimiento cuando se utilizó el suero y DPW, probablemente debido a la absorción/re-asimilación de aminoácidos (Vázquez & Murado, 2008).

El cálculo de las tasas de consumo de sustratos para glucosa, lactosa y lactosa del suero se realizó entre las 9 y las 15 h, periodo en el que se produjo el mayor descenso, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$), obteniendo valores de 0.39, 0.38 y 0.36 g/L.h, para glucosa, lactosa y suero (lactosa), respectivamente (Figura 2.1b). Mientras que para DPW (lactosa), entre las 6 y las 12 h el cálculo de la tasa de consumo fue de 0.39 g/L.h, al igual que la glucosa. En el caso de la glucosa, el sistema alcanzó el estado de agotamiento, mientras, para la lactosa, el suero

(lactosa) y el DPW (lactosa) alcanzaron valores bajos sin agotarse. Se encontraron resultados similares en estudios donde se utilizaron otras fuentes de carbono no tradicionales en la industria (Zhang et al., 2018).

Figura 2.1

Cinética de fermentación por lote con E. coli para crecimiento de biomasa (a), consumo de sustrato (b) y formación de L-valina (c). Glucosa (o); lactosa (□); suero (lactosa) (Δ); suero desproteinizado (DPW) (lactosa) (x). Las barras verticales representan la desviación estándar



En la Figura 2.1c se presenta la biosíntesis de L-valina, que al contrastarla con la producción de biomasa (Figura 2.1a) indica que existe una biosíntesis del producto asociada al crecimiento en los cuatro sustratos probados, tal como se afirma en otros reportes (Sanjay et al., 2016). Se observan dos patrones diferentes significativos ($p < 0,05$), uno para fuentes de carbono individuales (glucosa y lactosa) y otro para suero (suero entero y DPW). Para todas las fuentes, excepto el suero, hay un aumento de L-valina para las fuentes individuales dentro de las primeras 18 horas, seguido de una leve reducción, mientras que para el suero hay un aumento significativo dentro de las primeras 12 horas, seguido de una reducción (12-18 h) y luego un descenso drástico (18-21 h). El suero alcanza producciones hasta un 36% superiores en concentración de L-valina respecto a fuentes individuales

de carbono (lactosa y glucosa) en el periodo comprendido entre las 15-18 h. Sin embargo, luego de 18 h de cultivo, se presenta una reducción en la concentración del producto, posiblemente por el proceso de absorción/re-asimilación (Vázquez & Murado, 2008) mencionado anteriormente, o también puede ocurrir por la formación de subproductos como L-alanina, L-glicina y α -cetoglutarato (Ternbach et al., 2005).

La determinación de los parámetros cinéticos se resume en la Tabla 2.1, en la que se presentan las μ_{\max} y los rendimientos, obtenidos con las Ecuaciones 2.2 y 2.3 respectivamente. Al analizar estos valores, se destaca que el suero (con crecimiento diáuxico) y el DPW fueron las fuentes de carbono con mayor μ_{\max} ($p < 0.05$) y que mostraron un mayor rendimiento respecto a los valores obtenidos para sustratos simples. Sin embargo, el rendimiento de sustrato en biomasa (Y_{XS}) para todas las fuentes de carbono estudiadas fueron similar de acuerdo con otros valores de rendimiento obtenidos para *E. coli* (Stiefelmaier et al., 2018). Al observar estos resultados, es posible establecer que el crecimiento microbiano se ve favorecido por todos estos sustratos utilizados como fuente de carbono.

Tabla 2.1

Parámetros cinéticos en la fermentación de E. coli con diferentes fuentes de carbono

Fuente de carbono	μ_{\max} (h ⁻¹)	P_{\max} (g/L)	(g L-val/L.h)	Y_{XS} (g/g)	Y_{PX} (g/g)	Y_{PS} (g/g)
Glucosa	0.149 ^b	0.104 ^b (15 h)	0.014 ^b	0.255 ^{ab}	0.103 ^b	0.026 ^b
Lactosa	0.103 ^c	0.117 ^b (18 h)	0.018 ^b	0.267 ^a	0.106 ^b	0.030 ^b
Suero	0.219 ^a (3-6 h)	0.197 ^a (15 h)	0.048 ^a	0.239 ^b	0.263 ^a	0.066 ^a
(Lactosa)	0.070 ^d (9-12 h)					
DPW	0.218 ^a	0.187 ^a (18 h)	0.041 ^a	0.273 ^a	0.209 ^a	0.060 ^a
(Lactosa)						

Nota. μ_{\max} : Tasa máxima de crecimiento; P_{\max} : Concentración máxima de L-valina obtenida; Y_{XS} : rendimiento de biomasa sobre sustrato (g DCW/g de sustrato (fuente de carbono)); Y_{PX} : rendimiento de producto sobre biomasa (g L-valina/g DCW); Y_{PS} : rendimiento de producto sobre sustrato (g L-valina/g de sustrato); Letras minúsculas similares en la misma columna indican que no hay diferencia estadística significativa entre tratamientos ($p < 0.05$).

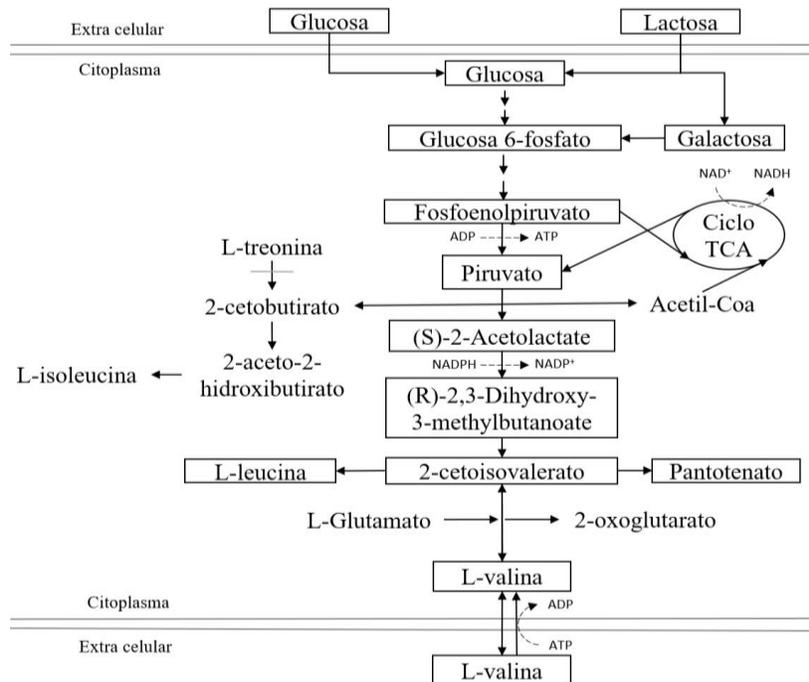
Los valores de concentración máxima del producto (P_{\max}) muestran un valor (indicado entre paréntesis) que se refiere a los diferentes tiempos en los que se alcanzó dicho máximo. Los máximos rendimientos y concentraciones de L-valina se obtuvieron para suero, indicándolos como materiales promisorios aptos para la biosíntesis de este aminoácido con *E. coli*, como se reporta en la biosíntesis de otros metabolitos de interés por medios fermentativos (Önür et al., 2020). Esto puede ocurrir por la cantidad de proteína soluble que poseen tanto el suero como el DPW, que a pesar de su desproteínización, puede contener algunos péptidos residuales (Mulcahy et al., 2017).

2.3.3 Análisis metabólico de la biosíntesis de L-valina

La ruta metabólica para la biosíntesis de L-valina se resume en la Figura 2.2, en la que se considera el tipo de fuente de carbono utilizada, ya sea glucosa o lactosa. Así, la lactosa se descompone en glucosa y galactosa, que se integran en la ruta metabólica como glucosa 6-fosfato para continuar en la glucólisis y su interacción con el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) a través del metabolito intermediario piruvato (Aidelberg et al., 2014). Al analizar este mapa simplificado del posible metabolismo del microorganismo utilizado en este estudio, se identifica la biosíntesis de L-valina. La desviación del flujo de carbono para la biosíntesis de otros aminoácidos como la treonina y la isoleucina es bien conocida (Oldiges et al., 2014), donde continúa hacia la biosíntesis de leucina, luego a la valina a través del consumo de glutamato, que es el aminoácido necesario para la producción de L-valina. También hay una clara desviación del flujo de carbono hacia la isoleucina desde el piruvato, que se ve favorecida por la presencia de treonina, un compuesto esencial para la cepa de *E. coli* utilizada para este trabajo (Huang, 1961). Con treonina presente, la ruta metabólica se ve favorecida para generar 2-acetolactato, que luego se dirige a la producción de 2-KIV, un metabolito esencial para la producción de otros aminoácidos y subproductos metabólicos (isobutanol, pantotenato) (Gu et al., 2017).

Figura 2.2

Rutas biosintéticas de E. coli para la producción de L-valina



Nota. Fuente adaptado de Aidelberg et al. (2014) y Carranza-Saavedra et al. (2021).

La producción de aminoácidos de cadena ramificada como L-valina, L-isoleucina y L-leucina consiste en varias reacciones catalizadas por enzimas acetohidroxi-butanoato sintasa (AHAS). *E. coli* tiene estas tres enzimas, AHAS (I, II y III), que difieren en su regulación y propiedades bioquímicas. Por lo tanto, AHAS I es inhibido por la retroalimentación de L-valina (Geraskina et al., 2019; Hao et al., 2020; Park, Jang, et al., 2011).

Sin embargo, dada la riqueza del suero en aminoácidos (Dinika et al., 2019; Menchik et al., 2019) y la complejidad en la ruta final de biosíntesis de L-valina a partir del piruvato, podría haber tenido un efecto regulador positivo en las enzimas (Guo et al., 2015) favoreciendo la producción de valina (Figura 2.1c), situación que se da en medios complejos y no en los puros. Además, la disminución en la concentración del producto (suero, Figura 2.1c) podría explicarse por la capacidad de *E. coli* de catabolizarlo para generar succinil-coA, dado el carácter glucogénico de este aminoácido (Geraskina et al., 2019; Oldiges et al., 2014) o también por el costo biosintético

de los aminoácidos, lo que establece una restricción selectiva a la hora de codificar aminoácidos y así mantenerse vivos en el tiempo (Zampieri et al., 2019).

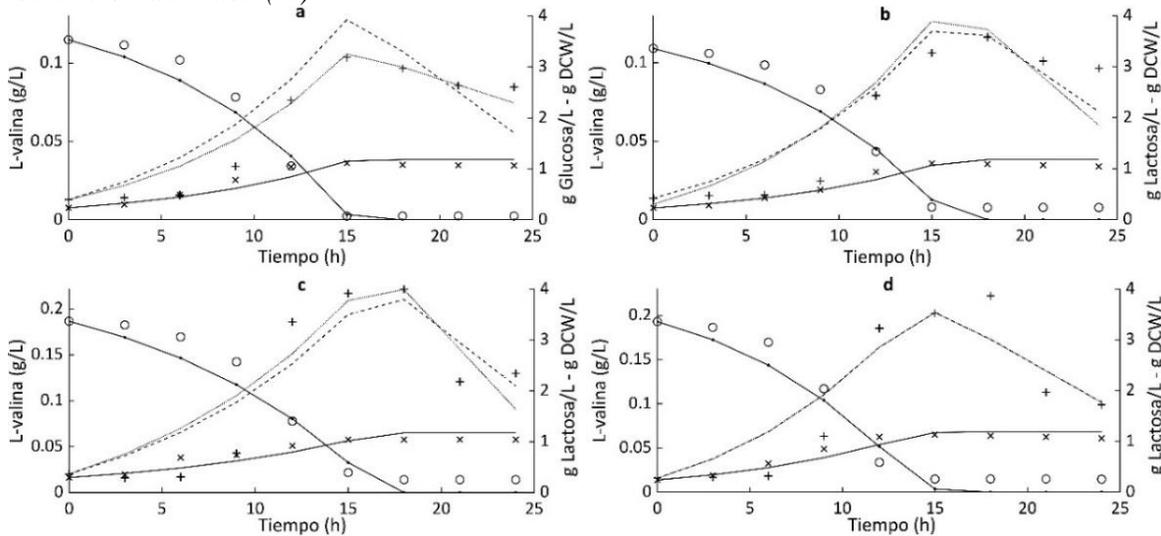
2.3.4 Simulación de crecimiento celular, consumo de sustrato y producción de L-valina bajo diferentes fuentes de carbono utilizadas

La caracterización de la biosíntesis de L-valina bajo diferentes fuentes de carbono, la simulación del crecimiento celular, el consumo de sustrato y la formación del producto durante el proceso por lotes se realizó utilizando el software MATLAB para resolver los modelos propuestos (Ecuaciones (2.1), (2.4), (2.5), (2.6) y (2.7)) simultáneamente. La Figura 2.3 muestra los perfiles de los resultados experimentales y modelados del consumo de sustrato, el crecimiento microbiano y la biosíntesis de L-valina para cada sustrato analizado (glucosa, lactosa, suero y DPW). Cuando se examinan los perfiles de todos los sustratos, se nota que los datos simulados por los modelos son consistentes con los datos experimentales. Como tal, se puede afirmar que los modelos probados en este trabajo pueden predecir el comportamiento del crecimiento celular, la biosíntesis y la absorción/re-asimilación del producto, así como el perfil de consumo de sustrato al mismo tiempo.

La Tabla 2.2 resume los valores obtenidos de los parámetros cinéticos al aplicar los modelos cinéticos propuestos. Los datos obtenidos de la simulación fueron consistentes con los resultados experimentales (μ_{max} e Y_{XS}), excepto en DPW con respecto a μ_{max} , posiblemente debido a la disposición del modelo para trazar la mejor curva de simulación en todos los datos experimentales, que muestra una tasa de crecimiento máxima específica (μ_{max}) de 0.109 h^{-1} con glucosa, 0.103 h^{-1} con lactosa, 0.080 h^{-1} con suero (Lactosa) y 0.119 h^{-1} con DPW (Lactosa) en los resultados de la simulación. Cabe señalar que estos modelos no simulan correctamente el crecimiento de células diáuxicas, como ocurre con los datos que se muestran en la Tabla 2.1 para el suero entero.

Figura 2.3

Cinética de fermentación de *E. coli* en cultivo por lote, comparación de datos experimentales Vs valores predichos por el modelo. a: Glucosa; b: Lactosa; c: Suero (Lactosa); d: suero desproteínizado (DPW) (Lactosa). Los valores experimentales muestran la siguiente simbología: (Biomasa (x), Sustrato (O), Producto (+)). Los valores pronosticados por el modelo muestran la siguiente simbología: (Biomasa (—), Sustrato (↔), Producto: Luedeking-Piret (- - -), Balance de Conservación de Masa (…))



En la Tabla 2.2 también es posible observar la constante de afinidad del microorganismo con el sustrato o constante de saturación de Monod (K_s). Este valor cambia para la glucosa y el suero en números obtenidos con los modelos Balance de Conservación de Masa y Luedeking-Piret, siendo el más bajo para el suero que mostró el valor más alto de concentración de L-valina. Adicionalmente, al comparar los valores de K_s para lactosa y DPW (lactosa), el valor se mantuvo constante al realizar las simulaciones con los dos modelos descritos para el producto. Estos valores coinciden con los reportados en la literatura para este tipo de microorganismos (Dack et al., 2017; Nooshkam et al., 2019).

Para el modelo de Balance de Conservación de Masa para P, se puede observar que Y_{XP} es mayor en fuentes de carbono individuales que en medios complejos (Tabla 2.2). Al observar la Figura 2.3, el valor de L-valina fue mayor en los dos tipos de suero utilizados que en la glucosa y la lactosa solas, con un comportamiento similar de la biomasa en todas las fuentes de carbono utilizadas. Además, β se encuentra en valores altos en suero y DPW (Tabla 2.2). La proporción de L-valina en su reducción tras alcanzar el máximo es considerable en comparación con

fermentaciones con glucosa y lactosa, coincidiendo con los datos experimentales encontrados (Figura 2.1c).

Tabla 2.2

Estimación de parámetros y validación de modelos establecidos para la producción de L-valina en fermentación discontinua con E. coli utilizando diferentes fuentes de carbono obtenidas por simulación

Parámetros cinéticos estimados	Glucosa	R ²	MSE	Lactosa	R ²	MSE	Suero	R ²	MSE	DPW	R ²	MSE
Contois (X); Balance de Conservación de Masa (S); Balance de conservación de masa (P)												
μ_{max} (h ⁻¹)	0.106			0.103			0.083			0.119		
K _s	0.016	0.919	0.002	0.008	0.953	0.001	0.004	0.894	0.002	0.176	0.928	0.002
Y _{xs} (g/g)	0.267	0.989	0.007	0.282	0.982	0.010	0.261	0.977	0.012	0.283	0.977	0.012
Y _{xp} (g/g)	5.121			5.148			2.498			3.313		
β (g P/g DCW.h)	0.007	0.799	0.009	0.007	0.849	0.008	0.013	0.857	0.030	0.010	0.884	0.024
Contois (X); Balance de Conservación de Masa (S); Luedeking-Piret (P)												
μ_{max} (h ⁻¹)	0.106			0.103			0.083			0.119		
K _s	0.005	0.918	0.002	0.008	0.953	0.001	0.010	0.894	0.002	0.176	0.928	0.002
Y _{xs} (g/g)	0.267	0.989	0.007	0.282	0.982	0.010	0.260	0.977	0.012	0.283	0.977	0.012
α (g/g)	0.131			0.224			0.485			0.302		
β (g P/g DCW.h)	0.003	0.953	0.002	0.009	0.792	0.011	0.019	0.836	0.032	0.010	0.884	0.024

Nota. Suero desproteínizado (DPW); P: producto (L-valina); DCW: peso de célula seca; K_s: constante de saturación de Monod; Y_{xs}: rendimiento de sustrato en biomasa; Y_{xp}: rendimiento de biomasa en el producto; α : parámetro de formación de producto asociado al crecimiento celular; β : parámetro de formación de producto sin asociación con el crecimiento celular; R²: Coeficiente de determinación; MSE: Error cuadrático medio.

Los resultados obtenidos al aplicar el modelo de Luedeking-Piret para todas las diferentes fuentes de carbono fueron analizados y presentados en la Tabla 2.2. Las constantes relacionadas con α y β tienen valores diferentes de cero para la producción de L-valina, lo que sugiere que la biosíntesis del producto es un proceso parcialmente asociado al crecimiento. Estos resultados coinciden con otros reportados para modelos similares (Tan et al., 2019). El α fue de 2 a 3 veces mayor para el suero y el DPW que para la lactosa y la glucosa puras (Tabla 2.2). Además, se

encontraron valores más altos en β para suero y DPW, lo que corresponde a la alta tasa de adsorción/re-asimilación del producto después de alcanzar un máximo, mientras se produce el agotamiento del sustrato.

El mejor modelo para predecir el comportamiento del producto es Luedeking-Piret, ya que está obteniendo resultados en los parámetros α y β , que no se encuentran en el modelo de Balance de Conservación de Masa. Sin embargo, en este estudio, el uso de dos modelos (Balance de Conservación de Masa y Luedeking-Piret) muestra que, estadísticamente, no hay una diferencia significativa para predecir. Además, para este tipo de estudio dependería más del tipo de sustrato que del tipo de modelo, tal y como afirma Xu (P. Xu & Peng Xu, 2020).

2.3.5 Validación de Modelo

La Tabla 2.2 muestra que los valores de R^2 son superiores a 0.91 para todos los parámetros obtenidos por Luedeking-Piret para glucosa y lactosa y que el MSE estuvo bajo en todos los modelos para todas las fuentes de carbono utilizadas. Estos resultados indican que los datos simulados de crecimiento celular, consumo de sustrato, biosíntesis de L-valina y degradación para las fuentes de carbono utilizadas muestran un buen ajuste con los datos experimentales.

Otra cualidad encontrada en el modelado fue que los valores esperados en los modelos coincidían con la varianza del error, con un MSE bajo (Tabla 2.2) en cada modelo probado (X, S y P), lo que indica que la probabilidad de que el modelo prediga cualquier posible evento (crecimiento celular, consumo de sustrato y producción de L-valina) tiene una alta tasa de confiabilidad (Brandt, 2014). Asimismo, mediante el análisis de gráficos de normalidad (Anexo A2.1 y A2.2), se obtuvo una relación lineal en todos los casos con una distribución normal y una varianza constante en la mayoría de los casos, excepto para la obtención de productos, que en algunos casos como se mostró en la Tabla 2.2. no hubo buen ajuste (Newton et al., 2018).

2.4 Conclusiones

Los resultados indican que bajo condiciones de medio mínimo la más alta producción de L-valina y $\mu_{\text{máx}}$ se obtienen con suero y DPW. Los modelos de Balance de Conservación de Masa y Luedeking-Piret ($R^2 > 0.90$) mostraron el mejor ajuste a los datos experimentales, además de predecir las tres fisiologías en *E. coli* (crecimiento celular, consumo de sustrato y rendimiento de producto). Sin embargo, el modelo de Luedeking-Piret es más asertivo y adecuado para la simulación y obtención de resultados en los parámetros α y β , proponiendo la biosíntesis del producto como un proceso parcialmente asociado al crecimiento celular en todos los sustratos utilizados. Por lo tanto, este tipo de trabajo es prometedor para una conversión verde, sostenible y atractiva hacia el uso de este tipo de subproducto (suero) para la obtención de L-valina, un importante aditivo para las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética.

Capítulo 3. Identificación de mapas metabólicos en *Escherichia coli* W utilizando como fuentes de carbono, glucosa y lactosa

3.1 Introducción

El crecimiento de una célula microbiana es el resultado de múltiples reacciones catalizadas enzimáticamente, muchas de las cuales están cuidadosamente reguladas por la célula para asegurar la optimización de nutrientes a utilizar, asegurando también que las reservas claves de metabolitos estén disponibles (Yang et al., 2020). En tal sentido, modelar todas estas reacciones requieren de un gran trabajo, sin embargo, en la mayoría de los casos las descripciones más simples de la cinética obtenidas experimentalmente son suficientes para el desarrollo y la optimización de los procesos metabólicos, que podrían ser estudiados *in silico* con el fin de predecir la formación de una interacción entre materiales genéticos, enzimas y metabolitos, constituyendo una plataforma sistemática y completa para analizar y optimizar el crecimiento microbiano y la producción de productos biológicos (N. Xu et al., 2018).

Por consiguiente, para la continuación del desarrollo de la tesis doctoral se utilizará un modelo metabólico a escala genómica de *E. coli* W. Este capítulo tiene como finalidad describir características y rutas metabólicas de *E. coli* con soporte científico, desde su fisiología hasta su genética, orientado hacia la producción de L-valina con el uso de glucosa y lactosa fuente de carbono. Así, se describirán los genes, proteínas o enzimas que se considerarán y se tendrán en cuenta en los posteriores estudios de la tesis doctoral.

Este apartado tendrá la finalidad de dar apoyo en conocimiento para el cumplimiento de los objetivos específicos: “Evaluar análisis de flujos metabólicos para entender el efecto que tiene sobre la producción de L-valina el empleo de diferentes fuentes de carbono, glucosa y lactosa” y “Construir una plataforma de *E. coli* para maximizar la producción de 2-cetoisovalerato como precursor de L-valina”.

3.2 Metodología

3.2.1 Identificación mapas metabólicos en *E. coli* para la producción de L-valina

El desarrollo de este apartado está dirigido en primer lugar, a realizar una revisión bibliográfica exhaustiva, seguida de la propuesta de una ruta bioquímica de biosíntesis de L-valina a partir de *E. coli*, para lo cual se tuvo en cuenta reportes de trabajos realizados acerca de aminoácidos (AA) de la familia de cadena ramificada y la información existente de rutas metabólicas para *E. coli*, apoyados de la base de datos bioinformáticas presentados en la Tabla 1.5.

Paralelamente se obtuvo información de los modelos encontrados en *E. coli* W para la identificación, entendimiento y análisis de las rutas metabólicas para la producción de L-valina con diferentes fuentes de carbono, siendo utilizada *E. coli* W (tipo silvestre, ATCC 9637) como cepa base para los análisis de las rutas planteadas, además, este microorganismo será descrito en detalle sobre sus rutas metabólicas para la producción de 2-KIV como precursor principal de L-valina y L-valina misma, como también será comparado con otros trabajos para justificar su selección.

Por último y no menos importante, este capítulo aportará información genética y de reacciones, que permitirán con apoyo de los análisis de flujos metabólicos el diseño de una cepa mutada para la sobreproducción de 2-KIV y L-valina, como en el diseño de oligonucleótidos usados en las técnicas de PCR, plásmidos, cassetes para mutación y sistema de sobreexpresión con exactitud y eficacia en relación al genoma del microorganismo a usar.

3.2.2 Modelo metabólico a usar

Para la identificación de rutas metabólicas y análisis de modelamiento *in silico* de *E. coli* W en este trabajo doctoral, se cuenta con un modelo (iCA_1273) provisto por la base de datos BioModels (<https://www.ebi.ac.uk/biomodels/>), que representa un modelo a escala genómica de *E. coli* W con 2477 reacciones y 1111 metabolitos, codificados por 1273 genes (Archer et al., 2011). Este modelo es el más completo y validado por secuenciación genómica completa del

microorganismo (Archer et al., 2011), dándonos un modelamiento verás y cercano a la realidad del comportamiento metabólico y genético de *E. coli* W en la producción de 2-KIV y L-valina.

3.3 Resultados

3.3.1 Microorganismo de estudio: *E. coli* W

El microorganismo seleccionado para el análisis de las rutas metabólicas y realizar el modelado metabólico fue *E. coli* W. *E. coli* W (tipo silvestre, ATCC 9637), la cual es una bacteria aislada por Selman A. Waksman, denominada "cepa de Waksman" o "cepa W", esta cepa destacó una mayor sensibilidad a la estreptomicina en comparación con otras cepas aisladas de *E. coli* en la colección de Waksman. *E. coli* W ha sido ampliamente usada en la industria (Archer et al., 2011), puesto que es la única cepa segura de *E. coli* que usa sacarosa como fuente de carbono (Felpeto-Santero et al., 2015; S. Y. Lee & Chang, 1993) entre otros azúcares, convirtiéndola en un microorganismo funcional para usar mezcla de sustratos o aprovechamientos de residuos con variedad de fuentes de carbonos diferente a la glucosa.

Además, *E. coli* W no solo produce bajas cantidades de acetato durante las fermentaciones si no que puede llegar a producir grandes cantidades de biomasa en cultivo en lote, sin alterar su máxima velocidad de crecimiento (Archer et al., 2011), cómo también, posee tolerancia al estrés ambiental como a las altas concentraciones de etanol, condiciones ácidas, altas temperaturas y estrés osmótico (Alterthum & Ingram, 1989; Gleiser & Bauer, 1981; Nagata, 2001; Shiloach & Bauer, 1975).

E. coli W es una cepa cuyo genoma se encuentra completamente secuenciado y anotado (GenBank: CP002185.1, NCBI). Su cromosoma tiene 4.900.968 bases pares (pb) y codifica 4.764 marcos abiertos de lectura. También están presentes dos plásmidos, pRK1 (102.536 pb) y pRK2 (5.360 pb) siendo una de sus funciones la reducción de mutaciones generacionales en el microorganismo (Archer et al., 2011).

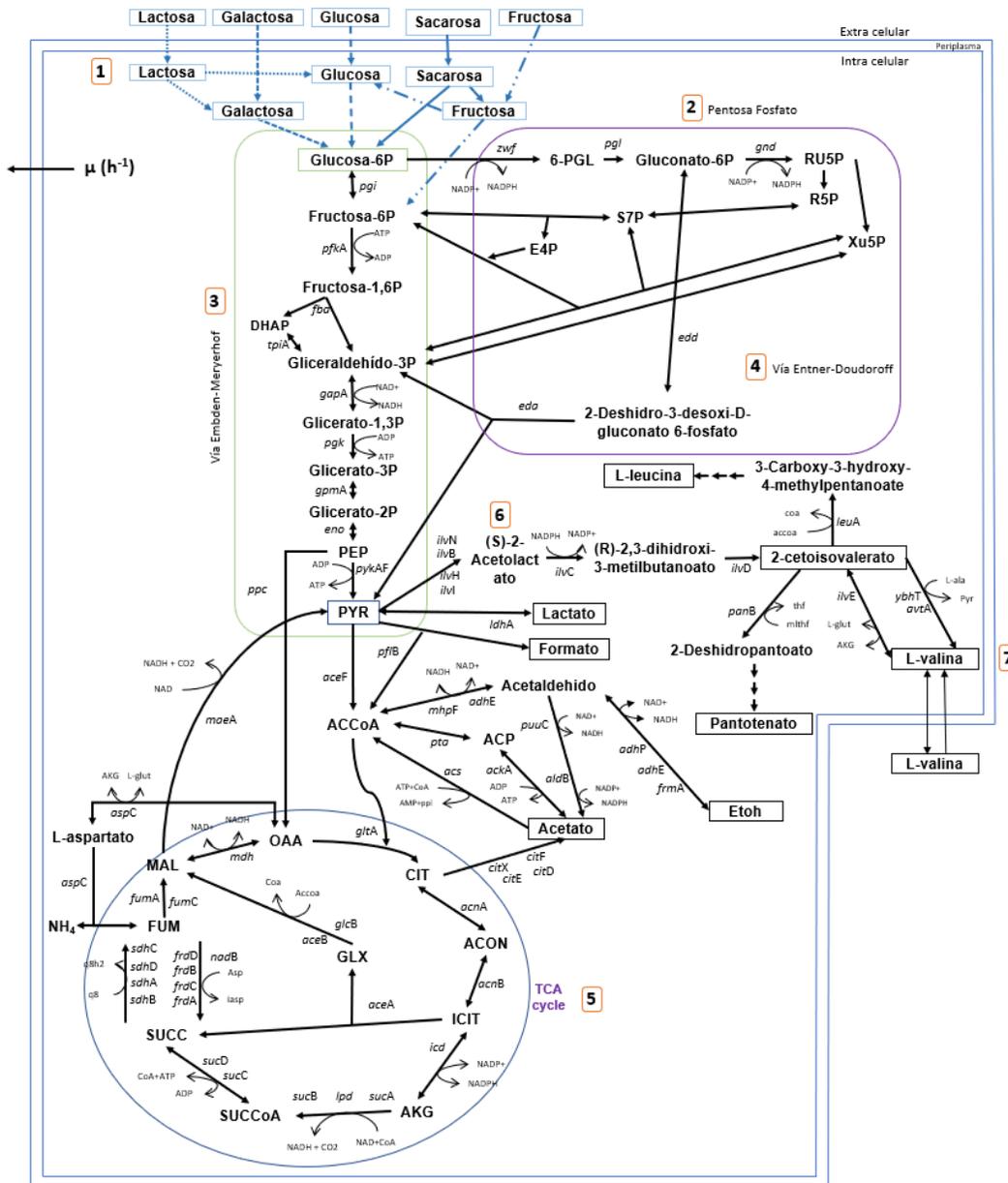
3.3.2 Metabolismo de *E. coli* para la producción de L-valina

Con este apartado se busca tener claridad de las reacciones globales que están involucradas en la producción de L-valina y así empezar a elucidar los aportes de cada etapa, desde el consumo de los diferentes sustratos a estudiar como también de metabolitos intermediarios que interfieren significativamente en la síntesis de L-valina y sus principales precursores como el 2-KIV. Así, se tendrá una serie de reacciones descritas que permitirán entender el comportamiento *in silico*, al realizar perturbaciones al sistema, en donde se podrá realizar análisis de los flujos metabólicos para proponer estrategias de mejora metabólica o genética de forma racional.

En la producción de L-valina interfieren siete rutas metabólicas principales que se describen en la Figura 3.1, las cuales son: transporte de fuente de carbono al interior de la célula, catabolismo de esa fuente de carbono mediante rutas como las de Entner-Doudoroff, Embden-Meyerhof-Parnas y vía pentosas fosfato hasta llegar al piruvato, donde se desvía hacia el ciclo del ácido tricarboxílico incluyendo las rutas anapleróticas y la ruta de biosíntesis de L-valina, que tienen como intermediario el 2-KIV.

A continuación, se presentará en detalle cada una de estas vías metabólicas.

Figura 3.1
Rutas metabólicas en *E. coli* W con énfasis en la biosíntesis de L-valina



Nota. Rutas y reacciones obtenidas a través de modelo a escala genómica MODEL1507180010 (iCA_1273) de la base de datos BioModels (<https://www.ebi.ac.uk/biomodels/>). 6-PGL: 6-fosfo-D-glucono-1,5-lactona, RU5P: Ribulosa 5-fosfato, R5P: Ribosa-5-fosfato, Xu5P: Xilulosa-5-fosfato, S7P: Sedoheptulosa-7-fosfato, E4P: Eritrosa-4-fosfato, DHAP: Dihidroxiacetona fosfato, PEP: Fosfoenolpiruvato, PYR: Piruvato, ACP: Proteína portadora de acilo, OAA, Oxalacetato, CIT: Citrato, ACON: Cis-Aconitato, AKG: 2-Oxoglutarato, GLX: Glioxilato, SUCCoA: Succinil-CoA, SUCC: Succinato, FUM: Fumarato, MAL: Malato, Etoho: Etanol.

3.3.2.1 Transporte activo para carbohidratos

E. coli tiene en su pared celular dos membranas de bicapa lipídica, la membrana externa es libremente permeable a mono y disacáridos, permitiendo la difusión de sustratos extracelulares al periplasma. Mientras su membrana interna (membrana citoplasmática) no permite el paso de carbohidratos a menos que esté presente una proteína específica para cada azúcar, luego se efectuará el transporte activo (Morgan, 1986).

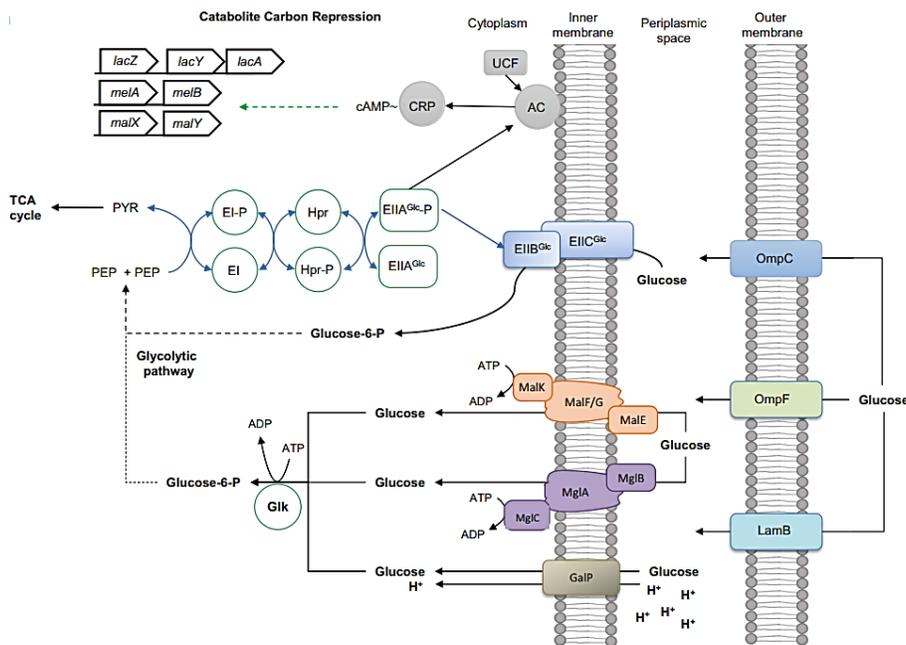
La eficiencia de la membrana para lograr el transporte de carbohidratos desde el cultivo hasta llegar al interior de la célula es un aspecto muy importante para el crecimiento microbiano. Así, el transporte activo se convierte en uno de los sistemas más importantes en este microorganismo. Ahora bien, para este tipo de mecanismo de transporte de azúcares en *E. coli*, se conocen tres formas diferentes de conseguirlo: el primero es el enlace de lactosa, galactosa, arabinosa, xilosa y fructosa al gradiente electroquímico de protones establecidos por hidrólisis de ATP; el segundo es el transporte de melibiosa con enlace de iones de Na^+ y el tercero es la activación directa del transporte de maltosa, galactosa, arabinosa, xilosa y ribosa por un metabolito fosforilado, posiblemente ATP; todos estos sistemas implican una proteína de unión periplásmica con alta afinidad por el sustrato y que pertenecen a la superfamilia ABC (transportadores ABC (del inglés ATP-Binding Cassette)) (Jeckelmann & Erni, 2020). Estos transportadores activos primarios acoplan la energía liberada por la hidrólisis de ATP para impulsar el influjo de solutos a través de la membrana interna en contra de su gradiente de concentración, lo que da como resultado la formación de gradientes electroquímicos que se utilizan para impulsar otros procesos celulares (Alva et al., 2020).

El flujo metabólico de *E. coli* W con sus respectivos genes para el transporte y catabolismo de diferentes carbohidratos empleados se presenta en la Figura 3.2, los genes presentados son los encargados del transporte al interior de la célula de los carbohidratos que contiene el suero lácteo (lactosa (gran proporción), galactosa y glucosa (menor proporción)). Se conoce que los genes *phoE*, *ompF*, *ompN* y *ompC* presentes para transportar todos los azúcares, son los principales codificantes de proteínas (porinas), las cuales permiten la difusión de diferentes azúcares, iones, aminoácidos,

de carbohidratos, puede también activar la represión de control de catabolitos (CCR) mediante la activación de las proteínas de represión catabólica (CRP) (Figura 3.3) y no permitir la permeabilidad fluida de diferentes azúcares en presencia de glucosa, provocando un crecimiento diaúxico en fermentaciones con mezcla de carbohidratos (Alva et al., 2020; Luo et al., 2014).

Por otro lado, como se mencionó anteriormente *E. coli* W puede metabolizar sacarosa, este carbohidrato es encontrado como principal molécula de transporte de carbohidratos en las plantas, por lo tanto, es el disacárido más abundante que se encuentra en la mayoría de los entornos, convirtiéndose en un sustrato de bajo precio. Así, la sacarosa en *E. coli* W que contiene el regulón *csc* que codifica un regulador (*cscR*), un transportador de sacarosa (*yeeX*), una invertasa (*cobU*) y una fructoquinasa (*xylA*) (Archer et al., 2011; Bockmann et al., 1992; Luo et al., 2014) puede ser convertida en glucosa y lograr glucólisis (Figura 3.2).

Figura 3.3
Transporte de glucosa en E. coli



Nota. Fuente Imagen tomada de Alva et al. (2020) - Reproduced with permission from Springer Nature.

En el caso de lactosa, es transportada hacia el citoplasma a través del simportador de protones (*lacY*), luego la enzima beta-galactosidasa codificada por *lacZ* (en el citoplasma) o *bglX* (en el periplasma) responsable de la hidrólisis en glucosa y galactosa para luego ser direccionada a glucosa-6-fosfato (g6p) (Figura 3.2) (Luo et al., 2014). Por lo tanto, glucosa (tanto en el periplasma como en el citoplasma) puede tomar diferentes rutas para llegar finalmente a g6p, sin embargo, como se indicó en apartados anteriores se pueden activar los genes de transporte de glucosa desde el periplasma al citoplasma y al mismo tiempo los de represión catabólica por genes: (*crr*, *malX*, *ptsH* y *ptsI*) o (*crr*, *ptsG*, *ptsH* y *ptsI*) o (*manX*, *manY*, *manZ*, *ptsH* y *ptsI*) (como se muestra en la Figura 3.3).

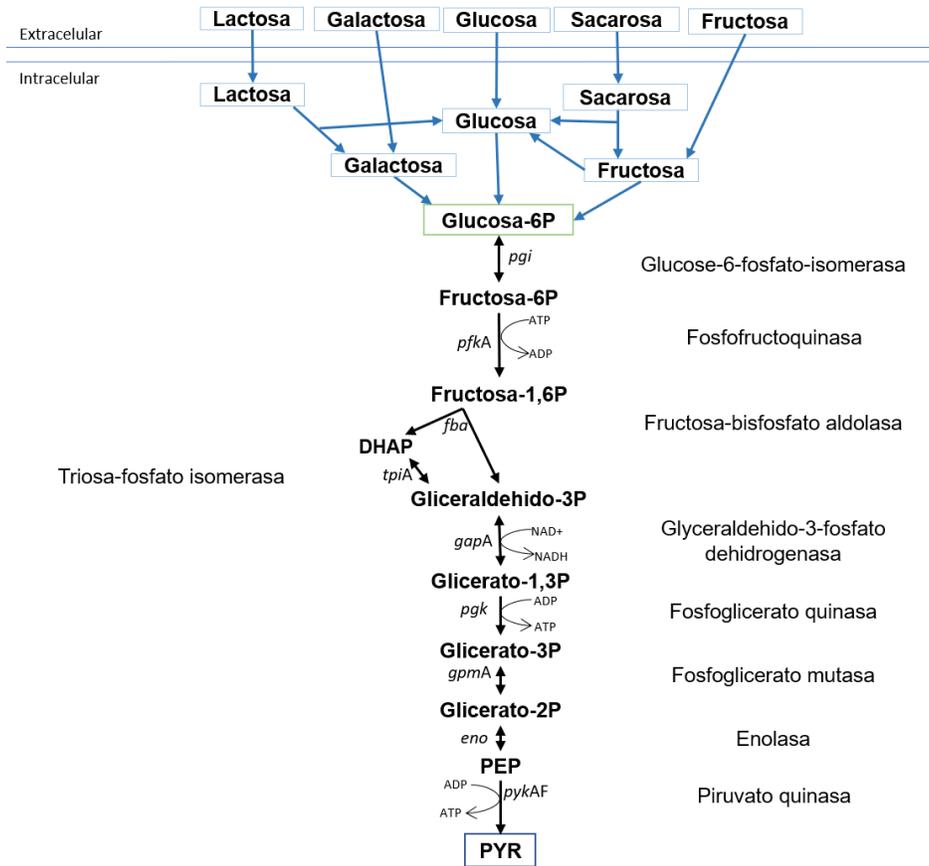
En cuanto a la galactosa, *E. coli* utiliza galactosa por la vía anfibólica (anabolismo – catabolismo) de Leloir, los pasos metabólicos de la utilización de galactosa son catalizados por las enzimas galactoquinasa (*galK* o *wcaK*), galactosa 1-fosfato uridililtransferasa (*galT*) y fosfoglucomutasa (*pgm* o *yqaB*) (Van Der Heiden et al., 2013) como son notados en la Figura 3.2.

3.3.2.2 Vía Embden-Meyerhof-Parnas o glicólisis

La glicólisis es la vía metabólica encargada de oxidar la glucosa con la finalidad de obtener energía en forma de ATP y NADH para la célula. Cabe aclarar, que luego de la fosforilación de la glucosa (mencionado en apartados anteriores) el proceso de glicólisis ocurre en el citoplasma celular, este proceso reside en ocho reacciones enzimáticas consecutivas que convierten a la g6p hasta piruvato (Figura 3.4), el cual es precursor para otras vías metabólicas generando acetil-CoA, oxaloacetato, L-alanina, L-isoleucina y L-valina, principalmente (X. Wang et al., 2018).

Figura 3.4

Vía Embden-Meyerhof-Parnas o glucólisis en *E. coli* W



Nota. Rutas y reacciones obtenidos a través de modelo a escala genómica: MODEL1507180010 (iCA_1273) de la base de datos BioModels (<https://www.ebi.ac.uk/biomodels/>).

En esta vía se destacan tres reacciones particulares que la caracterizan, la primera es el consumo de ATP por fosfofructoquinasa, segundo es la generación de 2 moléculas de ATP por fosfoglicerato quinasa y piruvato quinasa y tercero la generación de NADH por gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa, resumiendo lo planteado, se genera más moléculas de energía (ATP y NADH) a la célula de lo que consume.

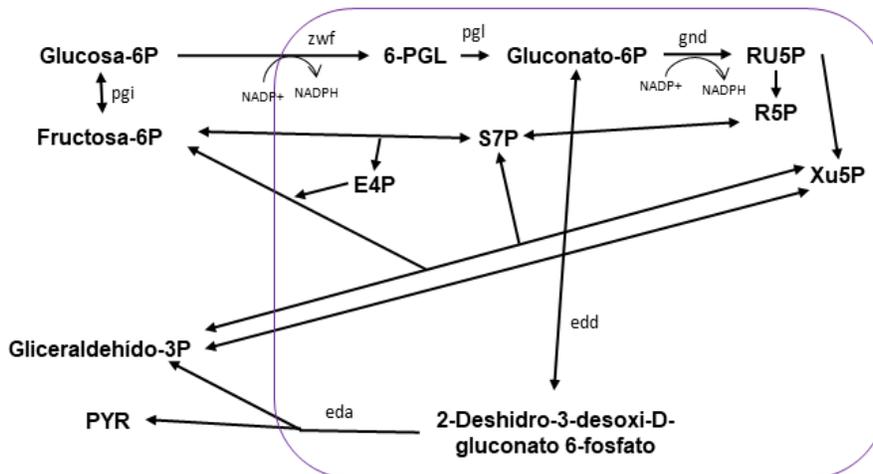
3.3.2.3 Vía de Entner-Doudoroff

La vía Entner-Doudoroff es una ruta metabólica alternativa que cataboliza glucosa a piruvato usando una serie de enzimas distintas a las empleadas en la vía de la glucólisis y a la vía pentosa fosfato. La inmensa mayoría de las bacterias utilizan la glucólisis y la vía pentosa fosfato en condiciones aerobias. Así, dependiendo de las condiciones anaeróbicas del medio, los organismos que utilizan la vía Entner-Doudoroff es debido a la baja producción de ATP por la vía glucólisis en condiciones limitadas de oxígeno (Egan et al., 1992).

Esta ruta da inicio con *g6p*, al oxidarse genera 6-fosfo-D-glucono-1,5-lactona y posteriormente gluconato-6P (encodado por *pgl* y *edd*, Figura 3.5), al poder deshidratarse a 2-Dehidro-3-Deoxi-D-gluconato-6-Fosfato seguirá desdoblándose a piruvato y Gliceraldehído-3-Fosfato mediante una aldolasa. Asimismo, esta vía se produce menos NADPH que en situación en la que el Gluconato-6P es descarboxilado a ribulosa-5-fosfato (vía pentosa fosfato) (Morgan, 1986). Sin embargo, en la vía Entner-Doudoroff se generan el NADPH que se requiere en la ruta de la biosíntesis de 2-KIV y L-valina (Figura 3.1 y 3.5).

Figura 3.5

Vías Entner-Doudoroff y Pentosa fosfatos en *E. coli* W



Nota. Rutas y reacciones obtenidos a través de modelo a escala genómica: MODEL1507180010 (*iCA_1273*) de la base de datos BioModels (<https://www.ebi.ac.uk/biomodels/>).

Por otro lado, se han identificado dos vías de biosíntesis distintas para la oxidación de glucosa, que eventualmente producirán gluconato-6P. La primera actúa directamente sobre la glucosa extracelular con glucosa deshidrogenasa y, en algunos casos, gluconato deshidrogenasa, enzimas independientes de nucleótido de piridina asociadas a la membrana que actúan en el espacio periplásmico para formar gluconato y 2-cetogluconato, respectivamente. Estos ácidos aldónicos son luego transportados a través de la membrana citoplásmica y fosforilados por las quinasa dependientes de ATP eventualmente para producir gluconato-6P (Figura 3.2) (Egan et al., 1992; Morgan, 1986). La segunda secuencia implica el transporte directo de glucosa a través de la membrana citoplásmica y su fosforilación por una quinasa dependiente de ATP para dar g6p como se muestra en la Figura 3.2 (descrito anteriormente) (Egan et al., 1992; Morgan, 1986).

3.3.2.4 Vía pentosa fosfato

La vía pentosa fosfato, utiliza una hexosa para generar azúcares de 5 carbonos necesarios para sintetizar nucleótidos y ácidos nucleicos como también la producción de NADPH que se utilizará como coenzima de enzimas propias del metabolismo anabólico, caracterizado por su balance energético neutro, ya que no genera ni consume ATP (LN & DG, 1977) (Figura 3.5). Puede dividirse en dos fases, la primera es oxidativa, con reacciones irreversibles (se genera NADPH), y la segunda es no oxidativa, con reacciones reversibles (se sintetizan pentosas-fosfato y otros monosacáridos-fosfato). En *E. coli* la oxidación de g6p a gluconato-6P y la posterior conversión de gluconato-6P en pentosa fosfato y CO₂, generan triosas fosfatos. Estas reacciones por las cuales el gluconato-6P se oxida adicionalmente y se convierte en pentosa fosfato son claramente diferentes de la deshidratación de gluconato-6P para dar 2-dehidro-3-deoxi-D-gluconato-6-Fosfato descrito en la sección anterior (Morgan, 1986) y que permiten generar moléculas de energía en forma de NADPH que son necesarias para la biosíntesis de 2-KIV y L-valina.

3.3.2.5 Ciclo del ácido tricarboxílico (TCA)

Este ciclo también se llama ciclo de Krebs o ciclo del ácido cítrico. Inicia con acetil CoA que se forma del piruvato obtenido de la glucólisis y también de la oxidación de ácidos grasos, esta vía inicia con una molécula de acetil-Coa que condensa con una de oxaloacetato y procede en 10 reacciones de forma cíclica que se regulada principalmente por tres enzimas (complejo de piruvato deshidrogenasa: piruvato deshidrogenasa, dihidrolipoil transacetilasa y dihidrolipoil deshidrogenasa), luego este ciclo también es regulado por otras enzimas de reacciones anapleróticas. En este ciclo se produce NADH Y FADH, ATP Y CO₂; algunos de estos productos favorecen la vía de la fosforilación oxidativa (respiración aeróbica en las células) (Morgan, 1986). Así, el citrato (6 carbonos) se obtiene en cada ciclo por condensación de un acetil-CoA (2 carbonos) con una molécula de oxaloacetato (4 carbonos), además el citrato produce en cada ciclo una molécula de oxaloacetato y dos CO₂ (Noronha et al., 2000).

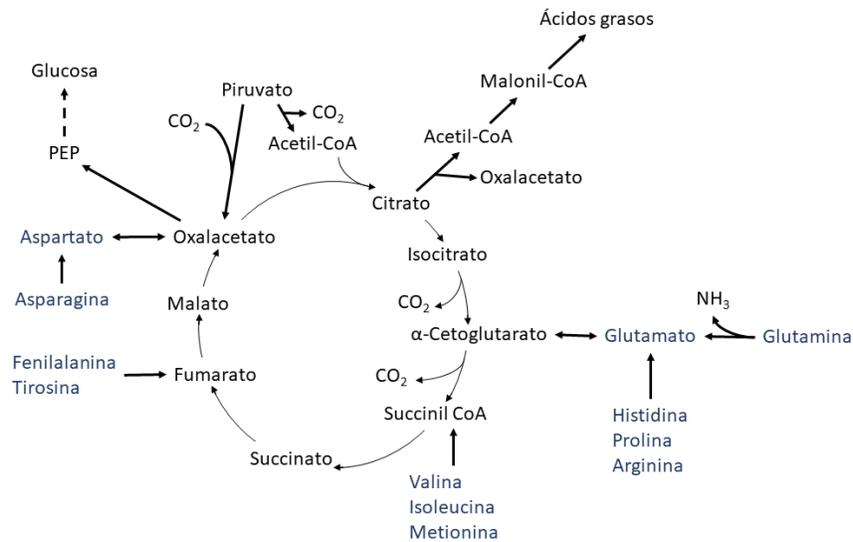
Si bien es cierto que, los ácidos orgánicos como el ácido acético en el medio de cultivo son un tipo de inhibición (Pinhal et al., 2019), en variantes como *E. coli* W no le afecta, además al ostentar una tendencia de baja producción de acetato y otros ácidos orgánicos (Alterthum & Ingram, 1989; Nagata, 2001); se adoptaría la idea de que *E. coli* W sería una cepa industrialmente competitiva a diferencia de las demás variantes, siendo útil para este estudio si contemplamos que dos de los precursores importantes para la producción de L-valina es piruvato y 2-KIV, que acidificarían el medio al redireccionar el flujo por esta vía de biosíntesis de L-valina.

Algunos de estos ácidos orgánicos provienen de reacciones anapleróticas que proporcionan intermediarios al TCA. Cuando los metabolitos del TCA son consumidos por vías sintéticas de *E. coli*, estos deben reestablecerse para que el ciclo siga funcionando, y la función de las reacciones anapleróticas es la de reponer dichas moléculas (Brunengraber & Roe, 2006; Valle et al., 2015). Se conocen cinco reacciones específicas que son mostradas en la Figura 3.6:

Piruvato a oxalacetato (piruvato carboxilasa (*aceF* y *gltA*)) activada por ACCoA; Aspartato a Oxalacetato (aspartato aminotransferasa); glutamato a 2-oxoglutarato (glutamato deshidrogenasa); β-oxidación de ácidos grasos a succinil-CoA (Metilmalonil-CoA mutasa) y posteriormente a acetil-CoA; malato a Piruvato (malato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺).

Figura 3.6

Representación esquemática de anaplerosis y cataplerosis en el TCA



Nota. Fuente adaptada de Owen et al. (2002).

Asimismo, en el TCA el catabolismo de los aminoácidos produce precursores gluconeogénicos o cetogénicos (Tabla 3.1). La eliminación de aniones gluconeogénicos en el ciclo de TCA emplea vías anapleróticas y catapleróticas para su oxidación terminal. La única vía conocida para la oxidación terminal de la leucina es a través del acetoacetato a acetil-CoA y la posterior oxidación en el ciclo del TCA (Owen et al., 2002).

Tabla 3.1

Relación de ácidos orgánicos producidos por aminoácidos como precursores en el TCA

Ácido orgánico	Aminoácido Precursor
Piruvato	Alanina, serina, glicina, treonina, cisteína, triptófano
Oxalacetato	Aspartato, asparagina
α-cetoglutarato	Glutamato, glutamina, prolina, histidina, arginina
Fumarato	Fenilalanina, tirosina
Succinil-CoA	Metionina, isoleucina, valina
Acetil-CoA	Leucina, isoleucina, lisina, fenilalanina, tirosina, triptófano, treonina

Nota. Fuente Owen et al. (2002).

Dentro de este marco, brevemente se podría dilucidar que fisiológicamente la más importante reacción es la producción de oxalacetato a partir de piruvato, puesto que un incremento de esta reacción podría disminuir el flujo de carbono que se requiere para la producción de 2-KIV y L-valina (M. Lee et al., 2004; Park et al., 2007).

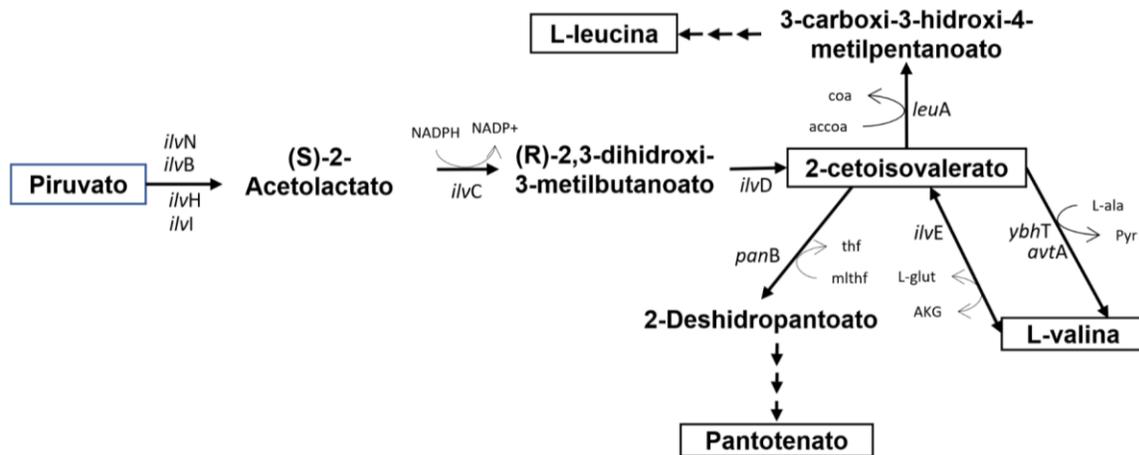
3.3.2.6 Biosíntesis de L-valina

Inicialmente, en la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA, por sus siglas en inglés Branched Chain Amino Acids) como L-valina, L-isoleucina y L-leucina interviene especialmente las enzimas acetohidroxiácido sintasas (AHAS), las cuales catalizan la formación de 2-acetolactato a partir de dos moléculas de piruvato (Figura 3.7). Además, en la producción y regulación de la biosíntesis de L-valina participan tres isoenzimas: AHAS (I, II y III) (Pátek, 2007). En *E. coli* W, según nuestro modelo metabólico usado, L-valina se sintetiza a partir de dos moléculas de piruvato mediante cuatro reacciones consecutivas catalizadas por las enzimas acetohidroxiácido sintasa I (AHAS I) (codificado por *ilvB* y *ilvN*)/AHAS III (codificado por *ilvI* y *ilvH*), isomerorreductasa (*ilvC*), dihidroxiácido deshidratasa (*ilvD*) y aminotransferasa B (*ilvE*) (Figura 3.7) (Park, Jang, et al., 2011). Cabe mencionar, que se produce también L-isoleucina a partir de piruvato y 2-cetobutirato, este último se forma a partir de L-treonina por la L-treonina deshidratasa (Park, Jang, et al., 2011), conllevando a una competencia por el sustrato piruvato para la generación de otras moléculas.

En cuanto a la inhibición por producto (L-valina), AHAS I es inhibido por L-valina mientras que acetohidroxiácido sintasa (AHAS II, codificado por *ilvG* y *ilvM*) es resistente a la L-valina (Park et al., 2007). AHAS II y AHAS III poseen una afinidad mucho mayor por el 2-cetobutirato que por el piruvato, lo que lleva a una síntesis preferida de L-isoleucina en presencia de 2-cetobutirato (Pátek, 2007).

Figura 3.7

Ruta resumida de la biosíntesis de L-valina en *E. coli* W



Nota. Rutas y reacciones obtenidos a través de modelo a escala genómica: MODEL1507180010 (iCA_1273) de la base de datos BioModels (<https://www.ebi.ac.uk/biomodels/>).

También, en otros estudios sobre inhibición por L-valina, en *E. coli* k12 se han revelado dos inserciones de pares de bases separadas en *ilvG* que dan como resultado una sensibilidad a L-valina (Park et al., 2007). Esta inhibición positiva de la vía de síntesis de aminoácidos de cadena ramificada no sólo afecta a la producción de L-valina sino también a isoleucina y leucina. Así, fue demostrado que *E. coli* K-12 tiene una tolerancia a L-valina muy baja debido a la mutación de cambio de marco en el gen *ilvG* que codifica la subunidad grande de AHAS II. En contraste, en *E. coli* W, *ilvG* está intacto y no contiene estos pares de bases de nucleótidos extras, por tanto tiene alta tolerancia a concentraciones elevadas de L-valina (Archer et al., 2011).

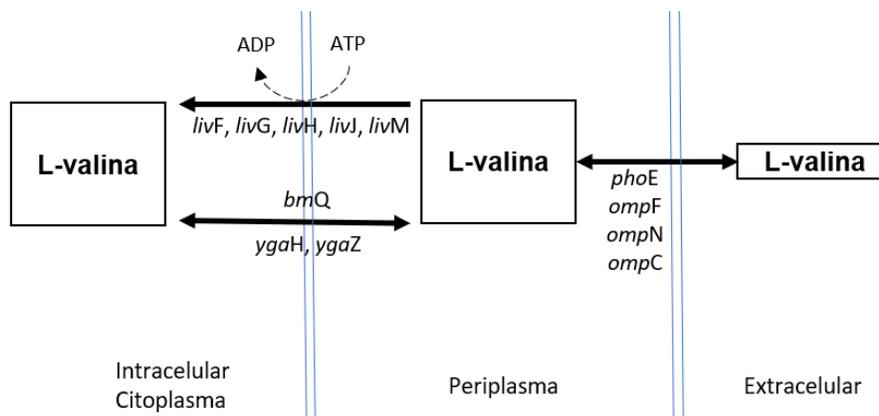
Por otra parte, 2-KIV siendo intermediario de la producción de L-valina, también es precursor de síntesis de L-leucina y D-pantotenato (Park, Jang, et al., 2011), como también, indirectamente está involucrado en la reacciones de biosíntesis de L-alanina y L-metionina (<https://websvc.biocyc.org>, <http://bigg.ucsd.edu>). Por tanto, se espera que la optimización y alta producción 2-KIV aumente el flujo de carbono hacia L-valina y en menor proporción hacia los otros compuestos.

3.3.2.7 Transporte de L-valina al exterior de la célula

En la Figura 3.8 se representa el flujo de secreción de L-valina. Este sistema de transporte de L-valina en *E. coli* W a través de la membrana citoplásmica se realiza de diferentes maneras: por un lado el principal componente de exportación reversible son las proteínas de los genes *YgaH/ygaZ* y *brnQ* ((Park et al., 2007), <http://bigg.ucsd.edu>). Por otro lado, el complejo del sistema de transporte de aminoácidos de cadena ramificada (*livF*, *livG*, *livH*, *livJ*, *livM*) importan L-valina y otros aminoácidos de cadena ramificada desde el periplasma al citoplasma (Adams et al., 1990). Cuando el microorganismo requiere tomar este aminoácido del exterior, se activan las proteínas de transporte desde el exterior celular al espacio periplásmico (*phoE*, *ompF*, *ompN* o *ompC*, anteriormente discutidas).

Figura 3.8

Reacciones de transporte de L-valina en *E. coli* W



Nota. Rutas y reacciones obtenidos a través de modelo a escala genómica: iECW_1372 de Bigg models (<http://bigg.ucsd.edu>).

3.3.3 Estudios de regulación transcripcional y mutaciones en *E. coli* para favorecer producción de L-valina

Mediante regulación transcripcional y delección de genes se han mejorado la sobreproducción de L-valina en *E. coli*, encontrándose análisis y redireccionamiento de flujo

metabólico para una mejora en la biosíntesis de este aminoácido. Uno de estos estudios principales es de Park, et al. (2007), quienes construyeron una plataforma de producción de L-valina con *E. coli* W3110 por ingeniería metabólica racional, además de una mejora gradual basada en el análisis del transcriptoma y la simulación de la eliminación genética de la red metabólica *in silico* a escala genómica. En principio, eliminaron la inhibición por retroalimentación en AHAS III por L-valina, reemplazando el promotor nativo que contenía las regiones líderes del atenuador transcripcional del operón *ilvGMEDA* por promotor *tac* y sobreexpresando los genes *ilvBN*. También, fue demostrado que la ruta para la biosíntesis de L-valina conlleva a niveles de expresión por *ilvC*, *ilvD* y *ilvE*, por tal razón fueron sobre expresados en un mismo plásmido (*ilvBNCED*).

Por otro lado, Park, et al. también realizaron modificaciones en las cuales se enfocaron en la delección de rutas alternas de consumo de 2-KIV para incrementar el pool de éste hacia la biosíntesis de L-valina. Sin embargo, los genes delecionados *ilvA*, *leuA* y *panB* convirtieron a *E. coli* W3110 auxótrofo de L-treonina, L-leucina y pantotenato. Además, establecieron tres delecciones de genes, *aceF* y *mdh* que conllevaron a la mejora del flujo metabólico hacia piruvato y *pfkA* para incrementar NADPH por la ruta Entner-Doudoroff y así conseguir un incremento de la productividad tanto de 2-KIV como de L-valina. Finalmente, realizaron sobreexpresión de los genes *lrp* y *ygaZH* que condujeron a una mayor secreción de L-valina, logrando producir 7.55 g/L de L-valina a partir de 20 g/L de glucosa en cultivo discontinuo en 48 h (0.378 g L-valina/g glucosa) (Park et al., 2007).

Asimismo, en otras investigaciones realizadas pensando en incrementar la producción de L-valina, Park, Kim, et al. (2011) presentaron una estrategia de mejora de proceso de producción de L-valina con *E. coli* W3110 con sus respectivas modificaciones genéticas de Park et al. (2007). El tipo de proceso realizado fue lote alimentado y la información obtenida fue procesada por análisis de sistemas, donde observaron que la fuente de energía en forma de ATP es muy importante para la producción eficiente de L-valina, además se evidenció un consumo de acetato adicionado y propio, reportando una producción de 32.3 g/L de L-valina (Park, Kim, et al., 2011).

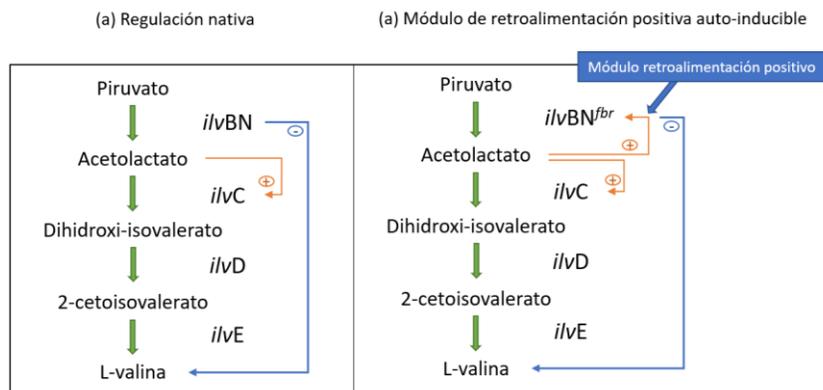
Igualmente, Park, Jang, et al. (2011) desarrollaron estudios de sobreproducción de L-valina empleando *E. coli* W, en el cual fue mutado el gen *ilvA* (auxótrofo de treonina) con el propósito de producir concentraciones altas de piruvato. Además, realizaron la delección del gen *lacI* con el fin

de permitir la expresión constitutiva de genes con promotor *tac* o *trc* y evitar la adición de inductor en el medio. También, lograron la sobreexpresión de genes *ilvB*, *ilvN*, *ilvC*, *ilvE* y *ilvD*, regulador global *Lrp* y exportador de L-valina *YgaZH* con alta eficiencia a través de replicación de plásmidos dentro del microorganismo. Obteniendo en procesos de producción en lote alrededor de 10 g L-valina/L y 60.7 g/L (29.5 h) por lote alimentado, con rendimiento de 0.08 g L-valina/g glucosa (Park, Jang, et al., 2011).

Por otra parte, uno de los principales problemas presentado en las fermentaciones ha sido la inhibición por producto de L-valina en *E. coli* (Figura 3.9A). Para eliminar este fenómeno, se ha generado un módulo auto-inductor artificial, denominado módulo de retroalimentación positiva en *E. coli* k12 (Geraskina et al., 2019). Este módulo consta de la sobreexpresión de *ilvBN* para la generación de acetolactato y 2-aceto-2-hidroxi-butanoato que son sustratos para *ilvC*, sin embargo, los genes *ilvY* e *ilvC* en el cromosoma se transcriben en direcciones opuestas de sus promotores que se superponen entre sí, estos sustratos son también co-inductores de la transcripción de *ilvY* y a la vez aumenta drásticamente la capacidad de unión de la ARN polimerasa para la transcripción de *ilvC*, por tanto cuando hay sobreexpresión de estos sustratos a su vez mejora la vía biosintética de los aminoácidos de cadena ramificada, demostrando que tal retroalimentación positiva mejora la producción de L-valina (Geraskina et al., 2019).

Figura 3.9

Esquemas de la inhibición en la biosíntesis de L-valina. A: Regulación nativa, B: Módulo de retroalimentación positiva auto-inducible



Nota. Fuente Geraskina et al. (2019).

En este sentido, se han realizado varias investigaciones que buscan solucionar el problema presentado de inhibición por producto realizando inserción de genes de otros microorganismos. Por ejemplo, se mejoró la vía sintética (*ilvCED*), adicionando el gen *alsS* de *Bacillus subtilis* en *E. coli* W3110, obteniéndose más alta producción de L-valina mitigando el efecto de inhibición por producto. Además, para aumentar la producción, también sobreexpresaron el regulador global Lrp y el exportador de L-valina *YgaZH* (Hao et al., 2020). Asimismo, fueron realizadas las mutaciones en los genes *pflB*, *adhE* y *ldhA* encargados de la transcripción para la producción de formato, etanol y lactato respectivamente, incrementando así la producción del pool piruvato. Otro hallazgo importante fue el determinar que un equilibrio en el poder reductor favorece la biosíntesis de L-valina, esto justificado por el reemplazo de una isomeroreductasa de acetohidroxiácido con preferencia a NADH y no NADPH y el aminoácido aminotransferasa de cadena ramificada que se reemplazó por leucina deshidrogenasa (*alsS*) de *Bacillus subtilis*, que conllevó a favorecer la producción de L-valina en *E. coli* W3110 a bajas concentraciones de oxígeno en el medio de cultivo. La fermentación discontinua en dos etapas de la cepa final diseñada produjo 84 g/L de L-valina en 36 h, una fase en lote con concentración significativa de oxígeno y la siguiente fase en lote alimentado con limitación de oxígeno, con un rendimiento de 0.41 g/g de glucosa (Hao et al., 2020).

3.4 Conclusiones

Al considerar como fuentes de carbono glucosa y lactosa, el planteamiento generado y el análisis de rutas metabólicas en *E. coli* W para la producción de 2-KIV como precursor de L-valina y L-valina misma, ha permitido identificar los metabolitos y principales reacciones en la producción de estos metabolitos, basándose en información bioinformática, literatura y modelo metabólico a escala genómica.

Contar con un modelo metabólico a escala genómica del microorganismo a estudiar (*E. coli* W, modelo iCA_1273), permitió identificar y deducir reacciones y genes de interés en las evaluaciones *in silico* que serán realizadas en posteriores capítulos de la tesis doctoral, como

también en el diseño de material genético para la construcción de plataformas productoras de metabolitos de interés.

Se encontró que el redireccionamiento de flujo de carbono hacia piruvato y posteriormente a 2-KIV es de importancia en *E. coli* W, los estudios en obtener las estrategias genéticas para el aumento de la producción de estos metabolitos serán adaptados en los capítulos siguientes, con el fin de estudiar el efecto que se obtendría en flujo metabólico usando lactosa como fuente de carbono en el medio de crecimiento y como fuente principal de suero lácteo.

Capítulo 4. Estudio metabólico *in silico* de *Escherichia coli* W utilizando glucosa y lactosa como fuente de carbono para la producción de 2-cetoisovalerato y L-valina

4.1 Introducción

Actualmente, se han realizado numerosos estudios sobre el uso de lactosa procedente del lactosuero como medio de cultivo (Amaro et al., 2019; Caballero et al., 2019; Fernández-Gutiérrez et al., 2021), sin embargo, son nulos los trabajos encontrados sobre la producción de aminoácidos con lactosa, especialmente para la producción de L-valina (aún menos para la ingeniería metabólica).

Este vacío de conocimiento muestra la gran importancia de dilucidar los comportamientos metabólicos y el rediseño racional para aumentar la producción óptima de 2-KIV y L-valina en *E. coli*, cuando se usa lactosa como fuente de carbono (compuesto principal en el suero). No obstante, las clásicas alteraciones genéticas y mutagénesis aleatoria (S. Y. Lee & Kim, 2015), que si bien dan buenos resultados de transformación y son técnicas valiosas, tienen como desventaja el consumo prolongado, exploraciones y prácticas aleatorias que producen cepas inestables, así como el desconocimiento sobre el comportamiento celular en los diferentes sustratos o metabolitos a los que están sometidos.

En este sentido, los métodos computacionales basados en modelos metabólicos han demostrado ser poderosas herramientas analíticas que pueden ser aplicadas en estudios de ingeniería metabólica, permitiendo la exploración sistemática del espacio de soluciones metabólicas para la producción del metabolito deseado (G. Wu et al., 2016). Siendo el uso de los conocimientos sobre el metabolismo celular *in vivo* e *in vitro* y modelos matemáticos a escala del genoma, técnicas que ayuden a encontrar posibles cuellos de botella de reacción en las rutas metabólicas y predicción de fenotipos mediante la estimación de la distribución del flujo intracelular y optimización de una función objetivo de interés (García-Jiménez et al., 2021). Estos modelos metabólicos se construyen a partir de la información bioquímica disponible de cada organismo y permiten realizar las predicciones computacionales de los estados metabólicos óptimos de estos microorganismos bajo diferentes escenarios nutricionales y productivos. En

consecuencia, estas predicciones se convierten en instrucciones precisas para la posterior modificación genética asistida por técnicas de biología sintética de última generación, lo que permite una optimización completa de la cepa productora (García-Jiménez et al., 2021; Mienda, 2017).

Este capítulo de investigación tiene como objetivo optimizar *in silico* la producción de L-valina a partir de lactosa, como principal compuesto del suero, en la cepa *E. coli* W mediante análisis computacionales que evalúen el efecto de la fuente de carbono sobre los flujos metabólicos en el microorganismo, especialmente sobre la biomasa, 2-KIV y L-valina. Este mismo capítulo tiene la finalidad de dar cumplimiento al tercer objetivo específico: “Evaluar análisis de flujos metabólicos para entender el efecto que tiene sobre la producción de L-valina el empleo de diferentes fuentes de carbono, glucosa y lactosa”.

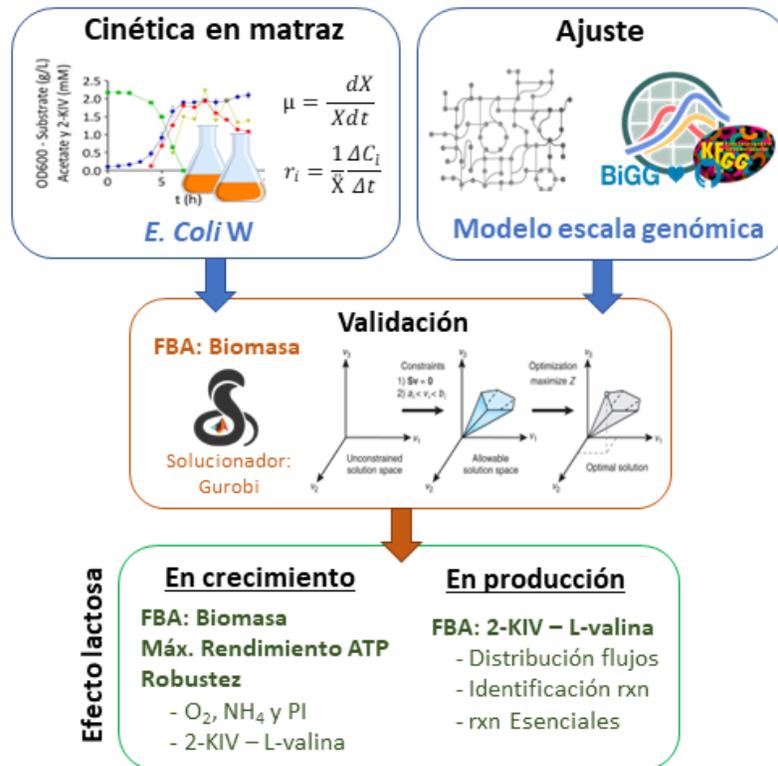
4.2 Metodología

4.2.1 Esquema de trabajo

Con el fin de analizar el flujo metabólico usando como fuente de carbono glucosa y lactosa, en la Figura 4.1 es presentado el esquema de trabajo de ingeniería metabólica realizado en este estudio. Se ha seleccionado *E. coli* W por poseer unas características metabólicas adecuadas y un modelo metabólico disponible, además de resistencia al estrés por acumulación de compuestos tales como ácidos orgánicos (Archer et al., 2011), este modelo ha sido ajustado con la adición de reacciones de exporte de 2-KIV al exterior de la célula y validado mediante FBA. Para ello, se utilizó como función objetivo la maximización en la producción de biomasa y como restricciones los flujos que fueron medidos mediante las cinéticas de crecimiento del microorganismo en estudio. Posteriormente con estos mismos flujos medidos experimentalmente, se realizó un análisis de flujo metabólico de las diferentes fuentes de carbono tanto para el crecimiento de *E. coli* W como para la producción de los metabolitos de interés (2-KIV y L-valina), con el objetivo de encontrar efectos diferenciales en su metabolismo al usar lactosa y visualizar las reacciones de importancia para deleccionar o sobre expresar para conseguir una óptima producción de 2-KIV y L-valina.

Figura 4.1

Procedimiento para análisis de balance de flujo (FBA) de *E. coli* W para la producción de 2-KIV y L-valina



4.2.2 Cepa y reactivos

Se utilizó la cepa *E. coli* W (ATCC® 9637 TM), que se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC). Todos los demás reactivos usados en este capítulo fueron grado reactivo.

4.2.3 Medios de crecimiento y condiciones de cultivos

Como medio de cultivo, se empleó un medio mínimo M9 modificando la fuente de carbono glucosa por lactosa (2 g/L).

La Cepa *E. coli* W fue aislada en placas de agar LB a 37 °C y luego almacenadas a 4 °C hasta su uso, renovando placas cada dos semanas. Una cepa fue inoculada en 50 mL de caldo LB

(preinóculo) entre 12 y 15 h a 37 °C a 250 rpm en un Incubadora-Agitadora 3033 (GFL, Alemania). Los inóculos para los medios de producción se obtuvieron mediante la centrifugación del preinóculo centrifugado (5200 g) y lavado con NaCl (0.85% p/v) los cuales fueron adicionados a 100 mL de medio M9 con glucosa o lactosa a una temperatura de 37 °C y 250 rpm. Todos los medios se esterilizaron a 121 °C durante 15 min a excepción de la solución de metales trazas. Se tomaron muestras cada hora o 12 h según la cinética a realizar, las cuales se emplearon para leer densidad óptica (OD) y posterior análisis de azúcares y ácidos orgánicos.

4.2.4 Procedimientos analíticos

El crecimiento bacteriano se determinó por OD a 600 nm (OD_{600}) usando un espectrofotómetro Ubet-30 (Jasco, Tokio, Japón).

Los azúcares (glucosa y lactosa) y ácidos orgánicos (ácido acético y fórmico) se determinaron por HPLC (Agilent 1260 Infinity II, Agilent Technologies, USA) equipado con una bomba, auto muestreador y con detectores de índice de refracción (IR) para azúcares y UV para ácidos orgánicos (210 nm), usando columna Hi-Plex H, 300x7.7 mm y guarda columna PL Hi-Plex H (Agilent Technologies, USA) y método isocrático con fase móvil de H_2SO_4 10 mM a 0.6 mL/min con volumen de inyección de muestra de 20 μ L. Todas las muestras se filtraron cuidadosamente utilizando un filtro de jeringa de nitrato de celulosa de 0.2 μ m antes de inyectarse en el HPLC. Las curvas estándares para cuantificar glucosa y lactosa se realizaron en un intervalo de concentraciones de 0.02-20 mM a 35 °C, para los ácidos orgánicos entre 0.05 - 40 mM. (Zaky et al., 2017).

4.2.5 Cinética de crecimiento

Las cinéticas de crecimiento fueron evaluadas por duplicado en matraces de 500 mL en los cuales, los medios de crecimiento mínimos (100 mL) fueron inoculados con *E. coli* W a una OD_{600} de 0.1, para luego ser evaluado cada hora y obtener las cinéticas de producción de biomasa, consumo de sustrato y producción de ácidos orgánicos.

4.2.6 Modelo metabólico

Para el análisis *in silico* se utilizó el modelo MODEL1507180010 (iCA_1273) de la base de datos BioModels (<https://www.ebi.ac.uk/biomodels/>) (Archer et al., 2011), el cual fue ajustado adicionado el flujo de salida para la producción de 2-KIV, quedando con 2480 reacciones.

4.2.7 Cálculo de los flujos metabólicos

Para la restricción del modelo iCA_1273 fueron calculados los flujos metabólicos del consumo de sustrato y producción de ácidos orgánicos mediante velocidad específica de síntesis o consumo de un metabolito por unidad de biomasa (Ecuación 4.1) en la fase exponencial de crecimiento en lote (Varma & Palsson, 1994).

$$r_i = \frac{1}{x} \frac{dC_i}{dt} \quad (4.1)$$

Dónde r_i es la velocidad específica de síntesis o consumo de un metabolito (mmol i/g DCW.h), X es concentración de biomasa (g DCW/L) y C_i es la concentración del metabolito (mmol metabolito i/L). Evaluada en la fase exponencial, la Ecuación 4.1 se podría aproximar de forma lineal en dos puntos a través del tiempo logrando así la Ecuación 4.2.

$$r_i = \frac{1}{\bar{X}} \frac{\Delta C_i}{\Delta t} \quad (4.2)$$

Dónde Δt es el intervalo entre el tiempo t de inicio de fase exponencial y el tiempo final de fase exponencial (h), \bar{X} es la concentración de biomasa promedio en el intervalo de tiempo Δt (g DCW/L) y ΔC_i es la diferencia de concentración del metabolito i en el intervalo de tiempo Δt (mmol metabolito i/L).

4.2.8 Tasa de crecimiento específico

Considerando un cultivo en lote, un balance de biomasa a través del tiempo es representado con la Ecuación (4.2) en donde C_i sería X y r_i se le conoce como μ , quedando la Ecuación 4.3. Al reorganizar los términos en la Ecuación 4.3, integrando y aplicando solución analítica, considerando t inicial = 0, inicio de fase exponencial y t , tiempo final de la fase exponencial, es posible obtener el valor de la tasa específica de crecimiento (μ) (Ecuación 4.4), siendo μ igual a μ_{max} en fase exponencial.

$$\mu = \frac{dX}{Xdt} \quad (4.3)$$

$$\ln X = \ln X_0 + \mu \cdot t \quad (4.4)$$

4.2.9 Análisis *in silico*

Los análisis *in silico* fueron llevados a cabo utilizando la herramienta COBRA Toolbox v3.0 para MATLAB R2018a (MathWorks) y solucionador Gurobi (versión 9.5.1) para obtener la distribución de flujos metabólicos de *E. coli* W. Las restricciones fueron suministradas teniendo en cuenta los flujos metabólicos (mmol/g DCW.h), medidos experimentalmente a partir de las cinéticas de crecimiento usando glucosa o lactosa como fuente de carbono.

4.2.10 Análisis de balance de flujos metabólicos

Fueron usadas tres funciones objetivo diferentes y analizadas una a una para calcular la distribución de flujo óptima: maximización de flujos de biomasa (μ , h^{-1}), 2-KIV y L-valina. En el caso de la optimización de la biomasa, las restricciones fueron los flujos medidos, el consumo de glucosa o lactosa, y la producción de ácido acético y fórmico. Para las funciones objetivo 2-KIV y L-valina, las restricciones fueron el flujo de biomasa (μ) al 70% del valor experimental encontrado

(seleccionado por simulaciones previas donde se evidenció que los flujos eran consistentes con lo esperado) y los mismos flujos medidos de producción de ácidos y consumo de sustrato.

Además, al realizar un análisis de variabilidad de flujo (FVA), identificamos el rango de variación (flujos mínimo y máximo) de cada reacción. FVA se llevó a cabo utilizando la función fastFVA() con optimizador CPLEX (versión 12.9.0) (Armingol et al., 2018; Schellenberger et al., 2011).

4.2.11 Maximización de rendimiento de ATP por sustrato

FBA también se puede utilizar para determinar los rendimientos máximos de importantes cofactores y precursores biosintéticos en glucosa y lactosa. Se calculó los rendimientos máximos de los cofactores ATP, NADH y NADPH de glucosa y lactosa en condiciones aeróbicas (Schuetz et al., 2007; Toro et al., 2018). Las restricciones al modelo fueron las siguientes: se realizó el cambio de flujo del consumo tanto de glucosa como de lactosa a -1 mmol/g DCW.h, seguidamente la reacción ATPM, fue cambiada a cero (0), que de forma predeterminada, esta reacción tiene un límite inferior de 8.9 mmol/g DCW.h para simular los costos de mantenimiento asociados al no crecimiento. Reacción ATPS4rpp: $ADP + pi + 4h \rightleftharpoons 3h + H_2O + ATP$, fue maximizada como función objetivo, con el fin de obtener el máximo rendimiento de ATP por flujo de consumo de sustrato (mol ATP/mol sustrato). Seguidamente fueron adicionadas al modelo las reacciones: NADH_pro (NADH \rightarrow NAD + H) y NADPH_pro (NADPH \rightarrow NADH + H) para ser maximizados también como función objetivo. Cada una de las funciones objetivos fueron solucionadas individualmente.

4.2.12 Robustez

El análisis de robustez configurado en la caja de herramientas COBRA usando la función robustnessAnalysis() se usó para comprender mejor el fenotipo de *E. coli* W bajo diferentes perturbaciones en el medio (Immanuel et al., 2018). Las restricciones fueron realizadas con los flujos metabólicos medidos experimentalmente (consumo de sustrato, producción de ácido acético

y ácido fórmico) y μ limitado al 70% donde hubo lugar en los análisis de robustez. Las perturbaciones fueron sobre el consumo de O₂, consumo de sustrato, consumo de NH₄, consumo de fosfatos (PI) y producción de 2-KIV y L-valina maximizando la velocidad específica de crecimiento.

4.2.13 Análisis de reacciones esenciales

Para clasificar las reacciones esenciales que se requieren para maximizar la obtención de los metabolitos deseados, se utilizó FBA parsimonioso (pFBA), minimizando así el flujo total de metabolitos necesarios para obtener la solución óptima (Anand et al., 2020) y poder detectar las reacciones esenciales necesarias para el crecimiento (μ) de acuerdo con el sustrato empleado. El análisis de las reacciones esenciales se realizó utilizando la función “singleGeneDeletion” de la caja de herramientas COBRA: si el grRatio es menor que 10^{-6} , entonces la reacción se define como esencial (Schellenberger et al., 2011).

4.3 Resultados

4.3.1 Análisis cinético

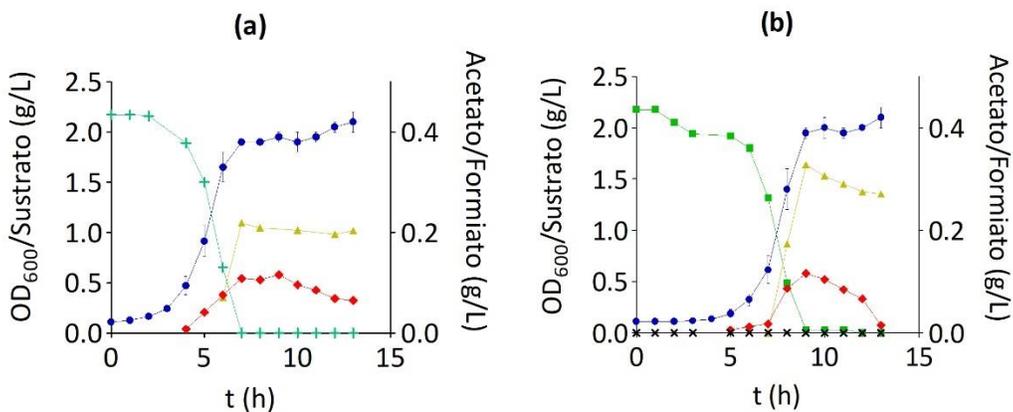
Se utilizaron la cinética de crecimiento celular de *E. coli* W, el consumo de glucosa y lactosa y la producción de ácidos orgánicos para calcular los flujos metabólicos detrás de las restricciones del modelo metabólico (Figura 4.2). Cuando se utilizó glucosa como fuente de carbono, *E. coli* W mostró una fase de latencia de 3 h, una tasa de crecimiento de $0.628 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ y $Y_{x/s}$ fue de $0.89 \pm 0.03 \text{ g/g}$, valores similares a los observados en *E. coli* K-12 (Figura 4.2a) (Bettenbrock et al., 2007; Villela Alonso et al., 2021). Cuando se usó lactosa como fuente de carbono, la fase de latencia aumentó a 5 h, la tasa de crecimiento aumentó a $0.823 \pm 0.10 \text{ h}^{-1}$ (Figura 4.2b.) y $Y_{x/s}$ fue de $0.91 \pm 0.07 \text{ g/g}$. A diferencia de *E. coli* K-12, no se detectó acumulación extracelular de glucosa o galactosa (Bettenbrock et al., 2007). En el caso de *E. coli* W, los genes responsables de controlar los reguladores globales podrían estar levemente reprimidos, provocando una caída en la represión

de la transcripción de genes ligados al ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), lo que a su vez resultó en una mayor producción de biomasa (Waegeman et al., 2011). Además, se observa que la cinética de crecimiento con una combinación de glucosa y otros azúcares no mostró evidencia de fenómenos de represión catabólica (datos mostrados en posterior capítulo).

La máxima producción extracelular de ácidos orgánicos (acetato y formiato) se detectó al final de la fase de crecimiento, una vez consumidos los azúcares. La detección extracelular cayó luego durante la fase estacionaria. Este comportamiento se observó con ambos sustratos y está en correspondencia directa con los datos reportados y la capacidad de *E. coli* W para usar estos ácidos orgánicos como fuentes de carbono en condiciones de carbono limitado (Novak et al., 2018; Phue & Shiloach, 2005). Aunque la producción de formiato se correlaciona con las condiciones anaeróbicas, se ha informado que *E. coli* produce este ácido orgánico en fermentaciones aeróbicas continuas y por lotes (Lara et al., 2009; Y. Wang et al., 2012). Por lo tanto, se consideraron condiciones aeróbicas para análisis *in silico* en este estudio. Cabe mencionar que, no se detectó producción de lactato bajo las condiciones experimentales de este estudio.

Figura 4.2

Cinéticas de crecimiento celular, consumo de sustrato y producción de ácidos orgánicos en E. coli W



Nota. a: glucosa y b: lactosa.

4.3.2 Validación del modelo mediante análisis de balance de flujo metabólico

Los valores de la tasa de crecimiento específica máxima y el flujo metabólico obtenidos a partir de datos experimentales se resumen en la Tabla 4.1. Los valores más altos reflejan los flujos de biomasa y ácidos registrados cuando se utilizó lactosa como fuente de carbono. Esto viene a mostrar una asimilación eficiente de la lactosa por parte de *E. coli* W y sugiere una ventaja potencial sobre la glucosa en términos de altos valores molares de carbono.

Tabla 4.1

Tasa de crecimiento y flujos metabólicos en E. coli W al usar glucosa y lactosa

Sustrato	Fase lag (h)	μ_{\max} (h ⁻¹)	μ_{\max} (h ⁻¹) <i>in silico</i>	Error % <i>in silico</i> (μ_{\max})	Flujo de consumo de sustrato mmol/g DCW.h*	Flujo de producción de acetato mmol/g DCW.h*	Flujo de producción de formiato mmol/g DCW.h*
Glucosa	3	0.63	0.62	1.8	7.12	1.19	1.61
Lactosa	5	0.82	0.87	5.5	5.35	2.53	8.23

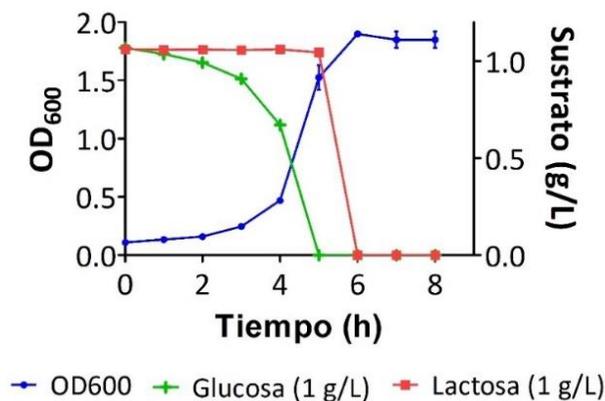
Al restringir el modelo con estos datos experimentales, se encontró buena concordancia en la predicción de la tasa de crecimiento, de hecho, se obtuvieron errores de 1.8% y 5.5% para glucosa (μ : 0.617 h⁻¹) y lactosa (μ : 0.868 h⁻¹), respectivamente (Tabla 4.1). Esto viene a demostrar que el modelo se asemeja al escenario real en al menos un 95% y por lo tanto, arroja predicciones confiables del comportamiento metabólico y los flujos internos para mejorar nuestra comprensión del efecto de los flujos de carbono en el crecimiento de *E. coli* W. Sin embargo, cabe señalar que no se puede reclamar una consistencia total para los modelos *in silico* debido a la falta actual de flujos metabólicos medidos experimentalmente. Por lo tanto, la prudencia debe ser un principio rector al analizar los flujos y se debe tener cuidado para respaldar los hallazgos con estudios adicionales y consideraciones racionales (Erb et al., 2017). La validación del modelo desbloqueará nuevas aplicaciones, como los análisis de rendimiento de las redes metabólicas que respaldan las vías para la biosíntesis de L-valina y otros metabolitos de interés que requieren 2-KIV como precursor.

4.3.3 El metabolismo inicial de la lactosa es compatible con el catabolismo simultáneo de galactosa y glucosa en *E. coli* W

La represión catabólica es uno de los fenómenos que tiene una fuerte correlación con la eficiencia del uso de diversas fuentes de carbono, especialmente *E. coli*, al crecer en una mezcla de cualquier azúcar con glucosa (X. Wang et al., 2019). La lactosa, al ser un disacárido y el principal compuesto del suero, se pudieron haber observado crecimientos diáuxicos en combinación con la glucosa. Como se muestra en la Figura 4.3, se observa que *E. coli* W no presenta crecimiento diáuxico al crecer con lactosa y glucosa (1:1), mostrando una reducción en la fase de latencia de la captación de lactosa. Posiblemente esto se deba a que este microorganismo tiene bajos niveles de activación de proteínas de represión catabólica, lo que le facilita probablemente crecer en múltiples sustratos y en mezclas con glucosa, puesto que al parecer hay jerarquía en el consumo de sustratos en mezcla (Aidelberg et al., 2014), pero el periodo de adaptación fue corto y por tanto un consumo inmediato de la lactosa en 1 h fue evidenciado (Figura 4.3).

Figura 4.3

Cinéticas de crecimiento celular y consumo de sustrato de *E. coli* W al concertar glucosa y lactosa (1 g/L:1 g/L) en el medio



Además, se puede observar claramente en las primeras reacciones de la vía de la glucólisis con modelado *in silico* (Figura 4.4), que mientras el metabolismo de la glucosa sigue la vía clásica

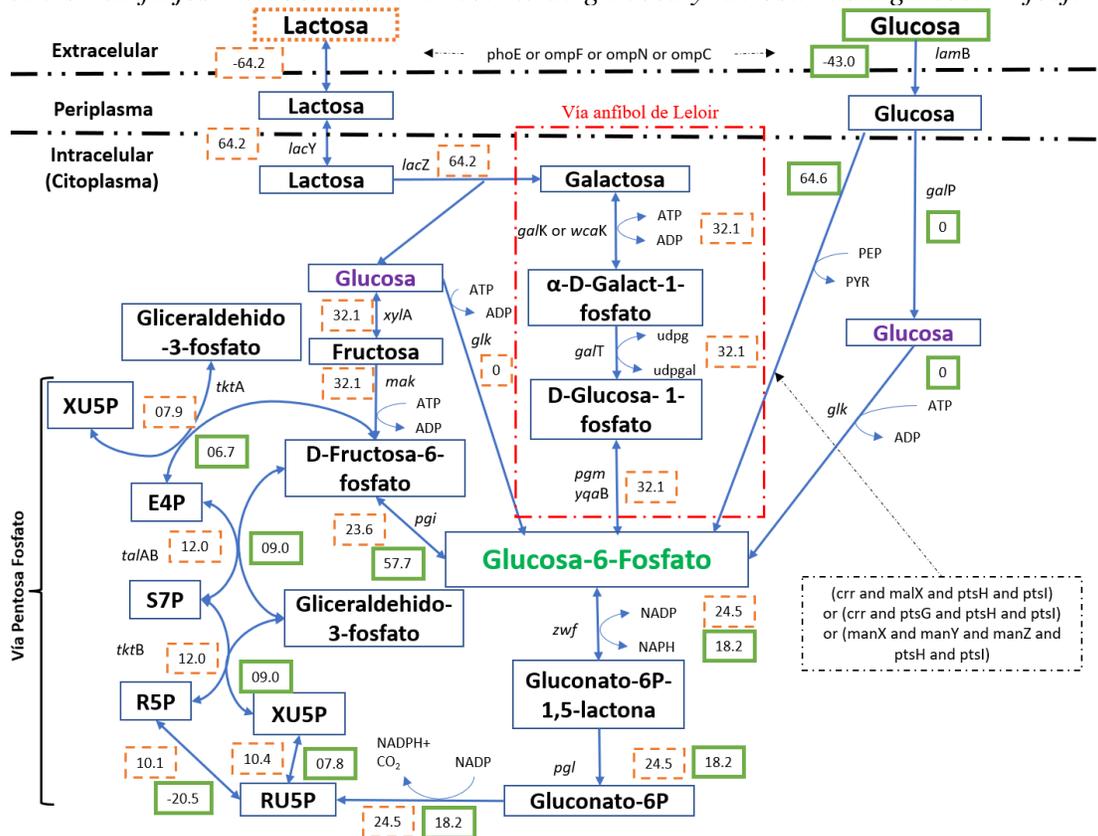
de Entner-Doudoroff, con la lactosa, posiblemente la represión catabólica asociada al sistema PTS se aliviaría debido a que la glucosa y la galactosa se generan en el citoplasma, al contrario de lo que sucede en otros microorganismos (Iskandar et al., 2019; X. Wang et al., 2019). Por tanto, el hecho de no encontrar galactosa en el sobrenadante (Figura 4.2b y 4.3) sugiere que la glucosa y la galactosa se metabolizan simultáneamente en *E. coli* W.

Dado que la lactosa es hidrolizada por la β -galactosidasa (*lacZ*) en glucosa y galactosa, el flujo de carbono se divide en dos: una corriente alimenta la ruta de la galactosa y luego la glucosa-6-fosfato, mientras que la otra alimenta la ruta de la glucosa y luego a glucosa-6-fosfato (Luo et al., 2014). En cuanto a la galactosa, *E. coli* W utiliza este sustrato a través de la vía anfíbol de Leloir (anabolismo - catabolismo), en un proceso bioquímico catalizado por galactoquinasa (*galK* o *wcaK*), galactosa 1-fosfato uridililtransferasa (*galT*) y fosfoglucomutasa (*pgm* o *yqaB*) (L. Hou et al., 2021; Van Der Heiden et al., 2013). Esto debería aumentar el flujo de carbono a través de la vía de la glucólisis y la PPP, a diferencia de lo que se ha observado para la glucosa (Macnab et al., 1973), como se ve en la Figura 4.4 Por lo tanto, los flujos metabólicos *in silico* de lactosa en la glucólisis, a partir del consumo de sustrato a la producción de glucosa-6-fosfato tienen un efecto significativo en la generación de un mayor flujo de carbono a través de la ruta de las pentosas fosfato (PPP) y la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), donde se agota la glucosa-1-fosfato.

Los resultados *in silico* también mostraron que la glucosa obtenida a través de la hidrólisis de lactosa en el citoplasma no fue redirigida hacia la glucosa-6-fosfato (*glk*). En cambio, se transformó en fructosa (proceso codificado por *xylA*) y luego entró en la vía PPP, que es una de las vías importantes para la producción de NADPH, una molécula necesaria para la biosíntesis de aminoácidos y el equilibrio redox (Y. Wu et al., 2020; Yuan et al., 2021). Las fermentaciones con *E. coli* utilizando sustratos marcados isotópicamente han demostrado que la glucosa y la galactosa de la descomposición de la lactosa, se desvían a fructosa-1,6P para la biosíntesis de aminoácidos (Macnab et al., 1973). Aquí se observó un comportamiento similar del metabolismo de la lactosa, en *C. glutamicum*, donde la delección de *zwf* interrumpe la vía PPP debido a una caída en el flujo de carbono hacia la vía glucolítica (Shen et al., 2020) y en *Kluyveromyces marxianus*, cuando además se utilizó lactosa como fuente de carbono se registró un aumento de la actividad enzimática de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (*zwf*) (Bellaver et al., 2004).

Figura 4.4

Distribución de flujos metabólicos en E. coli W de glucosa y lactosa hasta glucosa-6-fosfato



Nota. Valores numéricos son los flujos normalizados (mmol C/g DCW h) de glucosa y lactosa obtenidos *in silico*. Cuadros naranjas: flujos usando lactosa; Cuadros verdes: flujos usando glucosa. Rutas y reacciones obtenidos a través de modelo a escala genómica: MODEL1507180010 (iCA_1273) de la base de datos BioModels (<https://www.ebi.ac.uk/biomodels/>).

4.3.4 Aumento del flujo de carbono en las rutas de la glicólisis y TCA en *E. coli W*

Después del estudio del comportamiento de la desviación del flujo de carbono cuando se usa glucosa y lactosa después de la absorción, las rutas metabólicas de *E. coli W* que presentan reacciones y sustratos, genes y flujos correspondientes para ambos sustratos mientras se maximiza la biomasa, se muestran en la Figura 4.5. Con el fin de simplificar el análisis, los flujos calculados por el modelo se normalizaron (mmol C/g DCW·h) según la fuente de carbono.

Una mayor proporción de flujo hacia el gliceraldehído-3-fosfato con la captación de lactosa también fue observado, continuando la ruta de glicólisis hacia el piruvato y el ciclo TCA. Sin embargo, este tipo de reacción se había observado previamente siguiendo una dirección diferente al fermentar suero ácido con *E. coli*. Específicamente, se identificó un flujo directo de glucosa a glucosa-6-fosfato (*glk*) a lo largo de esta vía metabólica que solo podría inhibirse por estrés ácido (L. Hou et al., 2021).

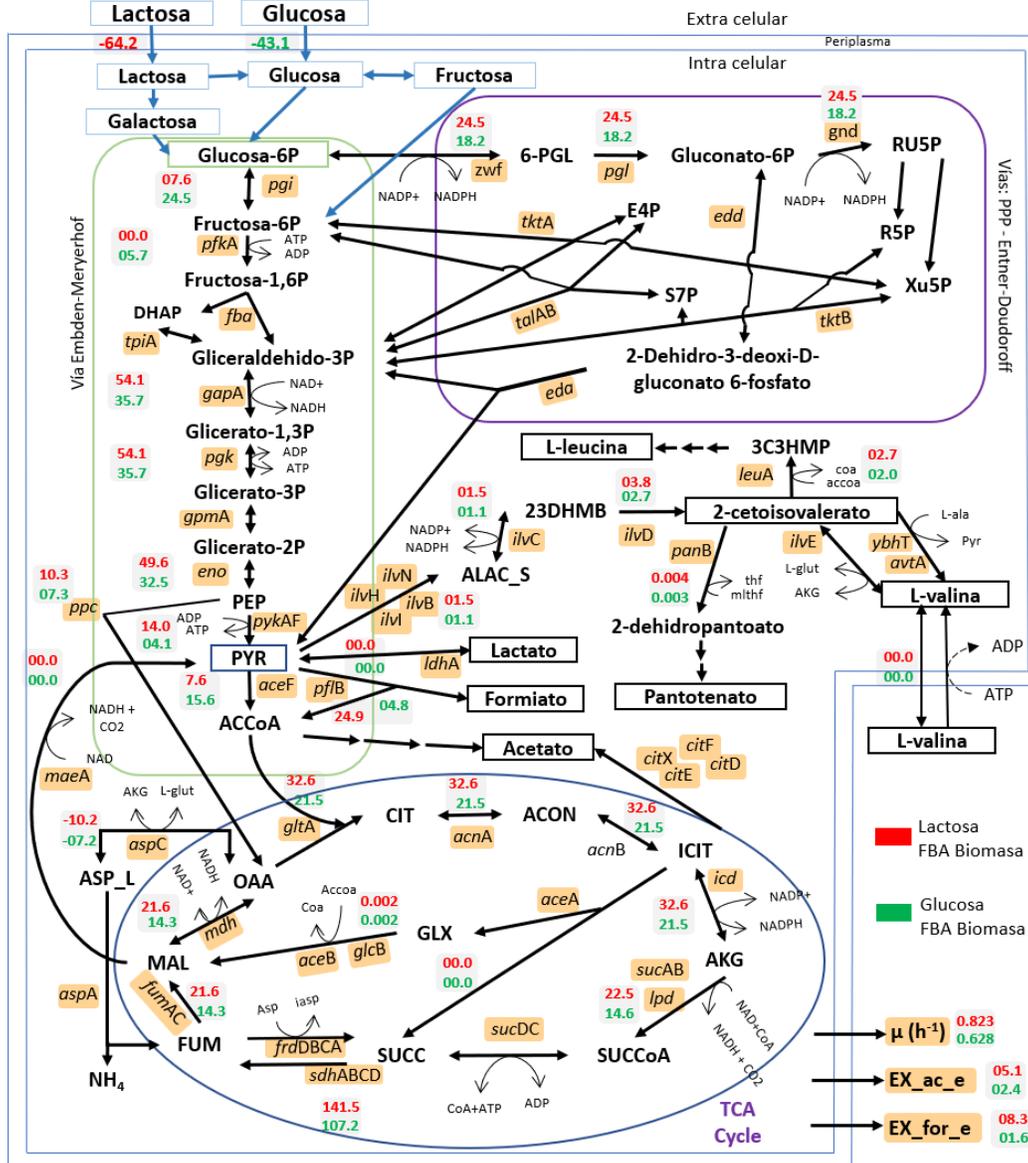
Durante el análisis de flujo metabólico no se evidenció en la reacción de fructosa-6P a fructosa-1,6P (reacción PFK, gen *pfkA*) (Pandi et al., 2020). Aunque esto podría considerarse una inconsistencia, debe tenerse en cuenta que las variaciones en el flujo de glucosa (datos suplementarios), puesto que en reacción CS (codificada por *gltA*) podrían alterar la solución en este punto y, por lo tanto, se requieren más pruebas de cuantificación para verificar esta reacción en *E coli* W.

Curiosamente, el catabolismo de la lactosa genera un mayor flujo de carbono a través de las reacciones de PPC (codificadas por *ppc*) y CS que la glucosa. En consecuencia, se suministra al ciclo TCA un mayor flujo de carbono y, por lo tanto, proporcionar la capacidad de producción de ácidos orgánicos para la biosíntesis de AA y otros metabolitos importantes como energía en forma de poder reductor para mantener la alta tasa de crecimiento encontrada (Millard et al., 2017).

Asimismo, la producción de 2- α -cetoglutarato (2-AKG) a partir de lactosa (Isocitrato (ICIT) \rightarrow 2-AKG) se produce en una proporción de casi 1.5 veces, lo que marca una diferencia con la glucosa. Esto proporcionaría que no solo habría un mayor flujo en las siguientes reacciones de síntesis/actividad de producción de metabolitos del ciclo TCA para su mantenimiento y crecimiento (Araújo et al., 2014), sino que además, 2-AKG le atribuiría funciones clave como metabolito biológico en mayor proporción, especialmente a través de la vía de síntesis de aminoácidos de cadena ramificada (según el modelo metabólico a escala genómica), siendo esto similar en cuanto a que hubo mayores actividades enzimáticas en el ciclo del TCA al usar lactosa en comparación con la glucosa (Bianco et al., 2006; Hanson & Cox, 1967).

Figura 4.5

Distribución de flujos metabólicos de la cepa *E. coli* W empleando lactosa (color rojo) y glucosa (color verde) como fuentes de carbono



Nota. Valores numéricos son los flujos normalizados (mmol C/g DCW h) de glucosa y lactosa obtenidos *in silico*. 6-PGL: 6-fosfo-D-glucono-1,5-lactona, PEP: Fosfoenolpiruvato, PYR: Piruvato, ACCoA: Proteína portadora de acilo, OAA, Oxalacetato, ACCoA: Acetil-CoA, CIT: Citrato, ACON: Cis-Aconitato, AKG: 2-Oxoglutarato, GLX: Glioxilato, SUCCoA: Succinil-CoA, SUCC: Succinato, FUM: Fumarato, MAL: Malato. Rutas y reacciones obtenidos a través de modelo a escala genómica: MODEL1507180010 (iCA_1273) de la base de datos BioModels (<https://www.ebi.ac.uk/biomodels/>).

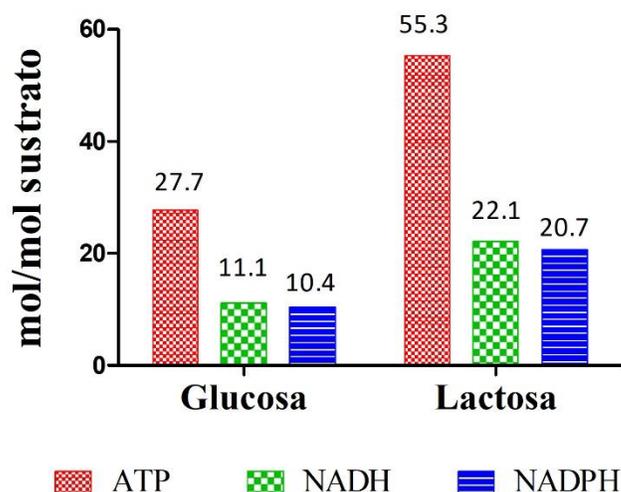
4.3.5 Rendimiento de ATP por sustrato

Los resultados obtenidos de rendimiento de ATP (27.7 mmol/g DCW h) a partir de glucosa es un valor que coincide con estudios *in silico* y rendimientos teóricos (Edirisinghe et al., 2016; Ruhdal Jensen et al., 1995). La lactosa como fuente de carbono proporciona un mayor flujo metabólico de moléculas energéticas (ATP) y cofactores (NADH y NADPH) que la glucosa, como se observa en la Figura 4.6 y en correspondencia con Pandi, et al. (2020).

Se ha encontrado en *E. coli* W que el uso de diferentes sustratos como galactosa y acetato como fuentes de carbono, a diferencia de la glucosa, aumenta el flujo de ATP (Farmer & Jones, 1976), lo que también podría ocurrir con la lactosa, ya que cuando se descompone en glucosa y galactosa y como no había galactosa extracelular durante la cinética con lactosa, el beneficio en este microorganismo podría establecerse mediante la fosforilación a nivel de sustrato en *E. coli* W, aunque la razón de esto parece variar según la naturaleza de la fuente de carbono (Farmer & Jones, 1976).

Figura 4.6

Rendimiento de mol de ATP, NADH y NADPH usando glucosa y lactosa como fuente de carbono



Correlacionando estos resultados respecto a FBA con ambos tipos de fuentes de carbono utilizadas, se podría decir que la lactosa no solo mejora el μ en *E. coli* W (Rosales-Colunga et al., 2012), sino que también potencia la biosíntesis de ATP; y por tanto, se espera que contribuya un aumento en la eficacia de transcripción del ADN y la traducción de ARN (Mori et al., 2019), además de favorecer la producción de metabolitos de interés, especialmente 2-KIV y L-valina que requieren sustrato NADPH.

4.3.6 Sensibilidad de los flujos

Esta prueba de robustez realizada en *E. coli* W permitió ver la sensibilidad de la velocidad específica de crecimiento, de producción de 2-KIV y L-valina (funciones objetivo) a través del consumo o biosíntesis de metabolitos a estudiar, observando los diferentes fenotipos y evaluando el efecto que tiene la fuente de carbono glucosa y lactosa.

Los efectos de variar la tasa de consumo de oxígeno, fuente de carbono, NH_4 y fosfatos (PI) sobre la capacidad de crecimiento de *E. coli* W, así como el efecto de ésta en la biosíntesis de 2-KIV y L-valina, es posible estimarlos en escenarios extremos como se muestran en la Figura 4.7. Se puede observar el mismo patrón de comportamiento para ambos sustratos (glucosa y lactosa), siendo más favorable la lactosa para velocidad específica de crecimiento en todos los escenarios analizados; al evaluar el efecto de consumo de oxígeno (al incrementarse), μ llega a un máximo de 0.87 a un flujo de 17.84 mmol $\text{O}_2/\text{g DCW}\cdot\text{h}$ con lactosa y 0.61 a un flujo de 13.32 mmol $\text{O}_2/\text{g DCW}\cdot\text{h}$ con glucosa, manteniéndose constante en ambos, no siendo necesario incrementar el flujo de consumo de oxígeno para lograr un aumento adicional en la tasa de crecimiento específico, estando estos resultados de consumo de oxígeno dentro del rango de datos encontrados (Carlson & Srienc, 2004; Fischer et al., 2004).

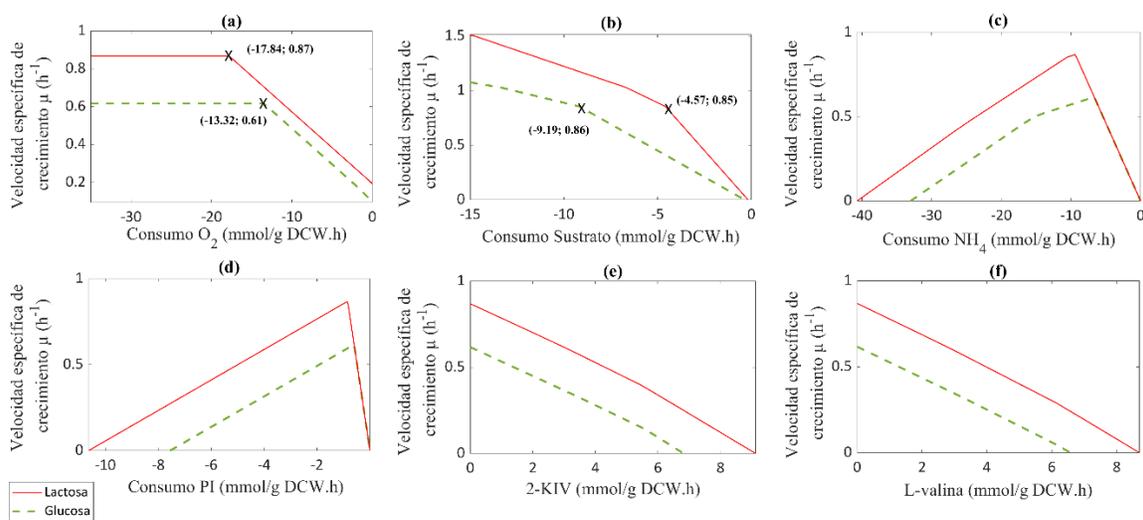
En cuanto a las diferentes fuentes de carbono (Figura 4.7b), valores iguales de μ requieren menores tasas de consumo con lactosa que con glucosa, debido a que la lactosa tiene el doble de moléculas de carbono (mencionado en apartados anteriores). Sin embargo, al correlacionar estos resultados con los comentados anteriormente, se corrobora que su dirección de flujo con la lactosa se desvía principalmente hacia la PPP, con mayor generación de ATP así como de cofactores

(NADH y NADPH), generando una mayor tasa de rendimiento para el crecimiento celular que al usar glucosa (Pandi et al., 2020). Es observado que las tasas de consumo de sustrato hasta los 5 mmol/g DCW.h para lactosa y hasta 8 mmol/g DCW.h para glucosa; disminuyen luego y considerablemente en ambos, pero siempre favoreciendo el consumo de sustrato y la tasa específica de crecimiento, siendo un 50% mayor para la lactosa respecto a la glucosa (Ver Figura 4.7b).

Por otra parte, la variación de tasa de consumo de NH_4 (Figura 4.7c) y PI (Figura 4.7d) tienen un comportamiento similar para la obtención de μ , una tasa de consumo rápida de estos sustratos hasta llegar a un óptimo, con posterior disminución de esa velocidad específica de crecimiento. Ahora bien, es posible lograr con lactosa mayor flujo de consumo tanto de NH_4 como de PI que glucosa, para obtener mayores velocidad específicas de crecimiento, esto es coherente con lo planteado por algunos autores, quienes demostraron que el fosfato es un modulador principal del metabolismo de lactosa en *E. coli* (Pandi et al., 2020).

Figura 4.7

Análisis de sensibilidad de la velocidad específica de crecimiento al variar el consumo de O_2 , fuente de carbono, NH_4 , PI y secreción de 2-KIV y L-valina



Por último, al determinar el efecto de la velocidad de crecimiento en la biosíntesis de 2-KIV (Figura 4.7e) y L-valina (Figura 4.7f), los cuales presentan relaciones inversas, mayor

velocidad de crecimiento implica menor flujo de 2-KIV y por ende menor flujo de L-valina. Se presenta un comportamiento muy lineal de biosíntesis de 2-KIV y de este para L-valina, obteniéndose los mismos valores de flujo de biosíntesis para las diferentes velocidades específicas de crecimiento analizadas, además es posible obtener mayores flujos de estos productos al emplear lactosa como sustrato.

4.3.7 Evaluación de diferentes funciones objetivos por FBA

La distribución de flujos metabólicos al realizar análisis de balances de flujos con diferentes funciones objetivos como maximizar crecimiento, producción de 2-KIV y L-valina por *E. coli* W usando como fuente de carbono glucosa y lactosa son mostrados en la Tabla 4.2, en ella se detallan algunas reacciones con su respectiva enzima involucrada y gen codificante. Estas reacciones están asociadas a los puntos de bifurcación en el flujo de glucosa, flujo en la vía PPP, los flujos de ingreso y salida de piruvato, vías anapleróticas de ciclo TCA y flujos particulares en la vía de biosíntesis de L-valina.

Como se ha discutido en apartados anteriores, la lactosa tiene una influencia significativa en el incremento de los flujos intracelulares, en los cuales se observa un mayor flujo de 2-KIV (Ex-2-KIV) y L-valina (Ex-val). También se obtuvo mayor flujo hacía PPP (G6PDH2r), identificando para los diferentes escenarios que el flujo en GND permanece constante lo que mostraría que la vía de Entner Doudoroff no está activa, solo la PPP. También se evidenció que en la ruta de la glucólisis en las reacciones GAPD y ENO para ambos sustratos no hay cambios considerables en sus flujos para las funciones objetivas utilizadas.

Al analizar los flujos en la vía anaplerotica del ciclo de TCA, reacción PPC (fosfoenol piruvato a oxalacetato) es notorio que se reduce el flujo al maximizar los flujos de 2 KIV y L-valina al compararlo con el resultado obtenido de maximización de μ , favoreciendo esto los flujos de los productos de interés. Donde se observó también un menor valor con lactosa de 5 mmol/g DCW.h, que benefició más la generación de producto comparado con glucosa.

Tabla 4.2

Distribución de flujos metabólicos principales por FBA con funciones objetivo μ , 2-KIV y L-valina en E. coli W usando como fuente de carbono glucosa y lactosa

Gen	Enzima	Abrev. reacción	Reacción	mmol C/g DCW.h (normalizado)					
				Glucosa			Lactosa		
				FBA μ	FBA 2-KIV	FBA L-val	FBA μ	FBA 2-KIV	FBA L-val
		μ	biomass_iCA1273_core_59p81M	0.617	0.432	0.432	0.868	0.608	0.608
Producción 2-KIV y L-valina extracelular									
<i>phoE</i> , <i>ompFN</i> C	Proteínas de transporte	<i>Ex-2-KIV</i>	EX_3mob[Extra_organism] ->	0.0	11.1	0.0	0.0	15.5	0.0
<i>phoE</i> , <i>ompFN</i> C	Proteínas de transporte	<i>Ex-val</i>	val_L[Extra_organism] ->	0.0	0.0	10.3	0.0	0.0	14.3
PPP y glicólisis									
<i>zwf</i>	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa	G6PDH2 _r	g6p + nadp <=> h + nadph + 6pgl	18.2	22.4	27.9	24.5	35.7	43.1
<i>gnd</i>	Fosfogluconato deshidrogenasa	GND	6pgc + nadp -> nadph + co2 + ru5p_D	18.2	22.4	27.9	24.5	35.7	43.1
<i>gapA</i>	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa	GAPD	pi + g3p + nad <=> h + 13dpg + nadh	35.7	36.3	35.4	54.1	54.0	52.8
<i>eno</i>	Enolasa	ENO	2pg <=> h2o + pep	32.5	34.8	33.2	49.6	50.9	49.6
<i>ppc</i>	Fosfoenolpiruvato carboxilasa	PPC	h2o + pep + co2 -> pi + h + oaa	7.3	5.11	5.11	10.3	1.14	1.4
<i>pykAF</i>	Piruvato quinasa	PYK	adp + h + pep -> pyr + atp	4.1	13.0	6.8	14.0	24.0	23.8
<i>aceF</i>	Piruvato deshidrogenasa	PDH	coa + nad + pyr -> co2 + nadh + accoa	15.6	7.5	7.6	7.6	0.0	0.0
<i>ilvC</i>	reductoisomerasa de ácido cetólico 2,3-dihidroxi 3-metilbutanoato	KARA1	h + alac_S + nadph <=> 23dhmb + nadp	1.1	14.5	14.5	1.5	20.31	20.3
<i>ilvD</i>	dihidroxiácido deshidratasa 2,3-dihidroxi 3-metilbutanoato	DHAD1	23dhmb -> 3mob + h2o	2.7	13.0	12.1	3.8	18.1	16.9
Ciclo TCA									
<i>mdh</i>	Malato deshidrogenasa	MDH	mal_L + nad <=> h + nadh + oaa	14.3	6.0	6.1	21.6	15.0	15.0
<i>gltA</i>	Citrato sintasa	CS	h2o + oaa + accoa -> cit + h + coa	21.5	9.0	9.25	32.6	4.4	5.2
<i>acnB</i>	Aconitasa B Isocitrato hidro liasa	ACONT _b	acon_C + h2o <=> icit	21.5	9.0	9.25	32.6	4.4	5.2
<i>icd</i>	Isocitrato deshidrogenasa NADP	ICDHyr	icit + nadp <=> nadph + akG + co2	21.5	9.0	9.25	32.6	4.4	5.2
<i>sucAB</i> <i>lpd</i>	Oxogluterato deshidrogenasa	AKGDH	akg + coa + nad -> co2 + nadh + succoa	14.6	5.2	5.39	22.5	0.4	1.1
<i>aceA</i>	Isocitrato liasa	ICL	icit -> glx + succ	0.0	0.0	1.5	0.0	9.1	8.7
<i>aceB</i>	Malato sintasa	MALS	glx + h2o + accoa -> mal_L + h + coa	0.002	0.001	1.5	0.002	6.1	5.8
<i>fumAC</i>	Fumarasa	FUM	h2o + fum <=> mal_L	14.3	6.0	6.1	21.6	8.9	9.2

Nota. EX: Intercambio, 3mob: 2-KIV, val_L: L-valina, g6p: glucosa-6p, 6pgl: gluconato-6P-1,5-lactona, 6pgc: gluconato-6P, ru5p: ribulosa 5-fosfato, g3p: gliceraldehído -3p, 13dpg: 3-fosfo-D-gliceroil fosfato, 2pg: glicerato-2-

fosfato, pi: fosfato, pep: fosfoenolpiruvato, oaa: oxaloacetato, pyr: piruvato, Accoa: acetil-CoA, alac_S: (S)- 2-acetolactato, 23dhmb: (R)-2,3-dihidroxi-3-metilbutanoato, mal: malato, cit: citrato, coa: coenzima-A, acon: cis-aconitato, icit: isocitrato, akg: 2-Oxoglutarato, succoa: succinil-CoA, glx: glioxilato, succ: succinato, fum: fumarato.

Como se ha dicho constantemente en los análisis realizados, al haber menor flujo de carbono con glucosa que con lactosa, se puede apreciar que la mejor solución en el espacio para la maximización de L-valina es la atenuación del gen *pykAF* (reacción PYK) al usar glucosa, algo no deseado metabólicamente, puesto que el direccionamiento de mayor flujo del fosfoenol piruvato hacia el TCA sería a través de la reacción anaplerótica PPC. Asimismo, y gracias a un mayor flujo de carbono al usar lactosa, se encontró que incrementar el flujo en PYK es viable para el incremento de μ , 2-KIV y L-valina.

Para lograr las máximas cantidades encontradas *in silico* de 2-KIV y L-valina usando lactosa en los medios de fermentación, según la Tabla 4.2, es probable la delección del gen *aceF* (reacción PDH), para evitar direccionar piruvato hacia Acetil-CoA, mejorando el flujo de carbono tanto con glucosa como lactosa hacia la ruta de síntesis de aminoácidos de cadena ramificada (Park et al., 2007), donde están involucrados las reacciones KARA1 y DHAD1, como se aprecia en la Tabla 4.1. Los genes involucrados *ilvC* e *ilvD*, son de vital importancia sobreexpresarlos con el fin de obtener una máxima producción de 2-KIV y L-valina (Novak et al., 2020), esto al evidenciarse aproximadamente cuatro veces más flujo en comparación con la función objetivo μ .

Entre las reacciones apreciables del ciclo TCA (MDH, CS, ACONTb, ICDHy, AKGDH, ICL, MALS, FUM), se observa que para una óptima producción de los metabolitos de interés (2-KIV y L-valina) en comparación a μ , cabría la posibilidad de que este ciclo se viera afectado, y por ende la generación de metabolitos claves para la generación de biomasa (Tabla 4.2). La resolución *in silico* al usar lactosa, da por defecto la activación de rutas anapleróticas como ICL; por tanto, la delección del gen *mdh* contribuye a que el flujo de carbono se reduzca en el TCA (malato a oxalacetato (MDH)), y posteriormente todo el flujo acumulado se direcciona hacia piruvato, incrementando los flujos metabólicos y disponibilidad de carbono en la ruta de síntesis de aminoácidos de cadena ramificada (Park et al., 2007). Además, también podría aumentar el flujo hacia piruvato con la delección del gen *pf1B* (delección de la producción de ácido fórmico) (Hao et al., 2020).

4.3.8 Análisis de reacciones esenciales

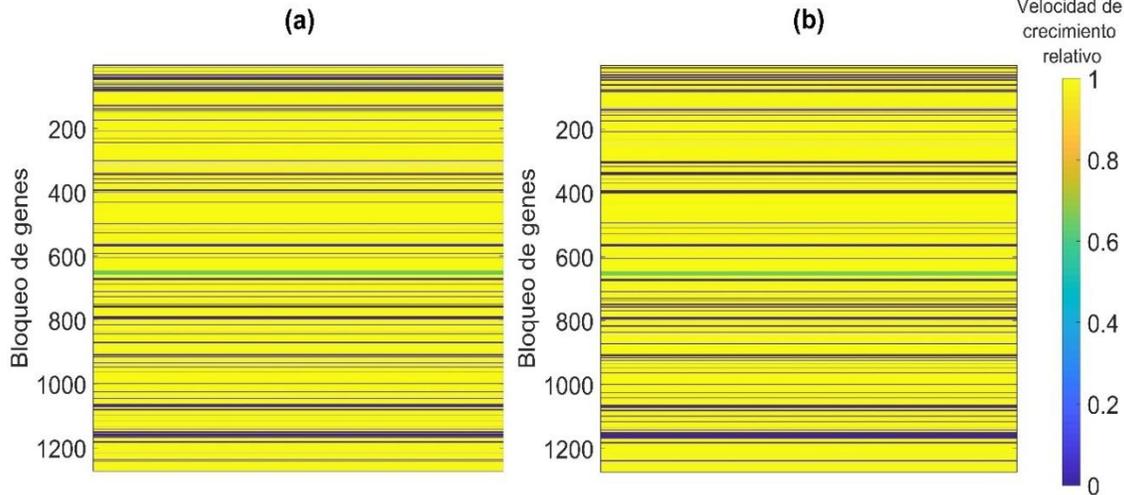
Un análisis completo de las reacciones y genes esenciales que requiere *E. coli* W para su crecimiento óptimo en glucosa o lactosa como fuentes de carbono, y su comparación con los estudios del apartado anterior, nos proporcionaría información sobre las posibles vías afectadas que intervienen en la producción de 2-KIV y L-valina.

Usando glucosa y lactosa como fuentes de carbono, fueron encontrados 202 y 205 reacciones, respectivamente (Datos_Suplementarios-SP2), que serían necesarias tanto para el crecimiento de biomasa como para la producción de los metabolitos de interés, en la Figura 4.8, se muestra los genes (en número según el modelo metabólico) que podría llevar a una velocidad de crecimiento relativo a cero si son deletados, que en correlación a la información presentada en la Tabla 4.2, se puede extraer que las reacciones G6PDH2r (codificada por *zwf*) y ENO (codificada por *eno*) son esenciales y por ende no se deberían deletar. Estos genes son importantes por su conexión con la PPP y el flujo hacia el TCA desde la vía de la glicólisis, respectivamente.

Otras reacciones encontradas son las de consumo de nutrientes, al realizar un análisis de robustez a cada una de ellas, se encontró un incremento en el consumo de NH_4 como sustrato (Figura 4.9). Si bien no se encontró NH_4 como nutriente de entrada como reacción esencial, por un lado, sí existe un efecto significativo en cuanto al consumo, ya que para la lactosa existe una mayor tasa de biosíntesis de ambos productos que con la glucosa, pero por otro lado, y a diferencia del 2-KIV, un punto óptimo de flujo de consumo de NH_4 se encuentra en la L-valina (lactosa: $-9.45 \text{ mmol NH}_4/\text{g DCW.h}$; glucosa: $-6.73 \text{ mmol NH}_4/\text{g DCW.h}$). Esto demuestra que L-valina requiere fuentes de nitrógeno para su óptima producción (Maser et al., 2020; Shabala et al., 2001).

Figura 4.8

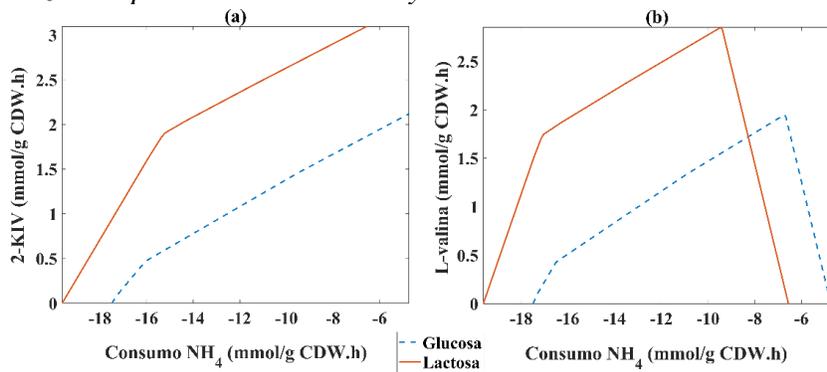
Análisis de genes esenciales para la maximización de la producción de L-valina



Nota. a: Genes esenciales encontrados al usar glucosa, b: genes esenciales encontrados al usar lactosa.

Figura 4.9

Análisis de robustez de la producción de 2-KIV y L-valina mientras se varía el consumo de NH_4



4.4 Conclusiones

La lactosa como fuente de carbono tiene un efecto diferencial con respecto a la glucosa en *E. coli* W, puesto que incrementa el flujo de carbono hacia PPP incrementando los niveles de NADPH y genera mayores moléculas de energía en forma de ATP. Los estudios *in silico*, mostraron que el metabolito 2-KIV es el principal precursor para la biosíntesis de L-valina.

Los estudios metabólicos a nivel de sistemas, nos permitieron ver que la lactosa mejora las capacidades de *E. coli* W en cuanto a μ y las producciones de 2-KIV y L-valina. En este sentido las reacciones ACLS (codificado por *ilvB*, *ilvN*), KARA1 (codificado por *ilvC*), DHAD1 (codificado por *ilvD*) y ILVE (codificado por *ilvE*) se postulan como candidatas a sobreexpresar. También, se puede concluir que mutaciones dirigidas de *aceF*, *mdh*, *ppc* o *pflB*, incrementarían las producciones de piruvato y por ende de 2-KIV y L-valina.

Capítulo 5. *Escherichia coli* W diseñada metabólicamente para incrementar la producción de 2-cetoisovalerato y L-valina usando glucosa, lactosa y lactosuero como fuentes de carbono

5.1 Introducción

En la actualidad, ha aumentado el interés en la investigación del uso de residuos agrícolas y agroindustriales como medios de cultivo en procesos de fermentación a escala industrial con el fin de reducir los costos de producción. Reemplazar materias primas como la glucosa es un desafío, ya que son notorios los bajos rendimientos, los altos costos de producción y la inclusión de metabolitos tóxicos en el medio de fermentación (Lopes et al., 2019; N. Ren et al., 2011). La integración de la biología sintética y la Ingeniería metabólica se postulan como aproximaciones interesantes para producir moléculas novedosas y complejas dado su potencial en el mejoramiento de rutas metabólicas bajo escenarios nutricionales variados (Cheong et al., 2018). En ese sentido, la búsqueda de nuevos chasis bacterianos no tradicionales que ofrezcan ventajas metabólicas y de crecimiento para el aprovechamiento de residuos como nuevas fuentes de carbono, también es un desafío, siendo ideal el empleo de cepas que no presenten fenómenos de represión catabólica (Calero & Nickel, 2019). A pesar de esto, hay necesidad de estudiar nuevos chasis para valorar nuevas fuentes de carbono como medio de cultivo, es así como, el lactosuero que es una mezcla de azúcares con lactosa como principal carbohidrato, que podría generar crecimiento diáuxico al utilizar *E. coli* en fermentaciones (Alva et al., 2020; Carranza-Saavedra et al., 2021).

Obtener lactosa en forma pura suele ser más cara que la glucosa; caso contrario es si esa lactosa proviene del lactosuero, se esperaría que fuera más económico en comparación con la glucosa (Amado et al., 2016; Silva et al., 2015), todo esto lo convierte en un compuesto prometedor como medio de cultivo.

Por otro lado, el incremento en el uso de biocombustibles ha dado lugar a estudios en la optimización de la producción de 2-KIV por vía fermentativa (Gu et al., 2017), este cetoácido es un importante precursor en la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) como la L-valina, entre otras importantes moléculas como pantotenato, coenzima A y glucosinolato (Neinast et al., 2019). Si bien se conoce la producción de 2-KIV a partir de *Klebsiella pneumoniae*

(Gu et al., 2017) y *C. glutamicum* (Buchholz et al., 2013), no se encontraron estudios empleando *E. coli*.

En este estudio, *E. coli* W, que tiene una alta tolerancia al estrés por acidificación en su medio de crecimiento y su capacidad para usar lactosa como fuente de carbono (Archer et al., 2011), se utilizó como chasis para la producción de 2-KIV y por ende L-valina. Este microorganismo fue diseñado racionalmente para una fermentación ideal sin auxotrofia vitamínica u otros suplementos como aminoácidos. Se usó una mezcla de azúcares, para poder evidenciar si habría crecimientos diaúxicos y por ende deletar genes de transporte y mejorar así, el óptimo transporte de azúcares al interior de la célula. Además, fueron usados como fuentes de carbono glucosa y lactosa en forma pura y lactosuero como materia prima alternativa, con el fin de obtener una producción de alto rendimiento de 2-KIV y demostrar que la inhibición por retroalimentación de la L-valina se elimina al introducir el gen *alsS* en el sistema de sobreexpresión realizado. Este capítulo fue construido con el fin de cumplir con el último objetivo específico de tesis doctoral: “Construir una plataforma de *E. coli* para maximizar la producción de 2-cetoisovalerato como precursor de L-valina”

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Cepa, plásmidos, cebadores y ADN utilizados

Las cepas y los plásmidos utilizados en este estudio se describen en la Tabla 5.1 los ADN (represor/promotor, cargo, Sitio de Unión al Ribosoma (RBS) y terminadores de transcripción), el casete diseñado y los cebadores para realizar y verificar el casete utilizado se enumeran en las Tablas A5.1, A5.2 y A5.3 de los anexos.

Tabla 5.1

Cepa, plásmidos y ADN utilizados en este estudio

Cepa	Genotipo	Fuente
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>fhuA2</i> Δ (<i>argF-lacZ</i>)U169 <i>phoA glnV44</i> Φ 80 Δ (<i>lacZ</i>)M15 <i>gyrA96</i> <i>recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	New England BioLabs (NEB)
<i>E. coli</i> W	Tipo silvestre (ATCC 9637) (WT)	www.atcc.org
WT Δ mdh- aceF	<i>E. coli</i> W, Δ mdh- <i>AceF</i>	Este estudio
<i>E. coli</i> W1288	<i>E. coli</i> W, Δ mdh- <i>AceF</i> , pSEVA681	Este estudio
<i>E. coli</i> W1294	<i>E. coli</i> W, pSEVA681-kiv	Este estudio
<i>E. coli</i> W1262	<i>E. coli</i> W, Δ mdh- <i>AceF</i> , pSEVA681-kiv	Este estudio
Plásmido	Descripción	Fuente
pSLTS	ori SC101(Ts) Resistencia ampicilina; ParaB para λ -Red; PtetR para I-SceI Gama, beta, exo,	(Kim et al., 2014)
pSEVA182	Amp ^r , pUC ori, cargo: lacZ α -pUC19	(Martínez-García et al., 2022)
pSBG422	Sitio I-SceI y un gen de resistencia a la kanamicina con sitios SacI/BamHI y SacI/BamHI pUC origen (vector de clonación de alto número de copias con resistencia a kanamicina y ampicilina)	(Martínez-García et al., 2022)
pSEVA681	Gm ^r , pUC, cargo: MCS-default,	(Martínez-García et al., 2022)
pSEVA681-kiv	Gm ^r , pUC ori, CDS: XylS/Pm- <i>alsS-ilvD-ilvC</i> , RBS-ST, terminador Te6 y dummy	Este estudio

5.2.2 Reactivos y medios de cultivo

Se adquirió lactosuero en polvo seco por aspersion grado alimenticio, que contenía 88 % de lactosa y 12 % de proteína p/p (Cimpa S.A.S., Bogotá, Colombia), mientras que todos los demás reactivos utilizados fueron grado analítico. Como medio de crecimiento se utilizó el medio mínimo M9 con metales trazas diluido en HCL 1 N y 2 g/L de fuente de carbono, así como medio de fermentación suplementado con 1 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de fuente de carbono. El medio de fermentación con lactosuero se preparó a partir de una solución madre reconstituyendo 10 g de lactosa del lactosuero en polvo a un volumen final de 100 mL de agua destilada. Todos los medios y soluciones se esterilizaron a 121 °C durante 15 min antes de su uso, excepto los metales trazas, el pH inicial fue ajustado a 7.0.

5.2.3 Manipulación del ADN

Se usó *E. coli* DH5 α como huésped de clonación para la construcción de plásmidos y casetes. Fue usado *E. coli* W como cepa inicial para manipulaciones genéticas. Las ADN polimerasas y otras enzimas modificadoras del ADN se adquirieron de New England Biolabs (Ipswich, EE. UU.) y los oligonucleótidos se adquirieron a través de Sigma-Aldrich (Madrid, España). Los kits de purificación de ADN se adquirieron de Nyztech (Lisboa, Portugal). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler Nexus Gradient (Eppendorf, Alemania). Los productos de PCR obtenidos fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % o al 1.5 % utilizando tampón Tris-acetato 1X. Los antibióticos ampicilina (100 μ g/mL), kanamicina (50 μ g/mL) y gentamicina (10 μ g/mL) fueron agregados a cada uno de los medios y agares según la necesidad.

5.2.4 Cultivo en matraces

Todas las cepas fueron activadas desde glicerol en agar LB a 37 °C durante 24 h. Las cepas se inocularon en 25 mL de LB (cultivo semilla) en matraces de 250 mL y posteriormente fueron incubados durante la noche a 37 °C con agitación a 250 rpm en Shaker MaxQ 4000 (Thermo Scientific, EE. UU.). Los cultivos semillas se centrifugaron (5200 g) y se lavaron con NaCl (0.85 % p/v), para ser inoculados en 25 mL de medio de cultivo (preinóculo) a 37 °C y 250 rpm durante 24 h. El preinóculo se lavó con NaCl y se transfirió a un matraz de 250 mL que contenía 20 mL de medio de producción y luego fue cultivado a 37 °C con agitación a 250 rpm durante 24 h, se empleó una densidad óptica inicial (OD₆₀₀) de 1.0. Fue añadido el inductor 3MB 0.5 mM a los medios de fermentación (ensayos previos). Todos los experimentos en matraces se realizaron por triplicado y los datos obtenidos se expresaron como la media \pm error estándar.

5.2.5 Análisis a nivel de sistema de azúcares

Para la cinética de crecimiento se cultivaron todas las cepas a 37 °C con agitación a 250 rpm por 13 h, con una OD₆₀₀ inicial de 0.1, utilizando glucosa, lactosa, galactosa, sacarosa, fructosa y maltosa como fuentes de carbono y una mezcla de todos los azúcares a una concentración de 2 g/L en medio de crecimiento, con el fin de observar posibles crecimientos diáuxicos. Además, se realiza validación de información experimental, realizando de forma aislada la cinética decrecimiento de *E coli* W con cada azúcar utilizado mezcla de este con glucosa en proporciones de 25:75 y 50:50 (glucosa:otro azúcar), de tal forma que la concentración final de azúcares en el medio fuera de 2 g/L.

5.2.6 Análisis de flujo metabólico

El Modelo metabólico iCA_1273 (MODEL1507180010) fue tomado de la base de datos BioModels (<https://www.ebi.ac.uk/biomodels/>) y usado para los modelamientos de cepas tipo silvestre (*E. coli* W WT) y mutadas (*E. coli* W1262). Este modelo metabólico le fue adicionado el flujo de salida para la producción de 2-KIV, quedando con 2,480 reacciones.

Restricciones para este sistema fueron μ de 70% (obtenida en los resultados del capítulo 4 – Tabla 4.1), el flujo de consumo de oxígeno (-18 mmol O₂/g DCW.h) (Carlson & Srienc, 2004; Fischer et al., 2004) y función objetivo la maximización de la producción de 2-KIV.

El análisis *in silico* se realizó en MATLAB R2018a con COBRA Toolbox v.3.0 y solucionador Gurobi (versión 9.5.1). Se realizó un muestreo de Monte Carlo para observar la variabilidad de frecuencia y flujo en las vías que muestran un posible aumento de la producción de pyr, 2-KIV y L-valina. El muestreo fue realizado con 35,000 puntos y 4 horas de duración (ensayos previos) (Heirendt et al., 2019), con las restricciones de la delección de genes, estableciendo reacciones con flujo de carbono a 0. El set de genes seleccionados para restringir el modelo y observar las variaciones de solución para la obtención del metabolito deseado, fueron escogidas principalmente por resultados del capítulo 4 que evidenciaban delecciones importantes para un aumento de flujo de carbono hacia 2-KIV y L-valina, como también en comparación con los

resultados en este capítulo y la literatura para redireccionamiento de flujo de carbono hacia piruvato. Las reacciones evaluadas por muestreo de Monte Carlo fueron enumeradas en la Tabla 5.2 y que fueron seleccionadas según la importancia mostradas en los resultados del capítulo 4 y este capítulo para la producción de 2-KIV y L-valina.

Tabla 5.2

Reacciones evaluadas en el Muestreo de Monte Carlo en E. coli W

Gen	Enzima	Reacción abreviación	Reacción
<i>pykAF</i>	Piruvato quinasa	PYK	adp + h + pep -> pyr + atp
<i>ilvBN, ilvGM, ilvIH</i>	Acetolactato sintasa	ACLS	h + 2pyr -> alac + co2
<i>ilvD</i>	Dihidroxiácido deshidratasa	DHAD1	23dhmb -> 2-KIV + h2o
<i>phoE, ompFNC</i>	Proteínas de transporte	EX-2KIV	EX_2-KIV[Extra_organism] ->
<i>phoE, ompFNC</i>	Proteínas de transporte	EX-valina	val_L[Extra_organism] ->
<i>maeB</i>	Malato deshidrogenasa ubiquinona-8	ME2	mal_L + nadp -> nadph + co2 + pyr
<i>aceF</i>	Piruvato deshidrogenasa	PDH	coa + nad + pyr -> co2 + nadh + accoa
<i>ppc</i>	Fosfoenolpiruvato carboxilasa	PPC	h2o + pep + co2 -> pi + h + oaa
<i>mdh</i>	Malato deshidrogenasa	MDH	mal_L + nad <=> h + nadh + oaa
<i>phoE, ompFNC</i>	Proteínas de transporte	EX-acetato	ac_e[Extra_organism] ->
<i>phoE, ompFNC</i>	Proteínas de transporte	EX-formiato	for_e[Extra_organism] ->
<i>aceA</i>	Isocitrato liasa	ICL	icit -> glx + succ
<i>icd</i>	Isocitrato deshidrogenasa - NADP	ICDHyr	icit + nadp <=> nadph + akg + co2
<i>sucAB lpd</i>	Oxogluterato deshidrogenasa	AKGDH	akg + coa + nad -> co2 + nadh + succoa

Nota. EX: Intercambio, 2-KIV: 2-KIV, val_L: L-valina, pi: fosfato, pep: fosfoenolpiruvato, oaa: oxaloacetato, pyr: piruvato, Accoa: acetil-CoA, alac: 2-Acetolactato, 23dhmb: 2,3-Dihidroxi-3-metilbutanoato, mal: Malato, coa: Coenzima-A, icit: Isocitrato, akg: 2-Oxoglutarato, succoa: succinil-CoA, glx: glioxilato, succ: succinato.

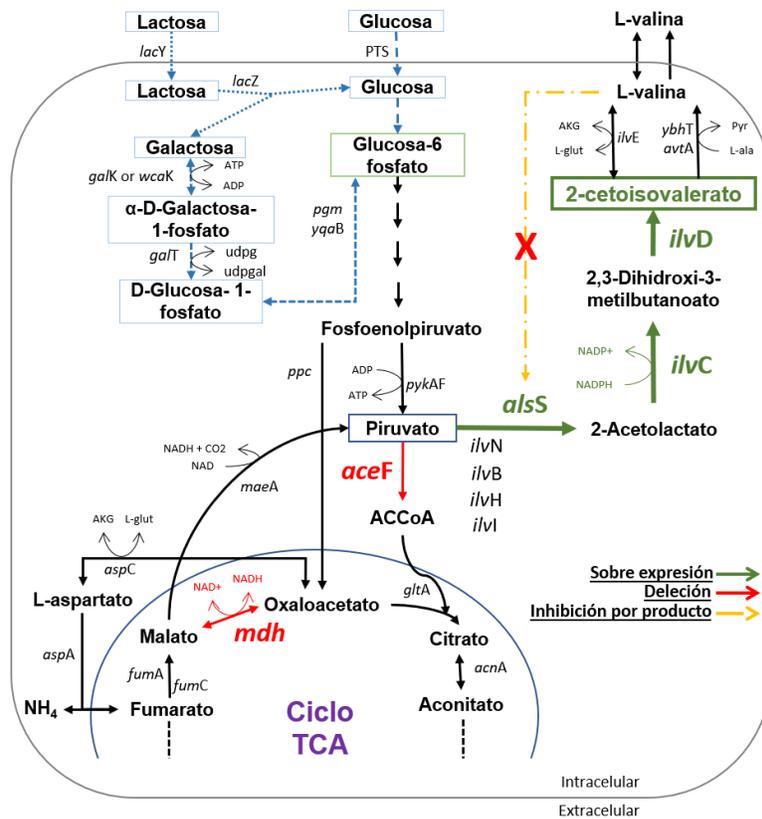
5.2.7 Diseño de *E. coli* W1262

La estrategia para obtener *E. coli* W1262 diseñada para producir 2-KIV se muestra en la Figura 5.1 (esquema diseñado a partir de las reacciones encontradas en el modelo iCA_1273), donde se observa las delecciones de los genes *aceF* y *mdh* realizadas para aumentar el flujo

metabólico hacia pyr y posteriormente hacia la vía de biosíntesis de L-valina a sobreexpresar (línea gruesa verde). Los genes de la vía de la biosíntesis de L-valina, en especial los que regulan la vía hasta 2-KIV fueron sobreexpresados: acetolactato sintasa, cetol-ácido reductoisomerasa y dihidroxi-ácido deshidratasa codificados por *alsS*, *ilvC* e *ilvD*, respectivamente. Fue introducido el gen *alsS* de *Bacillus subtilis* en el sistema de sobreexpresión (Felpeto-Santero et al., 2015), con el fin de eliminar la inhibición por retroalimentación de L-valina, que a concentraciones mayores de 1.8 mg L-valina/L puede inhibir el crecimiento celular en algunas cepas de *E. coli* (Park et al., 2007; Takpho et al., 2018).

Figura 5.1

Esquema resumen de *E. coli* W modificada para la sobreproducción de 2-cetoisovalerato (2-KIV) y L-valina



Nota. Acetil-CoA (ACCoA), ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Ciclo TCA). Rutas y reacciones obtenidos a través de modelo a escala genómica: MODEL1507180010 (iCA_1273) de la base de datos BioModels (<https://www.ebi.ac.uk/biomodels/>).

Con el objetivo de evitar la inhibición por retroalimentación en AHAS y aumentar el flujo de carbono de pyr a 2-acetolactato, múltiples estudios han introducido el gen *alsS* de *B. subtilis* mejorando el flux de carbono a L-valina y 2-KIV (Hao et al., 2020; Jung et al., 2020). Si no hay inhibición por retroalimentación para L-valina, la producción de este aminoácido siempre será positiva, aunque no haya sobreexpresión de *ilvE* e *ybhT-avtA* (Park et al., 2007).

5.2.7.1 Construcción de mutantes (inactivación génica)

Las deleciones de los genes *aceF* y *mdh* se realizaron mediante mutación cromosómica completa según metodología de Kim et al. (2014). El plásmido pSLTS que contenía los genes recombinantes λ Red (*exo*, *bet* y *gam*) fue expresado en *E. coli* W, así como los cassetes construidos mediante corte por enzimas de restricción tipo II y posterior unión con ligasas en este estudio pSEVA182_aceF_Arm1y2 y pSEVA182_mdh_Arm1y2 (Figura A5.1. y A5.2. de los anexos), generando la cepa WT Δ *mdh-aceF*. En la Figura 5.2 se muestra un esquema resumen sobre la estrategia aplicada para la delección de genes en este trabajo doctoral.

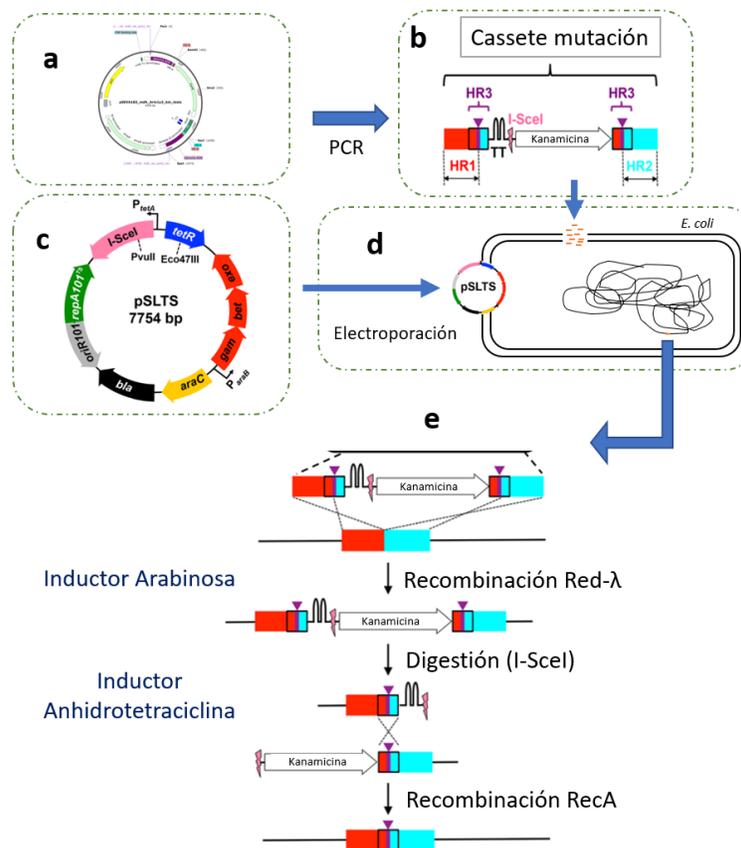
El método de mutación genómica siguió los siguientes pasos que son mostrados en la Figura 5.2:

- a- Diseño de plásmidos con cassette (300 pares de bases) de ADN correspondiente a regiones homólogas del genoma de *E. coli*. Este cassette incorpora también gen con resistencia a kanamicina (*kn*) y ampicilina (*amp*) para seleccionar cepas por fenotipado en agar LB+*kn*+*amp*, y diana de restricción para la digestión de ADN con I-SecI.
- b- Por técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es amplificado fragmentos de ADN que contienen las regiones homólogas a recombinar en el genoma con resistencia a *kn* para su selección por fenotipado.
- c- El plásmido pSLTS fue adquirido a través de la colaboración con Kim et al. (2014) con gen de resistencia a *amp* y termosensible a temperaturas mayores de los 30 °C, en el cual tenía incluido las proteínas de recombinación Red- λ (*gam*, *bet*, *exo*) activada su transcripción por inducción de arabinosa, y secuencia de la enzima de restricción I-SecI inducida por anhidrotetraciclina (AHT).

- d- Mediante electroporación es insertado dentro de *E. coli* el plásmido pSLTS y posteriormente, luego de inducir con arabinosa (15mM) durante el crecimiento en caldo LB+amp a 30 °C, son electroporados los cassetes diseñados (fragmentos amplificados por PCR).
- e- Luego de aislar bacterias crecidas en placas de agar LB+amp+kn a 30 °C, son resuspendidas en solución salina y plaqueadas en agar LB+amp+AHT con el fin de inducir I-SecI, la digestión de ADN por I-SecI permitió la eliminación de la resistencia a kn luego de que *E. coli* por acción de las proteínas de la familia RecA recombinasa, recombinara las regiones homólogas con 25 pares de bases en los extremos del cassette diseñado. Finalmente, el microorganismo es curado, al cultivarse en agar LB a 40 °C y eliminar el plásmido pSLTS con resistencia a amp.

Figura 5.2

Esquema resumen de la estrategia para delección de genes realizados en E. coli



Nota. Fuente adaptada de Kim et al. (2014). HR: región de homología, PCR (Técnica reacción en cadena de la polimerasa).

5.2.7.2 Construcción de sistemas de expresión sintética

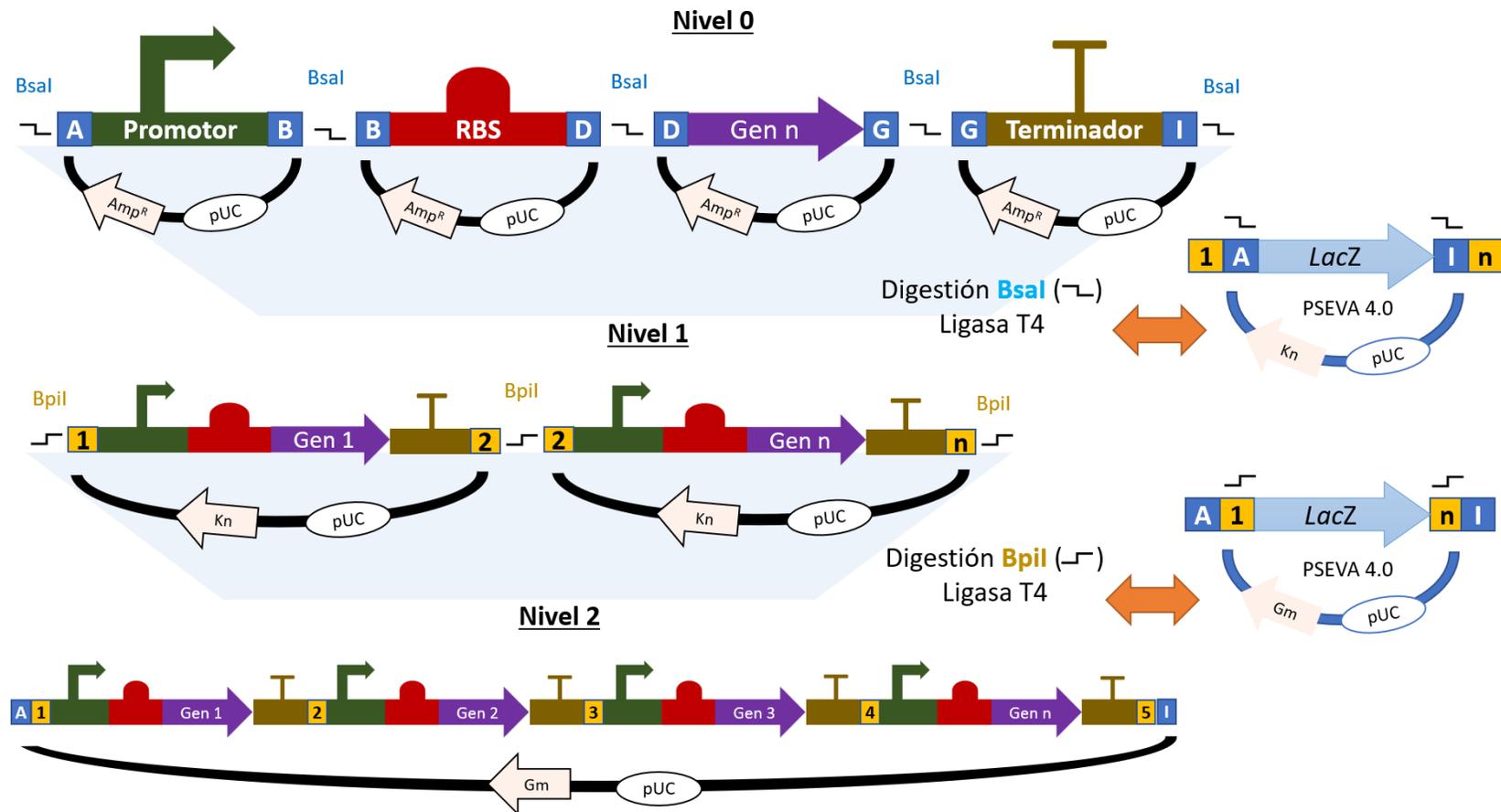
Se construyó un sistema de expresión sintética a través de vectores SEVA 4.0 y el sistema de clonación modular basado en Golden Standard (Blázquez et al., 2022; Martínez-García et al., 2022). En la Figura 5.3 es mostrado el diseño simultáneo de los sistemas de sobre expresión que permitió realizar un ensamblaje estandarizado de construcciones multigénicas. La estructura del plásmido pSEVA681-kiv se realizó con el sistema de expresión XylS/Pm, activado con 3-metilbenzoato (3MB).

El método para la sobre expresión de genes deseados fue estructural, desde el diseño de niveles 0 hasta niveles 2, como se muestra en la Figura 5.3:

- La creación de los niveles 0, fue realizado mediante la compra o clonación por PCR de fragmentos de ADN (promotores, RBS, CDS (gen n), terminadores). En el cual, en sus extremos fueron adicionados sitios de reconocimiento para digestión con extremo cohesivo de ADN por enzima BsaI (posición A: GCAG, B: TACT, D: AATG, G: GCTT, I: CGCT, n). Estos niveles 0 fueron construidos en vectores tipo SEVA 4.0 con resistencia a amp para ser transformados en *E. coli* DH5 α para su posterior clonación y verificación por secuenciación, cómo también los niveles 1 (Kn) y 2 (Gm).
- Estos niveles 0 fueron digeridos y ligados en una sola reacción con vectores tipo PSEVA 4.0 por enzimas BsaI y ligasa de ADN T4, respectivamente. Estos vectores estarían diseñados para que los niveles cero (promotor, RBS, CDS (Gen n) y terminadores) al construirse en un solo vector, les sea conferido sitios de reconocimiento de la enzima BpiI en posición deseada según el sitio de digestión (1: TGCC;2: GCAA, 3: ACTA, 4: TTAC, 5: CAGA, n), además de conferir resistencia a Kn y así, en la clonación se pudiera identificar por fenotipo (agar LB + Kn).
 - Luego en una reacción de un solo recipiente con vector tipo PSEVA 4.0 con resistencia a Gm, es digerido y ligado por BpiI y ligasa T4 los niveles 1, respectivamente. El vector usado tuvo la característica de contener sitios de reconocimiento de BpiI según el número de niveles 1 a ensamblar, por ejemplo, en la Figura 5.3, el nivel 2 a construir, su vector deberá estar construido con posición 1-5 para el multiensamblaje de 4 genes diferentes y construir un circuito genético de sobreexpresión.

Figura 5.3

Esquema por niveles en la construcción de un sistema de sobre expresión de genes por método de Golden Standard



5.2.8 Técnicas analíticas

La cuantificación de biomasa se realizó mediante técnica espectrofotométrica, por lectura OD₆₀₀, empleando un espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis (Thermo Scientific, EE. UU.). Los valores obtenidos de OD₆₀₀ se correlacionaron con el peso de célula seca por litro (g DCW/L) mediante la Ecuación: $g\ DCW/L = OD_{600} * 0.452$ (Erian et al., 2018).

Para determinar la concentración de azúcares (glucosa y lactosa) se utilizó el método DNS y se cuantificó mediante técnicas espectrofotométricas (Carranza-Saavedra et al., 2021; Miller, 1959), la absorbancia de la muestra fue medida a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis (Thermo Scientific, EE. UU.). Se utilizaron concentraciones de glucosa y lactosa de 0.5 a 8 g/L para obtener curva de calibración para cada tipo de azúcar.

La concentración de ácidos orgánicos y de L-valina se determinaron por HPLC. Todas las muestras se filtraron previamente utilizando un filtro de jeringa de nitrato de celulosa de 0.2 µm antes de ser inyectadas en el HPLC Siguiendo el método descrito por Kerem et al. (2004), el equipo empleado fue un HPLC Thermo Ultimate 3000 (Thermo Scientific, EE. UU.) equipado con una bomba cuaternaria, un inyector automático, un conjunto de termostato de columna y un detector de arreglo de diodos con detección UV. Fue utilizada una columna Zorbax Bonus-RP (4,6x250 mm, Agilent, EE. UU.), tamaño de partícula de 5 µm, para la cuantificación de 2-KIV. Para la fase móvil se prepararon los disolventes A (ácido trifluoroacético al 0.2% en agua, pH 1.96 y B (acetonitrilo). El volumen de inyección fue de 20 µL, se requirieron 10 minutos de equilibrio (disolvente A) antes de la siguiente inyección. La elución comenzó a 0.8 mL/min con un paso isocrático de solvente A (15 min), luego se aplicó un gradiente lineal de 0 a 50 % B durante los siguientes 5 min y luego 5 min a 80 % de solvente B. La temperatura de la columna fue de 30 °C y la detección fue a 210 nm. Se emplearon ácidos orgánicos a concentraciones de 3 a 30 mM, estos fueron usados para obtener las curvas de calibración (estándar externo).

Para la cuantificación de aminoácidos (L-valina) se siguió la metodología de Cigić, et al. (2008). Para cuantificar aminoácidos primarios se requirió de una prederivatización in

situ con orto-ftalaldehído y ácido 3-marcapropiónico (OPA/3-MPA). se empleó una precolumna Zorbax Eclipse AAA 4.6 x 12.5 mm con tamaño de partícula 5 μm y una columna Zorbax Eclipse AAA-C18 4.6 x 75 mm, tamaño de partícula 3.5 μm (Agilent, EE. UU.). U.S.A), se la temperatura empleada de la columna fue 40 $^{\circ}\text{C}$ y la detección a 338 nm. Una curva estándar de aminoácidos a concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 $\mu\text{mol/mL}$ fue utilizada para la cuantificación (estándar externo).

5.2.9 Parámetros cinéticos

La velocidad de crecimiento específica (μ) se calculó mediante la regresión lineal del logaritmo natural de g DCW/L y el tiempo (Ecuación 5.2), y el cálculo de los rendimientos de sustrato en biomasa (Ecuación 5.3), sustrato en el producto (Ecuación 5.4) y biomasa en el producto (Ecuación 5.5) se realizó mediante la relación de concentración de biomasa seca producida, concentración de glucosa consumida y valores de concentración de producto total, respectivamente.

$$\mu = \frac{dX}{Xdt} \quad (5.2)$$

$$Y_{X/S} = \frac{dX}{dS} \quad (5.3)$$

$$Y_{P/S} = \frac{dP}{dS} \quad (5.4)$$

$$Y_{P/X} = \frac{dP}{dX} \quad (5.5)$$

5.3 Resultados

5.3.1 Análisis a nivel del sistema de metabolismo complejo de azúcares en *E. coli* W

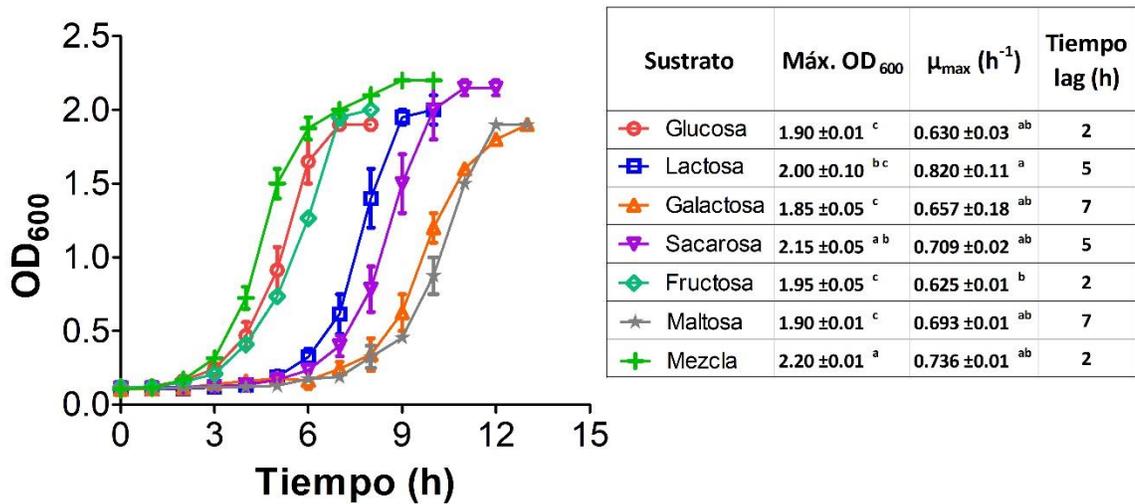
E. coli tiene un sistema complejo de transporte de azúcares y es capaz de asimilar diferentes fuentes de carbono, tales como la lactosa (X. Wang et al., 2019). La Figura 5.4 muestra la cinética de crecimiento de *E. coli* W utilizando diferentes tipos de carbohidratos de forma aislada, así como la mezcla de ellos, en el cual es observado que la glucosa y la fructosa se asimilan rápidamente, por direccionamiento del flujo de carbono directamente a la vía de la glucólisis (Luo et al., 2014). Además la mezcla de azúcares tuvo el periodo de latencia más corto, indicándonos que posiblemente al no haber señales de represión catabólica el microorganismo podría estar aprovechando todos los azúcares al mismo tiempo, su contenido en glucosa y fructosa hace que haya una más rápida asimilación en comparación con los puros (Luo et al., 2014).

Para el microorganismo empleado, la mayor concentración de biomasa se obtuvo para la mezcla de azúcares (monosacáridos y disacáridos) y sacarosa, seguida por lactosa ($p < 0.05$). Al analizar parámetros cinéticos como la velocidad de crecimiento, con diferencia significativo con respecto a los demás sustratos ($p < 0.05$), con lactosa, sacarosa y la mezcla se obtuvo la mayor μ , observándose que con azúcares complejos se podría estar aprovechando en su totalidad los moles de carbono suministrados con estos carbohidratos, beneficiando los flujos de carbono que permitirían una mejor producción de metabolitos primarios y por ende biomasa.

Los resultados observados en la Figura 5.4 indican que *E. coli* W puede usar múltiples fuentes de carbono, pero aumentando su tiempo de latencia en azúcares poco comunes como la maltosa y la galactosa; sin embargo, este microorganismo creció en condiciones óptimas al usar esos azúcares, y además, cuando se suministraron mezclas de estos azúcares no se observaron problemas en su crecimiento. Esta observación es muy interesante ya que no se evidencian comportamientos díauxicos.

Figura 5.4

Cinética de crecimiento de E. coli W usando diferentes tipos de azúcares



Nota. Las barras verticales y ± representan la desviación estándar. Letras minúsculas similares por columna indican que no hay diferencia estadística entre tratamientos ($p < 0.05$).

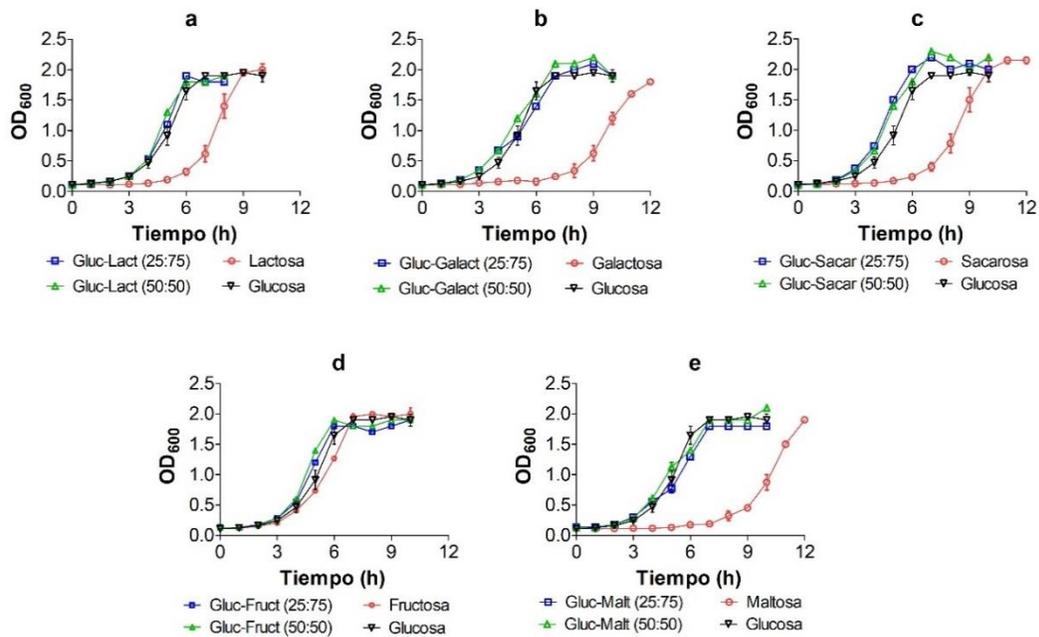
Con el fin de verificar la capacidad de asimilación de carbonos de *E. coli* W y constatar que no se presenta crecimiento diáuxico, se realizaron ensayos en los cuales se mezcla la glucosa con las otras fuentes de carbono en diferentes relaciones como se presenta en la Figura 5.5. En efecto, tampoco fue encontrado crecimientos diaúxicos al mezclar glucosa con las demás fuentes de carbono utilizados, debido posiblemente a que este microorganismo tipo silvestre podría contener intracelularmente elevadas cantidades de guanosina 3'-difosfato 5'-difosfato (ppGpp) que afectan la iniciación transcripcional de promotores de las proteínas de represión catabólica (CRP), o en su defecto posee la habilidad de generar rápidamente moléculas de ppGpp mediante la sintasa RelA e hidrolasa Spot al detectar múltiples fuentes de carbono o por agotamiento de glucosa en el medio (Fernández-Coll & Cashel, 2018). Pues esto le permitiría que sobreviva en cualquier tipo de ambiente con diferente fuente de carbono. Por lo anterior, no fue necesario deletar el gen *ptsG* para mejorar el catabolismo de lactosa o demás sustratos (Alva et al., 2020).

Aunque no se evidencia un comportamiento diáuxico marcado en las cinéticas realizadas, al analizar las μ_{max} de cada uno de los diferentes sustratos (Tabla 5.3), fue

observado una ligera afectación al usar glucosa con maltosa. Sin embargo, no hay una diferencia significativa ($p < 0.05$) de μ_{max} calculadas entre las demás mezclas con glucosa, puesto que como se mencionó anteriormente *E. coli* W no posee inconvenientes en el transporte de azúcares al interior de la célula al estar en diferentes tipos de azúcares. Se pudo observar que mezclas de glucosa con lactosa favorecen el crecimiento, al compararse con las otras mezclas de azucares y en especial con glucosa (presentando diferencias significativas), la razón puede deberse a que posiblemente se duplican los flujos de carbono y por ende la energía en forma de ATP en el interior del microorganismo.

Figura 5.5

Cinética de crecimiento de E. coli W en mezcla de azúcares con glucosa para el estudio del crecimiento diáuxico



Nota. Mezcla y fuente de carbono puro a una concentración de 2 g/L. Las barras verticales representan la desviación estándar.

Tabla 5.3

Velocidades de crecimiento específica en fase exponencial de E. coli W en diferentes sustratos puros y combinados con glucosa a una concentración final de 2 g/L

Sustrato (2 g/L)	μ_{\max} (h ⁻¹)
Glucosa 50% : Lactosa 50%	0.823±0.01 ^a
Lactosa	0.820±0.01 ^{ab}
Glucosa 50% : Fructosa 50%	0.805±0.03 ^{abc}
Glucosa 25% : Lactosa75%	0.736±0.02 ^{abcd}
Glucosa 25% : Fructosa75%	0.729±0.01 ^{abcd}
Glucosa 50% : Maltosa50%	0.728±0.01 ^{abcd}
Sacarosa	0.709±0.02 ^{bcd}
Glucosa 25% : Sacarosa75%	0.706±0.01 ^{bcd}
Glucosa 50% : Sacarosa50%	0.699±0.01 ^{bcd}
Maltosa	0.693±0.01 ^{cde}
Glucosa	0.630±0.03 ^{de}
Galactosa	0.657±0.18 ^{de}
Glucosa 25% : Galactosa75%	0.630±0.01 ^{de}
Fructosa	0.625±0.01 ^{de}
Glucosa 50% : Galactosa50%	0.616±0.02 ^{de}
Glucosa 25% : Maltosa75%	0.568±0.01 ^e

Nota. ± representa la desviación estándar. Letras minúsculas similares por columna indican que no hay diferencia estadística entre tratamientos (p<0.05).

5.3.2 Diseño de *E. coli* basado en un modelo de sobreproducción de 2-KIV

Numerosos estudios previos han abordado la producción de piruvato en diferentes organismos. Una lista no exhaustiva de estos estudios centrados en la sobreproducción de 2-KIV y L-valina como metabolitos finales derivados de piruvato se muestra en la Tabla 5.4. Específicamente se resaltan aquellos genes que se han eliminado para incrementar el flujo de carbono hacia 2-KIV o hacia L-valina. Interesantemente en todos los estudios, se ha empleado glucosa como fuente de carbono. Es interesante el hecho de que el pyr puede entrar y salir por varias vías, generando acetyl-CoA, acetato, lactato, formato, L-alanina y L-valina catalizado por los productos enzimáticos codificados por los genes *aceEF*, *poxB*, *ldhA*,

*pfl*ABCD, *yfd*ZQ y *ybh*T, respectivamente (X. Wang et al., 2018). Por tanto, es necesario eliminar estas rutas competidoras para incrementar los niveles de piruvato.

Tabla 5.4

Estudios de redirección del flujo de carbono hacia pyr para la sobreproducción de 2-KIV y L-valina

Microorganismo	Eliminación de genes	Producto	Referencia
<i>C. glutamicum</i>	<i>ilvA, panBC</i>	L-valina	(Radmacher et al., 2002)
<i>E. coli</i> W3110	<i>ilvA, leuA, panB, aceF, mdh</i> y <i>pfkA</i>	L-valina	(Park et al., 2007)
<i>C. glutamicum</i>	<i>aceE</i>	L-valina	(Blombach et al., 2007)
<i>C. glutamicum</i>	<i>aceE, aceE-pqo, aceE-pqo-pgi</i>	L-valina	(Bartek et al., 2011)
<i>C. glutamicum</i>	<i>panB</i>	L-valina	Holatko, 2009
<i>C. glutamicum</i>	<i>aceE, pqo, ilvE</i>	2-KIV	(Krause et al., 2010)
<i>E. coli</i> W3110	<i>ilvA, leuA, panB, aceF, mdh</i> y <i>pfkA</i>	L-valina	(Park, Kim, et al., 2011)
<i>E. coli</i> W	<i>ilvA, lacI</i>	L-valina	(Park, Jang, et al., 2011)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>yqhD</i>	2-cetoisovalerate decarboxilasa	(W. H. Lee et al., 2012)
<i>Brevibacterium flavum</i>	<i>avtA</i>	L-valina	(X. Hou et al., 2012)
<i>C. glutamicum</i>	L-valina: <i>aceE, pqo; pqo, ppc</i> . 2-KIV: <i>aceE, pqo, ilvE; pqo, ppc, ilvE</i>	L-valina y 2-ketoisovalerato	(Buchholz et al., 2013)
<i>C. glutamicum</i>	<i>pepC, ldh, avtA, ctf, ack, pta</i>	L-valina	(Hasegawa et al., 2013)
<i>C. glutamicum</i>	<i>aceE, alaT, ilvA</i>	L-valina	(C. Chen et al., 2015)
<i>C. glutamicum</i>	<i>ppc, pyc</i>	L-valina	(Schwentner et al., 2018)
<i>B. subtilis</i>	<i>Bcd, ilvB, leuA, ilvA, pdhA, sigF</i>	L-valina	(Westbrook et al., 2018)
<i>E. coli</i> W3110	<i>pflB, adhE</i> y <i>ldhA</i>	L-valina	(Hao et al., 2020)

Como se puede observar en la Tabla 5.4, las mutaciones *aceE* y *aceF* que catalizan la conversión de pyr en acetyl-CoA (reacción PDH) son las deleciones que se realizan principalmente (Bartek et al., 2011; Blombach et al., 2007; Buchholz et al., 2013; C. Chen et al., 2015; Nitschel et al., 2020; Park et al., 2007; Park, Kim, et al., 2011), como también la

delección combinada del gen *mdh* (reacción MDH) y *aceF* que incrementaron el flujo de carbono hacia *pyr* (Park et al., 2007; Park, Kim, et al., 2011).

Además, también se encontraron estudios acerca de las reacciones enzimáticas y posteriores delecciones de piruvato formiato liasa, deshidrogenasas, D-lactato deshidrogenasa y fosfotransacetilasa codificadas por *pflB*, *adhE* y *ldhA*, *pta*, que al disminuir su acción resulta en un aumento del flujo de carbono hacia *pyr* (Hao et al., 2020; Noda et al., 2019), así como la delección del gen *ppc* en la reacción de fosfoenolpiruvato carboxilasa (PPC) (Buchholz et al., 2013; Hasegawa et al., 2013; Schwentner et al., 2018), aunque en este último no sólo redirige el flujo hacia *pyr*, sino que también da como resultado una redirección de flujo hacia acetil-CoA y posteriormente a la vía de producción de alcohol y ácidos orgánicos (ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico) (Yang et al., 2017). Por otro lado, se ha identificado que se requiere un incremento en la producción del cofactor NADPH redireccionando el flujo hacia PPP (Bartek et al., 2011; Noda et al., 2019; Park et al., 2007; Park, Kim, et al., 2011) para un mayor flujo de carbono en la ruta de BCAA, ya que la actividad de cetol-ácido reductoisomerasa codificada por *ilvC* requiere esta molécula como sustrato (Noda et al., 2019).

En la literatura consultada (Tabla 5.4) se ha evidenciado la auxotrofia de vitaminas (pantotenato) y aminoácidos (L-treonina, L-isoleucina, L-leucina) de cepas mutadas para un mejor aprovechamiento del 2-KIV y la producción de L-valina (Holátko et al., 2009; Park et al., 2007; Park, Kim, et al., 2011; Radmacher et al., 2002; Westbrook et al., 2018). Sin embargo, evitar múltiples delecciones de genes es óptimo para reducir los costos operativos en la fermentación, esto se debe a que la ingeniería con muchas mutaciones a menudo da como resultado la generación de auxotrofias y la necesidad de usar medios complejos en el bioproceso. Por tanto, se ha seleccionado un conjunto mínimo de genes para mutar con garantías, lo que podría dar como resultado una producción aceptable en *E. coli* W: *mdh-aceF*, *ppc-mdh* y *ldhA-pflB-adhE* para ser estudiados mediante Muestreo de Monte Carlo.

Cada una de las reacciones escogidas para ser evaluadas en el Muestreo de Monte Carlo (Tabla 5.2), con su respectiva distribución de flujo (variabilidad) y la frecuencia muestreada de la solución FBA en *E. coli* W para la producción de 2-KIV (EX-2KIV) se

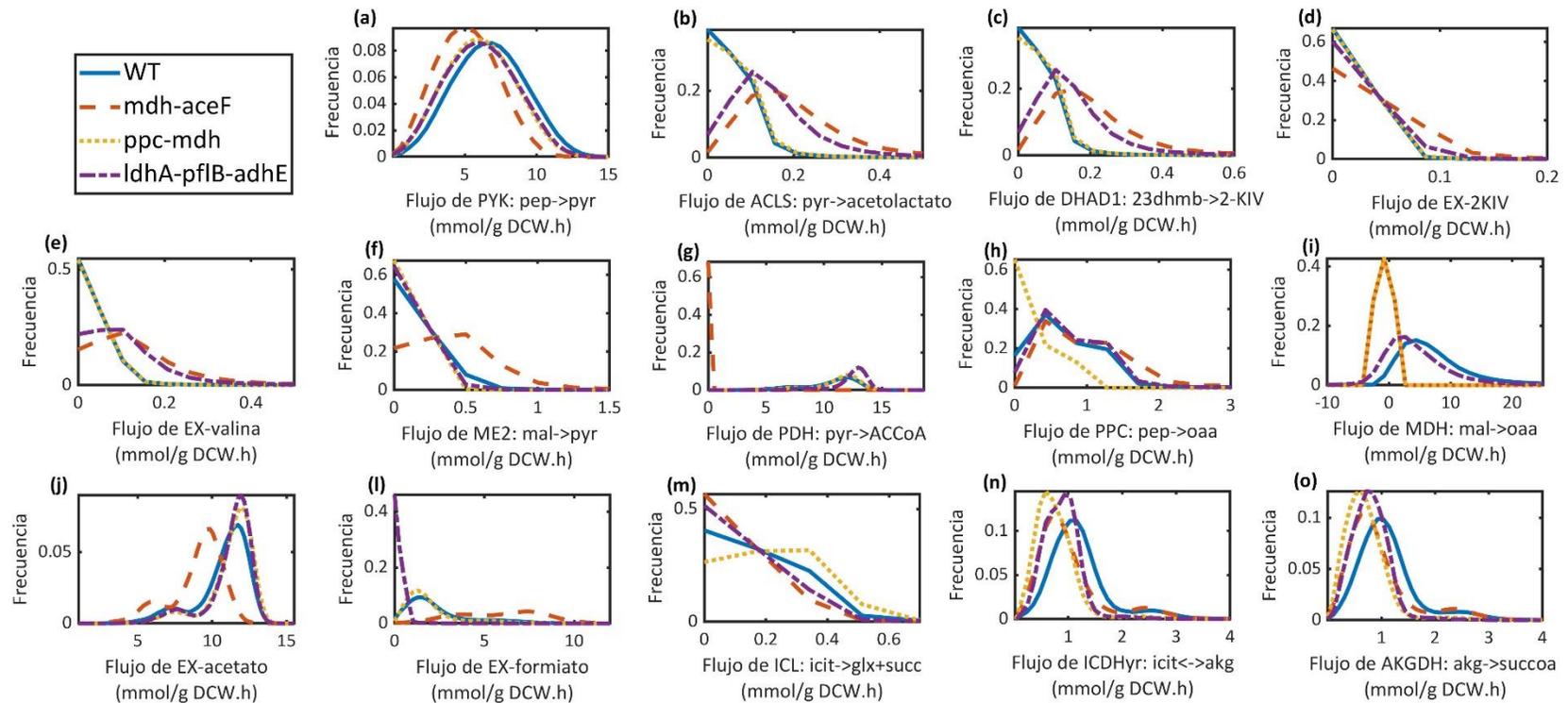
presentan en la Figura 5.6. Se muestra que la mutación *mdh-aceF* tiene una amplia variabilidad de flujo en reacciones ACLS, DHAD, Ex-2-KIV, ME2 (Figura 5.6 b, c, d, f) que otras set de mutaciones (*ppc-mdh* y *ldhA-pflB-adhE*) y sin mutación alguna (WT), lo que se correlacionó con otros resultados para la producción de L-valina (Park et al., 2007), posiblemente al aumentar el flujo de carbono en las rutas de BCAA.

Por una parte, en cuanto a la producción de L-valina (Figura 5.6d), las deleciones de *mdh-aceF* y *ldhA-pflB-adhE* tienen una mayor variabilidad de flujo metabólico en comparación con *ppc-mdh* y WT, aunque *ldhA-pflB-adhE* no produciría un mayor flujo en EX-2KIV (Figura 5.6d) que *mdh-aceF*, debido posiblemente al consumo de 2-KIV y su posterior producción de L-valina (Hao et al., 2020). Por otra parte, según el método de muestreo la mutación *mdh-aceF* tiene una mayor frecuencia y mayor flujo metabólico en la reacción ME2 (Figura 5.6f), siendo esta una de las reacciones importantes para el aumento de la producción de pyr, debido a su acción en la conversión de malato a pyr como ruta anaplerótica del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) (Noronha et al., 2000).

Al evaluar las demás reacciones del muestreo, fue observado que las reacciones PYK (Figura 5.6a) de la glucólisis, de producción de acetato (Figura 5.6j) y las del ciclo TCA (Figura 5.6 m, n, o) no mostraron diferencias en los muestreos realizados en todas las cepas mutadas y WT, apreciándose que podría haber en cualquiera de los casos una óptima solución con flujo reducido o aumentado de carbono en el ciclo TCA. Asimismo, en cada una de las cepas mutadas, las reacciones de PDH, PPC, MDH y EX-formiato (Figura 5.6 g, h, i, l), se vieron disminuidas como se esperaba al bloquear el flujo metabólico en ellas.

Figura 5.6

Muestreo de Monte Carlo en *E. coli* W para frecuencia de flujo y variabilidad en reacciones principales

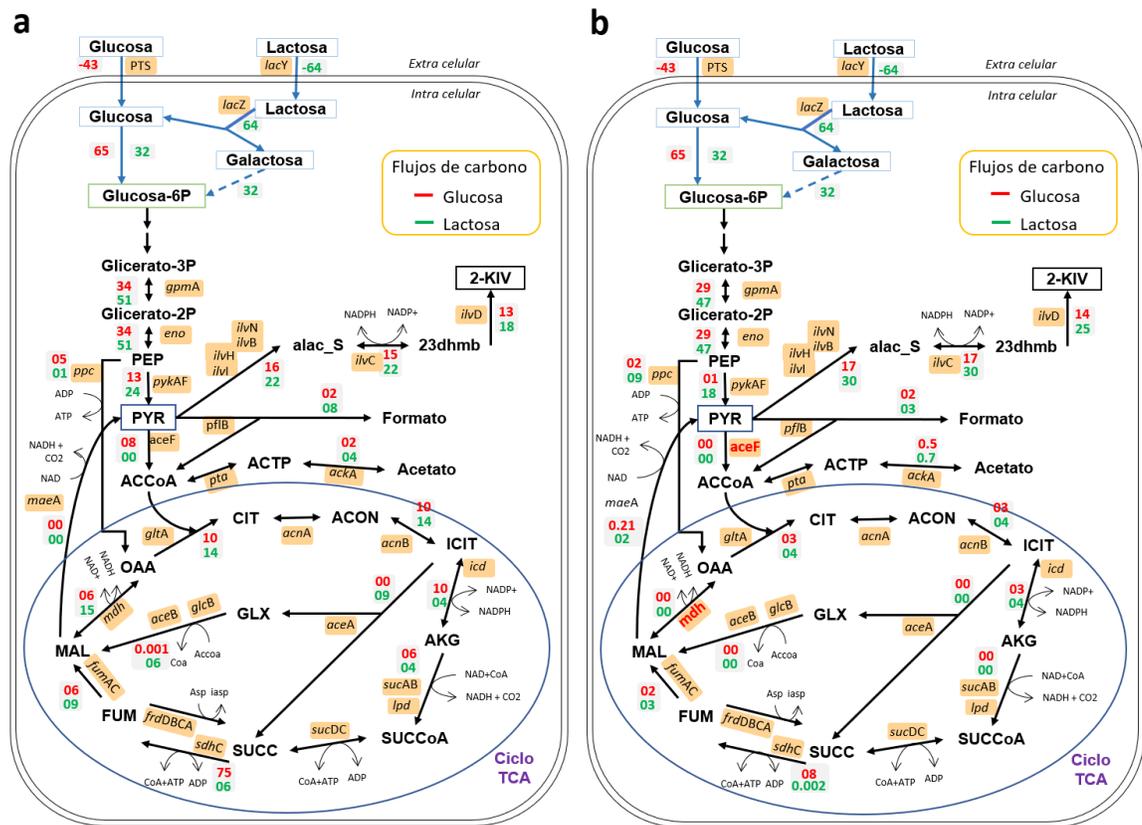


Con el fin de optimizar el flujo de carbono hacia pyr y aumentar así la producción de 2-KIV y consecuentemente L-valina, a partir de la literatura consultada y de los resultados de los análisis de flujos metabólicos (capítulo 4) y muestreo de Monte Carlo en este capítulo, fue seleccionado la delección de los genes *mdh* y *aceF*. Así, fue realizado FBA utilizando *E. coli* W y *E. coli* W $\Delta mdh-aceF$ para evaluar su posible efecto de variación de fuente de carbono entre glucosa y lactosa en cada cepa y como la mutación afecta la optimización de la producción de 2-KIV. Los flujos de carbono al utilizar glucosa y lactosa en modelos *in silico* son mostrados en la Figura 5.7, siendo la lactosa la responsable de un mayor flujo de carbono al final de la ruta de la glucólisis a diferencia de la glucosa (Figura 5.7a y 5.7b). Este fenómeno se podría atribuir a que la lactosa se divide en dos monosacáridos dentro de la célula por actividad de la β -galactosidasa (codificada por *lacZ*), lo que permite que en el modelado se identifiquen dos flujos similares con glucosa y galactosa siendo estos paralelamente aprovechados en el metabolismo, además de ser esta hipótesis verificada al no detectar galactosa extracelular en la cinética de captación de lactosa (Capítulo 4 – Figura 4.2 y 4.3).

Al analizar los flujos en el ciclo TCA en la cepa W (Figura 5.7a) se observa que la vía anaplerótica de conversión de malato a pyr (reacción ME1 o ME2, codificado por *maeA*) no se presenciaba flujo metabólico. Sin embargo, cuando es eliminado experimentalmente el gen *mdh* en *E. coli* W, la reacción con malato deshidrogenasa ubiquinona-8 (codificada por *mgo*) se activa parcialmente (Van der Rest et al., 2000) y no totalmente como se observaba en este estudio *in silico*. Por lo tanto, se tuvo que restringir la reacción en un 20 % de flujo a partir del flujo encontrado, ahora, como se puede ver en la Figura 5.7b se aprecia mayor flujo de carbono hacia pyr (reacción ME2).

Figura 5.7

Distribuciones de flujo metabólico por FBA en *E. coli* W (a) y *E. coli* W Δ mdh-aceF (b)



Nota. PEP: Fosfoenolpiruvato, PYR: Piruvato, alac_S: 2-Acetolactato, 23dhmb: 2,3-dihidroxi-3-metilbutanoato, 2-KIV: 2-cetoisovalerato, ACTP: proteína portadora de acilo, OAA, oxalacetato, ACCoA: acetil-CoA, CIT: citrato, ICIT: isocitrato, ACON: cis-aconitato, AKG: 2-oxoglutarato, GLX: glioxilato, SUCCoA: succinil-CoA, SUCC: succinato, FUM: fumarato, MAL: malato, Ciclo TCA: ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Rutas y reacciones obtenidos a través de modelo a escala genómica: MODEL1507180010 (iCA_1273) de la base de datos BioModels (<https://www.ebi.ac.uk/biomodels/>).

El ciclo TCA es importante porque es el enlace cíclico con las rutas metabólicas responsables de la degradación y desasimilación de carbohidratos, grasas y proteínas en anhídrido carbónico y agua, y en sinergia con la fosforilación oxidativa podría resultar en más moléculas de ATP y NADH (Noronha et al., 2000). En este estudio, como óptima solución para la generación de pyr y posterior producción de 2-KIV, el modelamiento *in silico* mostró que se debería disminuir el flujo de carbono en la reacción de pyr a acetyl-CoA

(codificado por *aceF*) al usar glucosa, pues esta estrategia permitiría que la mayor cantidad de flujo de carbono se direccionara hacia la reacción PPC (codificada por *ppc*) otra vía anaplerótica que favorece la biosíntesis de PEP a OAA, y así garantizar metabolitos para el ciclo TCA. Se ha encontrado en la fase exponencial del crecimiento de *E. coli*, la activación de la ruta anaplerótica PPC para abastecer de OAA y así generar compuestos biosintéticos, viéndose disminuida la transcripción de *aceF* (Al Zaid Siddiquee et al., 2003). Esto en sí, generaría una acumulación de PEP, lo que según nuestros resultados *in silico*, ha mostrado una biosíntesis de pyr desde el aprovechamiento de moléculas como dihidroxiacetona (reacción fosfoenolpiruvato + dihidroxiacetona \rightarrow dihidroxiacetona fosfato + PYR) y de los mismos metabolitos secundarios (Font & Sprenger, 2020; Paulsen et al., 2000).

Analizando conjuntamente cepa silvestre y cepa mutada no se aprecian grandes cambios con glucosa en la ruta de la glicólisis y reacción PPC, pero con lactosa la delección *mdh* permitió una disminución casi completa en la recirculación de flujo de carbono en el ciclo TCA y por tanto un mayor flujo de PEP a OAA (reacción PPC), mostrando una productividad de conversión superior de pyr a 2-acetolactato y también suministrando el flujo de carbono faltante de ACCoA a TCA. Sin embargo, aunque es sabido que afectar el ciclo del TCA afectaría la generación de biomasa, en los análisis realizados aplicando Muestreo de Monte Carlo se encontró una variabilidad de flujo en este ciclo que podría tornar en soluciones para la producción de 2-KIV dada por un mayor flujo metabólico en el ciclo TCA, por tanto, la estrategia y evaluación *in silico* de la mutación estaría indicando que el TCA podría verse afectado y por tanto la generación de biomasa también. Cabe mencionar que en el modelo metabólico de *E. coli* W mutada, la generación de biomasa podría darse por la activación de las reacciones PTAr (fosfotransacetilasa) y PPC, puesto que, fue encontrado que PTAr con el uso de acetil fosfato es capaz de generar moléculas de acetil-CoA, además de más actividad en la reacción PPC (mencionado anteriormente) (Maleki & Eiteman, 2017; Tomar et al., 2003).

En la distribución de flujo en *E. coli* W WT se puede observar que para producir 2-KIV es necesaria una reducción del flujo de carbono de pyr a ACCoA al usar lactosa (Figura 5.7a), confirmándose de esta manera con la cepa $\Delta mdh-aceF$ (Figura 5.7b), en el cual

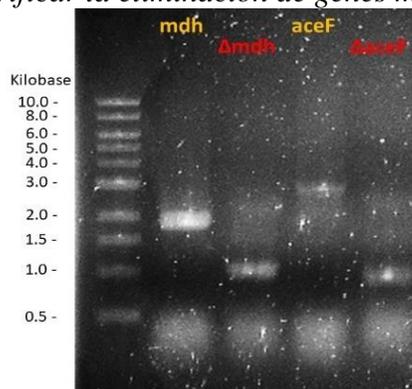
permitió ver una mayor producción de 2-KIV y una reducción del flujo de carbono a acetato. Además, también hubo una reducción en la producción de formiato al usar lactosa a diferencia de glucosa, posiblemente este comportamiento se deba al poco flujo metabólico que se distribuye por toda la ruta metabólica al usar glucosa. Esto está en correspondencia con algunos reportes en los que, se ha encontrado producción de estos ácidos orgánicos (acetato y formiato) en fermentaciones aeróbicas continuas y discontinuas con *E. coli* al usar glucosa (Lara et al., 2009; Y. Wang et al., 2012), y también que el consumo de formiato y acetato le generaría flujo de carbono (Sawers, 2005) y ACCoA (Novak et al., 2018), respectivamente.

5.3.3 Construcción y fenotipado de una cepa de *E. coli* W que carece de *mdh* y *aceF*

La construcción de la plataforma de *E. coli* W para la producción de 2-KIV comenzó con la delección de los genes *mdh* y *aceF* (WT Δmdh -*aceF*), según los resultados del análisis de flujo metabólico y la literatura en todo este estudio doctoral. En la Figura 5.8 se muestra la verificación por PCR y electroforesis en gel de las mutaciones realizadas. A WT Δmdh -*aceF* se le introdujo el plásmido pSEVA681 vacío por electroporación (*E. coli* W1288) para observar cualquier cambio en el flujo de carbono hacia pyr en relación con *E. coli* W.

Figura 5.8

Electroforesis en gel para verificar la eliminación de genes *mdh* y *aceF* en *E. coli* W

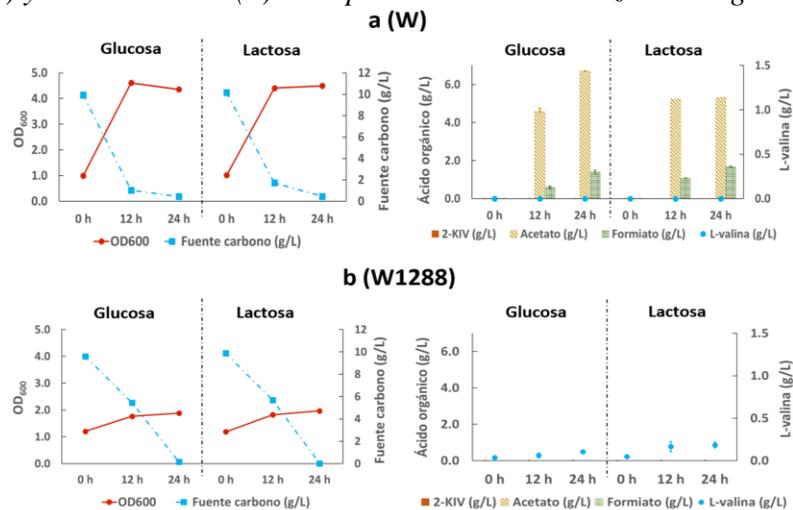


Estas cepas diseñadas mostraron diferencias entre las fuentes de carbono utilizadas para los experimentos en matraces (Figura 5.9). *E. coli* W y *E. coli* W1288 tienen un comportamiento similar en el consumo de sustrato, así como en la no detección de concentraciones de 2-KIV. Sin embargo, el crecimiento celular se reduce en *E. coli* W1288 usando tanto glucosa como lactosa, ya que esta cepa podría verse afectada por el costo energético en la producción de plásmidos con un alto número de copias (Fakruddin et al., 2013). Como también podría deberse a la disminución de flujo metabólico en el ciclo TCA según los análisis *in silico* estudiados.

Con *E. coli* W se obtuvo acetato y formiato a las 12 y 24 h en forma creciente, apreciándose más contenido utilizando glucosa que lactosa, mientras que con *E. coli* W1288 no se detectaron ácidos orgánicos, pero sí se encontró producción de L-valina siendo mayor con lactosa. El uso de flujo de carbono se muestra con la producción de L-valina, debido a que la delección de *mdh-aceF* ha mostrado una mayor dirección del flujo de carbono hacia pyr (Park et al., 2007), puesto que los genes para la sobreproducción de 2-KIV no son sobreexpresados, información representada claramente en los análisis *in silico* realizados.

Figura 5.9

Cinéticas de crecimiento, consumo de sustrato y producción de 2-cetoisovalerato y L-valina en E. coli W (a) y E. coli W1288 (b) en experimentos en matraz usando glucosa y lactosa



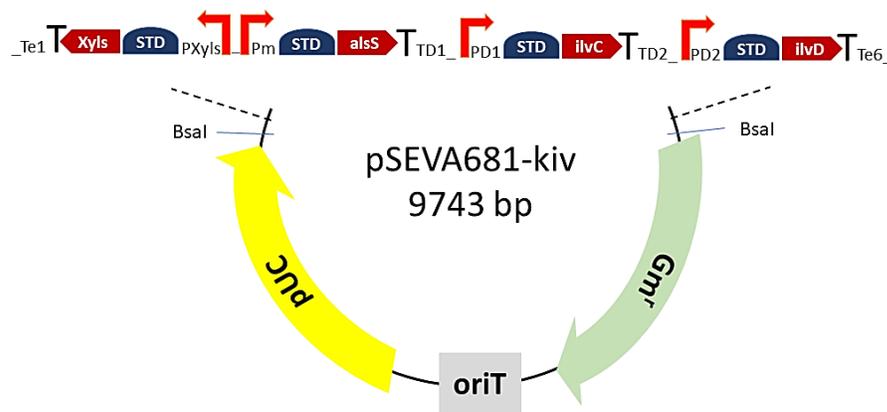
Nota. Las barras de error indican la diferencia entre replicas.

5.3.4 Reabastecimiento de pyr a 2-KIV a través de biología sintética

Se construyó un mecanismo de sobreexpresión de genes sintéticos para la producción de 2-KIV con un sistema de expresión XylS/Pm (regulador/promotor) (ilustrado en la Figura 5.10). Este sistema regulador XylS/Pm que se origina en el plásmido TOL pWW0 de *Pseudomonas putida*, se ha utilizado ampliamente para la expresión recombinante regulada de bajo y alto nivel de genes y grupos de genes en *E. coli* (Gawin et al., 2017). El sistema se caracteriza por el modo simple de regulación que se puede lograr usando 3MB, que normalmente no es metabolizado por la bacteria huésped y entra pasivamente a las células (Gawin et al., 2017), siendo estable y funcional dentro de *E. coli* W y con un control de expresión óptimo (Datos no mostrado).

Figura 5.10

Estructura del plásmido pSEVA681-kiv para producir 2-KIV



Nota. TD1 y TD2: terminales Dummy (Ficticio), PD1 y PD2: promotores Dummy (Ficticio), Gm^r: resistencia a la gentamicina.

Los genes *alsS*, *ilvC* e *ilvD* fueron sobreexpresados, ya que estos son los que codifican las enzimas de las reacciones de biosíntesis de pyr a 2-KIV, previamente discutidos en el capítulo 3 y 4. Se incorporó el gen *alsS* de *B. subtilis* para eliminar la inhibición por retroalimentación de la L-valina, esta estrategia genética obtuvo buenos resultados en otros

estudios (Hao et al., 2020) para incrementar y evitar la inhibición por retroalimentación de producto (L-valina), y que en este estudio fue comprobado mediante sistema de expresión sintética construido.

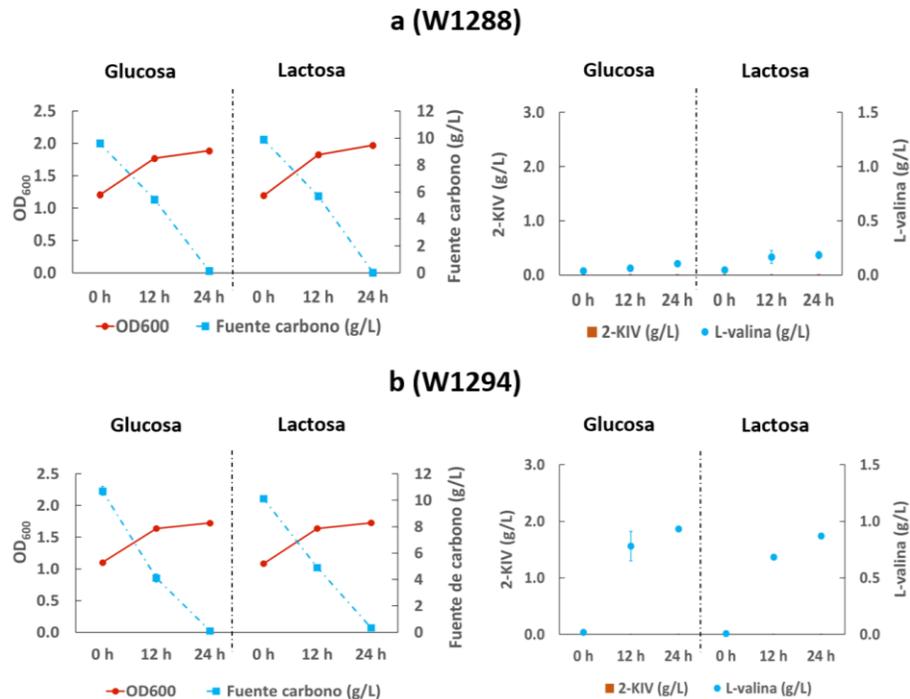
Se utilizaron promotores y terminadores defuncionalizados para los genes *ilvCD* con objeto de crear una unidad transcripcional policistrónica. Como secuencia de unión de ribosoma (RBS) fue seleccionado un RBS consenso (STD) (Nogales et al., 2011), todo esto dentro de un vector de clonación de alto número de copias (pUC) y utilizando 3MB a 0.5 mM (ensayos previos) para activar el sistema de expresión pSEVA681-kiv. Posteriormente, el plásmido pSEVA681-kiv fue introducido mediante electroporación en *E. coli* W y WT *Amdh-aceF*, construyendo así las cepas *E. coli* W1294 y *E. coli* W1262, respectivamente. La selección del promotor, RBS y terminadores de transcripción fueron seleccionados a partir de previas calibraciones de librería de promotores constitutivos, inducibles y diferentes tipos de RBS (datos no mostrados por hacer parte de otros laboratorios que están en proceso de publicación).

5.3.5 Eliminación de la inhibición por retroalimentación de L-valina en *E. coli* W1294

En las cepas mejoradas *E. coli* W1288 y *E. coli* W1294 se evaluó la inhibición por retroalimentación de cada una para la producción de L-valina sobre *alsS* (Pyr a 2-acetolactato), donde *E. coli* W1288 es empleada como control. Las cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa o lactosa, como fuente de carbono, y la producción de L-valina de estos microorganismos se muestran en las Figuras 5.11 a y b. Al observar estos comportamientos cinéticos se encontró una generación de biomasa muy similar entre las cepas independiente de la fuente de carbono empleada, sin embargo, el crecimiento celular en *E. coli* W1294 es ligeramente menor que en *E. coli* W1288 ($p < 0.05$). Esto puede explicarse debido a que *E. coli* W1294 tiene un tamaño de plásmido de 9743 pares de bases y además éste contiene un plásmido de origen de alto número de copias; la energía de clonación de este plásmido podría limitar el crecimiento normal del microorganismo (Fakruddin et al., 2013), así como su notoria reducción en el consumo de sustrato (12 h).

Figura 5.11

Cinéticas de crecimiento, consumo de sustrato y producción de 2-cetoisovalerato y L-valina de *E. coli* W1288 (a), *E. coli* W1294 (b) en experimentos en matraz usando glucosa y lactosa



Nota. Las barras de error indican la diferencia entre replicas.

Aunque en los resultados experimentales presentados en las Figura 5.11 a y b no se observaron producciones de 2-KIV, si se observaron la producción de L-valina, siendo mayor la titulación con *E. coli* W1294 (Figura 5.11b) que la obtenida con *E. coli* W1288 (Figura 5.11a). Se demuestra el consumo del 2-KIV generado para la biosíntesis de L-valina, sin ninguna restricción por retroalimentación de producto sobre AHAS, produciendo con diferencia significativa 0.93 ± 0.00 y 0.87 ± 0.02 g/L de L-valina al usar glucosa y lactosa, respectivamente. Esto se debe a que al comparar *E. coli* W1288 (sin mutaciones para retroalimentación) y la *E. coli* W1294 (con eliminación de retroalimentación, ósea con el sistema de sobreexpresión para producir 2-KIV), permitió ver que la inhibición por retroalimentación de L-valina puede ser eliminada mediante la incorporación del gen *alsS*, además, previamente se ha demostrado que la expresión de *alsS* da como resultado una mayor

actividad de la acetolactato sintasa en *E. coli*, en comparación con la actividad de AHAS (Westbrook et al., 2018), por lo que se planteó la hipótesis acerca de que el pyr podría canalizarse de manera más eficiente hacia la vía biosintética 2-KIV (pSEVA681- kiv). Por lo tanto, sin dirigir y aumentar el flujo de carbono hacia pyr (*E. coli* W1294), el sistema de sobreexpresión con pSeva681-kiv aprovechó cada molécula de pyr que se generó dentro del microorganismo para convertirlo en L-valina.

5.3.6 Redireccionamiento del flujo de carbono de Pyr hacia 2-KIV con eliminación de la inhibición por retroalimentación de L-valina en *E. coli* W1262

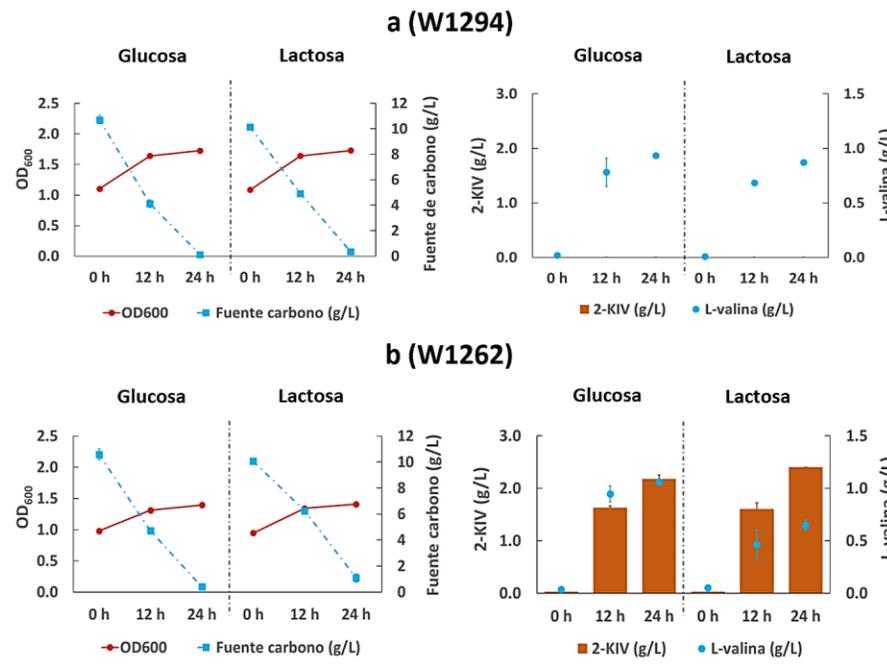
En la evaluación de las cepas mejoradas de *E. coli* W1294 (Figura 5.12a) que no presenta inhibición por retroalimentación y *E. coli* W1262 (Figura 5.12b) modificada en eliminación de flujos para aumento de pyr y que tampoco presenta inhibición por retroalimentación, se observa comportamientos similares para el consumo de sustratos independiente de las modificaciones genéticas y el tipo de sustrato. Al observar el comportamiento de crecimiento (OD_{600}), se ve una disminución en ambas cepas a término de las 24 h (W1294: glucosa – 1.73 ± 0.00 ; lactosa – 1.73 ± 0.01 y W1262: glucosa – 1.40 ± 0.01 ; lactosa – 1.41 ± 0.01), con diferencias significativas ($p < 0.05$). Esto puede deberse a las mutaciones realizadas en ella para redirigir el flujo de pyr, de tal manera que todo se desvíe hacia 2-KIV, siendo este supuesto corroborado en los análisis *in silico* con las cepas mutadas y al maximizar la producción de 2-KIV. Además, al sobreexpresar los genes escogidos en un plásmido de alto número de copias (mencionado anteriormente).

Aunado a esto, no se encontró producción de acetato ni formiato en las dos cepas estudiadas, siendo esto coherente con los análisis de flujo metabólicos *in silico* realizados, puesto que la reducción de flujo de carbono en estas vías se ven reflejadas en la producción de 2-KIV de 100% de diferencia, tal como era de esperarse con una producción de 2.2 ± 0.08 y 2.4 ± 0.00 g/L de 2-KIV a las 24 h con *E. coli* W1262 usando glucosa y lactosa, respectivamente. Así, se confirma que las mutaciones realizadas dirigen el flujo de carbono hacia el pyr, el sistema de sobreexpresión sintética construido para la producción de 2-KIV

es funcional en *E. coli* W, y que los análisis *in silico* realizados fueron asertivos respecto a una mejor biosíntesis de metabolito deseado cuando se usa lactosa como fuente de carbono.

Figura 5.12

Cinética de crecimiento de biomasa, consumo de sustrato y producción de 2-cetoisovalerato y L-valina de E. coli W1294 (a), E. coli W1262 (b) en experimentos en matraz usando glucosa y lactosa



Nota. Las barras de error indican la diferencia entre replicas.

De este estudio pudo constatar que fue efectiva la eliminación de inhibición por retroalimentación de L-valina, obteniendo un incremento por encima de 1.8 mg L-valina/L en la producción para ambas cepas (*E. coli* W1294 y *E. coli* W1262). Sin embargo, al analizar los resultados de producto al emplear lactosa con las diferentes cepas, se observa una reducción significativa ($p < 0.05$) en la concentración de L-valina en *E. coli* W1262 (0.65 ± 0.05 g/L de L-valina - 24 h) con respecto a *E. coli* W1294 (0.87 ± 0.02 g/L de L-valina - 24 h). Esta reducción de la concentración de L-valina con la lactosa podría deberse al esfuerzo que realiza el microorganismo por metabolizar la lactosa como sustrato, la cual

requiere fosfato (Pandi et al., 2020) y cómo fue evidenciado en los análisis de robustez (Capítulo 4 – Figura 4.6), por ende, se ve afectado el balance metabólico del microorganismo.

5.3.7 Producción de 2-KIV por *E. coli* W1288, *E. coli* W1294 y *E. coli* W1262 utilizando lactosuero como fuente de carbono

Las cinéticas del crecimiento celular, consumo de la lactosa (lactosuero) y producción de 2-KIV y L-valina, se muestran en las Figuras 5.14 a y b. En ellas se observó los comportamientos fenotípicos de las tres cepas modificadas (*E. coli* W1288, *E. coli* W1294 y *E. coli* W1262) en la captación de la lactosa del lactosuero para la producción de 2-KIV y L-valina. Es significativo ($p < 0.05$) que *E. coli* W1294 y *E. coli* W1262 tienen la producción de biomasa más baja y el consumo más bajo de lactosa de lactosuero a lo largo del tiempo. Sin embargo, *E. coli* W1262 presenta titulaciones de hasta 3.22 ± 0.07 g/L de 2-KIV y 1.40 ± 0.04 g/L de L-valina a las 24 h, siendo los valores más altos encontrados en todo este estudio ($p < 0.05$).

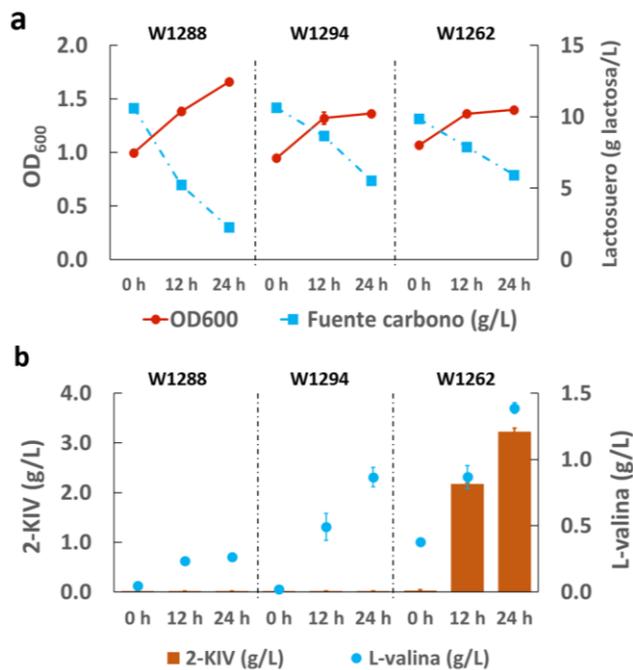
Asimismo, se puede apreciar que en *E. coli* W1288, W1294 y W1262 tuvieron consumo de lactosa del 78.6% (8.35 ± 0.11 g/L), 48.0% (5.10 ± 0.06 g/L) y 39.9% (3.93 ± 0.33 g/L) del inicial, respectivamente. Esta diferencia significativa ($p < 0.05$) se podría atribuir al hecho que en *E. coli* W1294 y W1262 se ven afectadas por el plásmido introducido (alto número de copias y 9743 pares de bases) y una sinergia entre el uso de un complejo sustrato (adaptación) y transcripción del sistema de sobre expresión podría estar ocurriendo, en cuanto a todo lo que involucra en flujo de carbono y producción del metabolito deseado.

Como se muestra en la Figura 5.13b, todas las cepas modificadas produjeron las concentraciones más altas de L-valina a las 24 h (W1288: 0.26 ± 0.01 g/L, W1294: 0.87 ± 0.074 g/L, W1262: 1.39 ± 0.04 g/L) en comparación con los sustratos de glucosa y lactosa. Esta mejora de la producción tanto de 2-KIV como de L-valina en *E. coli* W1262, podría atribuirse a el hecho de que el lactosuero contribuye a un mejor flujo metabólico de *E. coli* W, ya que es un medio complejo que contiene proteínas, lípidos y minerales. Esta disminución en la producción de L-valina encontrada en *E. coli* W1262 al usar lactosa pura se mejora con el

lactosuero, ya que posiblemente el lactosuero favorece un mejor catabolismo de la lactosa del lactosuero por sus otros compuestos en el medio y como fue encontrado en los estudios *in silico*, un simultáneo flujo de carbono se podría presentar.

Figura 5.13

Cinética de crecimiento de biomasa, consumo de lactosa y producción de 2-cetoisovalerato y L-valina en *E. coli* W1288, *E. coli* W1294 y *E. coli* W1262 en experimentos en matraces utilizando lactosuero



Nota. Las barras de error indican la diferencia entre replicas.

Ahora bien, la Tabla 5.5 muestra las comparaciones de diferentes cepas utilizadas para la sobreproducción de 2-KIV en la que todos los estudios utilizaron glucosa como fuente de carbono. En la cual, tanto *K. pneumoniae* como *C. glutamicum* tuvieron un consumo total de sustrato entre 81 y 82 g/L con producciones de hasta 35 g 2-KIV/L en comparación con nuestro estudio. Sin embargo, se puede observar que, en los rendimientos del producto con respecto a la biomasa, *E. coli* W1262 supera tanto a *C. glutamicum* como a *K. pneumoniae* en los tres tipos de fuente de carbono utilizados, apreciándose que con lactosuero se obtiene un mejor rendimiento.

Con *E. coli* W1262 a las 24 h de fermentación utilizando lactosuero se logra un mayor rendimiento de conversión de sustrato a producto ($Y_{p/s}$) que *K. pneumoniae* (26 h) y *C. glutamicum* (56 h). Cabe mencionar que el rendimiento de biomasa con respecto al sustrato de *E. coli* W1262 es mayor cuando se utiliza lactosuero que glucosa y lactosa pura, siendo bajo en comparación con *C. glutamicum*.

Tabla 5.5

Producción de 2-KIV por diferentes cepas

Cepa	Modo de operación	Tiempo (h)	Consumo sustrato total	2-KIV (g/L)	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	$Y_{p/x}$ (g/g)	Referencia
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Biorreactor lote alimentado	56	82 g/L glucosa aprox. 24 g/L acetato de potasio aprox.	25.56	0.20	0.31	1.58	(Krause et al., 2010)
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Biorreactor lote alimentado	44	82 g/L glucosa aprox. 5 g/L acetato de potasio aprox.	35.00	0.14	0.18	1.34	(Buchholz et al., 2013)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Biorreactor lote	26	81 g/L glucosa aprox.	17.40	0.05	0.21	4.68	(Gu et al., 2017)
<i>E. coli</i> W1262	Matraz lote	24	10.2 g/L glucosa	2.18	0.04	0.21	5.17	Este estudio
<i>E. coli</i> W1262	Matraz lote	24	9.0 g/L lactosa	2.41	0.05	0.27	5.15	Este estudio
<i>E. coli</i> W1262	Matraz lote	24	3.9 g/L Lactosa de lactosuero	3.22	0.08	0.81	9.71	Este estudio

5.4 Conclusiones

La lactosa tiene mejor efecto en la tasa de crecimiento específica máxima y producción de 2-KIV que la glucosa, debido a su ruptura vía enzimática en glucosa y galactosa, la que permitió el aumento de flujo de carbono intracelular a diferencia de la glucosa. Por tanto, el lactosuero con mejores resultados en la producción de 2-KIV y L-valina, se convierte en un medio complejo de fermentación beneficiosa y de bajo costo para producir 2-KIV y L-valina. Es factible la construcción metabólica de *E. coli* W para la sobreproducción de 2-KIV sin auxotrofia, empleando un sistema de sobreexpresión óptimo mediante la replicación de vectores de alto número de copias, utilizando glucosa, lactosa y lactosuero como fuentes de carbono. La cepa *E. coli* W1262 con mutaciones *mdh-aceF* y sistema de sobreexpresión, es promisorio chasis bacteriano para la sobreproducción de 2-KIV en diferentes fuentes de carbono, además de no poseer inhibición por retroalimentación para la biosíntesis de L-valina.

Capítulo 6. Discusión y Conclusiones

6.1 Lactosuero es mejor fuente de carbono para *E. coli* que azúcares puros para producir biomasa

Los resultados de esta tesis doctoral demostraron que el lactosuero mejora las velocidades específicas de crecimiento máximas en *E. coli*, no sólo por ser un medio de fermentación complejo en contenido de proteínas, ácidos grasos y minerales que contribuyen a un mejor desarrollo del microorganismo, si no por la lactosa como su principal componente. Puesto que, durante las cinéticas realizadas (Figura 4.2 y 4.3) y en correlación con los análisis *in silico* (Figura 4.4), se encontró que el fraccionamiento enzimático intracelular de la lactosa al ser desdoblada en glucosa y galactosa, genera un simultáneo flujo de carbono en el metabolismo, garantizando así moléculas de ATP, NADH y NADPH (análisis *in silico* – Figura 3.5), que mejorarán la conversión de bio-compuestos (aminoácidos, ácidos orgánicos, entre otros) y por ende de biomasa. Cabe mencionar que, *E. coli* W tuvo la capacidad de crecer en mezcla de diferentes fuentes de carbono sin comportamientos diaúxicos (Figura 4.3, 5.5 y 5.6). Destacando así que este microorganismo tipo silvestre, no activa los fenómenos de represión catabólica al usar en mezcla fuentes de carbono con glucosa (especialmente), lo que contribuiría a mayores velocidades específica de crecimiento y biosíntesis de productos, al usar lactosuero en comparación a los sustratos puros.

6.2 Lactosuero es mejor fuente de carbono que los sustratos puros para producir L-valina, potenciando la ruta de biosíntesis de 2-cetoisovalerato

En los resultados se pudo apreciar que la lactosa del lactosuero puede mejorar los flujos de carbono en el metabolismo de *E. coli*, para favorecer la biosíntesis de L-valina en comparación con glucosa. Como se ha mencionado, el doble flujo de carbono en el metabolismo por el desdoblamiento de la lactosa beneficia la producción de L-valina y su precursor 2-KIV. No obstante, es apreciado según los análisis de robustez en la Figura 4.7,

que la biosíntesis de L-valina requiere de un óptimo consumo en fuente de nitrógeno, a diferencia de su precursor directo, 2-KIV. Correlacionando lo anterior, se pudo observar en las cinéticas de producción (Figura 2.1), que el lactosuero beneficia la biosíntesis de L-valina a diferencia de sustratos puros, debido al aporte en contenido de proteínas al medio de fermentación. Además, en la construcción de las cepas mutantes para la validación de supuestos, se evidenció que tanto 2-KIV y L-valina son de mayor producción al usar lactosuero en comparación con los componentes puros estudiados (Figura 5.13).

Es de mencionar que, aunque la lactosa pura podría contribuir a mejores condiciones metabólicas y que según los resultados *in silico* posee un efecto de mayor flujo de carbono, su catabolismo requiere mayor disponibilidad de fosfatos que la glucosa en el medio. Por tanto, como fue apreciado en las Figuras 2.1, 4.2 y 5.12, aunque haya mayores velocidades específicas de crecimiento máxima que la glucosa, no hay una diferencia significativa en las producciones de L-valina y concentraciones máxima de biomasa con las dos fuentes de carbono puras (glucosa y lactosa). Sin embargo, de nuevo se hace mención que, con lactosuero hubo mayores producciones de L-valina que los sustratos puros (1.39 ± 0.04 g/L), debido a su diversa composición de proteínas, ácidos grasos y en especial minerales (en contenido de fosfatos), que le transfiere mayores beneficios en las reacciones enzimáticas involucradas en el catabolismo de la lactosa, y a la vez a la ruta de biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (Figura 2.1 y 5.11). Sin embargo, es importante que sean empleados más técnicas analíticas, como cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas o cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de etapa única que permitan la cuantificación de otros metabolitos, con una mejor sensibilidad de cuantificación y así lograr mayor refinación del modelo metabólico. Como también, análisis de flujos metabólicos de ^{13}C con trazadores isotópicos en lactosa con técnicas de espectroscopía por resonancia magnética nuclear, que podrían brindar información y dilucidar completamente el efecto de esta fuente de carbono al determinar el destino metabólico de los metabolitos a estudiar.

6.3. Diseño racional metabólico de mutantes, evidenció el efecto de las diferentes fuentes de carbono

Para aumentar el conocimiento de los efectos de las diferentes fuentes de carbono, este trabajo doctoral desarrolló un innovador sistema de sobreproducción de 2-KIV a través de estrategias de biología sintética de vanguardia. En el cual, no solo se logró evidenciar mayores producciones de 2-KIV (3.22 ± 0.07 g/L), sino también mayores producciones de L-valina sin sobreexpresión de los genes que convierten 2-KIV a este aminoácido, pues la incorporación del gen *alsS* del *Bacillus subtilis* suprimió la inhibición por retroalimentación de L-valina en acetohidroxiácido sintasa (Figura 5.11), al garantizar la conversión de piruvato a 2-acetolactato.

Fue positivo para el estudio del efecto de las diferentes fuentes de carbono la construcción de una nueva plataforma bacteriana (*E. coli* W1262), con novedoso sistema de sobreexpresión y la delección de genes *mdh* y *aceF*. Esta estrategia de mutación según los estudios *in silico*, permite el redireccionamiento de flujo de carbono hacia piruvato (capítulos 4 y 5), y por ende un mayor flujo de carbono hacia la ruta de biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada, garantizando así la producción de 2-KIV y L-valina. Este anterior supuesto fue validado con las producciones de 2-KIV y L-valina al realizar las fermentaciones con *E. coli* W1262 en comparación con los demás mutantes (capítulo 5), permitiendo así correlacionar los resultados *in silico* con los experimentales.

Por otra parte, en concordancia con lo evaluado *in silico* (Figura 5.9), los ácidos orgánicos (acetato y formiato) producidos en la cepa tipo silvestre, al usar glucosa y lactosa en forma pura, fueron disminuidos en biosíntesis en la nueva plataforma bacteriana, como también fue evidenciada la reducción de los flujos en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, que aunque repercutiría en la mejora del flujo de carbono hacia piruvato y posteriormente hacia 2-KIV, la biomasa se vería afectada, tal como fue observado en las cinéticas de fermentación con *E. coli* W1262 (Figura 5.11).

Asimismo, se le podría atribuir esa disminución de la producción de biomasa al sistema de sobreexpresión génica construido en un plásmido de alto número de copias, puesto

que su gasto energético al clonar este sistema, que estuvo evidenciado en los datos experimentales de biomasa (OD_{600} – Figuras 5.9, 5.11, 5.12 y 5.13), afectarían la generación de biomasa normal de este microorganismo. Siendo necesario futuros estudios en la incorporación de plásmidos de medios y bajos números de copias en su origen, además de estudios transcriptómicos y proteómicos de cepas silvestre y mutantes para obtener más información flujómica.

6.4 Conclusiones

1. El lactosuero resulta ser una fuente de carbono promisoría en la producción de L-valina en fermentaciones con *E. coli*, puesto que potencializa la ruta de biosíntesis de L-valina.
2. Con este estudio se presenta una alternativa más de empleo de lactosuero, que siendo un residuo líquido contaminante pero un sustrato de bajo costo, podría ser empleado en producción a nivel industrial no solo de L-valina sino también de 2-KIV, siendo este último de interés también en la producción de energía verde.
3. *E. coli* W resultó ser un potente chasis bacteriano para ser usado en la fermentación de residuos agroindustriales como el lactosuero. Su capacidad de crecer en mezcla de diferentes azúcares, con un catabolismo de doble proporción de flujo de carbono al usar lactosa como fuente de carbono, atribuyó a que este microorganismo lograra mejores producciones de 2-KIV (3.22 ± 0.07 g/L) y L-valina (1.39 ± 0.04 g/L). Por tanto, podría usarse no sólo en estos productos mencionados, sino también, en la biosíntesis de cualquier tipo de bio-producto.
4. Este tipo de trabajo es prometedor hacia trabajos de economía circular, para obtener un aditivo para alimento como es la L-valina.

Referencias

- Adams, M. D., Wagner, L. M., Graddis, T. J., Landick, R., Antonucci, T. K., Gibson, A. L., & Oxender, D. L. (1990). Nucleotide sequence and genetic characterization reveal six essential genes for the LIV-I and LS transport systems of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 265(20), 11436–11443. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)38417-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)38417-0)
- Ahmad, T., Aadil, R. M., Ahmed, H., Rahman, U. ur, Soares, B. C. V., Souza, S. L. Q., Pimentel, T. C., Scudino, H., Guimarães, J. T., Esmerino, E. A., Freitas, M. Q., Almada, R. B., Vendramel, S. M. R., Silva, M. C., & Cruz, A. G. (2019). Treatment and utilization of dairy industrial waste: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 361–372. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2019.04.003>
- Aidelberg, G., Towbin, B. D., Rothschild, D., Dekel, E., Bren, A., & Alon, U. (2014). Hierarchy of non-glucose sugars in *Escherichia coli*. *BMC Systems Biology*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12918-014-0133-z>
- Aktypis, A., Tychowski, M., Kalantzopoulos, G., & Aggelis, G. (2007). Studies on bacteriocin (thermophilin T) production by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040 in batch and fed-batch fermentation modes. *Antonie van Leeuwenhoek* 2007 92:2, 92(2), 207–220. <https://doi.org/10.1007/S10482-007-9148-4>
- Al Zaid Siddiquee, K., Arauzo-Bravo, M. J., & Shimizu, K. (2003). Metabolic flux analysis of pykF gene knockout *Escherichia coli* based on ¹³C-labeling experiments together with measurements of enzyme activities and intracellular metabolite concentrations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2004 63:4, 63(4), 407–417. <https://doi.org/10.1007/S00253-003-1357-9>
- Alexeeva, S., Hellingwerf, K. J., & Teixeira de Mattos, M. J. (2003). Requirement of ArcA for redox regulation in *Escherichia coli* under microaerobic but not anaerobic or aerobic conditions. *Journal of Bacteriology*, 185(1), 204–209. <https://doi.org/10.1128/JB.185.1.204-209.2003>
- Alterthum, F., & Ingram, L. O. (1989). Efficient ethanol production from glucose, lactose, and xylose by recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental*

Microbiology, 55(8).

- Alva, A., Sabido-Ramos, A., Escalante, A., & Bolívar, F. (2020). New insights into transport capability of sugars and its impact on growth from novel mutants of *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(4), 1463–1479. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10335-x>
- Amado, I. R., Vázquez, J. A., Pastrana, L., & Teixeira, J. A. (2016). Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. *Food Chemistry*, 198, 54–61. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.11.062>
- Amaro, T. M. M. M., Rosa, D., Comi, G., & Iacumin, L. (2019). Prospects for the use of whey for polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Frontiers in Microbiology*, 992. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00992>
- Amorim Franco, T. M., & Blanchard, J. S. (2017). Bacterial branched-chain amino acid biosynthesis: Structures, mechanisms, and drugability. *Biochemistry*, 56(44), 5849–5865. <https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCHEM.7B00849>
- Anand, S., Mukherjee, K., & Padmanabhan, P. (2020). An insight to flux-balance analysis for biochemical networks. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 36(1), 32–55. <https://doi.org/10.1080/02648725.2020.1847440>
- Antoniewicz, M. R. (2015). Methods and advances in metabolic flux analysis: a mini-review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42(3), 317–325. <https://doi.org/10.1007/S10295-015-1585-X>
- Antoniewicz, M. R. (2021). A guide to metabolic flux analysis in metabolic engineering: Methods, tools and applications. *Metabolic Engineering*, 63, 2–12. <https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2020.11.002>
- AOAC. (2000). *Official Methods of Analysis* (M. Gaithersburg (ed.); 17th ed.). Association of Official Analytical Chemists.
- Araújo, W. L., Martins, A. O., Fernie, A. R., & Tohge, T. (2014). 2-oxoglutarate: Linking TCA cycle function with amino acid, glucosinolate, flavonoid, alkaloid, and gibberellin biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00552>

- Archer, C. T., Kim, J. F., Jeong, H., Park, J. H., Vickers, C. E., Lee, S. Y., & Nielsen, L. K. (2011). The genome sequence of *E. coli* W (ATCC 9637): comparative genome analysis and an improved genome-scale reconstruction of *E. coli*. *BMC Genomics*, *12*(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-9>
- Armingol, E., Tobar, E., & Cabrera, R. (2018). Understanding the impact of the cofactor swapping of isocitrate dehydrogenase over the growth phenotype of *Escherichia coli* on acetate by using constraint-based modeling. *PLoS ONE*, *13*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196182>
- Aso, Y., Tsubaki, M., Dang Long, B. H., Murakami, R., Nagata, K., Okano, H., Phuong Dung, N. T., & Ohara, H. (2019). Continuous production of D-lactic acid from cellobiose in cell recycle fermentation using β -glucosidase-displaying *Escherichia coli*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *127*(4), 441–446. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOOSC.2018.09.011>
- Asunis, F., De Gioannis, G., Dessì, P., Isipato, M., Lens, P. N. L., Muntoni, A., Polettini, A., Pomi, R., Rossi, A., & Spiga, D. (2020). The dairy biorefinery: Integrating treatment processes for cheese whey valorisation. *Journal of Environmental Management*, *276*, 111240. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2020.111240>
- B.N.F. (2013). *Lactose intolerance - British Nutrition Foundation*. <https://archive.nutrition.org.uk/nutritionscience/allergy/lactose-intolerance.html?start=1>
- Badui, S., & Badui, D. (2006). *Química de los alimentos* (E. Quintanar Duarte (ed.); Quarter). Pearson Education. www.pearsoneducacion.net
- Barea, R., Brossard, L., Le Floc'H, N., Primot, Y., Melchior, D., & Van Milgen, J. (2009). The standardized ileal digestible valine-to-lysine requirement ratio is at least seventy percent in postweaned piglets. *Journal of Animal Science*, *87*(3), 935–947. <https://doi.org/10.2527/JAS.2008-1006>
- Bartek, T., Blombach, B., Lang, S., Eikmanns, B. J., Wiechert, W., Oldiges, M., Nöh, K., & Noack, S. (2011). Comparative ^{13}C metabolic flux analysis of pyruvate dehydrogenase complex-deficient, L-valine-producing *Corynebacterium glutamicum*.

- Applied and Environmental Microbiology*, 77(18), 6644–6652.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00575-11>
- Bayless, T. M., Brown, E., & Paige, D. M. (2017). Lactase Non-persistence and Lactose Intolerance. *Current Gastroenterology Reports 2017 19:5*, 19(5), 1–11.
<https://doi.org/10.1007/S11894-017-0558-9>
- Bellaver, L. H., Barbosa De Carvalho, N. M., Abrahão-Neto, J., & Gombert, A. K. (2004). Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. *FEMS Yeast Research*, 4(7), 691–698. <https://doi.org/10.1016/J.FEMSYR.2004.01.004>
- Berlec, A., & Štrukelj, B. (2013). Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40(3–4), 257–274. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1235-0>
- Berwig, K. H., Baldasso, C., & Dettmer, A. (2016). Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate) generated by *Alcaligenes latus* using lactose and whey after acid protein precipitation process. *Bioresource Technology*, 218, 31–37.
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.06.067>
- Bettenbrock, K., Sauter, T., Jahreis, K., Kremling, A., Lengeler, J. W., & Gilles, E. D. (2007). Correlation between growth rates, EIACrr phosphorylation, and intracellular cyclic AMP levels in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 189(19), 6891–6900. <https://doi.org/10.1128/JB.00819-07/ASSET/899E1B62-4B1F-47AB-AF33-BF657284C2B9/ASSETS/GRAPHIC/ZJB0190771450004.JPEG>
- Bianco, C., Imperlini, E., Calogero, R., Senatore, B., Pucci, P., & Defez, R. (2006). Indole-3-acetic acid regulates the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 152(8), 2421–2431. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.28765-0/CITE/REFWORKS>
- Blázquez, B., Torres-Bacete, J., Leon, D. S., Kniewel, R., Martinez, I., Sordon, S., Wilczak, A., Salgado, S., Huszcza, E., Popłoński, J., Prieto, M. A., & Nogales, J. (2022). Golden Standard: A complete standard, portable, and interoperative MoClo tool for

- model and non-model bacterial hosts. *BioRxiv*, 2022.09.20.508659.
<https://doi.org/10.1101/2022.09.20.508659>
- Blombach, B., Schreiner, M. E., Holátko, J., Bartek, T., Oldiges, M., & Eikmanns, B. J. (2007). L-valine production with pyruvate dehydrogenase complex-deficient *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(7), 2079–2084. <https://doi.org/10.1128/AEM.02826-06>
- Bockmann, J., Heuel, H., & Lengeler, J. W. (1992). Characterization of a chromosomally encoded, non-PTS metabolic pathway for sucrose utilization in *Escherichia coli* EC3132. *MGG Molecular & General Genetics*, 235(1), 22–32.
<https://doi.org/10.1007/BF00286177>
- Brandt, S. (2014). Data analysis: Statistical and computational methods for scientists and engineers, fourth edition. *Data Analysis: Statistical and Computational Methods for Scientists and Engineers, Fourth Edition*, 1–523. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-03762-2>
- Bren, A., Park, J. O., Towbin, B. D., Dekel, E., Rabinowitz, J. D., & Alon, U. (2016). Glucose becomes one of the worst carbon sources for *E. coli* on poor nitrogen sources due to suboptimal levels of cAMP. *Scientific Reports*, 6(April), 2–11.
<https://doi.org/10.1038/srep24834>
- Brunengraber, H., & Roe, C. R. (2006). Anaplerotic molecules: Current and future. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 29(2–3), 327–331. <https://doi.org/10.1007/s10545-006-0320-1>
- Buchholz, J., Schwentner, A., Brunnenkan, B., Gabris, C., Grimm, S., Gerstmeir, R., Takors, R., Eikmanns, B. J., & Blombacha, B. (2013). Platform engineering of *Corynebacterium glutamicum* with reduced pyruvate dehydrogenase complex activity for improved production of l-lysine, l-valine, and 2-ketoisovalerate. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(18), 5566–5575.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01741-13>
- Caballero, P., Rodríguez-Morgado, B., Macías, S., Tejada, M., & Parrado, J. (2019). Obtaining Plant and Soil Biostimulants by Waste Whey Fermentation. *Waste and*

- Biomass Valorization* 2019 11:7, 11(7), 3281–3292. <https://doi.org/10.1007/S12649-019-00660-7>
- Calero, P., & Nikel, P. I. (2019). Chasing bacterial chassis for metabolic engineering: a perspective review from classical to non-traditional microorganisms. *Microbial Biotechnology*, 12(1), 98–124. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13292>
- Campos, M., Govers, S. K., Irnov, I., Dobihal, G. S., Cornet, F., & Jacobs-Wagner, C. (2018). Genomewide phenotypic analysis of growth, cell morphogenesis, and cell cycle events in *Escherichia coli*. *Molecular Systems Biology*, 14(6), e7573. <https://doi.org/10.15252/MSB.20177573>
- Carcò, G., Dalla Bona, M., Carraro, L., Latorre, M. A., Fondevila, M., Gallo, L., & Schiavon, S. (2018). Influence of mild feed restriction and mild reduction in dietary amino acid content on feeding behaviour of group-housed growing pigs. *Applied Animal Behaviour Science*, 198, 27–35. <https://doi.org/10.1016/J.APPLANIM.2017.09.020>
- Carlson, R., & Sreenc, F. (2004). Fundamental *Escherichia coli* biochemical pathways for biomass and energy production: creation of overall flux states. *Biotechnology and Bioengineering*, 86(2), 149–162. <https://doi.org/10.1002/BIT.20044>
- Carranza-Saavedra, D., Sánchez Henao, C. P., & Zapata Montoya, J. E. (2021). Kinetic analysis and modeling of L-valine production in fermentation batch from *E. coli* using glucose, lactose and whey as carbon sources. *Biotechnology Reports*, 31(9). <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00642>
- Catone, M. V., Palomino, M. M., Legisa, D. M., Fina Martin, J., Monedero García, V., Ruzal, S. M., & Allievi, M. C. (2021). Lactic acid production using cheese whey based medium in a stirred tank reactor by a ccpA mutant of *Lacticaseibacillus casei*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2021 37:4, 37(4), 1–13. <https://doi.org/10.1007/S11274-021-03028-Z>
- Chen, C., Li, Y., Hu, J., Dong, X., & Wang, X. (2015). Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 for l-valine production. *Metabolic Engineering*, 29, 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.03.004>

- Chen, Y., & Nielsen, J. (2016). Biobased organic acids production by metabolically engineered microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 37, 165–172. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2015.11.004>
- Cheong, S., Clomburg, J. M., & Gonzalez, R. (2018). A synthetic pathway for the production of 2-hydroxyisovaleric acid in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 45(7), 579–588. <https://doi.org/10.1007/S10295-018-2005-9>
- Chung, H. J., Bang, W., & Drake, M. A. (2006). Stress Response of *Escherichia coli*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(3), 52–64. <https://doi.org/10.1111/J.1541-4337.2006.00002.X>
- Cigić, I. K., Vrscaj Vodosek, T., Kosmerl, T., & Strlic, M. (2008). Amino Acid Quantification in the Presence of Sugars using HPLC and Pre-Column Derivatization with 3-MPA/OPA and FMOC-Cl. *Acta Chim. Slov*, 55, 660–664.
- Colombia-Productiva, & MINCOMERCIO. (2020). *Proyecto de caracterización de la leche cruda identificando la presencia del Glicomacropéptido de Caseína c-GMP*. www.colombiaproductiva.com
- Comité-Nacional-De-Paro. (2019). *Agenda del comité nacional de paro para la negociación con el gobierno nacional*. moz-extension://b27e0696-1556-4aa2-ab61-fa4dc8aa74ac/enhanced-reader.html?openApp&pdf=https%3A%2F%2Findepaz.org.co%2Fwp-content%2Fuploads%2F2019%2F12%2FNuevoDocumento-2019-12-17-17.37.50_compressed.pdf
- D’Este, M., Alvarado-Morales, M., & Angelidaki, I. (2018). Amino acids production focusing on fermentation technologies – A review. *Biotechnology Advances*, 36(1), 14–25. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2017.09.001>
- Dack, R. E., Black, G. W., Koutsidis, G., & Usher, S. J. (2017). The effect of Maillard reaction products and yeast strain on the synthesis of key higher alcohols and esters in beer fermentations. *Food Chemistry*, 232, 595–601. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.04.043>

- Damalas, S. G., Batianis, C., Martin-Pascual, M., de Lorenzo, V., & Martins dos Santos, V. A. P. (2020). SEVA 3.1: enabling interoperability of DNA assembly among the SEVA, BioBricks and Type IIS restriction enzyme standards. *Microbial Biotechnology*, *13*(6), 1793–1806. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13609>
- Dien, S. Van. (2016). Metabolic Engineering for Biofuels. In S. Van Dien (Ed.), *Science*.
- Dinika, I., Nurhadi, B., Masruchin, N., Balia, R. L., & Utama, G. L. (2019). The roles of candida tropicalis toward peptide and amino acid changes in cheese whey fermentation. *International Journal of Technology*, *10*(8), 1533–1540. <https://doi.org/10.14716/IJTECH.V10I8.3661>
- Dlamini, A. M., & Peiris, P. S. (1997). Biopolymer production by a Klebsiella oxytoca isolate using whey as fermentation substrate | Enhanced Reader. *Biotechnology Letters*, *19*, 127–130.
- Duncan, D. B. (1955). Multiple Range and Multiple F Tests. *Biometrics*, *11*(1), 1. <https://doi.org/10.2307/3001478>
- Edirisinghe, J. N., Weisenhorn, P., Conrad, N., Xia, F., Overbeek, R., Stevens, R. L., & Henry, C. S. (2016). Modeling central metabolism and energy biosynthesis across microbial life. *BMC Genomics*, *17*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S12864-016-2887-8/FIGURES/4>
- Edwards, P. R., & Ewing, W. H. (1972). Identification of *Enterobacteriaceae*. In *Identification of Enterobacteriaceae*. (Issue Third edition). Burgess Publishing Company. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19732703282>
- Egan, S. E., Fliege, R., Tong, S., Shibata, A., Wolf, R. E., & Conway, T. (1992). Molecular characterization of the Entner-Doudoroff pathway in *Escherichia coli*: Sequence analysis and localization of promoters for the edd-eda operon. *Journal of Bacteriology*, *174*(14), 4638–4646. <https://doi.org/10.1128/jb.174.14.4638-4646.1992>
- Eggeling, L., Pfefferle, W., & Sahm, H. (2001). Amino acids. In C. Ratledge & B. Kristiansen (Eds.), *Basic Biotechnology* (Second). Cambridge University Press.
- Ellis, T., Adie, T., & Baldwin, G. S. (2011). DNA assembly for synthetic biology: From parts to pathways and beyond. *Integrative Biology*, *3*(2), 109–118.

<https://doi.org/10.1039/c0ib00070a>

- Erb, T. J., Jones, P. R., & Bar-Even, A. (2017). Synthetic metabolism: Metabolic engineering meets enzyme design. *Current Opinion in Chemical Biology*, 37, 56–62. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2016.12.023>
- Erian, A. M., Gibisch, M., & Pflügl, S. (2018). Engineered *E. coli* W enables efficient 2,3-butanediol production from glucose and sugar beet molasses using defined minimal medium as economic basis. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/S12934-018-1038-0/TABLES/6>
- Esmailnejad-Moghadam, B., Mokarram, R. R., Hejazi, M. A., Khiabani, M. S., & Keivaninahr, F. (2019). Low molecular weight dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* strains: Optimization of a new culture medium and the rheological assessments. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 18, 100181. <https://doi.org/10.1016/J.BCDF.2019.100181>
- Ewa Janus, Paula Ossowicz, Joanna Kleboko, Anna Nowak, Wiktoria Duchnik, Łukasz Kucharski, & Adam Klimowicz. (2020). Enhancement of ibuprofen solubility and skin permeation by conjugation with l -valine alkyl esters. *RSC Advances*, 10(13), 7570–7584. <https://doi.org/10.1039/D0RA00100G>
- Fakruddin, M., Mazumdar, R. M., Mannan, K. S. Bin, Chowdhury, A., & Hossain, M. N. (2013). Critical factors affecting the success of cloning, expression, and mass production of enzymes by recombinant *E. coli*. *ISRN Biotechnology*, 2013, 1–7. <https://doi.org/10.5402/2013/590587>
- Farmer, I. S., & Jones, C. W. (1976). The energetics of *Escherichia coli* during aerobic growth in continuous culture. *European Journal of Biochemistry*, 67(1), 115–122. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1976.TB10639.X>
- Fassina, P., Nunes, G. Q., Adami, F. S., Goettert, M. I., & De Souza, C. F. V. (2019). Importance of cheese whey processing: supplements for sports activities - a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 69(1), 83–99. <https://doi.org/10.31883/PJFNS-2019-0008>
- Feil, A. A., Schreiber, D., Haetinger, C., Haberkamp, Â. M., Kist, J. I., Rempel, C.,

- Maehler, A. E., Gomes, M. C., & da Silva, G. R. (2020). Sustainability in the dairy industry: a systematic literature review. *Environmental Science and Pollution Research* 2020 27:27, 27(27), 33527–33542. <https://doi.org/10.1007/S11356-020-09316-9>
- Feist, A. M., & Palsson, B. O. (2010). The biomass objective function. *Current Opinion in Microbiology*, 13(3), 344–349. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2010.03.003>
- Felpeto-Santero, C., Rojas, A., Tortajada, M., Galán, B., Ramón, D., & García, J. L. (2015). Engineering alternative isobutanol production platforms. *AMB Express*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0119-2>
- Fernández-Coll, L., & Cashel, M. (2018). Contributions of SpoT hydrolase, SpoT synthetase, and RelA synthetase to carbon source diauxic growth transitions in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01802>
- Fernández-Gutiérrez, D., Veillette, M., Ramirez, A. Á., Giroir-Fendler, A., Faucheux, N., & Heitz, M. (2021). Fermentation of whey and its permeate using a genetically modified strain of *Escherichia coli* K12 MG1655 to produce 2,3-butanediol. *Environmental Quality Management*. <https://doi.org/10.1002/TQEM.21788>
- Fischer, E., Zamboni, N., & Sauer, U. (2004). High-throughput metabolic flux analysis based on gas chromatography–mass spectrometry derived ¹³C constraints. *Analytical Biochemistry*, 325(2), 308–316. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2003.10.036>
- Font, E. G., & Sprenger, G. A. (2020). Opening a novel biosynthetic pathway to dihydroxyacetone and glycerol in *Escherichia coli* mutants through expression of a gene variant (fsaAA129S) for fructose 6-phosphate aldolase. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 9625, 21(24), 9625. <https://doi.org/10.3390/IJMS21249625>
- Forsgård, R. A. (2019). Lactose digestion in humans: intestinal lactase appears to be constitutive whereas the colonic microbiome is adaptable. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 110(2), 273–279. <https://doi.org/10.1093/AJCN/NQZ104>
- Fragoso-Jiménez, J. C., Baert, J., Nguyen, T. M., Liu, W., Sassi, H., Goormaghtigh, F., Van

- Melderer, L., Gaytán, P., Hernández-Chávez, G., Martínez, A., Delvigne, F., & Gosset, G. (2019). Growth-dependent recombinant product formation kinetics can be reproduced through engineering of glucose transport and is prone to phenotypic heterogeneity. *Microbial Cell Factories*, *18*(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1073-5>
- Frank, R. A. W., Kay, C. W. M., Hirst, J., & Luisi, B. F. (2008). Off-Pathway, oxygen-dependent Thiamine radical in the Krebs cycle. *Journal of the American Chemical Society*, *130*(5), 1662. <https://doi.org/10.1021/JA076468K>
- García-Jiménez, B., Torres-Bacete, J., & Nogales, J. (2021). Metabolic modelling approaches for describing and engineering microbial communities. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *19*, 226. <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2020.12.003>
- García Sánchez, C. E., & Torres Sáez, R. G. (2014). Comparison and analysis of objective functions in flux balance analysis. *Biotechnology Progress*, *30*(5), 985–991. <https://doi.org/10.1002/BTPR.1949>
- Gawin, A., Valla, S., & Brautaset, T. (2017). The XylS/Pm regulator/promoter system and its use in fundamental studies of bacterial gene expression, recombinant protein production and metabolic engineering. *Microbial Biotechnology*, *10*(4), 702–718. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12701>
- Geraskina, N. V., Sycheva, E. V., Samsonov, V. V., Eremina, N. S., Hook, C. D., Serebrianyi, V. A., & Stoyanova, N. V. (2019). Engineering *Escherichia coli* for autoinducible production of L-valine: An example of an artificial positive feedback loop in amino acid biosynthesis. *PLoS ONE*, *14*(4), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215777>
- Gilman, J., Walls, L., Bandiera, L., & Menolascina, F. (2021). Statistical Design of Experiments for Synthetic Biology. *ACS Synthetic Biology*, *10*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00385>
- Gleiser, I. E., & Bauer, S. (1981). Growth of *E. coli* W to high cell concentration by oxygen level linked control of carbon source concentration. *Biotechnology and*

- Bioengineering*, 23(5), 1015–1021. <https://doi.org/10.1002/bit.260230509>
- Gordeeva, Y. L., Rudakovskaya, E. G., Gordeeva, E. L., & Borodkin, A. G. (2017). Mathematical modeling of biotechnological process of lactic acid production by batch fermentation: A review. *Theoretical Foundations of Chemical Engineering* 2017 51:3, 51(3), 282–298. <https://doi.org/10.1134/S0040579517030058>
- Gregorio, V. F., Pié, L., & Terceño, A. (2018). A systematic literature review of bio, green and circular economy trends in publications in the field of economics and business management. *Sustainability* 2018, Vol. 10, Page 4232, 10(11), 4232. <https://doi.org/10.3390/SU10114232>
- Gu, J., Zhou, J., Zhang, Z., Kim, C. H., Jiang, B., Shi, J., & Hao, J. (2017). Isobutanol and 2-ketoisovalerate production by *Klebsiella pneumoniae* via a native pathway. *Metabolic Engineering*, 43(August), 71–84. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.07.003>
- Guo, Y., Han, M., Xu, J., & Zhang, W. (2015). Analysis of acetohydroxyacid synthase variants from branched-chain amino acids-producing strains and their effects on the synthesis of branched-chain amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. *Protein Expression and Purification*, 109, 106–112. <https://doi.org/10.1016/J.PEP.2015.02.006>
- Hafez, A. M. A., Abdelhady, H. M., & El-Tayeb, T. S. (2007). Bioconversion of various industrial by-products and agricultural wastes into pullulan. In *Journal of Applied Sciences Research* (Vol. 3, Issue 11).
- Hanson, R. S., & Cox, D. P. (1967). Effect of different nutritional conditions on the synthesis of tricarboxylic acid cycle enzymes. *Journal of Bacteriology*, 93(6), 1777–1787. <https://doi.org/10.1128/JB.93.6.1777-1787.1967>
- Hao, Y., Ma, Q., Liu, X., Fan, X., Men, J., Wu, H., Jiang, S., Tian, D., Xiong, B., & Xie, X. (2020). High-yield production of L-valine in engineered *Escherichia coli* by a novel two-stage fermentation. *Metabolic Engineering*, 62(September), 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.09.007>
- Hasegawa, S., Suda, M., Uematsu, K., Natsuma, Y., Hiraga, K., Jojima, T., Inui, M., &

- Yukawa, H. (2013). Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for high-yield l-valine production under oxygen deprivation conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(4), 1250–1257. <https://doi.org/10.1128/AEM.02806-12>
- Hausjell, J., Miltner, M., Herzig, C., Limbeck, A., Saracevic, Z., Saracevic, E., Weissensteiner, J., Molitor, C., Halbwirth, H., & Spadiut, O. (2019). Valorisation of cheese whey as substrate and inducer for recombinant protein production in *E. coli* HMS174(DE3). *Bioresource Technology Reports*, 8, 100340. <https://doi.org/10.1016/J.BITEB.2019.100340>
- Heirendt, L., Arreckx, S., Pfau, T., Mendoza, S. N., Richelle, A., Heinken, A., Haraldsdóttir, H. S., Wachowiak, J., Keating, S. M., Vlasov, V., Magnusdóttir, S., Ng, C. Y., Preciat, G., Žagare, A., Chan, S. H. J., Aurich, M. K., Clancy, C. M., Modamio, J., Sauls, J. T., ... Fleming, R. M. T. (2019). Creation and analysis of biochemical constraint-based models using the COBRA Toolbox v.3.0. *Nature Protocols*, 14(3), 639–702. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0098-2>
- Hendawy, W. S., Kanani, Y. M., Batawy, O. I., & Mongy, T. M. (2019). Optimization the alginate production conditions in sweet whey medium by *Azotobacter chroococcum*. *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*, 27(1), 479–489. <https://doi.org/10.21608/AJS.2019.43586>
- Hermann, T. (2003). Industrial production of amino acids by *Coryneform Bacterium*. *Journal of Biotechnology*, 104(1–3), 155–172. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00149-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00149-4)
- Herring, C. D., Glasner, J. D., & Blattner, F. R. (2003). Gene replacement without selection: regulated suppression of amber mutations in *Escherichia coli*. *Gene*, 311(1–2), 153–163. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(03\)00585-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00585-7)
- Hill, N. S., Buske, P. J., Shi, Y., & Levin, P. A. (2013). A Moonlighting Enzyme Links *Escherichia coli* Cell Size with Central Metabolism. *PLOS Genetics*, 9(7), e1003663. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1003663>
- Hoischen, C., & Kramer, R. (1990). Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of*

- Bacteriology*, 172(6), 3409–3416. <https://doi.org/10.1128/JB.172.6.3409-3416.1990>
- Hoischen, C., & Krämer, R. (1989). Evidence for an efflux carrier system involved in the secretion of glutamate by *Corynebacterium glutamicum*. *Archives of Microbiology* 1989 151:4, 151(4), 342–347. <https://doi.org/10.1007/BF00406562>
- Holátko, J., Elišáková, V., Prouza, M., Sobotka, M., Nešvera, J., & Pátek, M. (2009). Metabolic engineering of the L-valine biosynthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum* using promoter activity modulation. *Journal of Biotechnology*, 139(3), 203–210. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTECH.2008.12.005>
- Hou, L., Jia, L., Morrison, H. M., L.-W. Majumder, E., & Kumar, D. (2021). Enhanced polyhydroxybutyrate production from acid whey through determination of process and metabolic limiting factors. *Bioresource Technology*, 342(September), 125973. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125973>
- Hou, X., Chen, X., Zhang, Y., Qian, H., & Zhang, W. (2012). L-Valine production with minimization of by-products' synthesis in *Corynebacterium glutamicum* and *Brevibacterium flavum*. *Amino Acids* 2012 43:6, 43(6), 2301–2311. <https://doi.org/10.1007/S00726-012-1308-9>
- Huang, H. T. (1961). *Fermentation process* (Patent No. 2,975,105). Patent and Trademark Office.
- Iglesias-Iglesias, R., Portela-Grandío, A., Treu, L., Campanaro, S., Kennes, C., & Veiga, M. C. (2021). Co-digestion of cheese whey with sewage sludge for caproic acid production: Role of microbiome and polyhydroxyalkanoates potential production. *Bioresource Technology*, 337, 125388. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.125388>
- Ikeda, M. (2003). Amino Acid Production Processes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 79, 1–35. https://doi.org/10.1007/3-540-45989-8_1
- Immanuel, S. R. C., Banerjee, D., Rajankar, M. P., & Raghunathan, A. (2018). Integrated constraints based analysis of an engineered violacein pathway in *Escherichia coli*. *Biosystems*, 171, 10–19. <https://doi.org/10.1016/J.BIOSYSTEMS.2018.06.002>
- Irnov, I., Wang, Z., Jannetty, N. D., Bustamante, J. A., Rhee, K. Y., & Jacobs-Wagner, C.

- (2017). Crosstalk between the tricarboxylic acid cycle and peptidoglycan synthesis in *Caulobacter crescentus* through the homeostatic control of α -ketoglutarate. *PLOS Genetics*, 13(8), e1006978. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1006978>
- Iskandar, C. F., Cailliez-Grimal, C., Borges, F., & Revol-Junelles, A. M. (2019). Review of lactose and galactose metabolism in Lactic Acid Bacteria dedicated to expert genomic annotation. *Trends in Food Science and Technology*, 88, 121–132. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2019.03.020>
- Izaguirre, M. E., & Castillo, F. J. (1982). Selection of lactose-fermenting yeast for ethanol production from whey. *Biotechnology Letters*, 4, 257–262.
- Jeckelmann, J. M., & Erni, B. (2020). Transporters of glucose and other carbohydrates in bacteria. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 472(9), 1129–1153. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02379-0>
- Jessop-Fabre, M. M., & Sonnenschein, N. (2019). Improving reproducibility in synthetic biology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7(FEB), 18. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00018>
- Jung, H. M., Han, J. H., & Oh, M. K. (2020). Improved production of 2,3-butanediol and isobutanol by engineering electron transport chain in *Escherichia coli*. *Microbial Biotechnology*, 14(1), 213–226. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13669>
- Kallarakkal, K. P., Muthukumar, K., Alagarsamy, A., Pugazhendhi, A., & Naina Mohamed, S. (2021). Enhancement of biobutanol production using mixotrophic culture of *Oscillatoria sp.* in cheese whey water. *Fuel*, 284, 119008. <https://doi.org/10.1016/J.FUEL.2020.119008>
- Kaminarides, S., Aktypis, A., Koronios, G., Massouras, T., & Papanikolaou, S. (2018). Effect of ‘in situ’ produced bacteriocin thermophilin T on the microbiological and physicochemical characteristics of Myzithra whey cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 71, 213–222. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12448>
- Kaplun, A., Vyazmensky, M., Zherdev, Y., Belenky, I., Slutzker, A., Mendel, S., Barak, Z., Chipman, D. M., & Shaanan, B. (2006). Structure of the regulatory subunit of acetohydroxyacid synthase isozyme III from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular*

- Biology*, 357(3), 951–963. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2005.12.077>
- Karau, A., & Grayson, I. (2014). Amino Acids in Human and Animal Nutrition. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 143, 189–228.
https://doi.org/10.1007/10_2014_269
- Katz, L., Chen, Y. Y., Gonzalez, R., Peterson, T. C., Zhao, H., & Baltz, R. H. (2018). Synthetic biology advances and applications in the biotechnology industry: a perspective. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 45(7), 449–461.
<https://doi.org/10.1007/s10295-018-2056-y>
- Kawaguchi, T., Izumi, N., Charlton, M. R., & Sata, M. (2011). Branched-chain amino acids as pharmacological nutrients in chronic liver disease. *Hepatology*, 54(3), 1063–1070.
<https://doi.org/10.1002/HEP.24412>
- Kerem, Z., Bravdo, B. A., Shoseyov, O., & Tugendhaft, Y. (2004). Rapid liquid chromatography–ultraviolet determination of organic acids and phenolic compounds in red wine and must. *Journal of Chromatography A*, 1052(1–2), 211–215.
<https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2004.08.105>
- Kiley, P. J., & Beinert, H. (2003). The role of Fe–S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 6(2), 181–185.
[https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00039-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00039-0)
- Kim, Kim, W. J., Kim, H. U., & Lee, S. Y. (2020). Machine learning applications in systems metabolic engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 64, 1–9.
<https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2019.08.010>
- Kim, W. J., Kim, H. U., & Lee, S. Y. (2017). Current state and applications of microbial genome-scale metabolic models. In *Current Opinion in Systems Biology* (Vol. 2, pp. 10–18). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2017.03.001>
- Kim, Webb, A. M., Kershner, J. P., Blaskowski, S., & Copley, S. D. (2014). A versatile and highly efficient method for scarless genome editing in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *BMC Biotechnology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-84>
- Klapa, M. I., Aon, J. C., & Stephanopoulos, G. (2003). Systematic quantification of complex metabolic flux networks using stable isotopes and mass spectrometry.

- European Journal of Biochemistry*, 270(17), 3525–3542.
<https://doi.org/10.1046/J.1432-1033.2003.03732.X>
- Ko, Y. T., & Chipley, J. R. (1983). Microbial production of lysine and threonine from whey permeate. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(2), 610–615.
<https://doi.org/10.1128/AEM.45.2.610-615.1983>
- Koebmann, B. J., Westerhoff, H. V., Snoep, J. L., Nilsson, D., & Jensen, P. R. (2002). The glycolytic flux in *Escherichia coli* is controlled by the demand for ATP. *Journal of Bacteriology*, 184(14), 3909–3916. <https://doi.org/10.1128/JB.184.14.3909-3916.2002>
- Krause, F. S., Blombach, B., & Eikmanns, B. J. (2010). Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for 2-Ketoisovalerate production. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(24), 8053–8061.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01710-10>
- Królczyk, J. B., & Janiszewska-Turak, E. (2016). Use of whey and whey preparations in the food industry-A review. *Article in Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 66(3), 157–165. <https://doi.org/10.1515/pjfn-2015-0052>
- Lagoa-Costa, B., Kennes, C., & Veiga, M. C. (2020). Cheese whey fermentation into volatile fatty acids in an anaerobic sequencing batch reactor. *Bioresource Technology*, 308, 123226. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2020.123226>
- Lara, A. R., Taymaz-Nikerel, H., Mashego, M. R., Van Gulik, W. M., Heijnen, J. J., Ramírez, O. T., & Van Winden, W. A. (2009). Fast dynamic response of the fermentative metabolism of *Escherichia coli* to aerobic and anaerobic glucose pulses. *Biotechnology and Bioengineering*, 104(6), 1153–1161.
<https://doi.org/10.1002/BIT.22503>
- Lee, M., Smith, G. M., Eiteman, M. A., & Altman, E. (2004). Aerobic production of alanine by *Escherichia coli* aceF IdhA mutants expressing the *Bacillus sphaericus* alaD gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(1), 56–60.
<https://doi.org/10.1007/s00253-004-1560-3>
- Lee, Park, J. M., & Kim, T. Y. (2011). Application of Metabolic Flux Analysis in Metabolic Engineering. *Methods in Enzymology*, 498, 67–93.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385120-8.00004-8>

Lee, S. Y., & Chang, H. N. (1993). High cell density cultivation of *Escherichia coli* W using sucrose as a carbon source. *Biotechnology Letters*, *15*(9), 971–974.

<https://doi.org/10.1007/BF00131766>

Lee, S. Y., & Kim, H. U. (2015). Systems strategies for developing industrial microbial strains. *Nature Biotechnology* *2015 33:10*, *33*(10), 1061–1072.

<https://doi.org/10.1038/nbt.3365>

Lee, W. H., Seo, S. O., Bae, Y. H., Nan, H., Jin, Y. S., & Seo, J. H. (2012). Isobutanol production in engineered *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of 2-ketoisovalerate decarboxylase and valine biosynthetic enzymes. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *35*(9), 1467–1475. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0736-y>

Leuchtenberger, W., Huthmacher, K., & Drauz, K. (2005). Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* *2005 69:1*, *69*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/S00253-005-0155-Y>

Lewis, N. E., Hixson, K. K., Conrad, T. M., Lerman, J. A., Charusanti, P., Polpitiya, A. D., Adkins, J. N., Schramm, G., Purvine, S. O., Lopez-Ferrer, D., Weitz, K. K., Eils, R., König, R., Smith, R. D., & Palsson, B. (2010). Omic data from evolved *E. coli* are consistent with computed optimal growth from genome-scale models. *Molecular Systems Biology*, *6*(1), 390. <https://doi.org/10.1038/MSB.2010.47>

Li, C., Ding, J., Chen, D., Shi, Z., & Wang, L. (2020). Bioconversion of cheese whey into a hetero-exopolysaccharide via a one-step bioprocess and its applications. *Biochemical Engineering Journal*, *161*, 107701. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2020.107701>

Liao, C.-C., Yousef, A. E., Richter, E. R., & Chism, G. W. (1993). Bediococcus acidilactici PO2 Bacteriocin Production in Whey Permeate and Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Foods I. *Journal of Food Science*, *58*(2).

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb04291.x>

Liu, Y., & Nielsen, J. (2019). Recent trends in metabolic engineering of microbial chemical factories. *Current Opinion in Biotechnology*, *60*, 188–197.

<https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2019.05.010>

- LN, C., & DG, F. (1977). Pathways of NADPH formation in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 252 (10), 3382–3391. <http://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=PASCAL7850028223>
- Lodge, J., Lund, P., & Minchin, S. (2007). *Gene cloning* (J. Lodge, P. Lund, & S. Minchin (eds.)). Taylor & Francis Group.
- Long, C. P., Gonzalez, J. E., Feist, A. M., Palsson, B. O., & Antoniewicz, M. R. (2017). Fast growth phenotype of *E. coli* K-12 from adaptive laboratory evolution does not require intracellular flux rewiring. *Metabolic Engineering*, 44, 100–107. <https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2017.09.012>
- Lopes, A. C. A., Eda, S. H., Andrade, R. P., Amorim, J. C., & Duarte, W. F. (2019). New alcoholic fermented beverages—potentials and challenges. *Fermented Beverages: Volume 5. The Science of Beverages*, 577–603. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815271-3.00014-2>
- Louasté, B., & Eloutassi, N. (2020). Succinic acid production from whey and lactose by *Actinobacillus succinogenes* 130Z in batch fermentation. *Biotechnology Reports*, 27, e00481. <https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2020.E00481>
- Luo, Y., Zhang, T., & Wu, H. (2014). The transport and mediation mechanisms of the common sugars in *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances*, 32(5), 905–919. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.009>
- Luque, J., & Herráez, Á. (2000). *Biología molecular e ingeniería genética* (J. Luque & Á. Herráez (eds.)). Elsevier.
- Macnab, R., Moses, V., & Mowbray, J. (1973). Evidence for Metabolic Compartmentation in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 34(1), 15–19. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1973.TB02722.X>
- Maleki, N., & Eiteman, M. A. (2017). Recent Progress in the Microbial Production of Pyruvic Acid. *Fermentation 2017, Vol. 3, Page 8*, 3(1), 8. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION3010008>
- Malvido, M. C., González, E. A., Bazán Tantaleán, D. L., Bendaña Jácome, R. J., &

- Guerra, N. P. (2019). Batch and fed-batch production of probiotic biomass and nisin in nutrient-supplemented whey media. *Brazilian Journal of Microbiology* 2019 50:4, 50(4), 915–925. <https://doi.org/10.1007/S42770-019-00114-1>
- Martínez-García, E., Fraile, S., Algar, E., Aparicio, T., Velázquez, E., Calles, B., Tas, H., Blázquez, B., Martín, B., Prieto, C., Sánchez-Sampedro, L., Nørholm, M. H. H., Volke, D. C., Wirth, N. T., Dvořák, P., Alejaldre, L., Grozinger, L., Crowther, M., Goñi-Moreno, A., ... de Lorenzo, V. (2022). SEVA 4.0: an update of the Standard European Vector Architecture database for advanced analysis and programming of bacterial phenotypes. *Nucleic Acids Research*, 1(1256879), 13–14. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC1059>
- Maser, A., Peebo, K., Vilu, R., & Nahku, R. (2020). Amino acids are key substrates to *Escherichia coli* BW25113 for achieving high specific growth rate. *Research in Microbiology*, 171(5–6), 185–193. <https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2020.02.001>
- Mears, L., Stocks, S. M., Albaek, M. O., Sin, G., & Gernaey, K. V. (2017). Mechanistic fermentation models for process design, monitoring, and control. *Trends in Biotechnology*, 35(10), 914–924. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2017.07.002>
- Meiering, A. G., Azi, F. A., & Gregory, K. F. (1978). Microbial Protein Production from Whey and Cassava. *Transactions of the ASAE*, 21(3), 586–0593. <https://doi.org/10.13031/2013.35349>
- Menchik, P., Zuber, T., Zuber, A., & Moraru, C. I. (2019). Short communication: Composition of coproduct streams from dairy processing: Acid whey and milk permeate. *Journal of Dairy Science*, 102(5), 3978–3984. <https://doi.org/10.3168/JDS.2018-15951>
- Meng, W., Zhang, Y., Cao, M., Zhang, W., Lü, C., Yang, C., Gao, C., Xu, P., & Ma, C. (2020). Efficient 2,3-butanediol production from whey powder using metabolically engineered *Klebsiella oxytoca*. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12934-020-01420-2/TABLES/2>
- Mienda, B. S. (2017). *Escherichia coli* genome-scale metabolic gene knockout of lactate dehydrogenase (ldhA), increases succinate production from glycerol.

<https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1395768>, 36(14), 3680–3686.

<https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1395768>

Millard, P., Smallbone, K., & Mendes, P. (2017). Metabolic regulation is sufficient for global and robust coordination of glucose uptake, catabolism, energy production and growth in *Escherichia coli*. *PLoS Computational Biology*, 13(2).

<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005396>

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/AC60147A030>

MINAGRICULTURA, & MINPROTECCIÓN. (2006). *Decreto 616 de 2006*. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Ministerio de la Protección Social.

MinAmbiente. (2010). Decreto 3930. *Presidencia República de Colombia*.

<https://www.suin-juriscol.gov.co/viewDocument.asp?id=1878873>

Mohite, O. S., Weber, T., Kim, H. U., & Lee, S. Y. (2019). Genome-scale metabolic reconstruction of *Actinomycetes* for antibiotics production. *Biotechnology Journal*, 14(1), 1800377. <https://doi.org/10.1002/BIOT.201800377>

Moreno Grau, S., & Bayo Bernal, J. (1996). *Diseño de biorreactores y enzimología*. Editum. Ediciones de la Universidad de Murcia.

Morgan, M. J. (1986). *Carbohydrate Metabolism in Cultured Cells* (M. J. Morgan (ed.)). Plenum Press.

Mori, M., Marinari, E., & De Martino, A. (2019). A yield-cost tradeoff governs *Escherichia coli*'s decision between fermentation and respiration in carbon-limited growth. *Npj Systems Biology and Applications* 2019 5:1, 5(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41540-019-0093-4>

Mulcahy, E. M., Fargier-Lagrange, M., Mulvihill, D. M., & O'Mahony, J. A. (2017). Characterisation of heat-induced protein aggregation in whey protein isolate and the influence of aggregation on the availability of amino groups as measured by the ortho-phthaldialdehyde (OPA) and trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) methods. *Food Chemistry*, 229, 66–74. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.01.155>

Naciones-Unidas. (2015). *Paris Agreement Spanish*. Naciones Unidas. moz-

extension://b27e0696-1556-4aa2-ab61-fa4dc8aa74ac/enhanced-reader.html?openApp&pdf=https%3A%2F%2Ffuncce.int%2Fsites%2Fdefault%2Ffiles%2Fspanish_paris_agreement.pdf

- Nagata, S. (2001). Growth of *Escherichia coli* ATCC 9637 through the uptake of compatible solutes at high osmolarity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(4), 324–329. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80234-6](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80234-6)
- Neinast, M., Murashige, D., & Arany, Z. (2019). Branched Chain Amino Acids. *Annual Review of Physiology*, 81, 139–164. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114455>
- Newton, E. R., Irwin, J., Charbonneau, D., -, A., Gao, J., Dong, Y.-W., Shang, M.-S., Yang, Z., Zhang, Z.-K., Zhou -, T., Wang, W., & Lu, Y. (2018). Analysis of the mean absolute error (MAE) and the root mean square error (RMSE) in assessing rounding model. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 324(1), 012049. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/324/1/012049>
- Ngome, M. T., de Oliveira Meira, A. C. F., Torres, D. L. H., de Abreu, L. R., Mondragón-Bernal, O. L., Piccoli, R. H., & Alves, J. G. L. F. (2021). Biosynthesis of propionic acid using whey and calcium carbonate by mixed culture of *Propionibacterium freundenreichii* ATCC 6207 and *Lactobacillus paracasei*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 2021 38:4, 38(4), 811–822. <https://doi.org/10.1007/S43153-021-00143-0>
- Nielsen, J. (2001). Metabolic engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2001 55:3, 55(3), 263–283. <https://doi.org/10.1007/S002530000511>
- Nitschel, R., Ankenbauer, A., Welsch, I., Wirth, N. T., Massner, C., Ahmad, N., McColm, S., Borges, F., Fotheringham, I., Takors, R., & Blombach, B. (2020). Engineering *Pseudomonas putida* KT2440 for the production of isobutanol. *Engineering in Life Sciences*, 20(5–6), 148–159. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900151>
- Nitschke, M., Rodrigues, V., & Schinatto, L. F. (2001). Formulação de meios de cultivo à base de soro de leite para a produção de goma xantana por *X. Campestris* C7L. *Food Science and Technology*, 21(1), 82–85. <https://doi.org/10.1590/S0101->

20612001000100018

- Noda, S., Mori, Y., Oyama, S., Kondo, A., Araki, M., & Shirai, T. (2019). Reconstruction of metabolic pathway for isobutanol production in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 124. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1171-4>
- Nogales, J., Canales, A., Jiménez-Barbero, J., Serra, B., Pingarrón, J., García, J., & Díaz, E. (2011). Unravelling the gallic acid degradation pathway in bacteria: the gal cluster from *Pseudomonas putida*. *Molecular Microbiology*, 79(2), 359–374. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2010.07448.X>
- Nooshkam, M., Varidi, M., & Bashash, M. (2019). The Maillard reaction products as food-born antioxidant and antibrowning agents in model and real food systems. *Food Chemistry*, 275, 644–660. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.09.083>
- Noronha, S. B., Yeh, H. J. C., Spande, T. F., & Shiloach, J. (2000). Investigation of the TCA cycle and the glyoxylate shunt in *Escherichia coli* BL21 and JM109 using ¹³C-NMR/MS. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(3), 316–327. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000505\)68:3<316::AID-BIT10>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000505)68:3<316::AID-BIT10>3.0.CO;2-2)
- Novak, K., Baar, J., Freitag, P., & Pflügl, S. (2020). Metabolic engineering of *Escherichia coli* W for isobutanol production on chemically defined medium and cheese whey as alternative raw material. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 47(12), 1117–1132. <https://doi.org/10.1007/S10295-020-02319-Y>
- Novak, K., Flöckner, L., Erian, A. M., Freitag, P., Herwig, C., & Pflügl, S. (2018). Characterizing the effect of expression of an acetyl-CoA synthetase insensitive to acetylation on co-utilization of glucose and acetate in batch and continuous cultures of *E. coli* W. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S12934-018-0955-2/TABLES/5>
- Okamoto, K., Nakagawa, S., Kanawaku, R., & Kawamura, S. (2019). Ethanol production from cheese whey and expired milk by the brown rot fungus *neolentinus lepideus*. *Fermentation* 2019, Vol. 5, Page 49, 5(2), 49. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION5020049>

- Okpokwasili, G. C., & Nweke, C. O. (2016). Microbial growth and substrate utilization kinetics. *African Journal of Biotechnology*, 5(4), 305–317.
<https://doi.org/10.4314/ajb.v5i4>.
- Öktem, Y. A. (2019). Microbial growth kinetics of an anaerobic acidogenic bioreactor. In N. Balkaya & S. Guneysu (Eds.), *Recycling and reuse approaches for better sustainability* (pp. 233–243). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95888-0_19
- Oldiges, M., Eikmanns, B. J., & Blombach, B. (2014). Application of metabolic engineering for the biotechnological production of L-valine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(13), 5859–5870. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5782-8>
- Önür, Z. Y., Çelik, K., Baytekin, H., & Uzatici, A. (2020). Innovative products produced from whey. In K. Çelik (Ed.), *Whey Every Aspect* (p. 61). Uzundijital.
- Owen, O. E., Kalhan, S. C., & Hanson, R. W. (2002). The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *Journal of Biological Chemistry*, 277(34), 30409–30412. <https://doi.org/10.1074/jbc.R200006200>
- Pandey, K. K., Sood, S. K., Verma, S. K., Kumar, S., Rani, S., & Ganguli, S. (2019). Bioutilization of paneer whey waste for production of paneer making powder containing pediocin PA-1 as a biopreservative to enhance shelf life of paneer. *LWT*, 113, 108243. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.06.010>
- Pandi, K., Chauhan, A. S., Khan, W. H., & Rathore, A. S. (2020). Phosphate starvation controls lactose metabolism to produce recombinant protein in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(22), 9707–9718.
<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10935-y>
- Panikov, N. S. (1995). *Microbial Growth Kinetics* (First). Chapman & Hall.
- Panikuttira, B., O’Shea, N., Tobin, J. T., Tiwari, B. K., & O’Donnell, C. P. (2018). Process analytical technology for cheese manufacture. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(8), 1803–1815. <https://doi.org/10.1111/IJFS.13806>
- Park, J. H., Jang, Y., Lee, J. W., & Lee, S. Y. (2011). *Escherichia coli* W as a new platform strain for the enhanced production of L-Valine by systems metabolic engineering.

- 108(5), 1140–1147. <https://doi.org/10.1002/bit.23044>
- Park, J. H., Kim, T. Y., Lee, K. H., & Lee, S. Y. (2011). Fed-batch culture of *Escherichia coli* for L-valine production based on in silico flux response analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(4), 934–946. <https://doi.org/10.1002/bit.22995>
- Park, J. H., Lee, K. H., Kim, T. Y., & Lee, S. Y. (2007). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of L -valine based on transcriptome analysis and in silico gene knockout simulation. *PNAS*, 104(19), 7797–7802. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702609104>
- Pasotti, L., Zucca, S., Casanova, M., Micoli, G., Cusella De Angelis, M. G., & Magni, P. (2017). Fermentation of lactose to ethanol in cheese whey permeate and concentrated permeate by engineered *Escherichia coli*. *BMC Biotechnology*, 17(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S12896-017-0369-Y/FIGURES/5>
- Pátek, M. (2007). Branched-Chain Amino Acids. In *Amino Acid Biosynthesis ~ Pathways, Regulation and Metabolic Engineering* (Issue 5, pp. 129–162). Springer. https://doi.org/10.1007/7171_2006_070
- Pauline, M. D. (2012). *Bioprocess Engineering Principles* (Second). Academic Press.
- Paulsen, I. T., Reizer, J., Jin, R. Z., Lin, E. C. C., & Saier, J. (2000). Functional genomic studies of dihydroxyacetone utilization in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 146(10), 2343–2344. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-10-2343/CITE/REFWORKS>
- Peterson, C. N., Mandel, M. J., & Silhavy, T. J. (2005). *Escherichia coli* starvation diets: Essential nutrients weigh in distinctly. *Journal of Bacteriology*, 187(22), 7549–7553. <https://doi.org/10.1128/JB.187.22.7549-7553.2005>
- Phue, J. N., & Shiloach, J. (2005). Impact of dissolved oxygen concentration on acetate accumulation and physiology of *E. coli* BL21, evaluating transcription levels of key genes at different dissolved oxygen conditions. *Metabolic Engineering*, 7(5–6), 353–363. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2005.06.003>
- Pines, G., Freed, E. F., Winkler, J. D., & Gill, R. T. (2015). Bacterial Recombineering: Genome Engineering via Phage-Based Homologous Recombination. *ACS Synthetic Biology*, 4(11), 1176–1185. <https://doi.org/10.1021/ACSSYNBIO.5B00009>

- Pinhal, S., Ropers, D., Geiselmann, J., & De Jong, H. (2019). Acetate metabolism and the inhibition of bacterial growth by acetate. *Journal of Bacteriology*, 201(13), 147–166. <https://doi.org/10.1128/JB.00147-19>
- Pontrelli, S., Chiu, T., Lan, E. I., Chen, F. Y., Chang, P., & Liao, J. C. (2018). *Escherichia coli* as a host for metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, April, 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.008>
- Pospíšil, S., Kopecký, J., Přikrylová, V., & Spížek, J. (1999). Overproduction of 2-ketoisovalerate and monensin production by regulatory mutants of *Streptomyces cinnamomensis* resistant to 2-ketobutyrate and amino acids. *FEMS Microbiology Letters*, 172(2), 197–204. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00042-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00042-7)
- Prazeres, A. R., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48–68. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2012.05.018>
- Price, N. D., Schellenberger, J., & Palsson, B. O. (2004). Uniform sampling of steady-state flux spaces: Means to design experiments and to interpret enzymopathies. *Biophysical Journal*, 87(4), 2172–2186. <https://doi.org/10.1529/BIOPHYSJ.104.043000>
- Qian, H., Beard, D. A., & Liang, S. D. (2003). Stoichiometric network theory for nonequilibrium biochemical systems. *European Journal of Biochemistry*, 270(3), 415–421. <https://doi.org/10.1046/J.1432-1033.2003.03357.X>
- Radmacher, E., Vaitsikova, A., Burger, U., Krumbach, K., Sahm, H., & Eggeling, L. (2002). Linking central metabolism with increased pathway flux: L-valine accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2246–2250. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2246-2250.2002>
- Ramos, L. R., de Menezes, C. A., Soares, L. A., Sakamoto, I. K., Varesche, M. B. A., & Silva, E. L. (2019). Controlling methane and hydrogen production from cheese whey in an EGSB reactor by changing the HRT. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 2019 43:4, 43(4), 673–684. <https://doi.org/10.1007/S00449-019-02265-9>
- Rangel, A. E. T., Gómez Ramírez, J. M., & González Barrios, A. F. (2020). From industrial by-products to value-added compounds: the design of efficient microbial cell factories

- by coupling systems metabolic engineering and bioprocesses. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 14(6), 1228–1238. <https://doi.org/10.1002/BBB.2127>
- Rao, R., & Basak, N. (2021). Optimization and modelling of dark fermentative hydrogen production from cheese whey by *Enterobacter aerogenes* 2822. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(2), 1777–1800. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2020.10.142>
- Ren, N., Guo, W., Liu, B., Cao, G., & Ding, J. (2011). Biological hydrogen production by dark fermentation: challenges and prospects towards scaled-up production. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), 365–370. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2011.04.022>
- Ren, X.-D., Chen, X.-S., Tang, L., Sun, Q.-X., Zeng, X., & Mao, Z.-G. (2014). Efficient production of ϵ -poly-l-lysine from agro-industrial by-products by *Streptomyces* sp. M-Z18. *Annals of Microbiology* 2014 65:2, 65(2), 733–743. <https://doi.org/10.1007/S13213-014-0913-0>
- Rojas, V. M., Inácio, A. G., Martins Fernandes, I. P., Leimann, F. V., Gozzo, A. M., Barros Fuchs, R. H., Filipe Barreiro, M. F., Barros, L., Ferreira, I. C. F. R., Coelho Tanamati, A. A., & Gonçalves, O. H. (2020). Whey protein supplement as a source of microencapsulated PUFA-rich vegetable oils. *Food Bioscience*, 37, 100690. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2020.100690>
- Rosales-Colunga, L. M., Razo-Flores, E., & De León Rodríguez, A. (2012). Fermentation of lactose and its constituent sugars by *Escherichia coli* WDHL: Impact on hydrogen production. *Bioresource Technology*, 111, 180–184. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.01.175>
- Roy, D., Goulet, J., & Leduy, A. (1986). Batch fermentation of whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 24, 206–213.
- Ruhdal Jensen, P., Michelsen, le, & Westerhoff, H. V. (1995). Experimental Determination of Control by the H δ in *Escherichia coli*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 27(6).

- Ryan, M. P., & Walsh, G. (2016). The biotechnological potential of whey. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 2016 15:3, 15(3), 479–498.
<https://doi.org/10.1007/S11157-016-9402-1>
- Sainz, J., Pizarro, F., Pérez-Correa, J. R., & Agosin, E. (2003). Modeling of yeast metabolism and process dynamics in batch fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(7), 818–828. <https://doi.org/10.1002/BIT.10535>
- Sánchez, C., Gomez, N., & Quintero, J. (2012). Producción de ácido clavulánico por fermentación de *Streptomyces clavuligerus*: evaluación de diferentes medios de cultivo y modelado matemático. *Dyna*, 79.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0012-73532012000500019
- Sánchez Henao, C. P., Ramirez-Malule, H., & López-Agudelo, V. A. (2021). Basic concepts of metabolic flux analysis. *Ingeniería y Competitividad*, 23(1), 2021.
<https://doi.org/10.25100/IYC.V23I1.9509>
- Sanjay, K., Anand, A. P., Veeranki, V. D., & Kannan, P. (2016). Kinetics of growth on dual substrates, production of novel glutaminase-free L-asparaginase and substrates utilization by *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428 in a batch bioreactor. *Korean Journal of Chemical Engineering* 2017 34:1, 34(1), 118–126.
<https://doi.org/10.1007/S11814-016-0216-1>
- Saraf, S., Gupta, A., & Verma, N. (2019). Skin Targeting Approaches in Cosmetics. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 53, 577–594.
<https://doi.org/10.5530/ijper.53.4.119>
- Sawers, R. G. (2005). Formate and its role in hydrogen production in *Escherichia coli*. *Biochemical Society Transactions*, 33(Pt 1), 42–46.
<https://doi.org/10.1042/BST0330042>
- Schellenberger, J., Que, R., Fleming, R. M. T., Thiele, I., Orth, J. D., Feist, A. M., Zielinski, D. C., Bordbar, A., Lewis, N. E., Rahmanian, S., Kang, J., Hyduke, D. R., & Palsson, B. (2011). Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: The COBRA Toolbox v2.0. *Nature Protocols*, 6(9), 1290–1307.

<https://doi.org/10.1038/nprot.2011.308>

- Schuetz, R., Kuepfer, L., & Sauer, U. (2007). Systematic evaluation of objective functions for predicting intracellular fluxes in *Escherichia coli*. *Molecular Systems Biology*, 3(1), 119. <https://doi.org/10.1038/MSB4100162>
- Schurman, R. A., Takahashi Kelso, D., & Kelso, D. D. (2003). *Engineering Trouble: Biotechnology and Its Discontents - Google Libros* (R. A. Schurman & D. Takahashi Kelso (eds.)). University of California Press.
- Schwentner, A., Feith, A., Münch, E., Busche, T., Rückert, C., Kalinowski, J., Takors, R., & Blombach, B. (2018). Metabolic engineering to guide evolution – Creating a novel mode for L-valine production with *Corynebacterium glutamicum*. *Metabolic Engineering*, 47(March), 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.02.015>
- Sebastián-Nicolás, J. L., González-Olivares, L. G., Vázquez-Rodríguez, G. A., Lucho-Constantino, C. A., Castañeda-Ovando, A., & Cruz-Guerrero, A. E. (2020). Valorization of whey using a biorefinery. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 14(5), 1010–1027. <https://doi.org/10.1002/BBB.2100>
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., & D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology*, 189(23), 8746–8749. <https://doi.org/10.1128/JB.01368-07>
- Shabala, L., Ross, T., Newman, I., McMeekin, T., & Shabala, S. (2001). Measurements of net fluxes and extracellular changes of H⁺, Ca²⁺, K⁺, and NH₄⁺ in *Escherichia coli* using ion-selective microelectrodes. *Journal of Microbiological Methods*, 46(2), 119–129. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00270-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00270-6)
- Sharma, A., Mukherjee, S., Reddy Tadi, S. R., Ramesh, A., & Sivaprakasam, S. (2021). Kinetics of growth, plantaricin and lactic acid production in whey permeate based medium by probiotic *Lactobacillus plantarum* CRA52. *LWT*, 139, 110744. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.110744>
- Sharma, P., & Melkania, U. (2017). Impact of furan derivatives and phenolic compounds on hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste using co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *E. coli*. *Bioresource Technology*, 239, 49–56.

<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.04.113>

Sharma, R. (2019). Whey proteins in functional foods. *Whey Proteins: From Milk to Medicine*, 637–663. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812124-5.00018-7>

Shen, J., Chen, J., Solem, C., Jensen, P. R., & Liu, J.-M. (2020). Disruption of the Oxidative Pentose Phosphate Pathway Stimulates High-Yield Production Using Resting *Corynebacterium glutamicum* in the Absence of External Electron Acceptors. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(24).

<https://doi.org/10.1128/AEM.02114-20>

Shiloach, J., & Bauer, S. (1975). High-yield growth of *E. coli* at different temperatures in a bench scale fermentor. *Biotechnology and Bioengineering*, 17(2), 227–239.

<https://doi.org/10.1002/bit.260170208>

Shimizu, E., Oosumi, T., Heima, H., Tanaka, T., Kurashige, J., Enei, H., Miwa, K., & Nakamori, S. (1995). Culture conditions for improvement of L-threonine production using a genetically self-cloned L-threonine hyperproducing strain of *Escherichia coli* K-12. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59(6), 1095–1098.

<https://doi.org/10.1271/BBB.59.1095>

Singh, R., Das, R., Sangwan, S., Rohatgi, B., Khanam, R., Peera, S. K. P. G., Das, S., Lyngdoh, Y. A., Langyan, S., Shukla, A., Shrivastava, M., & Misra, S. (2021). Utilisation of agro-industrial waste for sustainable green production: a review. *Environmental Sustainability 2021 4:4*, 4(4), 619–636.

<https://doi.org/10.1007/S42398-021-00200-X>

Singh, R., & Geetanjali. (2016). Whey proteins and their value-added applications. *Protein Byproducts: Transformation from Environmental Burden Into Value-Added Products*, 303–313. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802391-4.00016-1>

Slowinski, W., & Charm, S. E. (1973). Glutamic acid production with gel-entrapped *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology and Bioengineering*, 15(5), 973–979.

<https://doi.org/10.1002/BIT.260150514>

Soliman, N. K., & Moustafa, A. F. (2020). Industrial solid waste for heavy metals adsorption features and challenges; a review. *Journal of Materials Research and*

- Technology*, 9(5), 10235–10253. <https://doi.org/10.1016/J.JMRT.2020.07.045>
- Soukoulis, C., Cambier, S., Serchi, T., Tsevdou, M., Gaiani, C., Ferrer, P., Taoukis, P. S., & Hoffmann, L. (2019). Rheological and structural characterisation of whey protein acid gels co-structured with chia (*Salvia hispanica* L.) or flax seed (*Linum usitatissimum* L.) mucilage. *Food Hydrocolloids*, 89, 542–553. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2018.11.002>
- Stiefelmaier, J., Ledermann, B., Sorg, M., Banek, A., Geib, D., Ulber, R., & Frankenberg-Dinkel, N. (2018). Pink bacteria—Production of the pink chromophore phycoerythrobilin with *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 274, 47–53. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2018.03.006>
- Szyperski, T. (1995). Biosynthetically directed fractional ¹³C-labeling of proteinogenic amino acids. an efficient analytical tool to investigate intermediary metabolism. *European Journal of Biochemistry*, 232(2), 433–448. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1995.433ZZ.X>
- Tadowski, S., Pedroso, M. M., Sieber, V., Larrabee, J. A., Guddat, L. W., & Schenk, G. (2016). Metal ions play an essential catalytic role in the mechanism of ketol–acid reductoisomerase. *Chemistry – A European Journal*, 22(22), 7427–7436. <https://doi.org/10.1002/CHEM.201600620>
- Takpho, N., Watanabe, D., & Takagi, H. (2018). High-level production of valine by expression of the feedback inhibition-insensitive acetohydroxyacid synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 46, 60–67. <https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2018.02.011>
- Talbot-Walsh, G., Kannar, D., & Selomulya, C. (2018). A review on technological parameters and recent advances in the fortification of processed cheese. *Trends in Food Science & Technology*, 81, 193–202. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2018.09.023>
- Tan, R., Lyu, Y., Zeng, W., & Zhou, J. (2019). Enhancing scleroglucan production by *Sclerotium rolfsii* WSH-G01 through a pH-shift strategy based on kinetic analysis. *Bioresource Technology*, 293, 122098. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2019.122098>

- Ternbach, M. B., Bollman, C., Wandrey, C., & Takors, R. (2005). Application of model discriminating experimental design for modeling and development of a fermentative fed-batch L-valine production process. *Biotechnology and Bioengineering*, *91*(3), 356–368. <https://doi.org/10.1002/BIT.20504>
- Tomar, A., Eiteman, M. A., & Altman, E. (2003). The effect of acetate pathway mutations on the production of pyruvate in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *62*(1), 76–82. <https://doi.org/10.1007/S00253-003-1234-6/FIGURES/5>
- Toro, L., Pinilla, L., Avignone-Rossa, C., & Ríos-Esteva, R. (2018). An enhanced genome-scale metabolic reconstruction of *Streptomyces clavuligerus* identifies novel strain improvement strategies. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *41*(5), 657–669. <https://doi.org/10.1007/S00449-018-1900-9/TABLES/5>
- Tran, Q. H., & Uden, G. (1998). Changes in the proton potential and the cellular energetics of *Escherichia coli* during growth by aerobic and anaerobic respiration or by fermentation. *European Journal of Biochemistry*, *251*(1–2), 538–543. <https://doi.org/10.1046/J.1432-1327.1998.2510538.X>
- Usmani, Z., Sharma, M., Awasthi, A. K., Sharma, G. D., Cysneiros, D., Nayak, S. C., Thakur, V. K., Naidu, R., Pandey, A., & Gupta, V. K. (2021). Minimizing hazardous impact of food waste in a circular economy – Advances in resource recovery through green strategies. *Journal of Hazardous Materials*, *416*, 126154. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2021.126154>
- Vadia, S., Tse, J. L., Lucena, R., Yang, Z., Kellogg, D. R., Wang, J. D., & Levin, P. A. (2017). Fatty acid availability sets cell envelope capacity and dictates microbial cell size. *Current Biology*, *27*(12), 1757-1767.e5. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2017.05.076>
- Valle, A., Cabrera, G., Muhamadali, H., Trivedi, D. K., Ratray, N. J. W., Goodacre, R., Cantero, D., & Bolivar, J. (2015). A systematic analysis of TCA *Escherichia coli* mutants reveals suitable genetic backgrounds for enhanced hydrogen and ethanol production using glycerol as main carbon source. *Biotechnology Journal*, *10*(11), 1750–1761. <https://doi.org/10.1002/biot.201500005>

- Van Der Heiden, E., Delmarcelle, M., Lebrun, S., Freichels, R., Brans, A., Vastenavond, C. M., Galleni, M., & Joris, B. (2013). A pathway closely related to the D-tagatose pathway of gram-negative enterobacteria identified in the gram-positive bacterium *Bacillus licheniformis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(11), 3511–3515. <https://doi.org/10.1128/AEM.03918-12>
- Van der Rest, M. E., Frank, C., & Molenaar, D. (2000). Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 182(24), 6892–6899. <https://doi.org/10.1128/JB.182.24.6892-6899.2000/ASSET/E8028288-D293-4304-90F5-57FE614BED/ASSETS/GRAPHIC/JB2400647004.JPEG>
- van Heeswijk, W. C., Westerhoff, H. V., & Boogerd, F. C. (2013). Nitrogen assimilation in *Escherichia coli*: Putting molecular data into a systems perspective. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(4), 628–695. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00025-13>
- Varma, A., & Palsson, B. O. (1994). Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(10), 3724–3731. <https://doi.org/10.1128/AEM.60.10.3724-3731.1994>
- Vartak, N. B., Liu, L., Wang, B., & Berg, C. M. (1991). A functional leuABCD operon is required for leucine synthesis by the tyrosine-repressible transaminase in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 173(12), 3864–3871. <https://doi.org/10.1128/jb.173.12.3864-3871.1991>
- Vázquez, J. A., & Murado, M. A. (2008). Unstructured mathematical model for biomass, lactic acid and bacteriocin production by lactic acid bacteria in batch fermentation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 83(1), 91–96. <https://doi.org/10.1002/JCTB.1789>
- Veeravalli, S. S., & Mathews, A. P. (2018). Exploitation of acid-tolerant microbial species for the utilization of low-cost whey in the production of acetic acid and propylene glycol. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2018 102:18, 102(18), 8023–8033.

<https://doi.org/10.1007/S00253-018-9174-3>

- Villela Alonso, M. S., Ghezal-Kraïem, H., Bouhaouala-Zahar, B., Bideaux, C., Arturo Aceves, C. L., & Fillaudeau, L. (2021). Effect of temperature on the production of a recombinant antivenom in fed-batch mode. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *105*, 1017–1030. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11093-5>/Published
- Waegeman, H., Beauprez, J., Moens, H., Maertens, J., De Mey, M., Foulquié-Moreno, M. R., Heijnen, J. J., Charlier, D., & Soetaert, W. (2011). Effect of iclR and arcA knockouts on biomass formation and metabolic fluxes in *Escherichia coli* K12 and its implications on understanding the metabolism of *Escherichia coli* BL21 (DE3). *BMC Microbiology*, *11*(70). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-70>
- Wang, D., Kim, H., Lee, S., Kim, D. H., & Joe, M. H. (2020). Improved gellan gum production by a newly-isolated *Sphingomonas azotifigens* GL-1 in a cheese whey and molasses based medium. *Process Biochemistry*, *95*, 269–278. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2020.02.020>
- Wang, L., & Hatzimanikatis, V. (2006). Metabolic engineering under uncertainty - II: Analysis of yeast metabolism. *Metabolic Engineering*, *8*(2), 133–150. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2005.11.003>
- Wang, X., Xia, K., Yang, X., & Tang, C. (2019). Growth strategy of microbes on mixed carbon sources. *Nature Communications*, *10*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09261-3>
- Wang, X., Zhang, H., & Quinn, P. J. (2018). Production of l-valine from metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* *2018 102:10*, *102*(10), 4319–4330. <https://doi.org/10.1007/S00253-018-8952-2>
- Wang, Y., Tian, T., Zhao, J., Zhao, X., Wang, J., & Zhou, S. (2012). Efficient production of optical pure D-lactate by HBUT-C engineered *Escherichia coli* W. *Advanced Materials Research*, *550–553*, 1409–1412. <https://doi.org/10.4028/WWW.SCIENTIFIC.NET/AMR.550-553.1409>
- Wanga, J., Cheng, L. K., & Chen, N. (2014). High-level production of L-threonine by recombinant *Escherichia coli* with combined feeding strategies.

- [Http://Mc.Manuscriptcentral.Com/Tbeq](http://Mc.Manuscriptcentral.Com/Tbeq), 28(3), 495–501.
<https://doi.org/10.1080/13102818.2014.927682>
- Warsi, O. M., Andersson, D. I., & Dykhuizen, D. E. (2018). Different adaptive strategies in *E. coli* populations evolving under macronutrient limitation and metal ion limitation. *BMC Evolutionary Biology*, 18(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1191-4>
- Weber, E., Engler, C., Gruetzner, R., Werner, S., & Marillonnet, S. (2011). A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLoS ONE*, 6(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016765>
- Wendisch, V. F. (2020). Metabolic engineering advances and prospects for amino acid production. *Metabolic Engineering*, 58, 17–34. <https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2019.03.008>
- Westbrook, A. W., Ren, X., Moo-Young, M., & Chou, C. P. (2018). Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for l-valine overproduction. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(11), 2778–2792. <https://doi.org/10.1002/bit.26789>
- Westfall, C. S., & Levin, P. A. (2017). Comprehensive analysis of central carbon metabolism reveals multiple connections between nutrients, biosynthetic capacity, and cell morphology in *Escherichia coli*. *BioRxiv*, 1–25. <https://doi.org/10.1101/191585>
- Wu, G. (2013). Functional amino acids in nutrition and health. *Amino Acids*, 45 (3), 407–411. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1500-6>
- Wu, G., Yan, Q., Jones, J. A., Tang, Y. J., Fong, S. S., & Koffas, M. A. G. (2016). Metabolic burden: Cornerstones in synthetic biology and metabolic engineering applications. *Trends in Biotechnology*, 34(8), 652–664. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2016.02.010>
- Wu, W. (2013). Fuel ethanol production using novel carbon sources and fermentation medium optimization with response surface methodology. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 6(2), 42–53. <https://doi.org/10.25165/IJABE.V6I2.647>
- Wu, Y., Yan, P., Li, Y., Liu, X., Wang, Z., Chen, T., & Zhao, X. (2020). Enhancing β -carotene production in *Escherichia coli* by perturbing central carbon metabolism and

- improving the NADPH supply. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 0, 585. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2020.00585>
- Xu, N., Ye, C., & Liu, L. (2018). Genome-scale biological models for industrial microbial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(8), 3439–3451. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8803-1>
- Xu, P., & Peng Xu, C. (2020). Analytical solution for a hybrid Logistic-Monod cell growth model in batch and continuous stirred tank reactor culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 117(3), 873–878. <https://doi.org/10.1002/BIT.27230>
- Yadav, A. N., Kour, D., Rana, K. L., Yadav, N., Singh, B., Chauhan, V. S., Rastegari, A. A., Hesham, A. E. L., & Gupta, V. K. (2019). Metabolic engineering to synthetic biology of secondary metabolites production. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Secondary Metabolites Biochemistry and Applications*, 279–320. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63504-4.00020-7>
- Yadav, J. S. S., Bezawada, J., Elharche, S., Yan, S., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2013). Simultaneous single-cell protein production and COD removal with characterization of residual protein and intermediate metabolites during whey fermentation by *K. marxianus*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 2013 37:6, 37(6), 1017–1029. <https://doi.org/10.1007/S00449-013-1072-6>
- Yang, M., Zhang, · Xiang, & Zhang, X. (2017). Construction of pyruvate producing strain with intact pyruvate dehydrogenase and genome-wide transcription analysis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(3), 59. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2202-5>
- Yang, Park, S. Y., Park, Y. S., Eun, H., & Lee, S. Y. (2020). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for natural product biosynthesis. *Trends in Biotechnology*, 38(7), 745–765. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.11.007>
- Yuan, X., Mao, Y., Tu, S., Lin, J., Shen, H., Yang, L., & Wu, M. (2021). Increasing NADPH availability for xylitol production via pentose-phosphate-pathway gene overexpression and Embden–Meyerhof–Parnas-pathway gene deletion in *Escherichia*

- coli*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(33), 9625–9631.
<https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.1C03283>
- Zakharov, S. D., & Cramer, W. A. (2004). On the mechanism and pathway of colicin import across the *E. coli* outer membrane. *Frontiers in Bioscience*, 9, 1311–1317.
<https://doi.org/10.2741/1334>
- Zaky, A. S., Pensupa, N., Andrade-Eiroa, Á., Tucker, G. A., & Du, C. (2017). A new HPLC method for simultaneously measuring chloride, sugars, organic acids and alcohols in food samples. *Journal of Food Composition and Analysis*, 56, 25–33.
<https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2016.12.010>
- Zamboni, N. (2011). ¹³C metabolic flux analysis in complex systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(1), 103–108. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2010.08.009>
- Zampieri, M., Hörl, M., Hotz, F., Müller, N. F., & Sauer, U. (2019). Regulatory mechanisms underlying coordination of amino acid and glucose catabolism in *Escherichia coli*. *Nature Communications*, 10(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-11331-5>
- Zelić, B., Vasić-Rački, D., Wandrey, C., & Takors, R. (2004). Modeling of the pyruvate production with *Escherichia coli* in a fed-batch bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 26:4, 26(4), 249–258. <https://doi.org/10.1007/S00449-004-0358-0>
- Zhang, Q., Sun, J., Wang, Z., Hang, H., Zhao, W., Zhuang, Y., & Chu, J. (2018). Kinetic analysis of curdlan production by *Alcaligenes faecalis* with maltose, sucrose, glucose and fructose as carbon sources. *Bioresource Technology*, 259, 319–324.
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2018.03.059>
- Zobel, S., Benedetti, I., Eisenbach, L., De Lorenzo, V., Wierckx, N., & Blank, L. M. (2015). Tn7-based device for calibrated heterologous gene expression in *Pseudomonas putida*. *ACS Synthetic Biology*, 4(12), 1341–1351.
<https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00058>
- Zotta, T., Solieri, L., Iacumin, L., Picozzi, C., & Gullo, M. (2020). Valorization of cheese whey using microbial fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2020 104:7, 104(7), 2749–2764. <https://doi.org/10.1007/S00253-020-10408-2>