



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

## DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA POSGRADO EN CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA

**Evaluación de la producción de ácido indolacético en *Bacillus subtilis*  
utilizando modelos metabólicos a escala genómica y algoritmos de  
optimización multiobjetivo**

**IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS**

**Presenta:** LÁZARO ALEJANDRO QUINTANA MENÉNDEZ

**Co-Director:** DR. ROBERTO OLIVARES HERNÁNDEZ

**Co-Director:** DR. JUAN GABRIEL VIGUERAS RAMÍREZ

**CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO, 2022**

**MÉXICO**

## **DEDICATORIA**

*A mi familia siempre, porque no faltó el abrazo y el impulso en la distancia, sepan que cada paso siempre es por ustedes.*

*A cada persona que de alguna manera es parte de este trabajo, o motivación, aliento y guía para lograrlo. A todos gracias por hacerme capaz y confiar en mí siempre.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*El presente trabajo se realizó en el Departamento de Procesos y Tecnología (DPT) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa bajo la dirección del Dr. Roberto Olivares Hernández y el Dr. Juan Gabriel Viguera Ramírez. Se agradece al Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería y la DCNI. Toda la instrumentación y equipamiento de los laboratorios de bioprocesos, Planta Piloto, así como el Laboratorio Virtual de Ingeniería de Procesos para el trabajo computacional.*

*Lázaro Alejandro Quintana Menéndez contó con beca de posgrado CONACyT (CVU 1109377) para realizar este trabajo. Se agradece además a los proyectos SEP-CONACyT No. 287615 y A1-S-30750 por su financiamiento y apoyo.*



Esta idónea comunicación de resultados fue realizada dentro del Programa de Maestría del Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería (PCNI) de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) de la Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Cuajimalpa. El trabajo teórico y las simulaciones computacionales fueron conducidas por el Dr. Roberto Olivares Hernández, mientras que la conducción del trabajo de laboratorio y manejo de equipos fue desarrollada por el Dr. Juan Gabriel Viguera Ramírez. El procedimiento experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioprocesos y la Planta Piloto, ambas instalaciones pertenecientes a la Unidad Cuajimalpa.



## DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, el día 30 del mes de agosto del año 2022, el que suscribe Lázaro Alejandro Quintana Menéndez alumno del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa, manifiesta que es autor intelectual de la presente idónea comunicación de resultados titulada; **“Evaluación de la producción de ácido indolacético en *Bacillus subtilis* utilizando modelos metabólicos a escala genómica y algoritmos de optimización multiobjetivo”** realizada bajo la dirección de Roberto Olivares Hernández y Juan Gabriel Viguera Ramírez y cede los derechos de este trabajo a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico o de datos del trabajo, sin el permiso expreso del director del trabajo como representante de la UAM. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: rolivares@cua.uam.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente de este.

Lázaro Alejandro Quintana Menéndez

---

**Nombre y firma del alumno**



## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“El que suscribe, Lázaro Alejandro Quintana Menéndez, alumno del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería declara que los resultados reportados en esta idónea comunicación de resultados son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Así mismo, declaro que hasta donde es de mi conocimiento no contiene material previamente publicado o escrito por otra (s) persona (s) excepto donde se reconoce como tal a través de citas y que este fue usado con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de este trabajo es producto de mi propia labor con la dirección y apoyo de mi director y de mi comité tutorial, en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación y a la expresión escrita.”

**Lázaro Alejandro Quintana Menéndez**

---

***Nombre y firma del alumno***



## DECLARACIÓN DE NO LUCRO

El que suscribe, Lázaro Alejandro Quintana Menéndez, alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería, manifiesta su compromiso de no utilizar con fines de difusión, publicación, protección legal por cualquier medio, licenciamiento, venta, cesión de derechos parcial o total o de proporcionar ventajas comerciales o lucrativas a terceros, con respecto a los materiales, datos analíticos o información de toda índole, relacionada con las actividades e intercambios de información derivados de la relación de investigación académica y tecnológica desarrollada entre la Universidad Autónoma Metropolitana (**UAM**) y Lázaro Alejandro Quintana Menéndez.

Lázaro Alejandro Quintana Menéndez

*Nombre y firma del alumno*

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN</b> .....	3
1.1 Justificación .....	5
<b>CAPÍTULO II ANTECEDENTES</b> .....	6
2.1 Microorganismos como fábricas celulares .....	6
2.2 <i>Bacillus subtilis</i> .....	9
2.2.1 Taxonomía y características generales .....	9
2.2.2 Ecología y distribución de <i>Bacillus subtilis</i> .....	11
2.2.3 Crecimiento del microorganismo .....	11
2.3 Trabajo con Biorreactores para el cultivo de microorganismos ....	12
2.3.1 Cultivo en biorreactores de <i>Bacillus subtilis</i> .....	15
2.4 Ácido Indolacético. Importancia de la auxina .....	17
2.5 Síntesis de AIA por <i>B. subtilis</i> .....	18
2.5.1 Vías metabólicas para la síntesis de AIA microbiano .....	19
2.6 Modelado matemático del metabolismo y FBA .....	21
2.7 Algoritmos de optimización binivel. OptKnock .....	26
2.8 Modelos metabólicos a escala genómica de <i>B. subtilis</i> .....	28
<b>CAPÍTULO III HIPÓTESIS</b> .....	32
<b>CAPÍTULO IV OBJETIVOS</b> .....	33
4.1 Objetivo general .....	33

4.1.1 Objetivos específicos .....	33
<b>CAPÍTULO V METODOLOGÍA .....</b>	<b>34</b>
5.1 Microorganismo y condiciones de cultivo .....	34
5.2 Estudio cinético del crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> .....	36
5.2.1 Cinética a nivel microcosmos. Ajuste de parámetros .....	36
5.2.2 Cinética en Biorreactor completamente instrumentado .....	37
5.3 Toma de muestras .....	40
5.4 Análisis de muestras .....	40
5.4.1 Determinación de biomasa .....	40
5.4.2 Determinación del consumo de sustrato .....	40
5.4.2 Determinación de la producción de AIA y el consumo de Trp ..	41
5.5 Cálculo de parámetros cinéticos .....	42
5.6 Análisis del metabolismo usando modelo a escala genómica iBSU1147+1 .....	43
<b>CAPÍTULO VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>44</b>
6.1 Cultivo y caracterización de la cepa .....	44
6.2 Cinética a nivel microcosmos .....	45
6.3 Cinética en biorreactores. Producción de AIA .....	49
6.3.1 Análisis de la producción de AIA en biorreactores .....	53
6.4 Análisis de Balance de Flujos .....	57
6.5 Optimización binivel mediante algoritmo OptKnock .....	65
<b>CAPÍTULO VII CONCLUSIONES .....</b>	<b>70</b>
<b>CAPÍTULO VIII PERSPECTIVAS .....</b>	<b>72</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>80</b>

ANEXO A CROMATOGRAMAS .....	80
ANEXO B CURVA PATRÓN AIA. REACTIVO DE SALKOWSKI .....	83
ANEXO C CÁLCULO DE PARÁMETROS CINÉTICOS .....	84
ANEXO D PRUEBA ESTADÍSTICA NO PARAMÉRTRICA	
KRUSKAL WALLIS .....	85

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>5.1</b> Composición del medio M9 modificado empleado para los inóculos y para los ensayos de producción de AIA .....	35
<b>6.1</b> Velocidad específica de crecimiento exponencial ( $\mu$ ), velocidades específicas de consumo de sustratos ( $q_{sFC}$ y $q_{sTrp}$ ), velocidad específica de producción ( $q_p$ ), rendimiento biomasa-sustrato $Y_{x/s}$ y rendimiento producto-sustrato $Y_{p/s}$ de <i>B. subtilis</i> en Biorreactores con medio M9 modificado, glucosa o propionato como fuente de carbono (FC), así como inducción con Trp a las 16 horas .....	52
<b>6.2</b> Resultado del análisis de optimización binivel OptKnock para ambos sustratos. Se presenta la estrategia de deleciones o Knockouts que permiten maximizar la producción de AIA acoplado al crecimiento microbiano .....	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

2.1 Representación esquemática del ciclo diseño-construcción-prueba-aprendizaje para mejorar la producción de biomoléculas .....	8
2.2 <i>Bacillus subtilis</i> . Características generales y aplicaciones en investigación básica y aplicada .....	10
2.3 Vías de síntesis de AIA dependientes de Triptófano en <i>Bacillus</i> .....	21
2.4 Esquema ilustrativo del proceso de modelado matemático del metabolismo .....	24
2.5 Consideración de restricciones no ajustables para definir el espacio de distribuciones de flujo factibles .....	25
2.6 Desarrollo temporal de los modelos metabólicos a escala genómica (GSMM) en <i>Bacillus subtilis</i> .....	30
5.1 Diseño esquemático del experimento a nivel microcosmos .....	37
5.2 A) Esquema de la placa del Biorreactor.. B) Imagen del sistema (New Brunswick_BioFlo III) acoplado y automatizado .....	39
6.1 Crecimiento de la cepa <i>Bacillus subtilis</i> W168 .....	45
6.2 Cinética de crecimiento y consumo de sustratos de los cultivos a nivel microcosmos .....	46
6.3 Cinética de crecimiento y consumo de sustratos de los cultivos en Biorreactor .....	50
6.4 Método espectrofotométrico para detectar la presencia de indoles..	54
6.5 Cinética del consumo del Trp y la producción de AIA por los cultivos en Biorreactores empleando glucosa y propionato como sustrato .....	56
6.6 Mapa comparativo para la distribución de flujos ilustrada en el metabolismo central empleando Glucosa como sustratos para la <b>Fase exponencial</b> y <b>Fase estacionaria</b> del cultivo .....	58

<b>6.7</b> Distribución del flujo de carbono en el metabolismo central para <b>Glucosa (GLU)</b> y <b>Propionato (PRO)</b> como fuente de carbono. Se emplearon las mismas condiciones de simulación. Se maximiza AIA como función objetivo. Todos los valores de flujo se encuentran en mmol/gDWC h .....	61
<b>6.8</b> Incorporación del <b>Propionato (PRO)</b> al metabolismo central del carbono a nivel del TCA .....	63
<b>6.9</b> Gráficas que describen las soluciones obtenidas mediante el algoritmo OptKnock para ambos sustratos en un escenario de <i>knockouts</i> determinado .....	69

## **ABREVIATURAS**

AIA: ácido indolacético

Trp: triptófano

PGPB: bacterias promotoras del crecimiento vegetal

PGPR: rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

VOC: compuestos orgánicos volátiles

IAN: indol-3-acetonitrilo

IAM: indol-3-acetamida

IPA: indol-3-piruvato

MCF : “microbial cell factories”/ fábricas de células microbianas

GSMM : “genome scale metabolic models”/ modelos metabólicos a escala genómica

PTS: sistema fosfotransferasa

MMS: medio mínimo suplementado

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

ESI-MS/MS: espectrometría de masas con fragmentación de péptidos

TLC: cromatografía en capa fina

UV: ultravioleta

IR: índice de refracción

TCA: ciclo de los ácidos tricarboxílicos

FBA: análisis de balance de flujos

MOMA: minimización del ajuste metabólico

GPR: gen-proteína-reacción

GLU: glucosa

PRO: propionato  
G6P: glucosa 6 fosfato  
F6P: fructosa 6 fosfato  
FDP: fructosa 1,6 difosfato  
G3P: gliceraldehído 3 fosfato  
3PG: 3 fosfoglicerato  
PEP: fosfoenolpiruvato  
PYR: piruvato  
AcCoA: acetil CoA  
CIT: citrato  
ICIT: isocitrato  
AKG:  $\alpha$  cetogutarato  
SUC: succinato  
MAL: malato  
OAA: oxaloacetato  
RU5P: ribulosa 5 fosfato  
R5P: ribosa 5 fosfato  
XU5P: xilulosa 5 fosfatos  
E4P: eritrosa 4 fosfato  
SHIK: shikimato  
COR: corismato  
ANT: antranilato  
IGP: indol glicerol fosfato  
NADH: nicotinamida adenina dinucleótido  
ATP: adenosina trifosfato



## RESUMEN

El ácido indolacético (AIA) es la fitohormona más estudiada de la clase de las auxinas y aunque es un metabolito producido por las plantas de manera natural puede ser estimulada su producción en microorganismos asociados a plantas. La síntesis de AIA está considerada parte del metabolismo secundario de *B.subtilis* y su formación se lleva cabo durante la fase estacionaria del crecimiento. La auxina se sintetiza con la ayuda del precursor triptófano secretado a través de los exudados de la raíz según el genotipo de la planta. Como parte de la estrategia para evaluar la capacidad del microorganismo para producir la auxina se realizó un análisis *in silico* para determinar los mejores escenarios de producción. Para ello se emplea el Análisis de Balance de Flujos utilizando las restricciones experimentales obtenidas mediante la cinética de crecimiento del microorganismo en un biorreactor completamente instrumentado. Los parámetros cinéticos permiten obtener simulaciones de la distribución de flujos en las condiciones experimentales del estudio para ambos sustratos mostrando mediante el análisis comparativo con los resultados experimentales el alto nivel de ajuste del modelo iBSU1147 para este objetivo de producción. Los resultados del Análisis de Balances de Flujos son contrastados con un análisis de optimización binivel utilizando el algoritmo *OptKnock*. El análisis de la cinética en biorreactor demostró que el crecimiento en presencia de glucosa es superior al propionato en la fase estacionaria de crecimiento. Sin embargo, se obtiene un mejor rendimiento  $Y_{p/Trp} = 0.915$  para el propionato lo que nos permite demostrar que es un mejor sustrato para la producción de la auxina. El análisis binivel mostró que no existe por sí solo un conjunto de genes que garantice una optimización considerable de AIA debido al acoplamiento de la síntesis de este metabolito con su inductor *Trp*. Sin embargo, se identificaron algunas estrategias de delección en genes que codifican para enzimas del TCA como malato deshidrogenasa y  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, así como otros pasos de reacción que conducen a la acumulación de E4P y F6P metabolitos claves en la síntesis de AIA.

## ABSTRACT

Indoleacetic acid (IAA) is the most studied phytohormone of the auxin class and although it is a metabolite naturally produced by plants, its production can be stimulated in plant-associated microorganisms. The synthesis of IAA is considered part of the secondary metabolism of *B. subtilis*, and its formation takes place during the stationary phase of growth. Auxin is synthesized with the help of the precursor tryptophan secreted through root exudates depending on the plant genotype. In this way, an *in silico* analysis can be developed to determine the best strategies that allow a supraoptimal production of IAA using *Bacillus subtilis* as a cellular biofactory. The kinetic parameters allow simulations of the flux distribution to be obtained under the experimental conditions of the study for both substrates, demonstrating through the comparative analysis with the experimental results the high level of fit of the iBSU1147 model for this production objective. For this purpose, we used Flux Balance Analysis using the experimental constraints obtained through the growth kinetics of the microorganism in a fully instrumented bioreactor, resulting in a flow distribution that would be contrasted with a bilevel optimization using OptKnock algorithm. Bioreactor kinetics analysis shows that growth in glucose ( $\mu = 0.07 \text{ h}^{-1}$ ) is superior to propionate ( $\mu = 0.06 \text{ h}^{-1}$ ) in the stationary phase of growth. However, a better yield  $Y_{p/Trp} = 0.915$  is obtained for propionate, which allows us to demonstrate that it is a better substrate for auxin production. The bilevel analysis showed that there is not a single set of genes that guarantees a considerable optimization of IAA due to the coupling of the synthesis of this metabolite with its inducer Trp. However, some deletion strategies were identified in genes that code for TCA enzymes such as malate dehydrogenase and  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase, as well as other reaction steps that lead to the accumulation of E4P and F6P key metabolites in the synthesis of IAA.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

La biodiversidad del mundo microbiano, así como las capacidades biosintéticas en condiciones ambientales específicas permiten que estos puedan ser empleados en la solución de problemas con impacto en la sociedad actual. Las fábricas de células microbianas (MCF, *del inglés “microbial cell factories”*) son una solución alternativa para la producción de biomoléculas a través de la extensión o modificación de rutas biosintéticas en microorganismos (Singh, 2021). La biología de sistemas basada en análisis computacionales y matemáticos juega un papel clave en la optimización de las MCF al predecir el mejor modelo que se adapta a la sobreproducción de compuestos específicos (Nielsen and Keasling, 2016).

El ácido indolacético (AIA) es la fitohormona más estudiada de la clase de las auxinas y regula varios aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas. Desempeña un papel clave en la fisiología vegetal y está involucrado en la división celular, elongación, diferenciación, desarrollo de frutos y respuesta fototrópica (Zhao, 2010). Este compuesto es un ácido orgánico débil que consta de un anillo indol plano, estructura acoplada a una cadena lateral que alberga un grupo carboxilo terminal (Rosquete *et al.*, 2012).

Se ha encontrado que esta auxina se produce por microorganismos del género *Bacillus sp.* y que destaca como uno de los principales grupos de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (*del inglés*, PGPB). Se han estudiado varios mecanismos involucrados en la interacción de este microorganismo con las plantas mostrando un aumento en la absorción de nutrientes por el cultivo, mediada por la solubilización de formas insolubles, fijación de nitrógeno, liberación de amoníaco de materia orgánica nitrogenada; también la síntesis de fitohormonas de crecimiento vegetal (auxinas, citoquininas y giberelinas) o la producción de compuestos

orgánicos volátiles (del inglés, VOC), que regulan la fisiología vegetal (Lopes et al., 2018). La síntesis de AIA está considerada parte del metabolismo secundario de *B.subtilis* y su formación se lleva cabo durante la fase estacionaria del crecimiento (Wagi and Ahmed, 2019). La auxina se sintetiza con la ayuda del aminoácido precursor triptófano (*Trp*) secretado a través de los exudados de la raíz según el genotipo de la planta (Liu et al., 2016). Las rutas dependientes de triptófano han sido las más estudiadas, empleando mutantes genéticos con deleciones de los genes involucrados en las rutas de síntesis de AIA. Se ha demostrado que en el género *Bacillus* predominan tres vías que emplean este aminoácido como precursor: vía del indol-3-acetonitrilo (IAN), vía del indol-3-piruvato (IPA) y la mejor caracterizada vía del indol-3-acetamida (IAM) (Keswani et al., 2020).

En el contexto celular el metabolismo tiene una capacidad de adaptación y respuesta que guía al microorganismo a modificaciones en las rutas para garantizar la supervivencia, es decir los objetivos celulares internos son prioridad ante una presión selectiva, los cuales compiten directamente con los objetivos de sobreproducción química (Chowdhury et al., 2015). De ahí que existe un grupo de herramientas basadas en el propio marco computacional que crea FBA (Flux Balance Analysis, siglas en inglés) que permiten este tipo de trabajo al desarrollar una estrategia de optimización multicapa que permite una optimización acoplada de dos niveles, garantizando maximizar los objetivos de crecimiento celular imponiendo desde una capa externa objetivos de producción química. Este algoritmo de optimización binivel se denomina OptKnock y no solo se limita a la distribución de flujos óptimos para acoplar el crecimiento celular a la sobreproducción química, pues permite a su vez obtener un conjunto de *knockouts* o deleciones de genes ajustados a fenotipos posibles que optimicen el objetivo de producción (Burgard et al., 2003).

## **1.1 Justificación**

El uso de inoculantes para la producción agrícola es una alternativa sustentable para incrementar la producción de alimentos. La producción industrial de los derivados de la biotecnología ha sido posible en buena medida debido al desarrollo de las técnicas de cultivo celular a gran escala: tecnologías de fermentación. Estas técnicas han permitido establecer las condiciones para el cultivo de células microbianas, vegetales y animales, para la síntesis de toda una gama de metabolitos de interés en los diferentes sectores de la industria (química, farmacéutica, textil, de alimentos, etc.) (Singh, 2021). Una de las pocas opciones de aplicación de los insumos es el uso de suspensiones microbianas obtenidas por una tecnología de cultivo que favorezcan el crecimiento de las plantas. De esta manera surge el interés en la producción de microorganismos con la capacidad de producir fitohormonas que promuevan el crecimiento de plantas. Sin embargo, para lograr una producción eficiente se debe tomar en cuenta que los objetivos son producir más microorganismos y al mismo tiempo producir las fitohormonas de interés. A nivel metabólico, estos objetivos compiten de manera natural por lo que los rendimientos suelen ser bajos.

Con la finalidad de evaluar la capacidad de *Bacillus subtilis* para producir AIA se propone el uso de modelos metabólicos a escala genómica utilizando algoritmos de optimización multiobjetivo (MOME, *por sus siglas en inglés*) como el algoritmo binivel OptKnock que permiten evaluar las deleciones de genes que aumentan la producción del metabolito de interés, manteniendo al mismo tiempo la máxima producción de biomasa.

## CAPÍTULO II

# ANTECEDENTES

### ***2.1 Microorganismos como fábricas celulares***

El conocimiento de los productos naturales ha ganado más atención pública para su uso en nuestra vida diaria. Muchos de los productos son fabricados a partir de un recurso petroquímico que disminuye aceleradamente en el planeta. Actualmente, el calentamiento global, los cambios climáticos y la naturaleza no degradable de los productos químicos y sus derivados utilizados en la vida diaria también constituyen una problemática de interés social (Bilal and Iqbal, 2018). En la actualidad, y debido a los efectos en el cambio climático, se ha disminuido el uso de los productos basados en petroquímicos y sus derivados. Por lo tanto, surge una necesidad apremiante de encontrar enfoques alternativos, sustentables y compatibles con el medio ambiente para la producción de biomoléculas de valor agregado que sean capaces de cumplir las demandas mundiales actuales (Asgher *et al.*, 2020).

La biodiversidad del mundo microbiano, así como las capacidades biosintéticas en condiciones ambientales específicas permiten que estos puedan ser empleados en la solución de problemas de alto impacto en la sociedad actual. Existen diversos procesos que ocurren por la actividad de microorganismos; sus contribuciones garantizan que sean potenciales candidatos para resolver problemas de escasez de alimentos, control de plagas, biodegradación de xenobióticos, degradación de residuos y contaminantes de la basura (Singh, 2021).

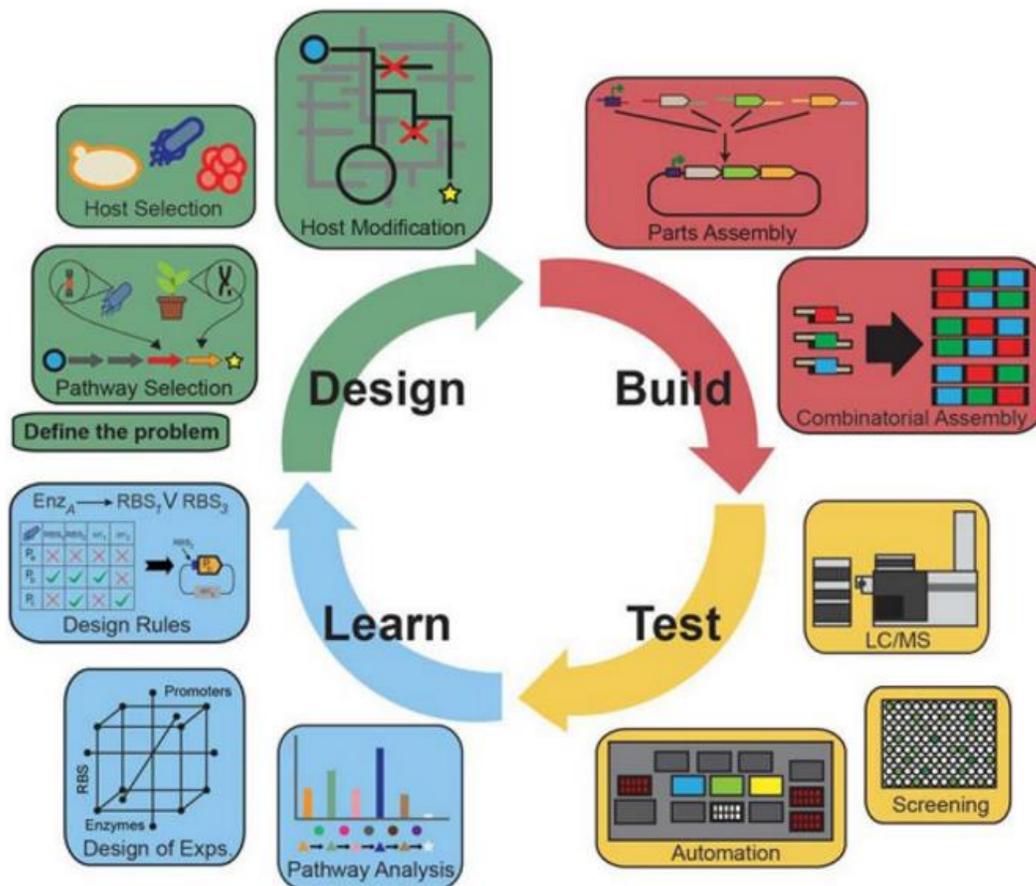
Las fábricas de células microbianas (MCF) son una solución alterna para la producción de biomoléculas a través de la extensión o modificación de rutas biosintéticas en microorganismos. Las MCF están creciendo rápidamente y ganando mucha atención científica debido a su alto potencial en el futuro y un

mercado que puede satisfacer las demandas actuales (Calero and Nikel, 2019). De manera general podemos entender este término de “*fábrica celular microbiana*” como una estrategia de producción en la que la optimización de las células microbianas depende en gran medida de la ingeniería metabólica y la biología sintética (Sharma and Saharan, 2018). En las últimas décadas, varios microorganismos han sido identificados y utilizados para la producción y optimización de biomoléculas de valor agregado con fines terapéuticos, aplicaciones biotecnológicas, farmacéuticas e industriales.

A partir de su uso en productos de fermentación tradicionales (pan, queso, vino y cerveza), en la actualidad se ha extendido el uso de microorganismos en otras industrias relacionadas con productos biofarmacéuticos (hormonas, enzimas, antibióticos, vitaminas y vacunas), además de polímeros, monómeros, productos químicos de alto valor y otros productos. Esto se logra en parte por los continuos avances en técnicas de biología molecular, tecnologías de ADN recombinante, ingeniería metabólica, así como herramientas de biología de sistemas (Gohil *et al.*, 2017).

En particular en los últimos años mediante técnicas de edición del genoma como CRISPR-Cas9 (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas) se ha avanzado en la construcción de genomas personalizados y extremadamente optimizados hacia objetivos de producción específicos aprovechando adaptaciones genómicas y en la expresión de compuestos que son adaptadas a otras especies que de manera natural no la poseen (Singh *et al.*, 2018). En este punto el avance ha sido tal que se plantea puedan usarse los CRISPRs para construir sistemas de entrega de genes guiados por ARN que lleguen a alterar los genomas de poblaciones enteras. Estos avances en su conjunto, sumado a la disponibilidad de los datos de secuenciación del genoma han facilitado la manipulación genética y la ingeniería de rutas para transformar microorganismos en fábricas de células microbianas (Choi *et al.*, 2019).

La biología de sistemas basada en análisis computacionales y matemáticos juega un papel clave en la optimización de las MCF al predecir el mejor escenario que se adapta a la sobreproducción de compuestos específicos (Nielsen and Keasling, 2016). En general, los investigadores siguen el ciclo de diseño-construcción-prueba-aprendizaje (DBTL) de manera sistemática y eficiente, un modelo conceptual ampliamente adoptado para el marco de ingeniería metabólica (*Figura 2.1*). En el modelo, cuatro componentes diferentes trabajan juntos para proporcionar la vía, el huésped y las partes más adecuadas que permiten validar la cepa diseñada (García-Granados *et al.*, 2019).



**Figura 2.1:** Representación esquemática del ciclo diseño-construcción-prueba-aprendizaje para mejorar la producción de biomoléculas. Tomado de: Singh, V. 2021. *Microbial Cell Factories Engineering for Production of Biomolecules*, Academic Press.

## **2.2 *Bacillus subtilis***

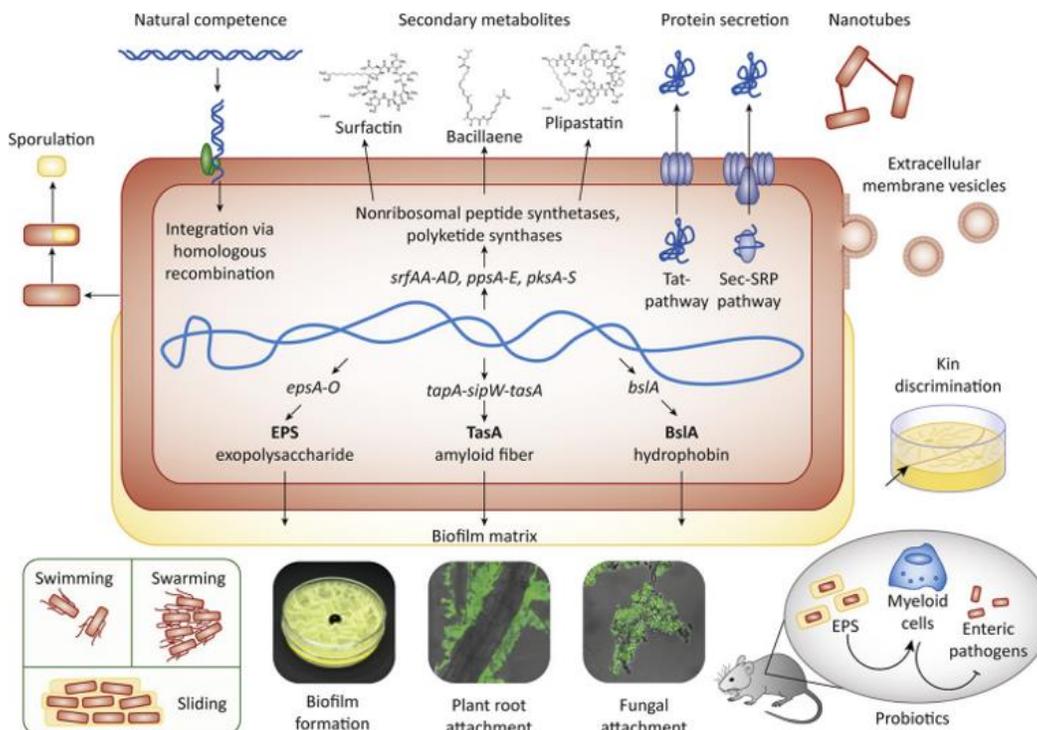
### **2.2.1 Taxonomía y características generales**

Las especies del género *Bacillus* se caracterizan por ser bacterias Gram positivas, pertenecen al *Phylum Firmicutes*; *Clase Bacilli*; *Orden Bacillales*; *Familia Bacillaceae* (Maughan and Van der Auwera, 2011). Tienen una morfología típica de bacilos: células en forma de bastones, sin embargo, las especies pertenecientes a este género poseen la peculiaridad de formar una endospora bacteriana como estructura de resistencia ante condiciones de estrés provocado por altas temperaturas, radiación UV, desecación, valores extremos de pH y salinidad (Zhang *et al.*, 2020).

La primera mención, de la que se tiene conocimiento, sobre la especie *Bacillus subtilis* fue por Ehrenberg en 1835, en ese entonces se denominaba *Vibrio subtilis*, sin embargo, fue renombrado por otro taxónomo de la época Ferdinand Cohn en 1872 como *Bacillus subtilis* luego de que este destacado investigador desarrollara la primera descripción del género *Bacillus* (Økstad and Kolstø, 2011).

*Bacillus subtilis* se convirtió en la especie más estudiada del género, debido a su competencia natural para la absorción de ADN extracelular que facilita la modificación genética simple. Este microorganismo pertenece a la clasificación de microorganismos generalmente reconocidos como seguros (GRAS, *siglas en inglés*) de ahí que sea considerado para numerosos procesos industriales relacionados con la producción de proteínas heterólogas, producción de enzimas, vitaminas y otros metabolitos (Liu *et al.*, 2020). Por su condición de protótrofa esta especie es capaz de crecer en medios sin requerimientos adicionales, además de que tiene un crecimiento rápido en condiciones de temperatura ambiente y con fuentes de carbono de bajo costo, incluso en procesos de fermentación a gran escala; lo que lo hace un microorganismo ideal para el trabajo en el laboratorio. Debido a su alta operabilidad genética y estabilidad es considerado como un microorganismo modelo para la ciencia básica y aplicada considerándose la bacteria Gram positiva más estudiada (Su *et al.*, 2020).

Esta especie tiene la característica de desarrollar competencia genética de forma natural para la incorporación de ADN exógeno en estado estacionario (González-González *et al.*, 2015), sumado a que posee un sistema de secreción de proteínas bien estudiado lo hace que sea un microorganismo ideal en procesos de producción de proteínas recombinantes y en ciencia básica para el estudio de funciones de determinados genes como vector de expresión (*Figura 2.2*). En ese sentido supera a su equivalente Gram negativo *Escherichia coli* debido a que esta bacteria posee en su membrana externa una capa de lipopolisacárido que tiene carácter de endotoxina y pirogénico que debe ser removido en los productos que se obtienen utilizando esta plataforma. Además *E. coli* tiene tendencia a formar inclusiones citoplasmáticas donde se encuentran las proteínas que se expresan como producto de tecnologías recombinantes, esto evidentemente complica los procesos de purificación de proteínas a diferencia de *Bacillus* sp. que las secreta al exterior celular (Zweers *et al.*, 2008).



**Figura 2.2:** *Bacillus subtilis*. Características generales y aplicaciones en investigación básica y aplicada. Tomado de: Kovács, Á. T. 2019. *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*. 27, 724-725.

Por la importancia de esta especie fue de los primeros microorganismos tomados en cuenta para su secuenciación, específicamente en 1990 se desarrolló una colaboración entre centros de investigación de Europa y Japón cuyo fin era secuenciar todo el genoma de *Bacillus subtilis cepa 168*; de manera que en el año 1997 se publica todo el genoma anotado de este microorganismo (Kobayashi *et al.*, 2003) (Tjalsma *et al.*, 2004). En años posteriores se identificaron todos los genes esenciales (Zeigler *et al.*, 2008), por lo cual actualmente podemos considerar el metabolismo de *B. subtilis* cómo uno de los más comprendidos al disponer de conjuntos de datos detallados del transcriptoma (Nicolas *et al.*, 2012), el endoproteoma y exoproteoma (Tjalsma *et al.*, 2004), incluso componentes del secretoma y el metaboloma (Meyer *et al.*, 2013), representando en su conjunto una extensa y confiable fuente de datos para la investigación de esta especie.

### **2.2.2 Ecología y distribución de *Bacillus subtilis***

*B. subtilis* se puede aislar de muchos entornos: terrestres y acuáticos, por lo que podemos clasificarlo como un microorganismo ubicuo que cuenta con adaptaciones como la formación de esporas, así como agregados celulares conocidos como biopelículas (“*biofilm*”) que le permite persistir en diferentes ambientes desfavorables (Caulier *et al.*, 2019). Sin embargo, es común encontrar esta especie en estrecha asociación con la superficie radicular de las plantas, por lo que pertenece al grupo de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) y, por lo tanto, es capaz de producir moléculas bioactivas como precursores de hormonas vegetales, lo que favorece el crecimiento de las plantas (Fierer, 2017).

### **2.2.3 Crecimiento del microorganismo**

*Bacillus subtilis* tiene la potencialidad de usar varios sustratos para su crecimiento, estos se incorporan al metabolismo central del carbono y son fácilmente asimilados por la bacteria, sin embargo, según estudios de Buffing *et al.* la glucosa es la fuente de carbono preferente, que se internaliza e incorpora al metabolismo (glucosa fosforilada) por medio del sistema fosfotransferasa (PTS) bien estudiado en esta especie (Buffing *et al.*, 2018). Generalmente en sustratos como la glucosa o sus derivados ocurre una oxidación aerobia completa hasta CO<sub>2</sub>

y H<sub>2</sub>O, esto genera ATP como molécula portadora de energía metabólica, intermediarios metabólicos y poder reductor mediante portadores de carga que en su conjunto constituyen elementos necesarios para las reacciones anabólicas (Zhu and Zhang, 2017).

De igual manera *B. subtilis* ha mostrado valores significativos de crecimiento cuando se utilizan otras fuentes de carbono como los ácidos orgánicos, algunos estudios indican el crecimiento de esta especie en propionato como fuente de carbono. En este estudio se informa una  $\mu = 0.09 h^{-1}$  para este sustrato, así como  $q_s = 0.28 \pm 0.03 g gDW^{-1}h^{-1}$ ; sin embargo también otros ácidos orgánicos resultan promisorios para su crecimiento como acetato, butirato, succinato y formato (Alfonso *et al.*, 2021). Debido a su metabolismo aerobio este microorganismo posee todos los genes que codifican para las enzimas que participan en ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y puede crecer en la mayoría de los intermediarios del ciclo de TCA como únicas fuentes de carbono (Michna *et al.*, 2016).

### **2.3 Trabajo con Biorreactores para el cultivo de microorganismos**

La producción industrial de los derivados de la biotecnología ha sido posible en buena medida debido al desarrollo de las técnicas de cultivo celular a gran escala: Estas técnicas han permitido establecer las condiciones para el cultivo de células microbianas, vegetales y animales, para la síntesis de toda una gama de metabolitos de interés en los diferentes sectores de la industria (química, farmacéutica, textil, de alimentos, etc.) (Sharma and Saharan, 2018). El componente fundamental de estas técnicas de cultivo es el fermentador o biorreactor, que es el recipiente en donde se promueve el crecimiento de organismos para la síntesis de diversos productos biotecnológicos.

El cultivo de microorganismos en biorreactores es uno de los procesos unitarios más importantes de la biotecnología moderna y también de los más desafiantes para seguimiento y control de procesos. Los biorreactores son complejos sistemas de monitoreo multivariable, porque durante su funcionamiento los sustratos son consumidos, mientras que se forman productos e intermediarios metabólicos en presencia de células vivas (Lourenço *et al.*, 2012). Estas células están generalmente

suspendidas en el medio del biorreactor en cantidades que pueden variar desde muy bajas hasta constituir una fase sólida mayoritaria (ausencia o casi ausencia de agua libre), y su presencia puede interferir con los métodos analíticos más utilizados (Preisner *et al.*, 2007).

La función principal de un fermentador es la de proveer un ambiente controlado para alcanzar el crecimiento y la formación óptima de productos. Evidentemente garantizar una condición estéril, que permita únicamente el cultivo de la especie biológica de interés debe ser una premisa que cumplan estos sistemas. Los fermentadores pueden variar en tamaño, desde 0.1-10 L, conocido como escala de laboratorio hasta 400,000 L (escala industrial). Las dimensiones del fermentador dependen de su proceso y operación. Por ejemplo, los cultivos celulares operados en lote o “*batch*” (sistemas de cultivo en donde sólo se adicionan nutrientes al principio de la fermentación y el volumen se mantiene constante), requieren fermentadores mayores a los que se usan en los cultivos continuos o semi-continuos “*fed-batch*” (sistemas con adición continua de nutrientes y volumen variable) (Karthikeyan *et al.*, 2022).

A nivel de investigación, el fermentador más empleado, tanto en la academia como en la industria, es el matraz. Se usa ampliamente para la evaluación y desarrollo de diversos cultivos celulares. Una ventaja de los matraces agitados es que se pueden llevar a cabo un gran número de experimentos para establecer el efecto de los diferentes componentes del medio de cultivo sobre el crecimiento y rendimiento de los microorganismos (Freyer *et al.*, 2004).

Por su parte, los fermentadores industriales presentan un alto grado de equipamiento, incluyendo sistemas de agitación y dispersión de aire para garantizar una buena oxigenación del medio y un eficiente mezclado, así como sensores para conocer el cambio de las variables del cultivo tales como: la temperatura, el oxígeno disuelto, el pH, la concentración celular, entre otros (Tajsoleiman *et al.*, 2019). En los últimos años se han logrado avances significativos en el diseño de los fermentadores, así como en el grado de control que se ejerce durante el proceso de fermentación, abriendo la posibilidad del cultivo de toda una

variedad de organismos, particularmente aquellos que han sido modificados genéticamente (Karthikeyan et al., 2022).

La aireación y el mezclado son las operaciones más importantes que se busca satisfacer en el fermentador ya que una proporciona oxígeno al cultivo (en procesos aerobios) y el otro mantiene cierta homogeneidad en los parámetros fisicoquímicos. En los fermentadores de laboratorio, la satisfacción de la demanda de oxígeno y un mezclado eficiente pueden lograrse sin mayor dificultad. Pero a mayor escala el proceso se complica. A medida que se incrementa el tamaño del equipo, se incrementan las diferencias de los parámetros de cultivo y la presión hidrostática cambia drásticamente. Lo anterior puede llevar a graves consecuencias en el rendimiento y calidad del producto de interés. La problemática se complica cuando la viscosidad del cultivo aumenta significativamente como resultado de la producción de polímeros o por el incremento en la masa celular, un ejemplo de esto sería en las fermentaciones con hongos filamentoso (Liao *et al.*, 2018).

De esta manera podemos decir que el fermentador (o biorreactor) tiene dos objetivos primordiales:

- a) proporcionar oxígeno a las células que se están cultivando en suspensión
- b) mantener las condiciones ambientales básicas (como temperatura, oxígeno disuelto y pH) en los niveles que sean óptimos para la producción del metabolito de interés.

Para lograr esto, un fermentador típico tiene, en primer lugar, que dispersar un gas (aire, que contiene oxígeno) en un líquido (normalmente agua, en la que se disuelven otros nutrientes esenciales, como azúcares y proteínas). Esto se logra burbujeando aire, que ha sido previamente filtrado para evitar introducir contaminaciones al cultivo, al interior del tanque fermentador. De igual manera su diseño permite dispersar el gas dentro del medio acuoso, mediante el uso de impulsores que rompen las burbujas de gas (que se está inyectando al tanque) en burbujas lo más pequeñas posibles. Este proceso permite maximizar el área superficial que el gas tiene en contacto con el líquido, debido a que para una misma

cantidad total de gas, un conjunto de burbujas pequeñas tiene mucha más área que una burbuja grande (Liao et al., 2018). En consecuencia, hay que suministrar continuamente aire para satisfacer la demanda de oxígeno del microorganismo. Este proceso se hace más complejo e ineficiente cuando la viscosidad del medio se incrementa (Panda, 2011).

### **2.3.1 Cultivo de *Bacillus subtilis* en biorreactores**

Las potencialidades antes mencionadas para el cultivo de este microorganismo, así como la facilidad de recuperación de los productos ha motivado el empleo de *B. subtilis* en procesos de fermentación, logrando exitosos escenarios de producción de compuestos con un alto valor industrial (Mohsin et al., 2021).

Un componente fundamental en la optimización de estos procesos es el diseño del medio de cultivo, actualmente se clasifican las fermentaciones de este microorganismo en dos grupos teniendo en cuenta si se utilizan medios químicamente definidos o medios complejos (Öztürk et al., 2016). Debido a los desafíos en el procesamiento *a posteriori* de las muestras existen muchos intentos de producir biomoléculas por *B. subtilis* en medios químicamente definidos o sintéticos, como también se le conocen. Los medios mínimos químicamente definidos se caracterizan por tener una sola fuente de carbono y de nitrógeno metabolizable, en su mayoría compuesto por estos macroelementos fundamentales y una solución a base de sales minerales y elementos de composición conocida (Sperotto et al., 2021). Sin embargo, aunque los procesos de separación y purificación de las biomoléculas que se obtienen por esta tecnología requieren un intenso trabajo, muchos investigadores han desarrollado medios complejos para impulsar el crecimiento celular y la formación de productos (Zou et al., 2014) (Chen et al., 2015) (Gao et al., 2012). En estos medios complejos es necesario controlar la inhibición por sustrato, fenómeno que afecta el crecimiento celular, por lo que el ajuste preciso de la fuente de carbono y nitrógeno constituye un parámetro esencial en el diseño de estos procesos (Zhang et al., 2018).

Se ha demostrado que la glucosa cuando se emplea como fuente de carbono generalmente es el sustrato limitante, sin embargo, resulta interesante cómo en

muchos procesos las limitaciones en el medio de otro compuesto como la peptona que funciona como fuente compleja de carbono y nitrógeno ralentizan significativamente el crecimiento celular. Este es un aspecto para tener en cuenta pues se ha demostrado en estudios como el de Oh *et al.* que una proporción de glucosa: peptona en el medio inicial de 1:2 resultó ser la óptima para obtener los mayores valores de  $\mu_0$  en la producción de subtilisina (Oh *et al.*, 2002). Del mismo modo en otro estudio de Cho *et al.* para la producción de nattoquinasa se emplea un medio complejo con una proporción glucosa/peptona de 1:5, en este mismo trabajo se obtiene la máxima actividad enzimática para la nattoquinasa cuando existía una relación entre ambos compuestos de 0.33 (Cho *et al.*, 2010).

Uno de los principales problemas que se encuentran en las fermentaciones de *B. subtilis* es la esporulación, fenómeno que se produce debido a la inanición (limitación de sustrato) (Zhang *et al.*, 2020). Estas células diferenciadas extremadamente resistentes son la respuesta a condiciones de crecimiento desfavorables y funcionan como estructuras de supervivencia; sin embargo, la transformación completa de las células vegetativas metabólicamente activas en esporas latentes en la fase tardía de la fermentación eventualmente termina la producción de muchas biomoléculas. De ahí que para la síntesis de metabolitos primarios sea fundamental controlar las condiciones de agotamiento de nutriente cuando se trabaja con este microorganismo (Liu *et al.*, 2014). Contrariamente, la síntesis de metabolitos secundarios generalmente está regulado por mecanismos inducidos en este proceso de latencia, relacionados en gran medida con los fenómenos que intervienen en la formación de endosporas (Oh *et al.*, 2002). Por lo tanto, podemos concluir que, según la biomolécula objetivo, debe diseñarse un sistema adecuado para regular el proceso de esporulación manipulando el suministro de nutrientes.

## **2.4 Ácido Indolacético. Importancia de la auxina**

El ácido indolacético es un ácido orgánico débil que consta de un anillo indol plano, estructura acoplada a una cadena lateral que alberga un grupo carboxilo terminal. El grupo carboxilo se protona a pH bajo, haciendo que la molécula sea menos polar y puede difundir a través de la membrana celular, mientras que en su forma no protonada y cargada negativamente es demasiado polar para la difusión (Rosquete et al., 2012).

El AIA es la fitohormona más estudiada de la clase de las auxinas y regula varios aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas. Desempeña un papel clave en la fisiología vegetal y está involucrado en la división celular, elongación, diferenciación, desarrollo de frutos y respuesta fototrópica (Zhao, 2010). Se conoce que este compuesto estimula la elongación celular al modificar ciertas condiciones en los organelos vegetales modificando el contenido osmótico de la célula (aumentando el contenido osmótico en el interior celular), esto provoca que se incremente la permeabilidad de agua y por consiguiente disminuye la presión de la pared (Keswani et al., 2020). También se caracteriza por inhibir o retrasar la abscisión de las hojas, inducir la floración y fructificación, así como evitar el desarrollo de las yemas axiales, dando origen a un fenómeno que se conoce como dominancia apical y promueve el fototropismo positivo, procesos en su conjunto esenciales en el desarrollo de las plantas (Zhao, 2010).

En el suelo abundan microorganismos con capacidad para promover el crecimiento de las plantas. El uso de inoculantes biológicos en los sistemas productivos es una alternativa viable e importante para lograr un desarrollo agrícola ecológicamente sostenible; ya que permite una producción a bajo costo, no contamina el ambiente y mantiene la conservación del suelo desde el punto de vista de fertilidad y biodiversidad (Paneque-Pérez, 2010).

El aumento de la población ha dado lugar a un aumento de la demanda para la producción de alimentos, aspecto que depende en gran medida de la presencia de plantas sanas pues es la vía para obtener altos rendimientos de los cultivos. Esto es un factor clave para tener en cuenta para el enorme crecimiento de mercado del

AIA. Aunque el compuesto se produce de forma natural, la estimulación de la planta con el compuesto sintético, ha tenido un impacto positivo (Keswani et al., 2020). Precisamente, la industria del AIA ha mantenido un crecimiento relativamente constante de las ventas durante los últimos años con una tasa de crecimiento anual compuesta de 7.97% de 2013 a 2016. Se calcula que en los próximos años el mercado del AIA alcance los 13,9 millones de dólares (Singh et al., 2016).

## **2.5 Síntesis de AIA por *B. subtilis***

El género *Bacillus sp.* destaca como uno de los principales grupos de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (*del inglés*, PGPB) de manera a que abundan los estudios donde se emplean especies pertenecientes a este género bacteriano para promover el crecimiento de plantas (Poveda and González-Andrés, 2021). Los mecanismos de acción son diversos, incluido el aumento en la absorción de nutrientes por el cultivo, mediada por la solubilización de formas insolubles, fijación de nitrógeno, liberación de amoníaco de materia orgánica nitrogenada; también la síntesis de fitohormonas de crecimiento vegetal (auxinas, citoquininas y giberelinas) o la producción de compuestos orgánicos volátiles, que regulan la fisiología vegetal (Lopes et al., 2018).

La síntesis de AIA está considerada parte del metabolismo secundario de *B.subtilis* y su formación se lleva cabo durante la fase estacionaria del crecimiento (Wagi and Ahmed, 2019). La auxina se sintetiza con la ayuda del precursor secretado a través de los exudados de la raíz según el genotipo de la planta. Precisamente Liu et al., demostró en su estudio que la mejora en la secreción de triptófano por las raíces de las plantas en presencia de la bacteria colonizadora de la rizosfera estimuló la producción de AIA en el microorganismo, lo que muestra una interacción simbiótica de ambos organismos asociados (Liu et al., 2016). Este AIA bacteriano cambia la reserva de auxinas de la planta a niveles supraóptimos. Los efectos fitoestimuladores de este compuesto se reflejan directamente en el crecimiento de las plantas al mejorar el desarrollo de sus raíces, provocando un

aumento de la relación superficie/volumen de las mismas y, en consecuencia, resulta en una mejor absorción de agua y nutrientes (Poveda and González-Andrés, 2021).

### **2.5.1 Vías metabólicas para la síntesis de AIA microbiano**

Aunque se conoce desde hace mucho tiempo los efectos beneficiosos de las rizobacterias, en particular las gram-positivas en la promoción del crecimiento de las plantas, los principios moleculares básicos que explican la síntesis de compuestos como el AIA comenzaron a ser estudiados hace unos años. De manera general, se ha observado un alto grado de similitud en las vías de biosíntesis de AIA entre plantas y bacterias, aunque un aspecto bien marcado en la síntesis microbiana de este compuesto es que el triptófano ha sido identificado como un precursor primario para la producción de la auxina; aunque se conoce que pueden existir algunos microorganismos que tengan vías de biosíntesis de AIA independientes del triptófano (Spaepen *et al.*, 2007).

Las rutas dependientes de triptófano han sido las más estudiadas, empleando mutantes genéticos con deleciones de los genes involucrados en las rutas de síntesis de AIA, se ha demostrado que en el género *Bacillus* tal como se muestra en la *Figura 2.3* predominan tres vías que emplean este aminoácido como precursor:

#### - Vía del Indol-3-acetonitrilo (IAN)

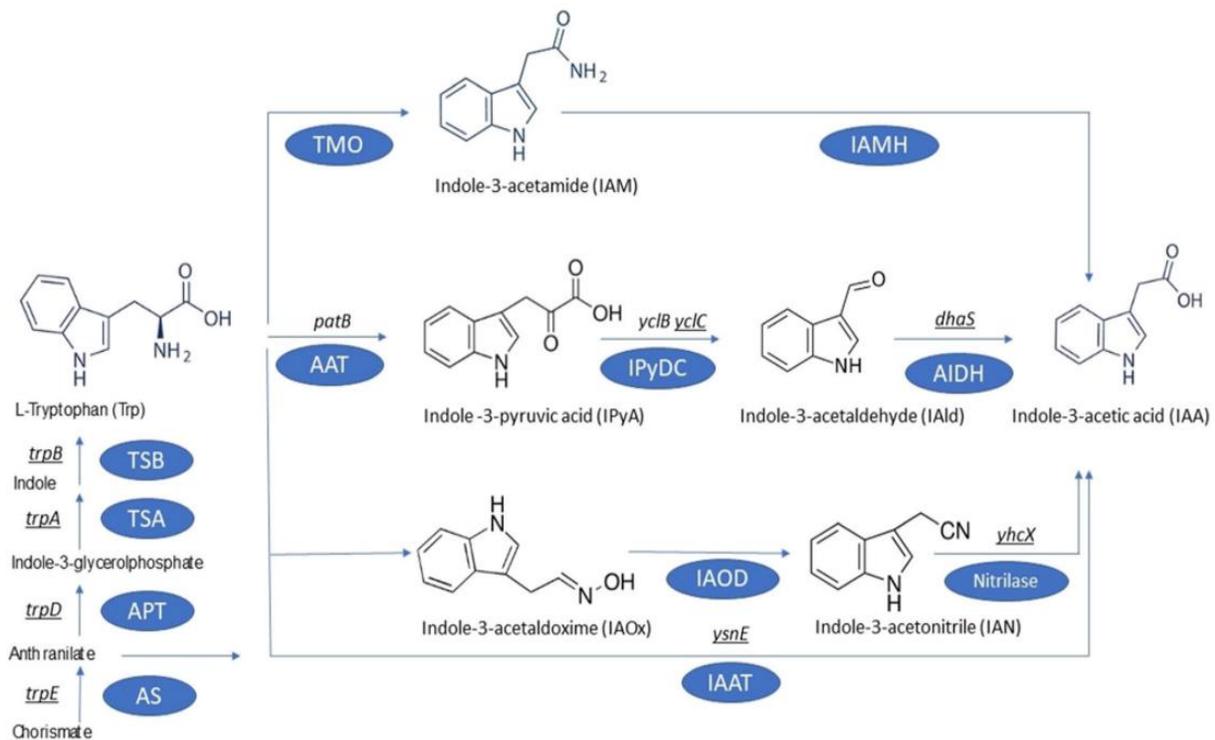
Esta vía comprende dos intermediarios a partir del triptófano, de los cuales el índol-3-acetonitrilo es el precursor directo de la auxina. Se ha demostrado que el producto del gen *yhcX* es precisamente una nitrilasa que convierte el precursor IAN en ácido indolacético, por lo que esta enzima determina la efectividad del proceso, esto ha sido demostrado por Liu *et al.* probando la asociación entre la expresión de esta enzima y el crecimiento radicular en plántulas de pepino (Liu *et al.*, 2016).

- Vía del Indol-3-piruvato (IPA)

En cuanto a esta ruta, ha sido descrita en algunos géneros bacterianos como *Bradyrhizobium sp.*, *Azospirillum sp.*, *Rhizobium sp.*, además de algunas cianobacterias. El primer paso de la vía es la conversión de triptófano a IPA por una aminotransferasa (transaminación). Luego el IPA se descarboxila a otro intermediario el ácido indol-3-acetaldehído, siendo esta la etapa limitante de la síntesis. Finalmente en el último paso el indol acetaldehído se oxida para obtener el AIA (Spaepen et al., 2007).

- Vía del Indol-3-acetamida (IAM)

La vía de la indol-3-acetamida (IAM) es la vía mejor caracterizada en bacterias. En esta ruta de dos pasos, el triptófano se convierte primero en IAM por la enzima triptofano-2-monooxigenasa, codificada por el gen *iaaM*. Más adelante, en el segundo paso, IAM se convierte en AIA por una hidrolasa. Esta ruta se describió en un inicio como una vía específica de bacterias, sin embargo, se ha mostrado mediante detección por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS/MS) la presencia de IAM en *Arabidopsis thaliana* (Pollmann et al., 2002). Esta vía contribuye a la virulencia de algunos microorganismos patógenos debido a la excesiva producción de AIA y ha sido documentada en *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas aureginosa*, *Pseudomonas syringae* y *Bacillus subtilis* (Yang et al., 2007).



**Figura 2.3:** Vías de síntesis de AIA dependientes de Triptófano en *Bacillus* sp. Tomado de: Keswani, C. et al., 2020. Auxins of microbial origin and their use in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 8549-8565.

## 2.6 Modelado matemático del metabolismo y FBA

El modelado matemático constituye una herramienta muy poderosa en física, química e ingeniería para la interpretación y predicción de fenómenos naturales y resultados experimentales. De esta forma se entiende que un modelo debe tener un carácter predictivo, que permita la simulación de nuevas condiciones de manera exacta. Entre los modelos matemáticos de mayor interés en la actualidad se encuentra el modelado del metabolismo celular. Este permite aplicar un marco teórico matemático para caracterizar el ajuste del metabolismo celular ante los distintos estímulos externos y por consiguiente optimizar las funciones metabólicas, de esta forma se puede comprender la relación entre el genotipo y el fenotipo (Gombert and Nielsen, 2000).

El surgimiento de un nuevo campo de estudio: la biología de sistemas; producto de la disposición masiva de datos generada por proyectos de secuenciación de genomas completos, así como actualmente la caracterización de transcritos de ARNm, proteínas y metabolitos, pero con un enfoque intensivo (todo este conjunto de datos da lugar a lo que hoy conocemos como las “ómicas”) representan en su conjunto mucha información que no pudiera ser interpretada fácilmente sin el empleo de herramientas matemáticas y computacionales (Chuang et al., 2010). Estos modelos matemáticos del metabolismo han sido utilizados para interpretar, evaluar datos, diseñar experimentos, caracterizar funciones y generar estrategias de optimización; de tal manera que permiten alcanzar una visión integral del desempeño metabólico de los microorganismos y células, en función de los estímulos externos a los que se encuentran expuestos (Klipp et al., 2016).

El análisis de un comportamiento celular no puede ser explicado solamente por elementos constitutivos de una célula, para definir las capacidades del sistema biológico y predecir su comportamiento se necesita un enfoque sistémico. Esto confiere un papel crucial al estudio de las redes metabólicas como elementos que integran las interacciones a nivel celular y facilitan la comprensión de un proceso metabólico, así como la relación que tiene con los procesos fisiológicos de la célula (Llaneras and Picó, 2008).

La manera en que se conectan las rutas metabólicas, es decir, la red metabólica permite rastrear el proceso de transformación de materia, por lo cual, el cálculo de un balance de materia nos dicta cuánto sustrato es convertido en producto y precursores para la producción de biomasa celular. Precisamente en este principio se basan los modelos estequiométricos, los cuales tal cual lo indica su nombre se construyen con base a la estequiometría de las reacciones y actualmente son una de las aproximaciones más empleadas para modelar el metabolismo celular.

Una red metabólica está definida por un conjunto de reacciones que se pueden representar de manera gráfica por medio de nodos (metabolitos) y líneas conectoras (reacciones) (*representados con flechas en la Figura 2.4*).

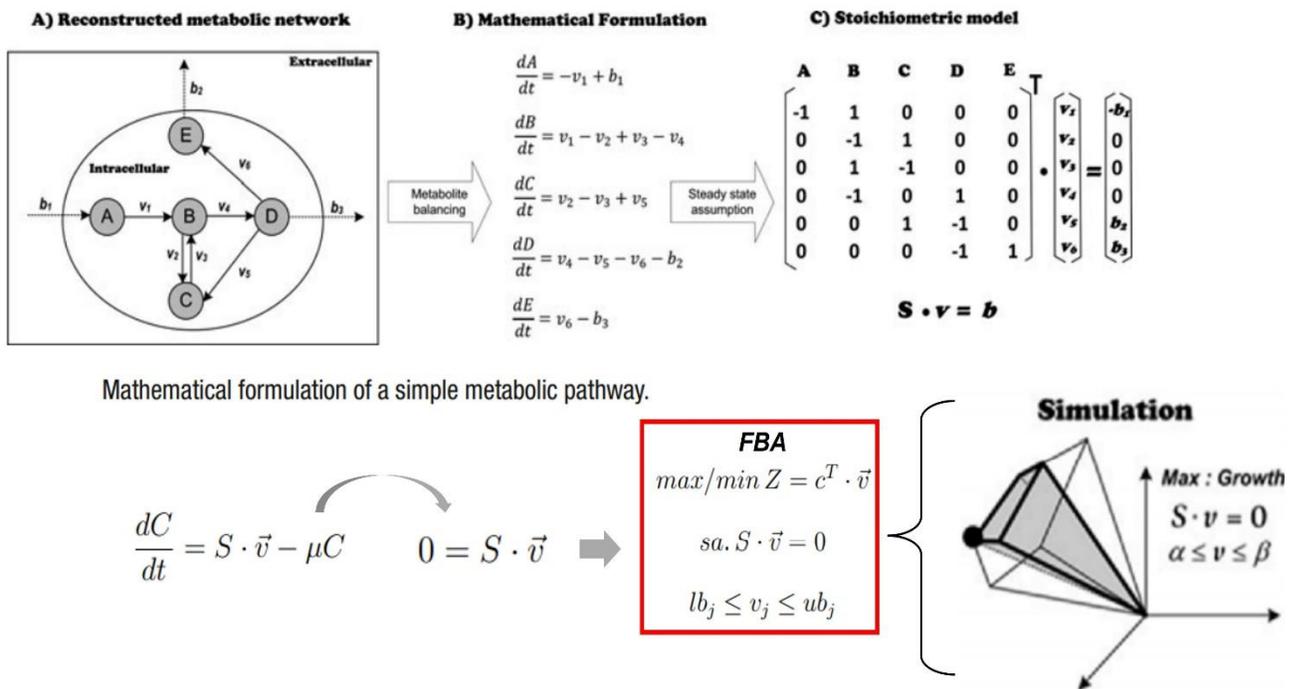
Este conjunto de reacciones permite generar los balances de materia de cada metabolito participante, generando un conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias que integra las velocidades de reacción, o flujos, de cada reacción. La aproximación denominada metabolic flux análisis permite reducir el sistema de ecuaciones dinámica a uno de carácter estacionario, obteniendo un sistema de ecuaciones lineales que al resolverse se obtienen la distribución de los flujos de materia (velocidades) a través de la red metabólica. Este sistema de ecuaciones lineales contiene en su matriz la información estequiométrica de la red en su conjunto con  $m$  metabolitos y  $n$  reacciones  $s$  en la que las filas corresponden a los metabolitos y las columnas a las reacciones (dimensión  $m \times n$ ). La relevancia de esta matriz está dada porque representa la traducción del conocimiento biológico a términos matemáticos (*Figura 2.4*), de esta manera surgió el termino de modelos estequiométricos.

Sin embargo, cuando se modela a escala genómica, esto es, se incluyen todas las reacciones del metabolismo, el sistema de ecuaciones lineales es indeterminado, esto es, con cientos de grados de libertad. Para poder resolver esto, se planteó la metodología denominada FBA (del inglés, "*Flux Balance Analysis*"), la cual consiste en considerar el sistema de ecuaciones lineales como un conjunto de restricciones lineales dentro de un problema de optimización lineal. Este tipo de análisis basado en restricciones permite la construcción de modelos predictivos, al obtener como resultado la distribución de flujos metabólicos intracelulares. Para entender esta metodología es necesario dejar planteado algunos principios básicos que explican cómo opera el algoritmo y permite predecir el fenotipo o comportamiento celular con bastante exactitud:

- *Suposición de un estado pseudoestacionario para metabolitos internos.*

Esta suposición está respaldada por el principio de que la dinámica intracelular (metabolismo) es mucho más rápida que la dinámica extracelular y que las concentraciones del metabolito interno se mantiene estacionario. De igual manera el término dilución ( $\mu C$ ) en la ecuación diferencial tampoco se tiene en cuenta debido a que es varios órdenes de magnitud más pequeño que la velocidad de reacción,

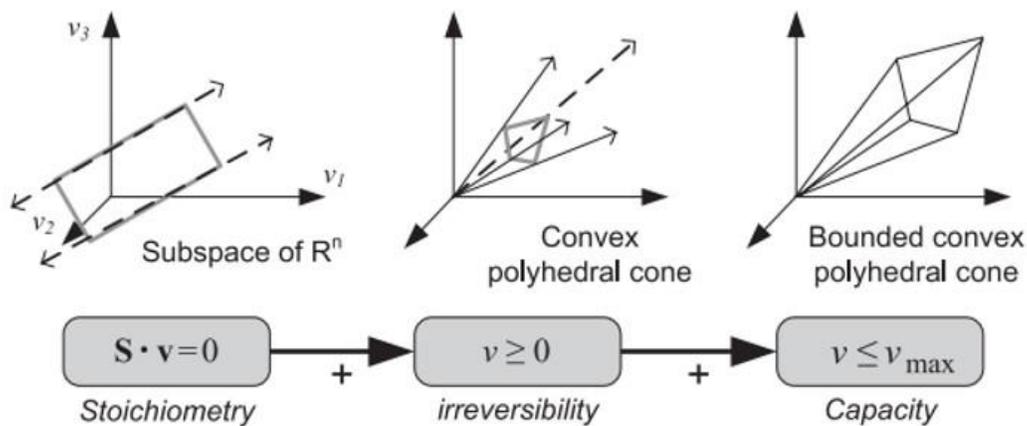
fluxes ( $v$ ), para cada metabolito. Sin embargo, este supuesto “estado estacionario” no implica que la naturaleza dinámica de todo el proceso sea ignorada por completo, pues los procesos extracelulares dinámicos, como la absorción de sustratos y la formación de productos, aún pueden considerarse. Entonces tenemos que, bajo estos supuestos, los balances de masa de cada metabolito pueden describirse mediante un sistema homogéneo de ecuaciones lineales, conocido como “ecuación general”:  $S \cdot \vec{v} = 0$



**Figura 2.4:** Esquema ilustrativo del proceso de modelado matemático del metabolismo, así como las ecuaciones derivadas del algoritmo de solución del problema de optimización lineal resultante mediante “Análisis de Balance de Flujos” (FBA, siglas en inglés). Modificado de: “Yeast System Biology” (Castrillo and Oliver), 2011, Human Press.

### Imposición de restricciones que limitan el espacio solución o fenotipos probables

El espacio de posibles distribuciones de flujo en el estado estacionario se define mediante las ecuaciones representadas en la *Figura 2.5* que constituyen las restricciones invariantes del modelo, estas son interpretadas como las capacidades del metabolismo celular de ahí que sean tomadas como *restricciones no ajustables*. Por otro lado, ciertos valores de flujo, generalmente captaciones de sustratos se incorporan como entradas del modelo, lo que se conoce como *restricciones ajustables*, valores de flujo experimentales que restringen aún más el espacio de posibles distribuciones de flujo incluso permiten teóricamente predecir la distribución de flujo real (Llaneras and Picó, 2008).



**Figura 2.5:** Consideración de restricciones no ajustables para definir el espacio de distribuciones de flujo factibles. La *restricción estequiométrica* restringe el espacio a un hiperplano, subespacio de  $R^n$ ; los *flujos irreversibles* están obligados a ser positivos, esto transforma el espacio resultante de distribuciones de flujo a un cono poliédrico convexo. Por último, *restricciones de capacidad máxima*, derivadas de la saturación enzimas o mecanismos de transporte celular, también pueden ser impuestas, y acotan el espacio solución a una figura geométrica conocida como polítopo. Tomado de: Llaneras, F. and Picó, J. 2008. *Stoichiometric modelling of cell metabolism. Journal of bioscience and bioengineering*, 105, 1-11.

- Establecer una función objetivo que represente el estado biológico buscado

Resulta lógico pensar que durante la evolución los organismos se esfuercen por optimizar su metabolismo para ser más competitivos en el ambiente. Este objetivo se traduce en una función que se expresa matemáticamente como una combinación lineal de los flujos metabólicos y es en definitiva quien determina su propia solución expresada como un problema de optimización. Resolviendo el problema de programación lineal resultante, se obtiene la distribución de flujos que hace el mejor uso (óptimo) de la red metabólica definida para satisfacer la función objetivo establecida. Matemáticamente, una 'función objetivo' se utiliza para cuantitativamente definir cuánto contribuye cada reacción a un determinado fenotipo. Entonces se entiende que el objetivo de FBA no es de solo determinar la distribución de flujos que corresponde a un conjunto de mediciones, sino construir un modelo capaz de predecir el fenotipo (distribución de flujo) que se expresará bajo ciertas condiciones (dadas por las restricciones de entrada) (Orth *et al.*, 2010).

Se ha propuesto el uso de funciones objetivo como producción de biomasa, consumo de oxígeno o producción de energía en forma de ATP, estas funciones tratan de reproducir el objetivo que tendría un microorganismo bajo distintos estímulos externos. En el caso de predecir el crecimiento, el objetivo es la producción de biomasa, es decir, la velocidad a la que los compuestos metabólicos son convertidos en constituyentes de biomasa tales como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. La producción de biomasa se representa matemáticamente agregando una "pseudoreacción de biomasa" al modelo, es decir, una columna adicional de coeficientes en la matriz estequiométrica, que consume metabolitos precursores a estequiometrías que simulan la producción de un gramo de biomasa. La reacción se basa en mediciones experimentales de los componentes de la biomasa. Esta reacción se escala de modo que el flujo a través de ella sea igual a la tasa de crecimiento exponencial ( $\mu$ ) del organismo (Orth *et al.*, 2010). Es importante señalar que precisamente la función objetivo más empleada hasta el momento es la maximización de biomasa, la cual ha entregado predicciones coincidentes con datos experimentales (García Sánchez and Torres Sáez, 2014).

No obstante, no existe un análisis sistemático que derive en un marco teórico con el cual se pueda fundamentar la elección adecuada de una función objetivo desde el punto de vista metabólico (Feist and Palsson, 2010).

## **2.7 Algoritmos de optimización binivel. OptKnock**

En el contexto celular el metabolismo tiene una capacidad de adaptación y respuesta que guía al microorganismo a modificaciones en las rutas para garantizar la supervivencia, es decir los objetivos celulares internos son prioridad ante una presión selectiva, los cuales compiten directamente con los objetivos de sobreproducción química. Este fenómeno ha condicionado la manipulación genética de las cepas microbianas de interés industrial para la producción de compuestos químicos específicos y obtener de esta manera los máximos rendimientos posibles en los procesos (Chowdhury et al., 2015). Sin embargo, estos procesos requieren de estudios teóricos que permitan el entendimiento de la red metabólica, así como el efecto de las deleciones en los objetivos de producción y crecimiento. De ahí que existe un grupo de herramientas basadas en el propio marco computacional que crea FBA que permiten este tipo de trabajo al desarrollar una estrategia de optimización multicapa que permite una optimización acoplada de dos niveles, garantizando maximizar los objetivos de crecimiento celular imponiendo desde una capa externa objetivos de producción química. Este algoritmo de optimización binivel se denomina OptKnock y no solo se limita a la distribución de flujos óptimos para acoplar el crecimiento celular a la sobreproducción química, sino que libera como resultados cuáles deleciones de genes o *knockouts* permiten fenotipos con una mayor producción química del compuesto fijado como objetivo (Burgard et al., 2003).

En última instancia, este tipo de algoritmos establece en teoría una forma de hacer cumplir computacionalmente la exigencia de una sobreproducción dirigida como requisito para el crecimiento. Este ha tenido implicaciones de largo alcance en la selección de cepas y su estabilidad debido a que la imposición del algoritmo garantiza que la producción química deseada se convierta en un subproducto obligatorio del crecimiento celular. El proceso de eliminación genética resulta en

principio bastante sencillo de entender, ya que esencialmente prueba estrategias de eliminación en vías que compiten con la deseada, aunque otras eliminaciones resultan poco intuitivas reflejando la complejidad y redundancia del metabolismo. Las variables binarias que se utilizan para capturar la eliminación de una reacción (es decir, el *knockout* del gen) sería fijando los límites inferior y superior del flujo correspondiente en el problema interno a cero. Alternativamente, se han desarrollado enfoques como *BiMOMA* que utilizan la minimización del ajuste metabólico (MOMA) como objetivo celular en lugar de maximización de la biomasa (Kim *et al.*, 2011). Otros estudios han sido desarrollados con éxito para la sobreproducción de compuestos en *E. coli* como succinato, lactato y 1,3-Propanodiol, en todos los compuestos el algoritmo permite obtener rendimientos de producción elevados, así como un marco teórico de modificaciones genéticas que dispararían aún más la producción de estos compuestos (Burgard *et al.*, 2003).

## **2.8 Modelos metabólicos a escala genómica de *B. subtilis***

Desde los inicios de la genómica, se han utilizado algoritmos basados en homología, se han desarrollado extensas bases de datos que resumen genomas microbianos completos; sin embargo, toda esa información se suele presentar en ausencia de la red bioquímica que pretende describir (Overbeek *et al.*, 2014). El resumen metabólico de un genoma era limitado entonces a estudios descriptivos y a la visualización de datos tabulados de unas pocas categorías metabólicas superiores. La manera en que los productos génicos se interconectan a nivel metabólico cambia por completo nuestra perspectiva de la genómica microbiana y del significado inferido de una secuencia del genoma (Henry *et al.*, 2010).

Precisamente desde el año 1999 comienza el desarrollo de los primeros modelos metabólicos a escala genómica (GSMM, siglas en inglés) reconociendo como el primer modelo el desarrollado por ese entonces para el microorganismo patógeno *Haemophilus influenzae* (Edwards and Palsson, 1999). Se entiende por GSMM a un modelo computacional de la red metabólica de un organismo que permite realizar simulaciones y generar predicciones sobre las capacidades de dicho metabolismo. Estos colocan la anotación del genoma en el contexto de cómo los componentes

bioquímicos de la célula se combinan para consumir sustratos, producir energía y crecer, contribuyendo a ampliar nuestra comprensión de un organismo cuyo genoma ha sido secuenciado. En su interior se estructura un conjunto completo de reacciones metabólicas descritas como ecuaciones de balance de masas, basadas en la estequiometría de un organismo utilizando asociaciones gen-proteína-reacción (GPR) que se formulan sobre la información de bases de datos de anotación del genoma e información obtenida experimentalmente (Thiele and Palsson, 2010).

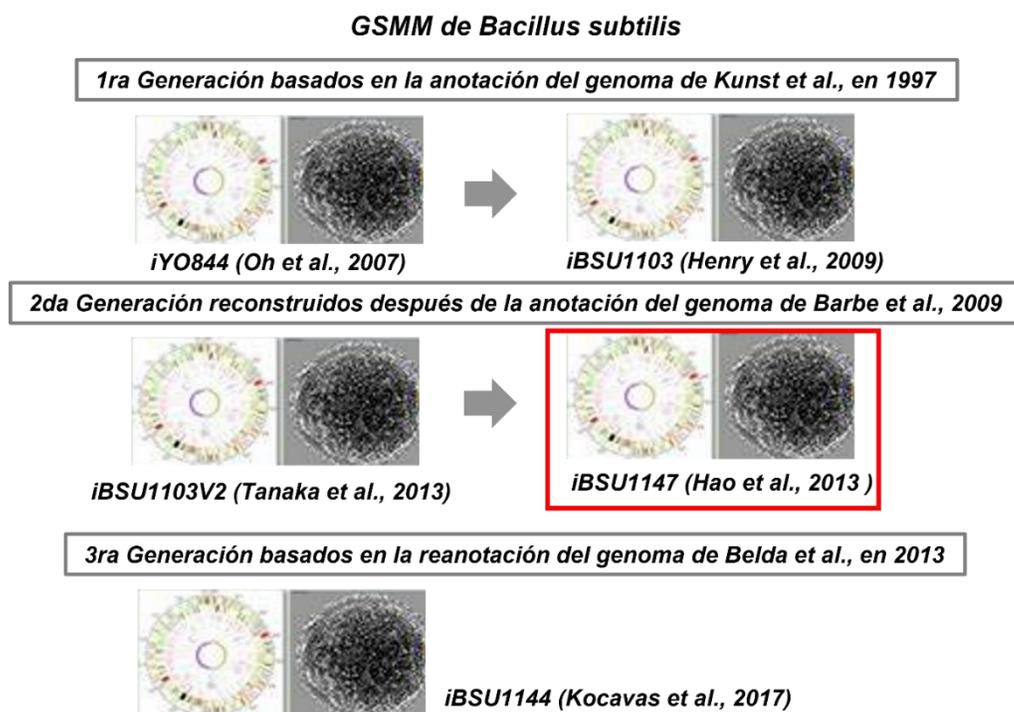
Un GSMM consta de tres componentes fundamentales: la matriz estequiométrica, que define la estructura de la red de reacciones bioquímicas; la tabla de asociaciones GPR derivadas de la anotación genómica del organismo; y una ecuación de biomasa o crecimiento que describe los componentes moleculares que conforman la biomasa del organismo en las proporciones aproximadas en que se encuentran en la célula. Tanto la matriz estequiométrica como las tablas GPR se extraen de bases de datos, como puede ser PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>), mientras que la definición de la ecuación de biomasa implica listar los componentes de las macromoléculas, y las proporciones en que se encuentran en la célula (Santos *et al.*, 2011).

Los primeros GSMM publicados para *Bacillus subtilis* se remontan a los finales de la primera década del 2000 (*ver Figura 2.6*), específicamente los trabajos desarrollados por Oh *et al.*, 2007; Goelzer *et al.*, 2008 y Henry *et al.*, 2009 que son considerados cómo la primera generación de modelos a escala genómica para este microorganismo (Oh *et al.*, 2007); (Goelzer *et al.*, 2008); (Henry *et al.*, 2009). La construcción de estos modelos se basó en la primera anotación del genoma para *B. subtilis* desarrollada por Kunst *et al.*, 1997, estudio dónde fueron reportados 4100 genes que codifican a proteínas (Kunst *et al.*, 1997). La segunda generación de GSMM para esta especie se basa en la anotación del genoma de Barbe *et al.*, 2009, la profundidad alcanzada por esta anotación permitió a los investigadores Tanaka *et al.*, 2013 y Hao *et al.*, 2013 reconstruir estos modelos agregando más reacciones y metabolitos, demostrando la dinámica de este proceso iterativo dónde se

introducen cambios y mejoras al modelo que deben ser validadas (Tanaka *et al.*, 2013); (Hao *et al.*, 2013).

La última versión de estos modelos a escala genómica iBSU1144 fue descrita por Kocavas *et al.*, 2017, construida sobre la base de la información del genoma reanotada por Belda *et al.*, 2013, por lo que representa una tercera generación de GSMM para esta especie, dónde se espera se sigan incluyendo nuevos modelos más curados y precisos para el estudio metabólico de *Bacillus* (Kocabaş *et al.*, 2017); (Belda *et al.*, 2013). Este modelo a escala genómica fue desarrollado incorporando información termodinámica en el patrón cambio molar de energía libre de Gibbs para cada reacción, con el objetivo de mejorar la precisión y consistencia de la reversibilidad de reacciones intracelulares (Kocabaş *et al.*, 2017).

**Figura 2.6:** Desarrollo temporal de los modelos metabólicos a escala genómica (GSMM) en *Bacillus subtilis*.



En este trabajo se utiliza el modelo iBSU1147 pues se ajusta a nuestros objetivos de producción, es decir contempla la vía para la síntesis del compuesto AIA. Además, este modelo constituye uno de los más empleados para el trabajo de ingeniería metabólica de *B. subtilis* teniendo en cuenta su nivel de validación

mediante predicciones de crecimiento en diferentes fuentes de carbono, y la eliminación de genes esenciales y no esenciales (Hao et al., 2013).

En resumen, actualmente los análisis *ómicos* continúan evolucionando, de ahí que la calidad y los ámbitos de aplicación de los GSMM también se han ampliado en consecuencia, contribuyendo juntos a una mejor comprensión del metabolismo en diversos organismos. El progreso se hace tangible cuando hace solo unos años se contaba con GSMM para organismos modelo, como *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* y actualmente han sido reconstruidos estos modelos para varios microorganismos y también organismos multicelulares, como los humanos y células vegetales. De esta forma, ha sido posible construir una amplia gama de estudios metabólicos para generar hipótesis basadas en modelos e implementar varias simulaciones específicas (Lewis et al., 2012). Las aplicaciones no se limitan al desarrollo de cepas para la producción de productos químicos y materiales de clase biológica, sino que los beneficios se extienden actualmente en investigaciones vinculadas a la detección de fármacos efectivos contra patógenos, predicción de funciones enzimáticas, análisis del pan-reactoma, modelado de interacciones entre múltiples células y organismos, así como la comprensión de enfermedades humanas (Gu et al., 2019).

## **CAPÍTULO III**

# **HIPÓTESIS**

Por medio de utilizar algoritmos de optimización multiobjetivo y modelos de escala genómica se pueden encontrar estrategias de ingeniería metabólica que incrementen la producción de AIA en *Bacillus subtilis*.

## CAPÍTULO IV

# OBJETIVOS

### **4.1 Objetivo general**

Calcular la distribución de flujos de carbono utilizando modelos metabólicos a escala genómica y algoritmos de optimización multiobjetivo para la producción de ácido indolacético usando *Bacillus subtilis*.

#### **4.1.1 Objetivos específicos**

1. Instalar un biorreactor completamente instrumentado y automatizar el sistema para el monitoreo de parámetros de cultivo.
2. Realizar cinéticas de crecimiento y producción de AIA en cultivos de *Bacillus subtilis* en microcosmos y biorreactor usando glucosa y propionato como fuentes de carbono.
3. Realizar un análisis comparativo de la distribución de flujos utilizando FBA con base en los parámetros cinéticos obtenidos.
4. Evaluar la optimización binivel para encontrar estrategias de ingeniería metabólica para la sobreproducción de AIA.
5. Establecer estrategias de ingeniería metabólica con los algoritmos propuestos para incrementar los rendimientos de AIA.

## CAPÍTULO V

# METODOLOGÍA

### **5.1 Microorganismo y condiciones de cultivo**

Para este estudio se utiliza una cepa bien caracterizada *Bacillus subtilis* W168 perteneciente al banco celular del Laboratorio de Biotecnología de la UAM Cuajimalpa. Esta cepa es protótrofa debido a que está transformada con la cepa W23 para restablecer el operón *trpC2*, y tiene la capacidad de esporular (Zeigler et al., 2008).

Primeramente, se comprueba la viabilidad y pureza de la cepa. Para ello se realiza un cultivo en placas Petri estriado del microorganismo utilizando Agar Nutritivo (*Merck*) de manera que a las 24 horas de crecimiento se comprobó que las colonias tenían la apariencia típica de *Bacillus subtilis*. Además del análisis macroscópico se utilizó un microscopio óptico (*Nikon*) a 1000X previamente realizada la metodología de Tinción de Gram.

El desarrollo de todo el diseño experimental requiere de una cepa robusta y que los resultados sean fiables y réplicas exactas, por ello se hace necesario contar con un banco del microorganismo bien conservado a fin de disponer del mismo. Fueron conservados réplicas del microorganismo suficientes para todo el análisis *a posteriori* en congelación a -80°C utilizando glicerol al 10% como agente criopreservante.

El medio de cultivo que fue utilizado para los experimentos consistió en un medio mínimo a base de sales (químicamente definido, cómo también se conoce). y que es una variante del medio M9, dónde fueron ajustados algunos parámetros en base a la composición Carbono/ Nitrógeno, así como componentes necesarios para

mantener el pH de este en un valor óptimo (Mageshwaran *et al.*, 2014). Se utilizó como fuente de carbono glucosa y propionato indistintamente en cada experimento como parte del análisis. Se describe la composición de este *Medio M9 modificado* en la *Tabla 5.1*.

Para cada experimento se preparó un inóculo partiendo de los crioviales conservados a -80°C, fueron cultivados en medio sólido conteniendo Agar Nutriente mediante estriado para incubarse a 33°C por un período de 24 horas. Luego se tomaron 2 colonias aisladas como inóculo en cada experimento según sus características que se describen en el apartado siguiente.

**Tabla 5.1: Composición del medio M9 modificado empleado para los inóculos y para los ensayos de producción de AIA.**

<b>Componente</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
<i>Fosfato ácido di sódico</i>	<b>6</b>
<i>Fosfato de potasio dihidrogenado</i>	<b>3</b>
<i>Cloruro de sodio</i>	<b>0.5</b>
<i>Nitrato de amonio</i>	<b>0.5</b>
<i>Sulfato de magnesio heptahidratado</i>	<b>0.024</b>
<i>Cloruro de calcio</i>	<b>0.0001</b>
<b>Fte de Carbono:</b> <i>Glucosa/ Propionato de sodio</i>	<b>5</b>
<b>Inductor:</b> <i>Triptófano</i>	<b>0.5</b>

## **5.2 Estudio cinético del crecimiento de *Bacillus subtilis***

Para evaluar la producción de ácido indolacético (AIA) por este modelo microbiano de *Bacillus subtilis* se desarrolló un diseño de experimentos que consistió en una primera parte donde se evaluó la cinética de crecimiento de este microorganismo: fases de crecimiento con sus tiempos, temperatura óptima de crecimiento, valor de pH, consumo de sustrato, así como otros parámetros cinéticos como rendimientos producto/sustrato ( $Y_{p/s}$ ), velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ),

productividad, velocidad específica de consumo de sustrato ( $q_s$ ) y producción de AIA ( $q_p$ ) para ambas fuentes de carbono glucosa y propionato respectivamente. Esta primera etapa fue mediante cultivos en botellas serológicas de manera que se fueron ajustando los parámetros realizando estas réplicas a nivel microcosmos que también aportaron datos cinéticos de valor que fueron procesados. Posteriormente se procedió a implementar un biorreactor completamente instrumentado (*New Brunswick BioFlo III*) con el objetivo de realizar un monitoreo en tiempo real de la cinética de este microorganismo, así como mantener un ajuste en los parámetros que pueden condicionar mejores escenarios de producción del ácido indolacético. El diseño de ambos procesos se describe a profundidad en los apartados posteriores.

### **5.2.1 Cinética a nivel microcosmos. Ajuste de parámetros.**

Para este experimento se preparan botellas serológicas conteniendo 30 mL (*Figura 5.1*) cuya composición se describe a continuación:

- 21 mL de medio mínimo M9 modificado
- 6 mL de la fuente de carbono (glucosa o propionato); es importante destacar que se deben esterilizar por separado ambos componentes para evitar procesos de precipitación por interacción entre las sales que conforman el medio y la fuente de carbono. La concentración final de la fuente de carbono en el sistema debe corresponder a 5 g/L.
- 3 mL de inóculo que consiste en la biomasa húmeda de un cultivo de 16 horas previamente centrifugada, lavada con solución salina estéril 0.85%, y resuspendida en el medio mínimo a base de sales que ya se ha descrito (*M9 modificado*). De manera que representa el 10% (v/v) del sistema.
- A partir de las 15 horas de cinética se añaden a todos los microcosmos 5mL del aminoácido Triptófano, que funciona como inductor de la síntesis del producto de interés.

Todas las botellas serológicas se incuban a 30 °C en Shaker (*New Brunswick Scientific I26*) manteniendo una agitación de 150rpm durante 48 horas que se mantiene el experimento y la toma de muestras.



**Figura 5.1:** Diseño esquemático del experimento a nivel microcosmos.

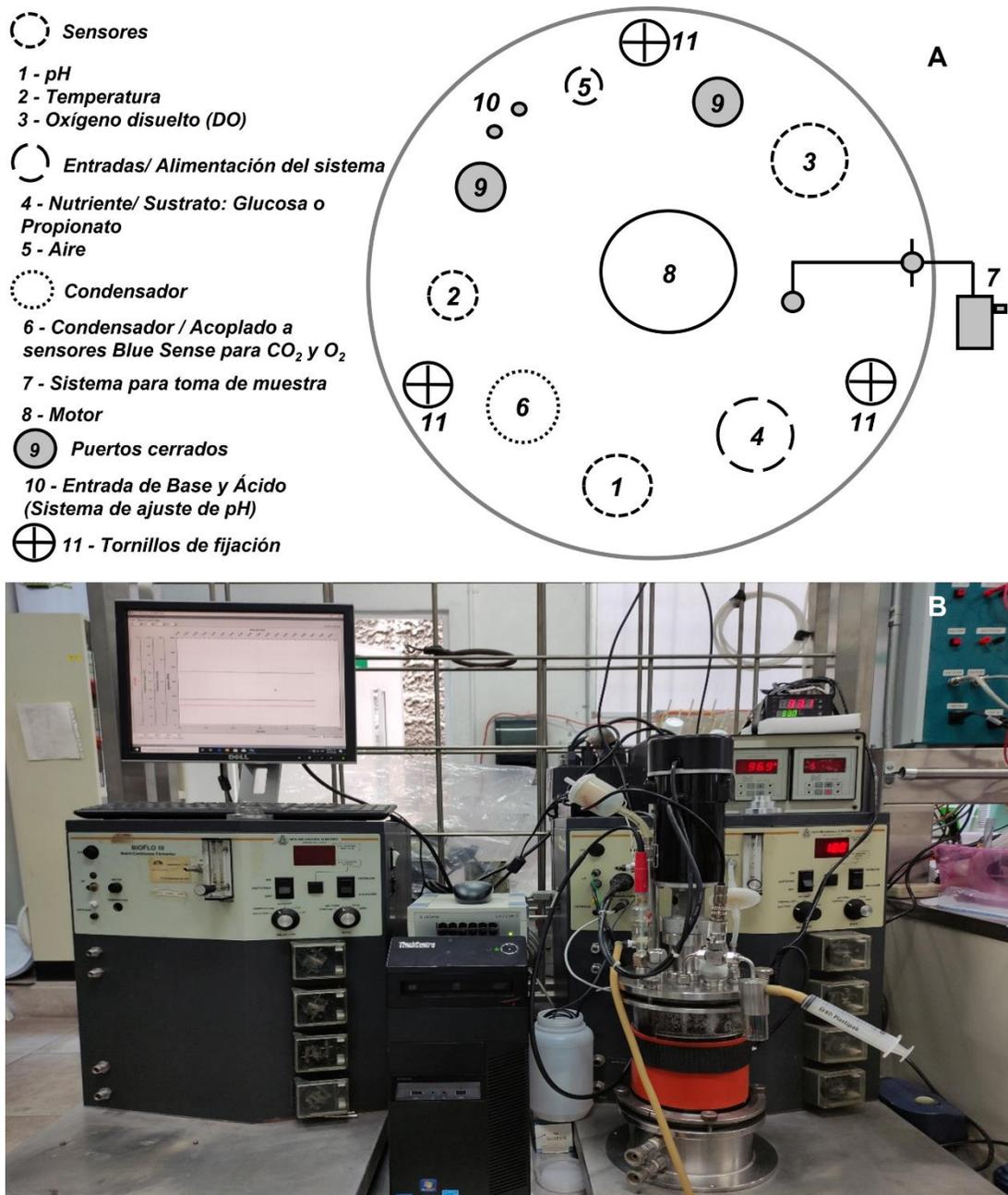
### **5.2.2 Cinética en Biorreactor completamente instrumentado.**

Se equipó un biorreactor (*New Brunswick BioFlo III*) con una capacidad de 3 L (volumen total) para los experimentos y cinéticas de crecimiento, consumo de sustratos y producción. El equipo permitió un monitoreo de varios parámetros que caracterizan el proceso de producción de AIA pues se contó con sensor de pH, sensor de oxígeno disuelto (DO), sensor de temperatura. De igual manera fueron acoplados sensores para el monitoreo de CO<sub>2</sub> y el O<sub>2</sub> (*Blue Sense*) que se produce durante el crecimiento del microorganismo, aspecto fundamental para una correcta caracterización del crecimiento de *Bacillus subtilis* bajo las condiciones impuestas (*Figura 5.2*).

Para la estandarización del proceso a nivel de biorreactor se realizaron pruebas abióticas y fueron calibrados todos los sensores utilizando soluciones buffer de pH, así como condiciones de oxigenación y temperatura controlada. Se acopló la consola del equipo a un software (*Biorec 1.3.0.0/ Bioreactor Controller 2016*) mediante el cual se controla el proceso de una manera más eficiente y se obtiene datos de interés para la caracterización del proceso, gráficas dinámicas y en tiempo

real del comportamiento de las variables controladas por sensores (pH, Temperatura, DO, Agitación). Los sensores *Blue Sense* que registran CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> se acoplaron a la salida del condensador el cual se encontraba a una temperatura de 6 °C mediante un equipo de recirculación de H<sub>2</sub>O, de esta manera se impide la formación de agua de condensación que pudiera alterar las mediciones. El registro de ambos sensores se obtiene en este caso mediante el software que recomienda el proveedor (*Ferm Vis/ Versión 2.0.3.3\_2010*).

El equipo fue esterilizado antes de cada cultivo conteniendo el medio mínimo M9 modificado, tal cual el experimento a nivel microcosmo se considera añadir por separado la fuente de carbono correspondiente en cada caso, así como el inductor *Trp* (ambos componentes se esterilizan por separado). Antes de la inoculación se ajustan y calibran los sensores y se preparan las condiciones de trabajo que en estos experimentos se mantiene una temperatura constante de 30°C mediante mantilla de calentamiento, se ajusta la agitación a 250 rpm (impelentes tipo Rushton), durante todo el proceso hay un suministro de aire pues es un cultivo aerobio (filtro de venteo de 50 mm y 0.2 µm antes de la entrada al biorreactor para garantizar un flujo estéril).



**Figura 5.2:** **A)** Esquema de la placa del Biorreactor. Se muestra el diseño y la instrumentación del equipo para la medición de los parámetros que caracterizan la cinética en estudio. **B)** Imagen del sistema (*New Brunswick\_BioFlo III*) acoplado y automatizado.

El volumen de trabajo fue de 2L y el equipo cuenta con sistema para la toma de muestra que permite mediante vacío y sin detener el proceso extraer 4mL en cada hora de muestreo.

### **5.3 Toma de muestras**

En las cinéticas de crecimiento de *Bacillus subtilis* se tomaron muestras a los siguientes tiempos de cultivo: 0, 4, 6, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 23, 25, 40, 44 y 48 horas. Se tomó un volumen de 2 mL de muestra para determinar crecimiento celular por densidad óptica a 600nm, consumo de sustrato y concentración de AIA. Las muestras se centrifugaron a 12, 000 rpm durante 5 min (*centrífuga minispin Eppendorf 5452, USA*); se utilizó el sobrenadante para la cuantificación de consumo de sustrato y producción de producto y se utilizó el pellet para la cuantificación de biomasa. En todos los puntos de muestreo se realizó por triplicado.

### **5.4 Análisis de muestras**

#### **5.4.1 Determinación de biomasa**

El incremento de biomasa en los cultivos se determinó mediante peso seco. Los pellets se secaron en estufa (*Fisher Scientific*) a 80 °C durante 24 h. Tras ese período de secado, se determinó el peso seco de la biomasa en una balanza analítica (*Mettler Toledo*). Se midió la absorbancia a 600 nm en el Espectrofotómetro (*Thermo Scientific*) de manera que con los valores de peso seco conocidos y su correspondiente en la lectura del espectrofotómetro se elaboró una curva patrón que relaciona ambos parámetros para este cultivo, de manera que se pueden interpolar y obtener los valores de peso seco a partir de la lectura de absorbancia correspondiente a cada muestra en la cinética.

#### **5.4.2 Determinación del consumo de sustrato**

El consumo de los diferentes sustratos fue determinado a partir de los sobrenadantes de las muestras obtenidas, tanto para los experimentos a nivel microcosmos como en biorreactor, estos sobrenadantes se guardaron a -20 °C hasta el momento de su análisis. La cuantificación de las fuentes de carbono se

realizó por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con una columna Aminex HPX-87H (*Bio-Rad Laboratories Inc., USA*), se ajustaron los parámetros para detectar el consumo de ambos sustratos glucosa y propionato con buena resolución. Previo al análisis de muestras mediante HPLC, estas se descongelaron y se filtraron empleando un filtro de nylon de tamaño de partícula de 0.2  $\mu\text{m}$ . Se utilizó un equipo de HPLC (*Varian ProStar*) con detector de Índice de refracción (*Knauer*) y horno 50°C. Como fase móvil se utilizó una solución de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) a una concentración de 5 mM. El flujo de la fase móvil fue de 0.6 mL/min y un tiempo de corrida variable en dependencia de la fuente de carbono a analizar, en el caso específico de la glucosa este corresponde a 10 minutos, mientras que para el propionato se necesitaron 20 minutos en las mismas condiciones. Se prepararon soluciones estándar para ambos sustratos en el rango de concentraciones de 5 a 0.01g/L, estas fueron medidas de igual manera mediante cromatografía HPLC; con estos resultados se elaboró una curva patrón que relaciona la concentración de estos analitos con el área del pico (mRIU.s). La cuantificación de las fuentes de carbono analizadas se realizó interpolando los valores obtenidos del análisis de la muestra en la curva estándar explicada anteriormente. En el *Anexo A* se muestran los cromatogramas obtenidos para los patrones de cada fuente de carbono.

#### **5.4.3 Determinación de la producción de AIA y el consumo de Trp**

La concentración de AIA fue determinada igualmente a partir de los sobrenadantes, estos se guardan a -20°C hasta el momento de su análisis. La cuantificación de AIA se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 530 nm (*Espectro Thermo Scientific, Evolution, USA*) utilizando el método de Salkowski (Glickmann and Dessaux, 1995). Las muestras de sobrenadante se incubaron durante 30 minutos en la oscuridad con el reactivo Salkowski (2,4 g de  $\text{FeCl}_3$  en 100 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) en una relación 1:1. Para la determinación de las concentraciones de AIA los valores de absorbancia obtenidos fueron extrapolados en una curva patrón de AIA sintético (*Sigma & Aldrich*). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. En el *Anexo B* se muestra la curva patrón obtenida

utilizando esta metodología. Este reactivo permite detectar AIA y otros compuestos indólicos (Hernández *et al.*, 2004).

Los resultados de producción de AIA fueron corroborados mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con una columna C18 (*Waters Inc., USA/ ODS 300 x 4.6 mm 0.5um*). Previo al análisis de muestras mediante HPLC, estas se descongelaron y se filtraron empleando un filtro de nylon de tamaño de partícula 0.2  $\mu\text{m}$ . Se utilizó un equipo de HPLC (*Varian ProStar*) con detector de UV (*One Varian ProStar 320 UV/VIS*) a una longitud de onda de 280 nm. Como fase móvil se utilizó una mezcla de agua acidulada (ácido acético al 1%) y acetonitrilo en proporción 70:30. El flujo de la fase móvil fue de 1 mL/min y tiempo de corrida de 15 min. Las concentraciones de AIA y *Trp* se determinaron a través de una curva patrón elaborada con estándares de ambos compuestos en un rango de concentración de 1 a 0.01 g/L. En el *Anexo A* se muestran los cromatogramas obtenidos para corroborar la producción de AIA y el consumo de *Trp*.

## **5.5 Cálculo de parámetros cinéticos**

La tasa específica de crecimiento,  $\mu$  ( $h^{-1}$ ), se calculó mediante una regresión lineal de la concentración de biomasa vs IVC (Área bajo la curva utilizando el método numérico de Simpson) (Gatica and Ares, 2012). La tasa específica de consumo de sustrato,  $q_s$ , se calculó con una regresión lineal de la concentración de sustrato respecto al IVC, la  $q_p$  se calculó con una regresión lineal de la concentración de producto respecto al IVC, las concentraciones de biomasa, sustrato y producto utilizadas se encontraban en (mmol/L) como unidades de medida y el valor de IVC se encontraba en ( $g\text{-DW } h/L$ ) como unidades de medida. Los rendimientos  $Y_{x/s}$ ,  $Y_{x/p}$  y  $Y_{p/s}$  fueron determinados a partir de los parámetros cinéticos  $\mu$ ,  $q_s$ ,  $q_p$ . El *Anexo C* incluye las linealizaciones realizadas a algunas de las gráficas obtenidas para obtener parámetros cinéticos.

## **5.6 Análisis del metabolismo usando modelo a escala genómica *iBSU1147+1*.**

Para evaluar el metabolismo fueron utilizados los parámetros cinéticos obtenidos mediante el cultivo en MMS suplementado con glucosa y propionato de sodio (*Trp* como inductor). Las simulaciones se hicieron con COBRA Toolbox 3.0 en el software MATLAB (Heirendt *et al.*, 2019). Utilizando el modelo *iBSU1147+1*, (Hao *et al.*, 2013) se llevaron a cabo diferentes análisis basados en restricciones que permitieron calcular la distribución de flujos en toda la red metabólica, aspecto necesario para los análisis y las simulaciones de escenarios de producción óptimos en la síntesis biológica del AIA.

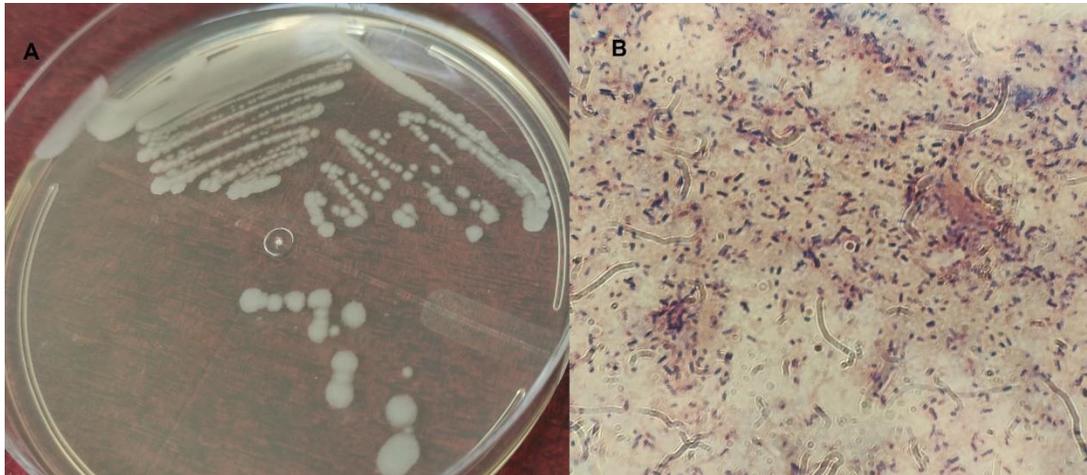
## CAPÍTULO VI

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **6.1 Cultivo y caracterización de la cepa**

En estudios de este tipo es necesario una correcta caracterización de la cepa empleada para garantizar la reproducibilidad de los resultados y que puedan ser consistentes con otros estudios de la misma especie. El análisis fenotípico de la cepa mostró la presencia de caracteres típicos de crecimiento de *Bacillus subtilis*. El análisis macroscópico de las colonias fue consistente con lo esperado para esta cepa y permitió mostrar que el microorganismo se encontraba viable y puro, en ese sentido se aprecian colonias blanquecinas, de apariencia cremosa y bordes lisos (ver Figura 6.1). La tinción de Gram, prueba primaria para la caracterización de bacterias coincide con la caracterización cultural esperada pues se aprecian bacillos de coloración violeta, típico de las bacterias gram positivas como el género *Bacillus* (Garrity *et al.*, 2005).

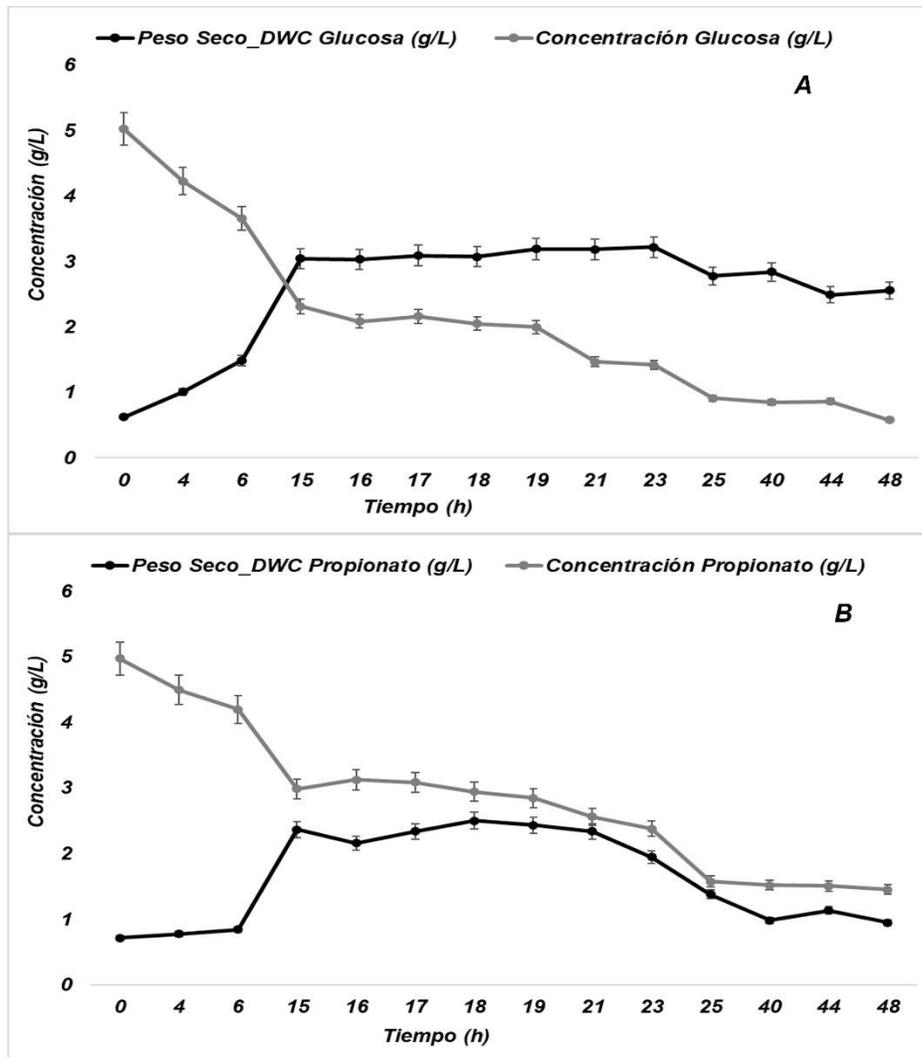
En la microscopía no se observaron endosporas, una característica de este género es la formación de estas estructuras de resistencia ante condiciones de estrés (Setlow *et al.*, 2017). Esto puede explicarse por las condiciones de cultivo óptimas en que se encontraba el microorganismo (Zhang *et al.*, 2020). Como se trataba de obtener un crecimiento óptimo de la cepa se utilizó un medio complejo como agar nutriente que contiene macromoléculas de fácil asimilación por el microorganismo como la peptona. Además, la temperatura de crecimiento fue de 33°C que se encuentra en el rango de las temperaturas óptimas para el desarrollo de esta especie (Cook, 1996).



**Figura 6.1:** Crecimiento de la cepa *Bacillus subtilis* W168 empleada en el estudio **A)** Características macroscópicas del crecimiento de esta cepa en Agar Nutriente. *Siembra por estrías para obtener colonias aisladas.* **B)** Fotomicrografía de *B. subtilis* W168 con un aumento de 1000X. Detalle de la imagen los bacillos gram positivos típicos de la especie obtenidos mediante la metodología de tinción de Gram.

## **6.2 Cinética a nivel microcosmos.**

Se desarrolló primeramente en este estudio unas cinéticas de crecimiento a nivel microcosmos. Este experimento permite conocer el comportamiento de esta cepa de *B. subtilis* en las condiciones de trabajo lo que resulta necesario para el proceso de escalado a biorreactor y los ajustes que se necesitaban optimizar en cuanto a temperatura, pH, composición del medio y agitación antes de evaluar escenarios de producción. Este precisamente constituye el propósito de estos experimentos a pequeña escala, por lo que se evaluaron las condiciones para ambos sustratos por separado: glucosa y propionato. Se mostró luego de analizar varias condiciones de cultivo que el mejor crecimiento se obtiene a una temperatura de 33°C y pH = 6.9. Las gráficas que representan la cinética de crecimiento y el consumo de estos sustratos en estas condiciones se encuentran representadas en la *Figura 6.2*.



**Figura 6.2:** Cinética de crecimiento y consumo de sustratos de los cultivos a nivel microcosmos. **A)** Cultivo con glucosa como fuente de carbono. **B)** Cultivo con propionato como fuente de carbono.

Para ambos experimentos se puede apreciar que existe una entrada a fase estacionaria entre las 15 y 16 horas. Los tiempos se corresponden con otros trabajos dónde se evalúa el género *Bacillus*, como el estudio de Lopez *et al.*, y fueron evaluados varios medios de cultivo de bajo costo para la producción de AIA empleando una cepa de *Bacillus circulans* mostrando cinéticas de crecimiento similares a la presentada en este estudio alcanzando la fase estacionaria de crecimiento sobre las 15 horas (Sarmiento-López *et al.*, 2022). Este segmento de la

curva de crecimiento (fase de aceleración negativa) es de gran importancia y precisamente se desarrollaron en un inicio estos experimentos con el objetivo de determinar el momento en que entra a la fase estacionaria esta cepa de *B. subtilis* en las condiciones de cultivo. Durante la fase de aceleración negativa comienza la producción del AIA la que se extiende por la fase estacionaria de crecimiento, esto se entiende por ser un metabolito secundario (*producto tipo III según Gaden*) cuya síntesis típicamente no se encuentra asociada al crecimiento microbiano (Bennett and Bentley, 1989).

Por otro lado, este intervalo de tiempo nos permite conocer el momento adecuado para añadir el metabolito inductor triptófano en los experimentos de producción y potenciar la síntesis de la auxina. Otra estrategia factible y probada en otros estudios sería incorporar la molécula inductora directamente al medio de cultivo (Alfonso et al., 2021), aunque mediante este diseño también se produce AIA, estudios de este tipo muestran que en las primeras 15 h de cultivo, durante la fase exponencial de crecimiento existe un consumo de triptófano no asociado a la producción. La explicación tiene una base molecular y está relacionada con los sistemas de regulación en procariontes para la expresión genética. El triptófano como aminoácido que se encuentra disponible en el medio inactiva como correpressor el operón triptófano que codifica para las enzimas que sintetizan el propio aminoácido (Merino *et al.*, 2008). Esta estrategia tiene sentido pues la célula por economía celular no consume energía metabólica en este proceso anabólico si encuentra el metabolito disponible. Entonces el *Trp* se consume para formar parte de proteínas estructurales necesarias en esta etapa de crecimiento y multiplicación celular, fenómeno que disminuye las concentraciones del compuesto disponibles para inducir la síntesis de la fitohormona. En nuestro caso conocer la cinética de crecimiento nos permite definir la adición de *Trp* como inductor a las 15 h de cultivo en las cinéticas de producción (Poveda and González-Andrés, 2021).

La fase de adaptación (*lag*) es más marcada y se extiende en el tiempo para propionato, hasta las 6 h de cultivo, mientras que en la cinética de glucosa comienza inmediatamente su fase exponencial, prácticamente sin un período de adaptación.

Este fenómeno era esperado pues la glucosa es una fuente de carbono de fácil asimilación, las vías de incorporación de este sustrato se integran directamente al metabolismo central del carbono y son enzimas constitutivas con altos valores de actividad en la célula. Además, se conoce la presencia en bacterias como *Bacillus* del sistema fosfotransferasa (PTS), un mecanismo bien conservado para la incorporación de carbohidratos y en particular glucosa al interior celular. El sistema PTS está involucrado en el transporte y fosforilación de carbohidratos, en el movimiento hacia estas fuentes de carbono (quimiotaxis) y en la regulación de diferentes vías metabólicas de diversos carbohidratos que pueden, o no, ser transportados por el mismo. La fosforilación del hidrato de carbono está acoplada a su traslocación a través de la membrana y donde la energía para este proceso es provista por el fosfoenolpiruvato. La ventaja de que el azúcar sea fosforilado durante su transporte es que puede entrar directamente a las vías catabólicas y anabólicas sin consumo extra de ATP. En otros sistemas de transporte se consume ATP no solo para transportar el carbohidrato, sino que también se gasta cuando se fosforila para que sea metabolizado (Postma *et al.*, 1993). Otro aspecto que explica la diferencia entre ambos sustratos en cuanto a la extensión de la fase *lag* está determinado por el inóculo que proviene de caldo nutriente. Este medio de cultivo contiene componentes complejos como la pluripeptona (peptona y caseína) y extracto de carne, donde la glucosa como monosacárido es estructura en estos compuestos. El inóculo determina la extensión de esta fase de adaptación por lo que su concentración es un aspecto para estandarizar en los estudios de cinética microbiana, en nuestro trabajo se parte de un peso húmedo de 1.24 g específicamente  $10^8$  UFC/mL que se mantiene para todos los experimentos.

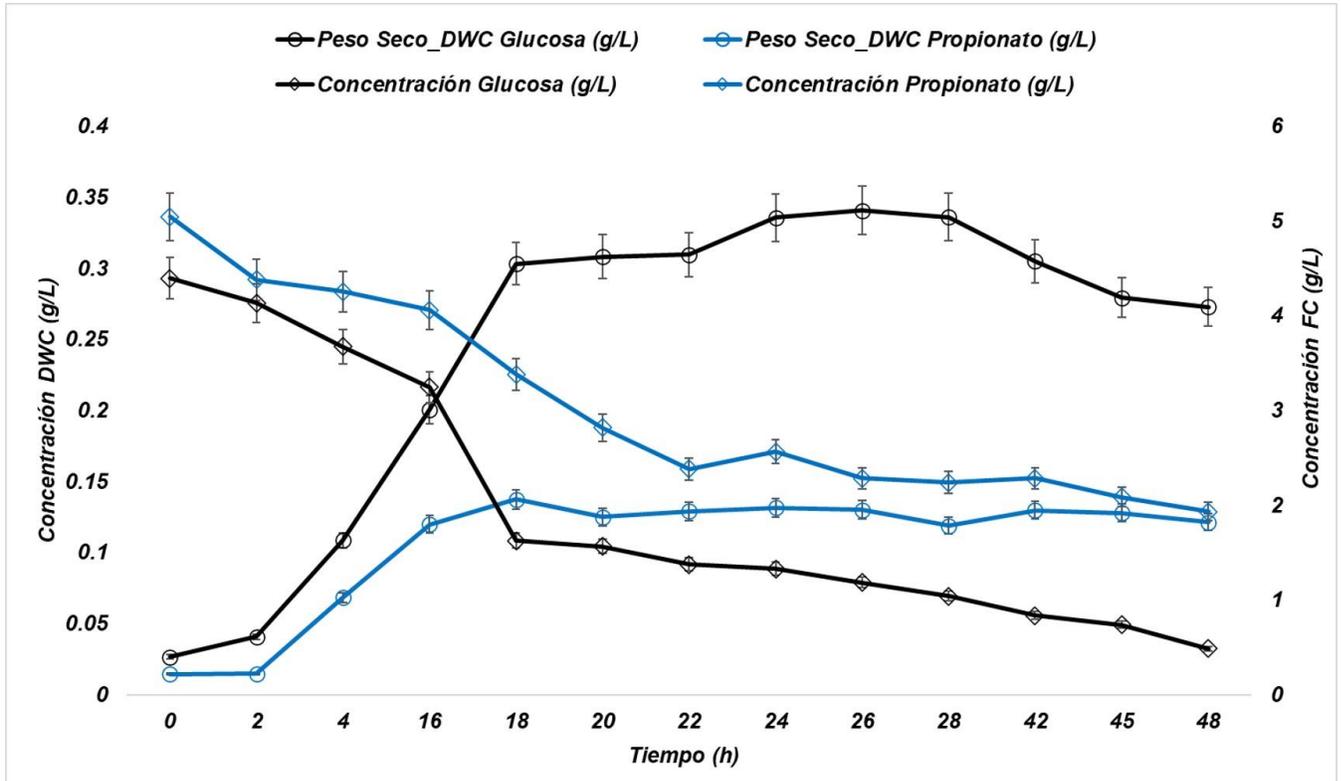
En la fase exponencial, el más alto valor de  $\mu$  se obtuvo utilizando GLU como fuente de carbono con un valor de  $0.13 \text{ h}^{-1}$  comparado con la  $\mu = 0.11 \text{ h}^{-1}$  que se obtiene para propionato. El mayor valor de biomasa se obtiene para la glucosa a las 23 h de cultivo donde el peso seco fue de 3.22 g/L, mientras que para propionato su pico máximo de crecimiento corresponde con las 18 h de cultivo donde alcanza un valor de 2.5 g/L de biomasa seca.

### **6.3 Cinética en biorreactores. Producción de AIA**

Mediante la caracterización de la cinética de crecimiento de la cepa se pudieron estandarizar las condiciones para desarrollar el escalado a un biorreactor de 2L completamente instrumentado y automatizado para el control de los parámetros de crecimiento. Existen numerosos trabajos que vinculan la producción de algún metabolito de interés en procesos de fermentación de *Bacillus subtilis*, el rápido crecimiento de este microorganismo en medios convencionales y económicos, así como la facilidad de cultivo y estabilidad en un amplio rango de valores de pH y oxigenación hacen que sea un microorganismo ideal para la producción de compuestos a gran escala. En ese sentido, desde sus inicios se ha asociado este microorganismo en procesos de fermentación para la producción de proteínas heterólogas (Wong, 1995); (Schallmey *et al.*, 2004). Estudios como el desarrollado por Chen *et al.*, evaluaron la secreción de  $\alpha$ -amilasa en un proceso de escalado para un biorreactor del tipo BioFlo 310 de una cepa recombinante de *B. subtilis*. La actividad enzimática luego de optimizar las condiciones de cultivo fue de 1.089 U/mL, obteniéndose a su vez una productividad de 16.6 U/mL h, desarrollando un sistema *fed-batch* que garantiza mediante la adición de medio fresco mantener las células en un estado metabólicamente activo (Chen *et al.*, 2015).

En nuestro estudio se desarrollan los experimentos en biorreactor para evaluar la producción de AIA con la cepa *B. subtilis* W168. En la *Figura 6.3* se muestra la cinética de crecimiento y el consumo de sustrato para nuestro trabajo. Resulta evidente como en el crecimiento en glucosa se obtienen mayores valores de biomasa alcanzando valores de 0.34 gDWC/L comparado con los 0.13 gDWC/L en la cinética con propionato. Esto se hace evidente si analizamos el consumo de ambas fuentes de carbono en la propia gráfica, pues se aprecia como la pendiente del consumo de glucosa es más abrupta y comienza desde el inicio de la cinética

acompañando la fase exponencial que describe el microorganismo y llegando a ser consumida prácticamente en su totalidad hacia las 48 h.



**Figura 6.3:** Cinética de crecimiento y consumo de sustratos de los cultivos en Biorreactor. Condiciones de cultivo en medio M9 modificado con inducción mediante *Trp* a las 16h. Intervalos de muestreo señalados en la gráfica, T = 33°C.

\* ○ *Cinética de crecimiento (DWC/L)* \* ◇ *Consumo de sustratos (g/L)*

Contrariamente el propionato es consumido hasta las 22h de cultivo a una menor velocidad, restando por consumir 1.92 g/L de este sustrato hacia el final del intervalo de crecimiento analizado. El comportamiento de las cinéticas se corresponde con otros estudios como el desarrollado por Alfonso *et al.*, dónde se evaluó el crecimiento de *B. subtilis* en diferentes fuentes de carbono, mostrando entonces que la glucosa como sustrato garantiza valores elevados de biomasa celular en un corto período de tiempo a diferencia de ácidos orgánicos como el propionato (Alfonso *et al.*, 2021).

Los resultados luego de estandarizar los parámetros mediante pruebas abióticas y cultivos se muestran en la Tabla 6.1, fueron caracterizados en las 48 horas de fermentación para cada sustrato los parámetros cinéticos que caracterizan el proceso. Es necesario realizar los cálculos en el estado estacionario pues la auxina se considera un metabolito secundario y por tanto se produce en esa etapa del proceso (Garrity et al., 2005).

El valor más alto de la tasa de crecimiento tanto en la fase exponencial como en la estacionaria se obtiene cuando se utiliza glucosa como fuente de carbono, lo cual corresponde con los experimentos anteriores a nivel microcosmos, teniendo en cuenta además su rápida asimilación en esta especie y su incorporación al metabolismo energético. Precisamente se ha demostrado mediante experimentos de marcaje isotópico de glucosa [ $U-^{13}C_6$ ] y análisis de flujo metabólico (MFA) como este sustrato direcciona el metabolismo según su disponibilidad en el medio. En cultivos limitados en glucosa prácticamente solo hay flujo en el metabolismo de mantenimiento y formación de biomasa, mientras que el exceso de glucosa permite actividad en otras vías energéticamente menos eficientes y se desacoplan los procesos centrales del catabolismo y anabolismo (Dauner *et al.*, 2001).

El análisis de los rendimientos por separado para ambos sustratos mostró que no existían diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Kruskal Wallis (*Anexo D*). Esta prueba utiliza el estadístico  $\chi^2$  y con una significancia de 0.05 permite comparar valores que no se ajustan a la normalidad, entonces mediante el análisis de las medianas por rangos en nuestro experimento se tienen dos grupos correspondientes a los valores que se obtienen cuando el sustrato es glucosa y propionato respectivamente (McKight and Najab, 2010).

El ajuste de los datos para cada condición se explica por la eficiencia del metabolismo de esta cepa independientemente del sustrato, en la formación de biomasa y la producción de AIA cuando se encuentra en las condiciones óptimas, así como la presencia de la molécula inductora en concentraciones que estimulan las vías metabólicas de síntesis de la auxina. Sin embargo, si analizamos solamente el rendimiento de producción de AIA con respecto al consumo del aminoácido

inductor *Trp* se puede observar que este es mayor para los cultivos con propionato;  $Y_{p/Trp}$  (gAIA/gTrp) corresponde a 0.915 para este sustrato en correspondencia con el valor de 0.761 que se obtiene para glucosa. Esto nos muestra la eficiencia de esta cepa en la producción de AIA cuando se utiliza propionato como sustrato en el medio de crecimiento, lo cual se ha demostrado en un estudio anterior de Alfonso *et al.*, con un valor de rendimiento de 0.98 para este compuesto (Alfonso *et al.*, 2021).

**Tabla 6.1:** Velocidad específica de crecimiento exponencial ( $\mu$ ), velocidades específicas de consumo de sustratos ( $q_{sFC}$  y  $q_{sTrp}$ ), velocidad específica de producción ( $q_p$ ), rendimiento biomasa-sustrato  $Y_{x/s}$  y rendimiento producto-sustrato  $Y_{p/s}$  de *B. subtilis* en biorreactor con medio M9 modificado, glucosa o propionato como fuente de carbono (FC), así como inducción con *Trp* a las 16 horas.

<b>Parámetro Cinético</b>	<b>Sustrato (FC)</b>	
	<b>Glucosa</b>	<b>Propionato</b>
$\mu_{exponencial}$	$0.15 \pm 0.06$	$0.14 \pm 0.02$
$\mu_{estacionaria}$	$0.07 \pm 0.12$	$0.06 \pm 0.04$
$q_{sFC\_exp}$	$2.15 \pm 0.08$	$4.18 \pm 0.04$
$q_{sFC\_est}$	$1.2 \pm 0.03$	$2.85 \pm 0.01$
$q_{sTrp}$	$1.5 \pm 0.05$	$1.8 \pm 0.02$
$q_{pAIA}$	$1.33 \pm 0.02$	$1.92 \pm 0.07$
$Y_{x/sustrato}$ (g/g)	$0.324 \pm 0.05$	$0.219 \pm 0.08$
$Y_{x/(sustrato + Trp)}$ (g/g)	$0.134 \pm 0.11$	$0.094 \pm 0.06$
$Y_{p/(sustrato + Trp)}$ (g/g)	$0.446 \pm 0.03$	$0.524 \pm 0.04$
$Y_{p/Trp}$ (g/g)	$0.761 \pm 0.04$	$0.915 \pm 0.03$

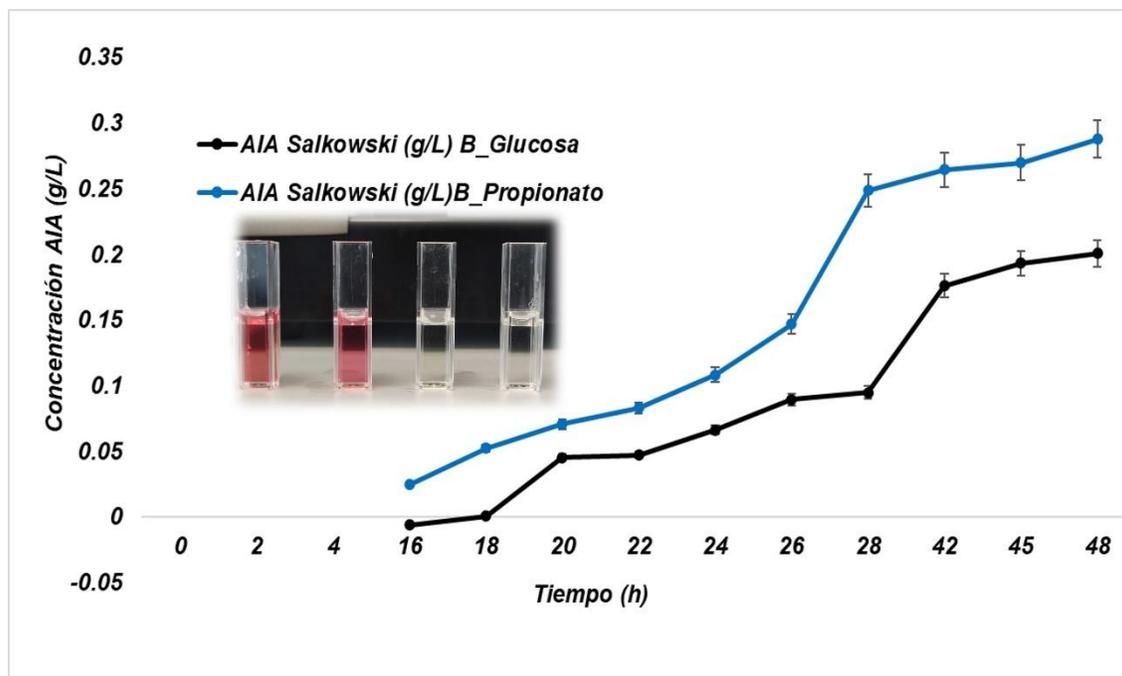
Si analizamos los  $Y_{x/s}$  y  $Y_{p/s}$  podemos evaluar el aprovechamiento del carbono presente en el medio, distribuido en la formación de biomasa y producto de interés, teniendo en cuenta que en nuestro proceso son calculados los parámetros cinéticos en fase estacionaria debido a nuestros objetivos de producción. Entre ambos sustratos la glucosa presenta un mejor aprovechamiento del carbono con un valor de 77% en comparación con el 74% que se obtiene cuando el sustrato es propionato. Resulta interesante lo similares que son ambos parámetros que

describen el rendimiento global del carbono hacia los objetivos celulares y se entiende los resultados debido a la distribución para ambos sustratos de cada componente, ya que en el propionato más del 50% del carbono disponible se emplea para producir AIA, comparado con la glucosa que solo utiliza un 45% a pesar de que garantiza mayor formación de biomasa que el ácido orgánico. Estos resultados guardan relación con otros estudios donde se utiliza este microorganismo, Panda *et al.*, identifican un aprovechamiento del carbono de un 85% empleando glucosa como sustrato para la producción de PHB (Panda *et al.*, 2018). Mientras que Sauer *et al.*, reportan un valor de 80% de utilización de carbono durante la producción de riboflavina en cultivo continuo, así como Dos Santos *et al.*, con un 72% para la producción de nistosa con esta especie microbiana (Sauer *et al.*, 1996); (Dos Santos *et al.*, 2016). En ese sentido en nuestro trabajo, el balance de carbono pudiera completarse si se cuantifican otros metabolitos que se estima pudieran ser inducidos en las condiciones de cultivo que desarrollamos. Se conoce que esta bacteria puede producir otra fitohormona de carácter indólico, el ácido indolbutírico (AIB) cuyas vías de síntesis están relacionadas con las del AIA (de Oliveira Nunes *et al.*, 2018); (Garg *et al.*, 2015).

### **6.3.1 Análisis de la producción de AIA en biorreactor.**

Para determinar la producción de AIA se desarrollaron dos metodologías que permiten un monitoreo cuantitativo de este compuesto en el intervalo de la cinética de crecimiento. El ensayo de Salkowski es un método colorimétrico ampliamente utilizado en estudios para determinar la presencia de compuestos derivados del indol. Los resultados de estos ensayos deben ser interpretados teniendo en cuenta que la reacción positiva se debe a la presencia de indoles de manera general y no solo al AIA, por lo cual se recomienda realizar otro tipo de técnicas más sensibles como HPLC, espectrometría de masas ESI-MS/MS para confirmar la presencia del compuesto (Patel and Patel, 2014). El objetivo de este ensayo en nuestro trabajo era monitorear durante el cultivo la presencia de estos compuestos indólicos en el sobrenadante de las muestras de biorreactor y poder conocer la concentración

durante toda la cinética mediante una curva patrón desarrollada con concentraciones conocidas de AIA. Los resultados se muestran en la *Figura 6.4*.



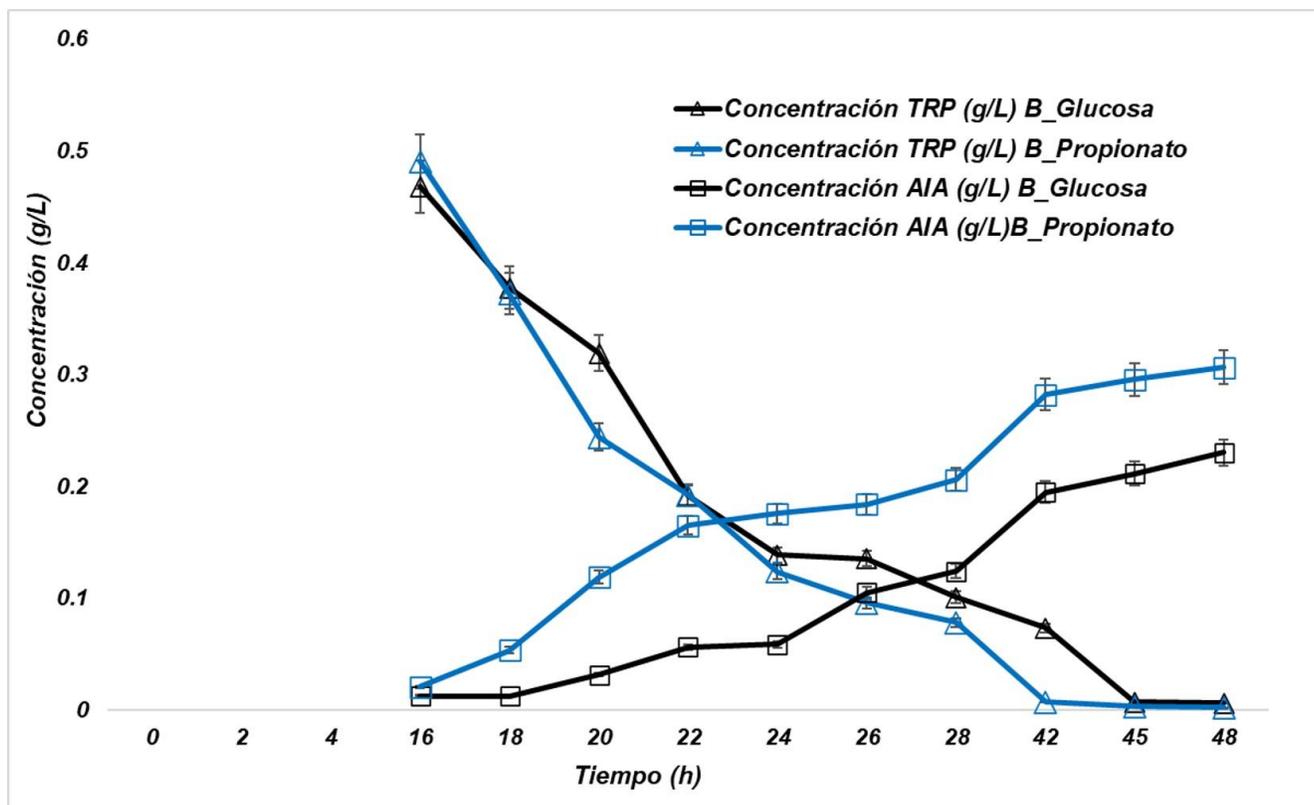
**Figura 6.4:** Gráfica de la cinética de producción de AIA mediante el método de Salkowski la interpolación de los valores de absorbancia para cada muestra con la curva patrón desarrollada para esta técnica (*Anexo B*). Detalle en la gráfica muestra apariencia del resultado positivo al ensayo colorimétrico de Salkowski, la intensidad de la coloración rosácea es directamente proporcional a la concentración de indoles en la muestra.

Teniendo en cuenta la baja especificidad de la técnica de Salkowski que, si bien permite una detección cuantitativa del total de indoles, no es funcional en estudios para una caracterización individual de un compuesto perteneciente a este grupo se corrobora la presencia del AIA mediante otra metodología. Los ensayos cromatográficos resultan el “*gold standard*” en la química analítica para la detección y cuantificación de compuestos. Evidentemente, la cromatografía es una de las técnicas analíticas más poderosas de la química moderna, fundamentado por la capacidad de la técnica de detectar y cuantificar muchos componentes individuales presentes en una muestra mediante un único procedimiento analítico (Kumar and

Kumar, 2012). De esta manera la biología experimental y la bioquímica se ha apropiado de las herramientas cromatográficas y son empleadas en casi cualquier estudio de caracterización de compuestos. Para la detección de AIA se utilizaba en un inicio la cromatografía de capa fina TLC, esta técnica permite un análisis cualitativo del compuesto lo que limita la caracterización. En nuestro trabajo desarrollamos un análisis RP-HPLC para detectar y cuantificar la auxina, resultados que son mostrados en la *Figura 6.5*. Se presenta la cinética que describe la producción de AIA, acoplada al consumo de la molécula inductora *Trp* en los experimentos a nivel biorreactor con glucosa y propionato como sustratos. Cómo se ha explicado la inducción de este proceso de producción inicia a las 15 horas de cultivo luego que el microorganismo se encuentra en fase de aceleración negativa cómo se aprecia en las cinéticas de crecimiento (*ver Figura 6.3*).

En las gráficas de producción del compuesto *Figura 6.5*, se puede apreciar la asociación directa que existe entre la molécula inductora y la auxina, cómo el consumo de *Trp* potencia la producción de la auxina para ambos sustratos. Sin embargo, la velocidad de producción y concentración de AIA difiere en los experimentos con glucosa y propionato. Si analizamos los valores de  $q_s$  y  $q_p$  para ambos sustratos (*ver Tabla 6.1*) nos podemos percatar que el consumo de *Trp* en presencia de glucosa representa el 83% comparado con los cultivos en propionato, mientras que la producción de AIA es de igual manera considerablemente menor en los experimentos con glucosa representando el 69% en relación con propionato. Esto es bien interesante pues nos permite demostrar que la biomasa o cantidad de células no determina obtener mayor producción de AIA pues se discutió anteriormente como la cinética de crecimiento y densidad celular se favorecía con glucosa en el medio de cultivo. De igual manera la concentración final que se alcanza para propionato a las 48 h es de 0.31 g/L comparado con los 0.23 g/L obtenidos con glucosa como fuente de carbono. Nuestros resultados coinciden con otros estudios de este tipo como el desarrollado por Araujo *et al.*, dónde utilizan una cepa de *B. subtilis* aislado de la rizosfera de una planta de soja en Brazil obteniendo de 0.17 a 0.31 g/L de AIA, aunque en su trabajo no pudieron determinar la

concentración de *Trp* al usar medios complejos papa-dextrosa e hidrolizados de proteína suplementados con glucosa (Araujo *et al.*, 2005).



**Figura 6.5:** Cinética del consumo del *Trp* y la producción de AIA por los cultivos en Biorreactores empleando glucosa y propionato como sustrato.

\*  $\Delta$  Consumo de *Trp* (g/L) \*  $\square$  Producción de AIA (g/L).

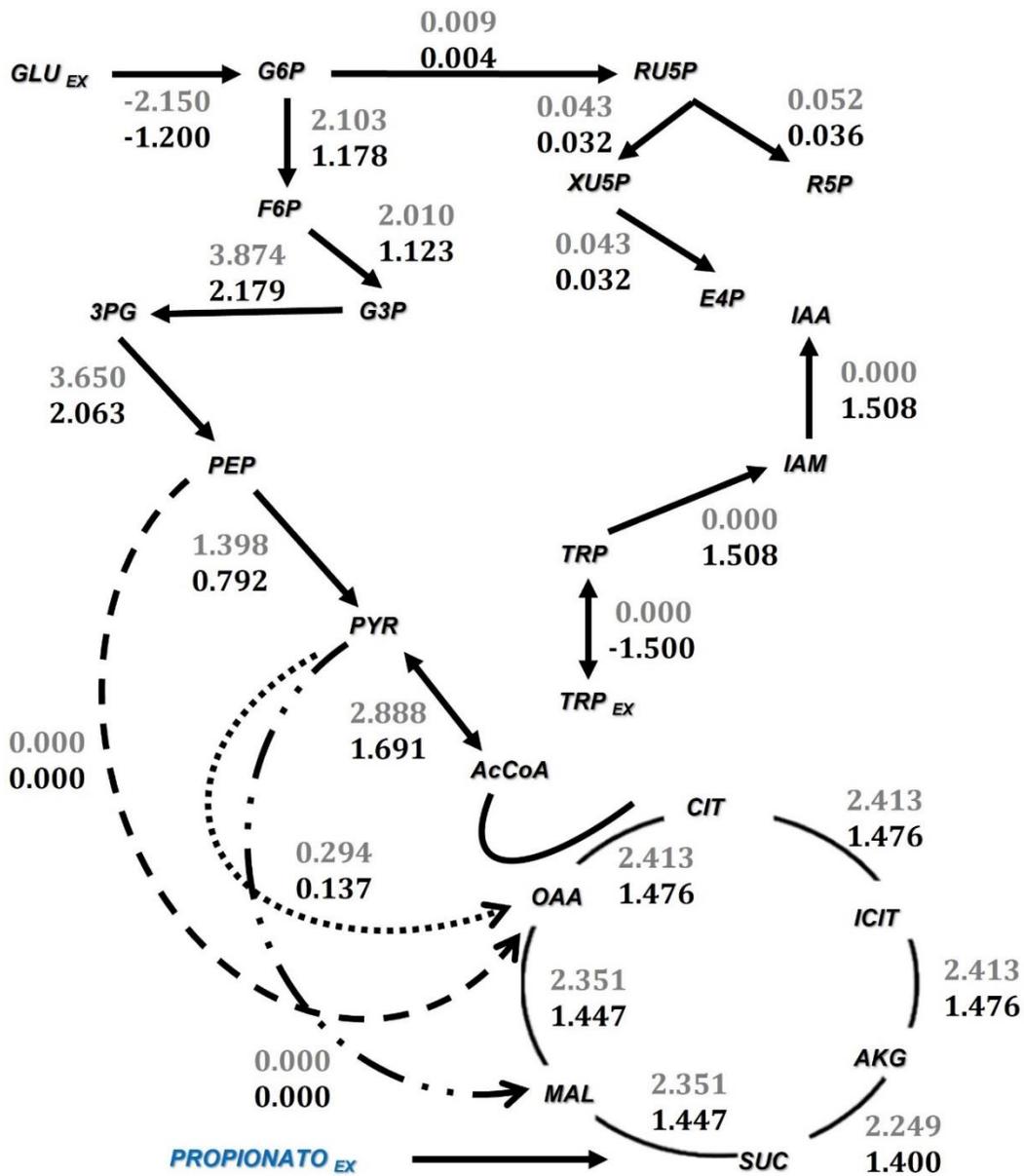
La presencia de L-triptófano en el medio es una condición necesaria para la biosíntesis de AIA. Cuando se estudia la producción de la auxina en condiciones de laboratorio por microorganismos de la rizosfera como *B. subtilis* es fundamental la adición del aminoácido *Trp* al medio de cultivo (Kravchenko *et al.*, 2004). Este metabolito es el principal precursor de AIA para la biosíntesis microbiana y su presencia en la rizosfera vegetal está determinado por la propia planta mediante sus exudados radiculares (Spaepen *et al.*, 2007). En nuestro caso utilizamos una concentración de *Trp* de 0.5 g/L para la inducción de la producción de la auxina en

la fase de aceleración negativa de nuestros cultivos. Esto coincide con otros estudios como Zaidi *et al.*, que utilizaron esta misma concentración de aminoácido 0,5 g/L como suplemento de igual manera de un medio mínimo de sales M9 para el cultivo de la cepa de *B. subtilis* SJ-101, sin embargo se obtuvo 0.055 g/L de AIA, una menor concentración tomando como referencia nuestro trabajo (Zaidi *et al.*, 2006).

#### **6.4 Análisis de Balance de Flujos.**

Se calcularon las distribuciones de flujo para toda la red metabólica de *B.subtilis* basado en las restricciones experimentales impuestas para el consumo de glucosa o propionato como sustratos, el consumo de *Trp*, así como la función objetivo para este análisis en algunos casos biomasa o la producción del AIA. Todas las simulaciones fueron realizadas utilizando el modelo a escala económica iBSU1147 (Hao *et al.*, 2013); específicamente su variante modificada iBSU1147+1 dónde se añade un paso intermedio en la vía de síntesis IAM que conecta el aminoácido triptófano como precursor del AIA en la red metabólica descrita (Alfonso *et al.*, 2021).

En la Figura 6.6 se muestran las distribuciones de flujo en el metabolismo central del carbono para las simulaciones en fase exponencial (señalados en gris los valores de los *fluxes*) y fase estacionaria (valores en negro) utilizando glucosa como sustrato. El objetivo de esta primera simulación es aproximarnos al metabolismo de esta cepa en las condiciones idóneas por lo que se maximiza la biomasa como función objetivo para la fase exponencial de crecimiento y la producción de AIA para el intervalo estacionario de la cinética.



**Figura 6.6:** Mapa comparativo para la distribución de flujos ilustrada en el metabolismo central empleando Glucosa como sustratos para la **Fase exponencial** y **Fase estacionaria** del cultivo. Se utilizan los valores de  $q_s$  obtenidos experimentalmente para este sustrato en ambos intervalos de crecimiento (ver *Tabla 6.1*). Todos los valores de flujo se encuentran en mmol gDW<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>.

Durante todo el metabolismo central se hace evidente que el flujo de carbono es considerablemente mayor en la fase exponencial de crecimiento comparado con el período estacionario. Existen nodos claves en esta representación del metabolismo central que determinan la producción de los elementos que son necesarios en la fase de crecimiento activo del microorganismo como la reacción de entrada al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (*del inglés, TCA*). La formación de **CIT** a partir de los intermediarios metabólicos **AcCoA** y **OAA** es superior en poco más del 40% cuando se simula el crecimiento exponencial comparado con el estacionario. Esto se explica por la funcionalidad de la vía para contribuir al estado metabólico que pretende el microorganismo en ese intervalo de crecimiento. Por ejemplo, en este caso en el crecimiento exponencial en glucosa, se requiere poder reductor, y energía metabólica en forma de ATP pues el microorganismo se encuentra sintetizando componentes estructurales para las células en formación, así como están activas vías anabólicas que requieren de estos cofactores NADH, FADH<sub>2</sub> producidos en el TCA y vía de las Pentosas Fosfato (PP).

La internalización de glucosa al metabolismo central es un punto crítico en el análisis de redes metabólicas cuando se utiliza este sustrato como fuente de carbono (Huang *et al.*, 2020). Este metabolito se puede incorporar mediante diferentes transportadores, algunos son transporte activo por lo que consumen ATP para concentrar la glucosa en el interior celular, mientras por otro lado existen transportadores pasivos (conocidos como GLUT), y otros mecanismos de transporte activo secundario que dependen de un gradiente de iones, generalmente H<sup>+</sup> para la entrada de este sustrato (Jahreis *et al.*, 2008). En *Bacillus subtilis*, aunque hay evidencia que existe una permeasa dependiente de H<sup>+</sup> que puede contribuir al transporte de este metabolito, la entrada de glucosa ocurre casi exclusivamente por vía PTS (sistema fosfotransferasa). Un estudio de deleciones demostró que en esta especie el sistema está conformado por un operón *ptsGHI*, en el cual el elemento *ptsG* codifica para una permeasa que está regulada por los otros componentes del operón *ptsH* y *ptsI*, además de que se demuestra que el sistema cuenta con una autorregulación negativa, inducida por un terminador (*glcT*) como elemento de control ante la ausencia de glucosa en el medio extracelular (Stülke *et al.*, 1997).

De esta manera se entiende la disminución de los valores de flujo en ambas condiciones a partir del **PEP** pues este metabolito es un componente esencial en el sistema PTS antes descrito, aportando el grupo fosfato necesario para la fosforilación de la Glucosa a **G6P**. Esto puede explicar la ausencia de flujo en la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, que en el sentido anaplerótico cataliza la conversión de **PEP** en **OAA** como intermediario del **TCA**. El flujo a partir de este metabolito se prioriza en este nodo hacia la formación de **PYR** teniendo en cuenta que este paso catalizado por la enzima piruvato quinasa permite la obtención de energía metabólica en forma de ATP necesaria en estas condiciones de crecimiento activo, lo cual explica un mayor flujo en la simulación del crecimiento exponencial. Además, este compuesto es identificado como un nodo fundamental en el metabolismo central del carbono para reacciones de síntesis de componentes estructurales como aminoácidos y en respiración aerobia la formación de **Ac-CoA** como metabolito de entrada al **TCA**. De esta forma si hay flujo en la enzima piruvato carboxilasa que permite la formación de **OAA** a partir de **PYR** representando la mitad del flujo de carbono en el estado estacionario comparado con el período de crecimiento exponencial.

Por otro lado, solo hay flujo a partir del *Trp* en las simulaciones en fase estacionaria por la propia dinámica experimental. Este compuesto solo se añade a partir de las 16 horas cuándo se conoce por el estudio de la cinética de esta especie que culmina el crecimiento exponencial, de manera que se favorece con este inductor que se desvíe hacia el metabolismo secundario, específicamente a la producción de la auxina **AIA**, lo cual se demuestra en el mapa metabólico mostrado en la *Figura 6.6* el consumo de este aminoácido mediante la vía IAM anotada en el modelo.

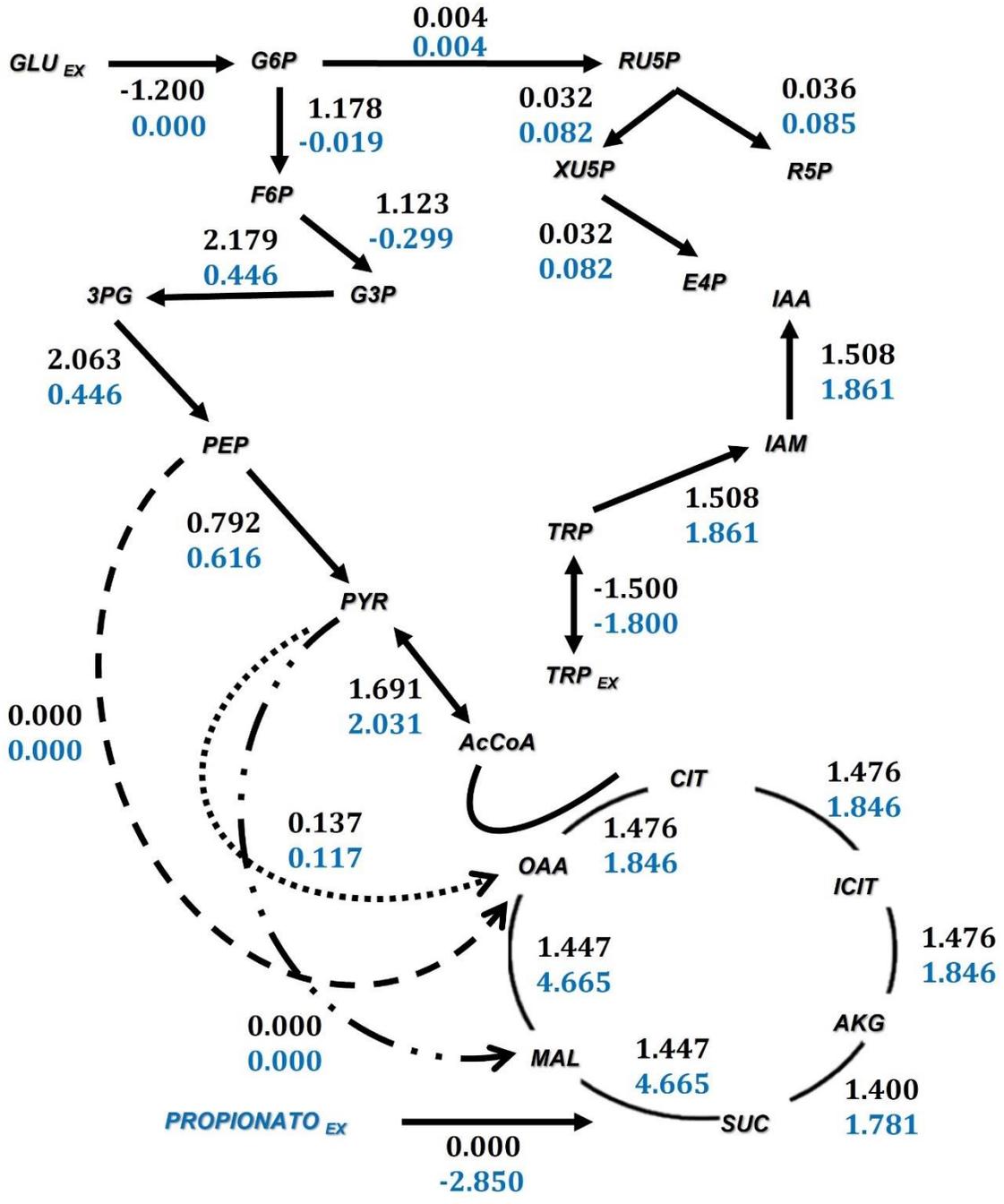
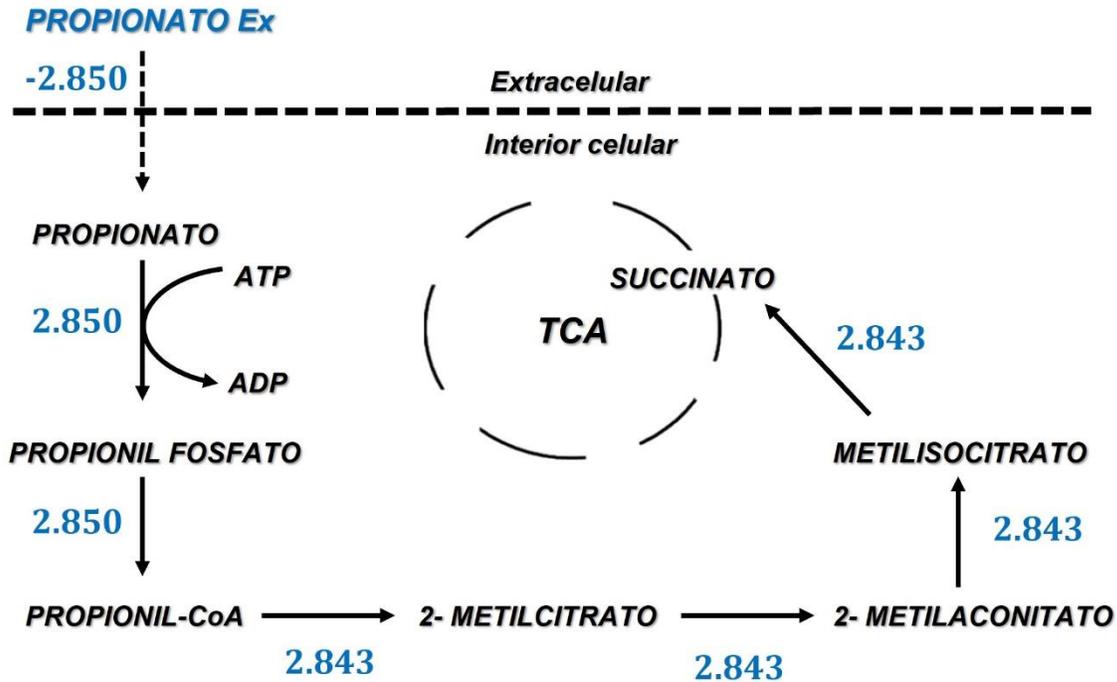


Figura 6.7: Distribución del flujo de carbono en el metabolismo central para Glucosa (GLU) y Propionato (PRO) como fuente de carbono. Se emplearon las mismas condiciones de simulación. Se maximiza AIA como función objetivo. Todos los valores de flujo se encuentran en mmol gDW<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

En la Figura 6.7 se presenta un mapa metabólico como medio de visualización de la distribución de flujos obtenida para la simulación de los sustratos empleados en la investigación: glucosa (valores en negro) y propionato (valores en azul) cuando se simula la fase estacionaria de crecimiento y se maximiza la producción de AIA como función objetivo. Un aspecto importante es que con la reanotación de este modelo iBSU1147+1 se logra obtener un valor óptimo para el compuesto objetivo AIA, lo cual es un indicio de la sensibilidad del modelo y el trabajo de curado realizado por otros investigadores para optimizar la red metabólica específicamente en el metabolismo secundario de *B. subtilis* (Aminian-Dehkordi *et al.*, 2019); (Hao *et al.*, 2013).

Como se ha explicado la glucosa utiliza la vía glucolítica con menores valores de flujo si comparamos con lo simulado en el crecimiento exponencial, pero con una actividad considerablemente superior si lo comparamos con el propionato. La explicación está en que los sustratos gluconeogénicos se incorporan al metabolismo microbiano en otros niveles donde no hay tanta actividad de la vía glucolítica. En el caso del propionato su entrada al metabolismo central del carbono sería a nivel del TCA específicamente a través del **SUC** mediante interconversión de varios intermediarios metabólicos sin una aparente pérdida de flujos pues son reacciones reversibles en su mayoría que ocurren de manera espontánea ( $\Delta G < 0$ ) en el sentido anaplerótico (*ver Figura 6.8*). Esto explica el incremento en los valores de flujo de propionato con respecto a glucosa en todas las reacciones del TCA, aspecto que se agudiza en el sitio de entrada del compuesto donde la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa en las simulaciones con el ácido orgánico es alrededor de cuatro veces superior comparado con su valor cuando se utiliza glucosa. El incremento de los intermediarios del TCA puede contribuir a las vías anabólicas cuando la demanda energética de la célula no es tan alta y por tanto no se favorece el crecimiento como en la fase estacionaria. Un resultado similar se obtiene en un trabajo de Pardelha *et al.*, donde se evalúa mediante un análisis de FBA la producción de polihidroxialcanoatos (PHA) en mezclas complejas de ácidos grasos y ácidos orgánicos como el propionato (Pardelha *et al.*, 2012).



**Figura 6.8:** Incorporación del **Propionato (PRO)** al metabolismo central del carbono a nivel del TCA. Valores de flujo se encuentran en  $\text{mmol gDW}^{-1} \text{h}^{-1}$ .

El TCA se ha demostrado muchos estudios que representa el eje central del metabolismo heterótrofo de bacterias como *B. subtilis* y *E. coli*, de manera que se encuentra bajo una fuerte represión catabólica de los sistemas reguladores del organismo, muchas veces este control está ejercido por la presencia de diferentes fuentes de carbono. Se ha demostrado en *B. subtilis* que hay tres enzimas en el TCA que constituyen el núcleo de esta vía: la citrato sintasa, isocitrato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa, codificadas en el operón *citZ icd mdh* (Meyer *et al.*, 2011). Producto de la actividad regulatoria de estas enzimas pueden ser inhibidas por sustrato cómo todas las involucradas en la vía, sin embargo, hay un punto de control de la condición metabólica de la célula en la primera enzima de la vía la enzima citrato sintasa, que tiene inhibición por ATP, o sea es capaz de sentir la relación ATP/ADP en la célula de manera que ante una condición energética favorable se encuentra prácticamente inactiva y por consiguiente toda la vía (Jin and Sonenshein, 1994).

En nuestra distribución de flujo no se aprecia en ninguno de los sustratos la actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), esta represión catabólica se ha estudiado a profundidad en el caso de la glucosa y está condicionada por la presencia del factor de transcripción CcpA. Este elemento de regulación interviene en la actividad de más de 100 genes del metabolismo central y es considerado en las bacterias gram positivas como *Bacillus* un elemento activo para el control de su metabolismo y en estas condiciones inhibe la actividad de enzimas que participan en la vía gluconeogénica como la PEPCK que cataliza la formación de **PEP** a partir de **OAA** (Sonenshein, 2007).

Precisamente para la formación de nuestro producto AIA, que cómo se ha explicado depende de manera directa de la formación de *Trp* el **PEP** resulta un metabolito esencial y un nodo de interés para la vía de síntesis del aminoácido. Esto resulta evidente cuándo se analiza la distribución de flujos en la vía del shikimato, la entrada a esta vía se produce mediante dos precursores primarios de dos vías centrales del metabolismo: el propio **PEP** de la Glicólisis y la **E4P** procedente de la vía de las Pentosas Fosfato. Ambos metabolitos contribuyen a la formación de 3-dehidroquinato quien se transforma en dehidroshikimato y en otros pasos de reacción en shikimato (SHIK), shikimato-3-fosfato, intermediarios metabólicos necesarios para la producción de *Trp* mediante la vía del indol glicerol fosfato (IGP). Este último paso de reacción es esencial en nuestro proceso como parte del metabolismo de los compuestos indólicos y resulta interesante cómo en las condiciones de cultivo y el análisis de simulación con glucosa no se favorece esta reacción ( $v=0.01163 \text{ mmol gDW}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) que pudiera condicionar un escenario de sobreproducción del aminoácido y por consiguiente de la auxina AIA.

En las simulaciones con propionato el valor de flujo para estas enzimas que conforman el operón *Trp* es seis veces mayor que en las simulaciones con glucosa lo que concuerda con los resultados demostrando no sólo la mejor asimilación del aminoácido suministrado al medio sino además la síntesis *de novo* de *Trp* favorecida en las condiciones de cultivo con el ácido orgánico. Otra diferencia es en

la **E4P** en dónde el flujo es 2.5 veces mayor para propionato comparado con glucosa por lo que este compuesto contribuye a la formación de *Trp* de igual manera vía del **SHIK** garantizando una diferencia de flujo que concluye en definitiva en una sobreproducción del metabolito objetivo AIA.

### **6.5 Optimización binivel mediante algoritmo OptKnock**

Las aproximaciones con FBA se basan en algoritmos de optimización lineal, no obstante, también se han propuesto algoritmos no lineales y de optimización multi-objetivo con la finalidad de mejorar las predicciones de flujo. Por este motivo, se desarrolló un análisis de optimización binivel con el objetivo de determinar estrategias de eliminación de genes que conduzcan a la sobreproducción química del AIA, acoplado a la producción de biomasa, es decir mediante el marco de optimización de OptKnock se pueden evaluar dos funciones objetivo a la vez (objetivo celular: max biomasa; objetivo químico: max AIA). Los resultados se muestran en la *Tabla 6.2* en dónde, utilizando las mismas restricciones experimentales y el conjunto de reacciones que requiere el algoritmo para su análisis, se realizaron simulaciones que permiten encontrar estrategias de 2 a 5 *knockouts* para cada sustrato. El algoritmo permite que la producción de la sustancia química deseada, en este caso el AIA se convierta en un subproducto obligatorio del crecimiento, ajustando la conectividad de la red metabólica. Esto en definitiva se resume a que la función concreta de OptKnock sería identificar y eliminar *a posteriori* las reacciones metabólicas que desacoplan el crecimiento celular de la producción química (Burgard et al., 2003).

Si hacemos un análisis general de los resultados de OptKnock no se aprecia una considerable optimización para nuestro sistema en las condiciones de simulación que se prueban en este estudio. Resulta interesante como el algoritmo identifica el estado estacionario y las delecciones que se propone en ambos sustratos permiten ajustarse a un menor valor de biomasa, comparado con la WT. Sin embargo, ninguna estrategia permite en el propionato ajustarse a un mejor escenario de producción, a diferencia de la glucosa que encuentra un ligero aumento en el flujo de carbono hacia la auxina si se eliminan cuatro genes de vías centrales del

metabolismo de carbono. En el TCA se propone mediante esta estrategia la delección de *mdh* que codifica para la enzima malato deshidrogenasa y la enzima multimérica  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa que se encuentra en el genoma codificada por los genes *odhA*, *odhB*, *pdhD*, según la base de datos Uniprot y KEGG (Bairoch *et al.*, 2005, Kanehisa).

**Tabla 6.2:** Resultado del análisis de optimización binivel OptKnock para ambos sustratos. Se presenta la estrategia de eliminación de reacciones que permiten maximizar la producción de AIA acoplado al crecimiento microbiano.

GLUCOSA			MAX V <sub>bio</sub>	
No. Delecciones	Knockouts	Enzima	Biomasa (h <sup>-1</sup> )	AIA (mmol/gDW h)
0	"Wild type"	-----	0.1	1.496
2	1. FDP $\rightleftharpoons$ DHAP + G3P 2. MAL $\rightleftharpoons$ FUM + H <sub>2</sub> O	Fructosa bisfosfato aldolasa Fumarasa	0.07	1.4992
3	1. 2PG $\rightleftharpoons$ H <sub>2</sub> O + PEP 2. MAL $\rightleftharpoons$ FUM + H <sub>2</sub> O 3. G6P $\rightleftharpoons$ F6P	Enolasa Fumarasa Glucosa-6-fosfato isomerasa	0.04	1.51
4	1. MAL + NAD $\rightleftharpoons$ OAA + H + NADH 2. RU5P $\rightleftharpoons$ XU5P 3. AKG + NAD + CoA $\rightleftharpoons$ SUC-CoA + CO <sub>2</sub> + NADH 4. F6P + ATP $\rightarrow$ FDP + ADP	Malato deshidrogenasa Ribulosa-5-fosfato epimerasa $\alpha$ -Cetoglutarato deshidrogenasa (E2) Fosfofructoquinasa (PF1K)	0.04	1.61

PROPIONATO			MAX V <sub>bio</sub>	
No. Delecciones	Knockouts	Enzima	Biomasa (h <sup>-1</sup> )	AIA (mmol/gDW h)
0	"Wild type"	-----	0.1	1.796
2	1. MAL + NAD $\rightleftharpoons$ OAA + H + NADH 2. SUC-CoA + GDP + HPO <sub>4</sub> $\rightleftharpoons$ SUC + GTP + CoA	Malato deshidrogenasa Succinil-CoA sintetasa	0.06	1.798
3	1. MAL + NAD $\rightleftharpoons$ OAA + H + NADH 2. 2PG $\rightleftharpoons$ H <sub>2</sub> O + PEP 3. AKG + NAD + CoA $\rightleftharpoons$ SUC-CoA + CO <sub>2</sub> + NADH	Malato deshidrogenasa Enolasa $\alpha$ -Cetoglutarato deshidrogenasa (E2)	0.03	1.798
5	1. AKG + ALA $\rightleftharpoons$ GLU + PYR 2. MAL + NAD $\rightleftharpoons$ OAA + H + NADH 3. 2PG $\rightleftharpoons$ H <sub>2</sub> O + PEP 4. AKG + VAL $\rightleftharpoons$ GLU + 3M-2-OB 5. AKG + NAD + CoA $\rightleftharpoons$ SUC-CoA + CO <sub>2</sub> + NADH	Transaminasa (ALAT) Malato deshidrogenasa Enolasa Transaminasa $\alpha$ -Cetoglutarato deshidrogenasa (E2)	0.06	1.798

Este análisis en particular resulta interesante pues podemos apreciar en la *Tabla 6.2* cómo, de igual manera para propionato, es consecuente la estrategia de eliminación de ambos pasos de reacción del TCA, en todos los análisis de eliminación de reacciones simulados, sin importar el número de delecciones fijadas como solución del algoritmo. Sin embargo, las interpretaciones de las simulaciones

deben ser analizadas con cuidado y contrastadas con la información que se obtiene de la revisión de otros trabajos y otros análisis *in silico* que permitan asegurar que en efecto si responden al fenotipo buscado (Singh, 2021). En este caso, si bien ambos grupos de genes no son considerados esenciales para *B. subtilis* de ahí que puedan ser eliminados sin provocar un fenotipo no viable, codifican para enzimas que se encargan de formar poder reductor en forma de NADH, esto pudiera explicar cómo disminuye la biomasa ante los *knockouts*. De igual manera cómo se mencionó anteriormente se simula el estado estacionario dónde la producción de AIA es óptima por lo que el poder reductor puede no ser una limitante en este período de crecimiento microbiano dónde no se prioriza las reacciones anabólicas.

Otra estrategia interesante y aparentemente relacionada se encuentra en las otras reacciones que se plantea eliminar según el algoritmo OptKnock la ribulosa-5- fosfato epimerasa producto génico de *rpe* y la fosfofructoquinasa que se encuentra anotada en el genoma como *pfkA*. Aunque ambas reacciones corresponden a vías diferentes pentosas fosfato y glicólisis respectivamente están asociadas de cierta manera con la producción de intermediarios de la vía del shikimato para la síntesis de *Trp*. El análisis más intuitivo sería para *pfkA* ya que la delación de este gen conduce una acumulación de **F6P** un paso importante en el metabolismo central pues este nodo si no continúa su flujo a **FDP** (flujo glucolítico) por el efecto de la mutación se desvía hacia la formación de **E4P** (metabolito de partida hacia la vía del **SHIK**) mediante la enzima **Trancetolasa EC 2.2.1.1**:

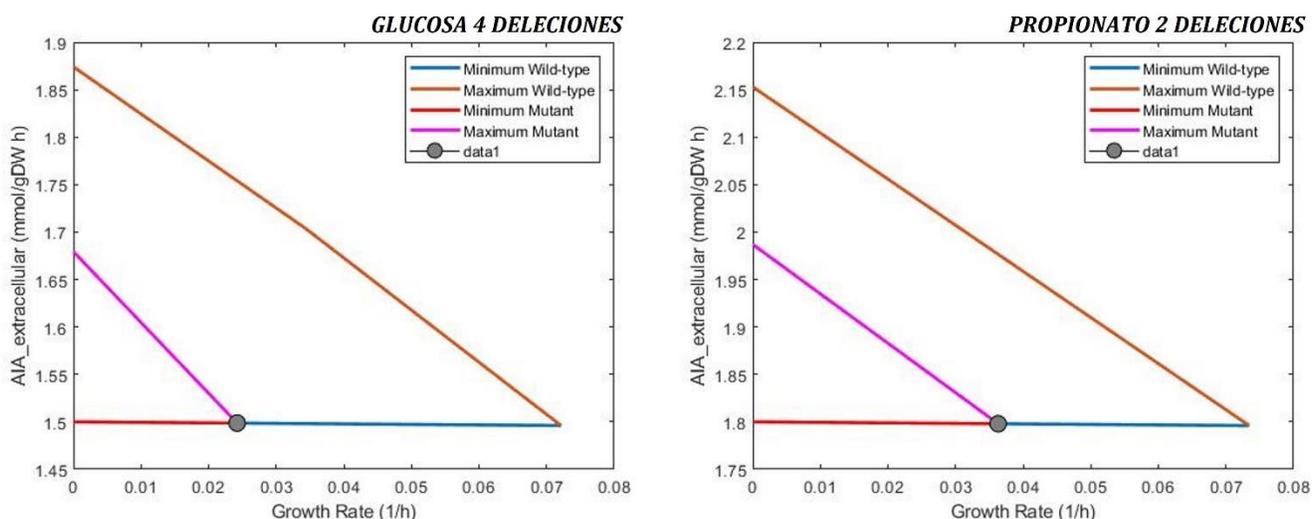


Esta reacción reversible en el sentido directo a cómo se encuentra anotada favorece la formación de este compuesto esencial en nuestro proceso de producción y a su vez la reacción nos permite entender el otro *knockout* menos intuitivo que propone el algoritmo. La delección de *rpe* se explica por un análisis esencial que condiciona el funcionamiento de las redes metabólicas y se debe tener en cuenta en cualquier estudio de este tipo que es la bioenergética. Como se aprecia en la tabla 6.2 esta reacción de epimerasa transforma **RU5P** en **XU5P** y el efecto positivo para el acomodo de la red hacia nuestro objetivo de producción no

se encuentra tanto en la acumulación de la **RU5P**, sino en la disminución de las concentraciones de **XU5P** producto de la eliminación de este paso de reacción en las pentosas fosfato. El efecto se traduce en favorecer el sentido directo en la reacción reversible de la Trancetolasa (EC 2.2.1.1) pues sería el sentido espontáneo ( $\Delta G < 0$ ) producto de las concentraciones de los productos en ese sentido de la reacción. Esto provoca por transitividad un aumento en el flujo hacia **E4P** que favorece en otros pasos de reacción el flujo hacia **SHIK**, **COR** y **ANT**.

En la Figura 6.9 se muestran las gráficas que describen el proceso de optimización mediante este algoritmo binivel, estas son parte de la solución que se obtienen realizando las simulaciones y nos permiten describir si existe acoplamiento entre ambos objetivos optimizados. Como se muestra en ambos casos son bastante semejantes en cuanto al desarrollo del algoritmo, sin embargo, existe mayor biomasa en las simulaciones con propionato y flujo hacia la producción de AIA. Teniendo en cuenta estos resultados, dónde la dependencia a *Trp* de nuestro producto determina que no varíe considerablemente su producción ante estrategias de optimización cómo esta desarrollamos como control negativo la optimización de la reacción de síntesis de *Trp* anotada en el modelo siguiendo las mismas restricciones y el análisis realizado para AIA:





**Figura 6.9:** Gráficas que describen las soluciones obtenidas mediante el algoritmo OptKnock para ambos sustratos en un escenario de *eliminación de genes* determinado. El punto de intersección para los trazados determinados como mutantes se corresponde con el valor de optimización en esas condiciones de simulación.

Los resultados de este análisis no fueron mejores pues la optimización de *Trp* dado su complejo sistema de regulación no resulta trivial. Precisamente un estudio de Niu *et al.*, describe las principales estrategias en cepas de *E. coli* para optimizar la producción de este aminoácido mediante ingeniería metabólica. En ese trabajo se demuestra que debe existir enfoques integrados para lograr cepas superproductoras de este compuesto, por un lado, estrategias que incrementan la concentración intracelular de metabolitos esenciales para las vías de síntesis de *Trp* como el **PEP** y la **E4P**, sumado a control de vías de regulación, factores de transcripción, la regulación dinámica del operón *trpEDCBA* y sus elementos de control como la proteína represora *trpR*, así como ingeniería de los sistemas de transporte del aminoácido al exterior celular (Niu *et al.*, 2019).

## CAPÍTULO VII

### CONCLUSIONES

Se evaluó el crecimiento de la cepa de *B. subtilis* W168 en los sustratos **GLU** y **PRO** en cinéticas a nivel microcosmos que permitieron describir las fases de crecimiento de esta cepa en las condiciones de cultivo, demostrando que aproximadamente a las 15 horas comienza la fase estacionaria de crecimiento. Por otro lado, se desarrollaron cinéticas en biorreactor completamente instrumentado dónde se logra describir de manera más precisa el comportamiento de este cultivo con un mayor crecimiento cuando se emplea **GLU** como fuente de carbono alcanzando valores de 0,34 gDWC/L comparado con los 0.13 gDWC/L en las cinéticas con **PRO**. En ese punto resulta particularmente interesante que no se consume al final del cultivo todo el propionato suministrado, quedando un remanente de 1.92 g/L de este ácido orgánico.

El análisis de la producción de **AIA** y el consumo del metabolito inductor *Trp* demostró que el **PRO** constituye un mejor sustrato para la producción de la auxina en las condiciones de fermentación evaluadas. Si analizamos los valores de  $q_s$  y  $q_p$  para ambos sustratos nos podemos percatar que el consumo de *Trp* en presencia de **GLU** representa el 83% comparado con los cultivos en propionato, mientras que la producción de **AIA** es de igual manera considerablemente menor en los experimentos con **GLU** representando el 69% en relación con **PRO**. Esto explica el mayor valor de rendimiento alcanzado en los experimentos con el ácido orgánico  $Y_{p/Trp} = 0,915$ , que corresponde a una concentración final de **AIA** a las 48 h de cultivo de 0,31 g/L.

Se llevó a cabo un análisis de balance de flujos para ambos sustratos con base a las restricciones experimentales impuestas por los parámetros cinéticos del cultivo

en biorreactor en dónde la distribución de flujos permitió dirigir el balance de carbono hacia **AIA** correspondiéndose con lo obtenido en los experimentos un mayor flujo de producción de la auxina en las simulaciones con **PRO**. En el mapa metabólico del metabolismo central del carbono resulta interesante cómo se favorecen ciertas vías en dependencia del sustrato, como el aumento de los valores de flujo en las reacciones del **TCA** cuando se emplea **PRO** en las simulaciones explicado por la vía de entrada de este compuesto al metabolismo central, así como la disminución de los flujos en nodos de interés relacionados a metabolitos intermediarios como el **PEP** para la síntesis de *Trp* en la célula.

El algoritmo binivel OptKnock mostró que no existe por sí solo un conjunto de genes que garantice una optimización considerable de **AIA** debido al acoplamiento de la síntesis de este metabolito con su inductor *Trp*. Es importante considerar que que OptKnock es un planteamiento en donde se evalúa la competencia de dos objetivos, el de producción de un compuesto de interés y el crecimiento celular, y por lo tanto es probable que el algoritmo esté limitado para casos de estudio como este en particular, en donde existe una dependencia muy importante de un precursor de AIA como lo es el *Trp*.

Sin embargo, aun así, se identificaron algunas estrategias de delección en genes que codifican para enzimas del **TCA** como malato deshidrogenasa y  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, así como otros pasos de reacción que conducen a la acumulación de **E4P** y **F6P** metabolitos claves en la síntesis de **AIA**.

## CAPÍTULO VIII

### PERSPECTIVAS

Para mantener la investigación en la sobreproducción de AIA empleando este modelo microbiano se propone realizar estudios con otras cepas o aislados naturales en cultivos donde pudiera elaborarse una estrategia de diseño para evaluar el potencial del compuesto en experimentos de estimulación de crecimiento *in vivo*. Se puede seguir perfeccionando el modelo metabólico mediante el diseño de otros experimentos de optimización multinivel o multiobjetivo que permitan determinar estrategias factibles para la sobreproducción de la auxina.

Desarrollar modificaciones genéticas con la finalidad de demostrar las predicciones simuladas con las herramientas computacionales, así como experimentos de actividad enzimática que permiten una correcta descripción de las enzimas involucradas en la síntesis del aminoácido *Trp* y el AIA completarán el análisis de este proceso y permiten confirmar algunas hipótesis de investigación.

Finalmente, el trabajo en su conjunto permitirá desarrollar un insumo para aplicación en cultivos de interés alimentario lo cual deriva en un desarrollo tecnológico de utilidad para la industria de la agricultura.

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFONSO, F. C., VIGUERAS-RAMÍREZ, G., ROSALES-COLUNGA, L. M., DEL MONTE-MARTINEZ, A. & HERNÁNDEZ, R. O. 2021. Propionate as the preferred carbon source to produce 3-indoleacetic acid in *B. subtilis*: comparative flux analysis using five carbon sources. *Molecular Omics*, 17, 554-564.
- AMINIAN-DEHKORDI, J., MOUSAVI, S. M., JAFARI, A., MIJAKOVIC, I. & MARASHI, S.-A. 2019. Manually curated genome-scale reconstruction of the metabolic network of *Bacillus megaterium* DSM319. *Scientific reports*, 9, 1-14.
- ARAUJO, F. F., HENNING, A. A. & HUNGRIA, M. 2005. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 1639-1645.
- ASGHER, M., QAMAR, S. A., BILAL, M. & IQBAL, H. M. N. 2020. Bio-based active food packaging materials: Sustainable alternative to conventional petrochemical-based packaging materials. *Food Research International*, 137, 109625.
- BAIROCH, A., APWEILER, R., WU, C. H., BARKER, W. C., BOECKMANN, B., FERRO, S., GASTEIGER, E., HUANG, H., LOPEZ, R. & MAGRANE, M. 2005. The universal protein resource (UniProt). *Nucleic acids research*, 33, D154-D159.
- BELDA, E., SEKOWSKA, A., LE FÈVRE, F., MORGAT, A., MORNICO, D., OUZOUNIS, C., VALLENET, D., MEDIGUE, C. & DANCHIN, A. 2013. An updated metabolic view of the *Bacillus subtilis* 168 genome. *Microbiology*, 159, 757-770.
- BENNETT, J. W. & BENTLEY, R. 1989. What's in a name?—microbial secondary metabolism. *Advances in applied microbiology*. Elsevier.
- BILAL, M. & IQBAL, H. M. N. 2018. Bio-based biopolymers and their potential applications for bio- and non-bio sectors. *Handbook of Biopolymers*. Jenny Stanford Publishing.
- BUFFING, M. F., LINK, H., CHRISTODOULOU, D. & SAUER, U. 2018. Capacity for instantaneous catabolism of preferred and non-preferred carbon sources in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Scientific reports*, 8, 1-10.
- BURGARD, A. P., PHARKYA, P. & MARANAS, C. D. 2003. Optknock: a bilevel programming framework for identifying gene knockout strategies for microbial strain optimization. *Biotechnology and bioengineering*, 84, 647-657.
- CALERO, P. & NIKEL, P. I. 2019. Chasing bacterial chassis for metabolic engineering: a perspective review from classical to non-traditional microorganisms. *Microbial Biotechnology*, 12, 98-124.
- CAULIER, S., NANNAN, C., GILLIS, A., LICCIARDI, F., BRAGARD, C. & MAHILLON, J. 2019. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in microbiology*, 10, 302.
- CHEN, J., GAI, Y., FU, G., ZHOU, W., ZHANG, D. & WEN, J. 2015. Enhanced extracellular production of  $\alpha$ -amylase in *Bacillus subtilis* by optimization of regulatory elements and over-expression of PrsA lipoprotein. *Biotechnology letters*, 37, 899-906.
- CHO, Y.-H., SONG, J. Y., KIM, K. M., KIM, M. K., LEE, I. Y., KIM, S. B., KIM, H. S., HAN, N. S., LEE, B. H. & KIM, B. S. 2010. Production of nattokinase by batch and fed-batch culture of *Bacillus subtilis*. *New Biotechnology*, 27, 341-346.

- CHOI, K. R., JANG, W. D., YANG, D., CHO, J. S., PARK, D. & LEE, S. Y. 2019. Systems metabolic engineering strategies: integrating systems and synthetic biology with metabolic engineering. *Trends in biotechnology*, 37, 817-837.
- CHOWDHURY, A., ZOMORRODI, A. R. & MARANAS, C. D. 2015. Bilevel optimization techniques in computational strain design. *Computers & Chemical Engineering*, 72, 363-372.
- CHUANG, H.-Y., HOFREE, M. & IDEKER, T. 2010. A decade of systems biology. *Annual review of cell and developmental biology*, 26, 721.
- COOK, L. K. N. 1996. Optimizing culturing conditions for *Bacillus subtilis*. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*, 19, 54-8.
- DAUNER, M., STORNI, T. & SAUER, U. W. E. 2001. *Bacillus subtilis* metabolism and energetics in carbon-limited and excess-carbon chemostat culture. *Am Soc Microbiol*.
- DE OLIVEIRA NUNES, G. F., MENEZES, K. A. S., SAMPAIO, A. A., LEITE, J., FERNANDES-JÚNIOR, P. I., SEIDO, S. L., ZILLI, J. É. & MARTINS, L. M. V. 2018. Polyphasic characterization of forage legumes root nodule bacteria isolated from semiarid region in Brazil. *Revista de Ciências Agrárias*, 41, 612-624.
- DOS SANTOS, D. A., BALDO, C., BORSATO, D. & CELLIGOI, M. A. P. C. 2016. Utilization of low-cost substrates for the production of nystose by *Bacillus subtilis* natto cct 7712. *Acta Scientiarum. Technology*, 38, 391-397.
- EDWARDS, J. S. & PALSSON, B. O. 1999. Systems properties of the *Haemophilus influenzae* Rd metabolic genotype. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 17410-17416.
- FEIST, A. M. & PALSSON, B. O. 2010. The biomass objective function. *Current opinion in microbiology*, 13, 344-349.
- FIERER, N. 2017. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 15, 579-590.
- FREYER, S. A., KÖNIG, M. & KÜNDEL, A. 2004. Validating shaking flasks as representative screening systems. *Biochemical Engineering Journal*, 17, 169-173.
- GAO, T., WONG, Y., NG, C. & HO, K. 2012. L-lactic acid production by *Bacillus subtilis* MUR1. *Bioresource Technology*, 121, 105-110.
- GARCÍA-GRANADOS, R., LERMA-ESCALERA, J. A. & MORONES-RAMÍREZ, J. R. 2019. Metabolic engineering and synthetic biology: synergies, future, and challenges. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 36.
- GARCÍA SÁNCHEZ, C. E. & TORRES SÁEZ, R. G. 2014. Comparison and analysis of objective functions in flux balance analysis. *Biotechnology progress*, 30, 985-991.
- GARG, V., KUKREJA, K., GERA, R. & SINGLA, A. 2015. Production of indole-3-acetic acid by berseem (*Trifolium alexandrinum* L.) rhizobia isolated from Haryana, India. *Agr Sci Digest*, 35, 229-232.
- GARRITY, G. M., BRENNER, D. J., KRIEG, N. R., STALEY, J. R. & MANUAL, B. S. 2005. Systematic bacteriology. *The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria, Bergey's Manual Trust, Department of Microbiology and Molecular Genetics*, 2.
- GATICA, S. N. & ARES, O. E. 2012. La importancia de la visualización en el aprendizaje de conceptos matemáticos.
- GLICKMANN, E. & DESSAUX, Y. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 61, 793-796.
- GOELZER, A., BEKKAL BRIKCI, F., MARTIN-VERSTRAETE, I., NOIROT, P., BESSIÈRES, P., AYMERICH, S. & FROMION, V. 2008. Reconstruction and analysis of the genetic and metabolic regulatory networks of the central metabolism of *Bacillus subtilis*. *BMC systems biology*, 2, 1-18.

- GOHIL, N., PANCHASARA, H., PATEL, S., RAMÍREZ-GARCÍA, R. & SINGH, V. 2017. Book review: recent advances in yeast metabolic engineering. *Frontiers Media SA*.
- GOMBERT, A. K. & NIELSEN, J. 2000. Mathematical modelling of metabolism. *Current opinion in biotechnology*, 11, 180-186.
- GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, E., GARCÍA-HERNÁNDEZ, A. L., FLORES-MEJÍA, R., LÓPEZ-SANTIAGO, R. & MORENO-FIERROS, L. 2015. The protoxin Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis* improves the protection conferred by intranasal immunization with *Brucella abortus* RB51 in a mouse model. *Veterinary Microbiology*, 175, 382-388.
- GU, C., KIM, G. B., KIM, W. J., KIM, H. U. & LEE, S. Y. 2019. Current status and applications of genome-scale metabolic models. *Genome biology*, 20, 1-18.
- HAO, T., HAN, B., MA, H., FU, J., WANG, H., WANG, Z., TANG, B., CHEN, T. & ZHAO, X. J. M. B. 2013. In silico metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for improved production of riboflavin, Egl-237,(R, R)-2, 3-butanediol and isobutanol. 9, 2034-2044.
- HEIRENDT, L., ARRECKX, S., PFAU, T., MENDOZA, S. N., RICHELLE, A., HEINKEN, A., HARALDSDÓTTIR, H. S., WACHOWIAK, J., KEATING, S. M. & VLASOV, V. 2019. Creation and analysis of biochemical constraint-based models using the COBRA Toolbox v. 3.0. *Nature protocols*, 14, 639-702.
- HENRY, C. S., DEJONGH, M., BEST, A. A., FRYBARGER, P. M., LINSAY, B. & STEVENS, R. L. 2010. High-throughput generation, optimization and analysis of genome-scale metabolic models. *Nature biotechnology*, 28, 977-982.
- HENRY, C. S., ZINNER, J. F., COHOON, M. P. & STEVENS, R. L. 2009. iBsu1103: a new genome-scale metabolic model of *Bacillus subtilis* based on SEED annotations. *Genome biology*, 10, 1-15.
- HERNÁNDEZ, A., RIVES, N., CABALLERO, A., HERNÁNDEZ, A. N. & HEYDRICH, M. 2004. Caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz en la producción de metabolitos del tipo AIA, sideróforos y ácido salicílico. *Revista de Salud Pública*, 6, 6-13.
- HUANG, J., HOU, J., LI, L. & WANG, Y. 2020. Flux balance analysis of glucose degradation by anaerobic digestion in negative pressure. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45, 26822-26830.
- JAHREIS, K., PIMENTEL-SCHMITT, E. F., BRÜCKNER, R. & TITGEMEYER, F. 2008. Ins and outs of glucose transport systems in eubacteria. *FEMS microbiology reviews*, 32, 891-907.
- JIN, S. & SONENSHEIN, A. L. 1994. Identification of two distinct *Bacillus subtilis* citrate synthase genes. *Journal of bacteriology*, 176, 4669-4679.
- KANEHISA, M. The KEGG database. 2002. Wiley Online Library, 91-100.
- KARTHIKEYAN, A., JOSEPH, A., SUBRAMANIAN, R. & NAIR, B. G. 2022. Fermenter Design. *Industrial Microbiology and Biotechnology*. Springer.
- KESWANI, C., SINGH, S. P., CUETO, L., GARCÍA-ESTRADA, C., MEZAACHE-AICHOOR, S., GLARE, T. R., BORRIS, R., SINGH, S. P., BLÁZQUEZ, M. A. & SANSINENEA, E. 2020. Auxins of microbial origin and their use in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 8549-8565.
- KIM, J., REED, J. L. & MARAVELIAS, C. T. 2011. Large-scale bi-level strain design approaches and mixed-integer programming solution techniques. *PLoS one*, 6, e24162.
- KLIPP, E., LIEBERMEISTER, W., WIERLING, C. & KOWALD, A. 2016. *Systems biology: a textbook*, John Wiley & Sons.
- KOBAYASHI, K., EHRlich, S. D., ALBERTINI, A., AMATI, G., ANDERSEN, K. K., ARNAUD, M., ASAI, K., ASHIKAGA, S., AYMERICH, S. & BESSIERES, P. 2003. Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 4678-4683.
- KOCABAŞ, P., ÇALIK, P., ÇALIK, G. & ÖZDAMAR, T. H. 2017. Analyses of extracellular protein production in *Bacillus subtilis*-I: Genome-scale metabolic model reconstruction based on updated gene-enzyme-reaction data. *Biochemical Engineering Journal*, 127, 229-241.

- KRAVCHENKO, L. V., AZAROVA, T. S., MAKAROVA, N. M. & TIKHONOVICH, I. A. 2004. The effect of tryptophan present in plant root exudates on the phytostimulating activity of rhizobacteria. *Microbiology*, 73, 156-158.
- KUMAR, S. D. & KUMAR, D. R. H. 2012. Importance of RP-HPLC in analytical method development: a review. *International journal of pharmaceutical sciences and research*, 3, 4626.
- KUNST, F., OGASAWARA, N., MOSZER, I., ALBERTINI, A. M., ALLONI, G. O., AZEVEDO, V., BERTERO, M. G., BESSIÈRES, P., BOLOTIN, A. & BORCHERT, S. 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390, 249-256.
- LEWIS, N. E., NAGARAJAN, H. & PALSSON, B. O. 2012. Constraining the metabolic genotype–phenotype relationship using a phylogeny of in silico methods. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 291-305.
- LIAO, Q., CHANG, J.-S., HERRMANN, C. & XIA, A. 2018. *Bioreactors for microbial biomass and energy conversion*, Springer.
- LIU, Y., CHEN, L., ZHANG, N., LI, Z., ZHANG, G., XU, Y., SHEN, Q. & ZHANG, R. 2016. Plant-microbe communication enhances auxin biosynthesis by a root-associated bacterium, *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29, 324-330.
- LIU, Y., SU, A., TIAN, R., LI, J., LIU, L. & DU, G. 2020. Developing rapid growing *Bacillus subtilis* for improved biochemical and recombinant protein production. *Metabolic Engineering Communications*, 11, e00141.
- LIU, Y., ZHU, Y., MA, W., SHIN, H.-D., LI, J., LIU, L., DU, G. & CHEN, J. 2014. Spatial modulation of key pathway enzymes by DNA-guided scaffold system and respiration chain engineering for improved N-acetylglucosamine production by *Bacillus subtilis*. *Metabolic Engineering*, 24, 61-69.
- LLANERAS, F. & PICÓ, J. 2008. Stoichiometric modelling of cell metabolism. *Journal of bioscience and bioengineering*, 105, 1-11.
- LOPES, R., TSUI, S., GONÇALVES, P. J. R. O. & DE QUEIROZ, M. V. 2018. A look into a multifunctional toolbox: endophytic *Bacillus* species provide broad and underexploited benefits for plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34, 1-10.
- LOURENÇO, N. D., LOPES, J. A., ALMEIDA, C. F., SARRAGUÇA, M. C. & PINHEIRO, H. M. 2012. Bioreactor monitoring with spectroscopy and chemometrics: a review. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 404, 1211-1237.
- MAGESHWARAN, V., INMANN, F. & HOLMES, L. D. 2014. Growth kinetics of *Bacillus subtilis* in lignocellulosic carbon sources. *Int J Microbiol Res*, 6, 570-574.
- MAUGHAN, H. & VAN DER AUWERA, G. 2011. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution*, 11, 789-797.
- MCKIGHT, P. E. & NAJAB, J. 2010. Kruskal-wallis test. *The corsini encyclopedia of psychology*, 1-1.
- MERINO, E., JENSEN, R. A. & YANOFSKY, C. 2008. Evolution of bacterial trp operons and their regulation. *Current opinion in microbiology*, 11, 78-86.
- MEYER, F. M., GERWIG, J., HAMMER, E., HERZBERG, C., COMMICHAU, F. M., VÖLKER, U. & STÜLKE, J. 2011. Physical interactions between tricarboxylic acid cycle enzymes in *Bacillus subtilis*: evidence for a metabolon. *Metabolic engineering*, 13, 18-27.
- MEYER, H., WEIDMANN, H. & LALK, M. 2013. Methodological approaches to help unravel the intracellular metabolome of *Bacillus subtilis*. *Microbial cell factories*, 12, 1-13.
- MICHNA, R. H., ZHU, B., MÄDER, U. & STÜLKE, J. 2016. Subti Wiki 2.0—an integrated database for the model organism *Bacillus subtilis*. *Nucleic acids research*, 44, D654-D662.

- MOHSIN, M. Z., OMER, R., HUANG, J., MOHSIN, A., GUO, M., QIAN, J. & ZHUANG, Y. 2021. Advances in engineered *Bacillus subtilis* biofilms and spores, and their applications in bioremediation, biocatalysis, and biomaterials. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 6, 180-191.
- NICOLAS, P., MÄDER, U., DERYN, E., ROCHAT, T., LEDUC, A., PIGEONNEAU, N., BIDNENKO, E., MARCHADIER, E., HOEBEKE, M. & AYMERICH, S. 2012. Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*. *Science*, 335, 1103-1106.
- NIELSEN, J. & KEASLING, J. D. 2016. Engineering cellular metabolism. *Cell*, 164, 1185-1197.
- NIU, H., LI, R., LIANG, Q., QI, Q., LI, Q. & GU, P. 2019. Metabolic engineering for improving L-tryptophan production in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 46, 55-65.
- OH, J. S., KIM, B.-G. & PARK, T. H. 2002. Importance of specific growth rate for subtilisin expression in fed-batch cultivation of *Bacillus subtilis* spoIIIG mutant. *Enzyme and microbial technology*, 30, 747-751.
- OH, Y.-K., PALSSON, B. O., PARK, S. M., SCHILLING, C. H. & MAHADEVAN, R. 2007. Genome-scale reconstruction of metabolic network in *Bacillus subtilis* based on high-throughput phenotyping and gene essentiality data. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 28791-28799.
- ØKSTAD, O. A. & KOLSTØ, A.-B. 2011. Genomics of *Bacillus* species. *Genomics of foodborne bacterial pathogens*. Springer.
- ORTH, J. D., THIELE, I. & PALSSON, B. Ø. 2010. What is flux balance analysis? *Nature biotechnology*, 28, 245-248.
- OVERBEEK, R., OLSON, R., PUSCH, G. D., OLSEN, G. J., DAVIS, J. J., DISZ, T., EDWARDS, R. A., GERDES, S., PARRELLO, B. & SHUKLA, M. 2014. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic acids research*, 42, D206-D214.
- ÖZTÜRK, S., CALIK, P. & ÖZDAMAR, T. H. 2016. Fed-batch biomolecule production by *Bacillus subtilis*: a state of the art review. *Trends in biotechnology*, 34, 329.
- PANDA, I., BALABANTARAY, S., SAHOO, S. K. & PATRA, N. 2018. Mathematical model of growth and polyhydroxybutyrate production using microbial fermentation of *Bacillus subtilis*. *Chemical Engineering Communications*, 205, 249-256.
- PANDA, T. 2011. *Bioreactors: Analysis and design*, McGraw-Hill Education.
- PANEQUE-PÉREZ, V. M. 2010. Manual de técnicas analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos. Ediciones INCA.
- PARDELHA, F., ALBUQUERQUE, M. G. E., REIS, M. A. M., DIAS, J. M. L. & OLIVEIRA, R. 2012. Flux balance analysis of mixed microbial cultures: application to the production of polyhydroxyalkanoates from complex mixtures of volatile fatty acids. *Journal of biotechnology*, 162, 336-345.
- PATEL, M. V. & PATEL, R. K. 2014. Indole-3-acetic acid (IAA) production by endophytic bacteria isolated from saline dessert, the little Runn of Kutch. *CIBTech J Microbiol*, 3, 17-28.
- POLLMANN, S., MÜLLER, A., PIOTROWSKI, M. & WEILER, E. W. 2002. Occurrence and formation of indole-3-acetamide in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 216, 155-161.
- POSTMA, P. W., LENGELER, J. W. & JACOBSON, G. R. 1993. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiological reviews*, 57, 543-594.
- POVEDA, J. & GONZÁLEZ-ANDRÉS, F. 2021. *Bacillus* as a source of phytohormones for use in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 8629-8645.
- PREISNER, O., LOPES, J. A., GUIOMAR, R., MACHADO, J. & MENEZES, J. C. 2007. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in bacteriology: towards a reference method for bacteria discrimination. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 387, 1739-1748.
- ROSQUETE, M. R., BARBEZ, E. & KLEINE-VEHN, J. 2012. Cellular auxin homeostasis: gatekeeping is housekeeping. *Molecular plant*, 5, 772-786.

- SANTOS, F., BOELE, J. & TEUSINK, B. 2011. A practical guide to genome-scale metabolic models and their analysis. *Methods in enzymology*. Elsevier.
- SARMIENTO-LÓPEZ, L. G., LÓPEZ-MEYER, M., MALDONADO-MENDOZA, I. E., QUIROZ-FIGUEROA, F. R., SEPÚLVEDA-JIMÉNEZ, G., RODRÍGUEZ-MONROY, M. J. J. O. B. & BIOENGINEERING 2022. Production of indole-3-acetic acid by *Bacillus circulans* E9 in a low-cost medium in a bioreactor.
- SAUER, U., HATZIMANIKATIS, V., HOHMANN, H.-P., MANNEBERG, M., VAN LOON, A. P. & BAILEY, J. E. 1996. Physiology and metabolic fluxes of wild-type and riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Applied and environmental microbiology*, 62, 3687-3696.
- SCHALLMEY, M., SINGH, A. & WARD, O. P. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian journal of microbiology*, 50, 1-17.
- SETLOW, P., WANG, S. & LI, Y.-Q. 2017. Germination of spores of the orders Bacillales and Clostridiales. *Annual review of microbiology*, 71, 459-477.
- SHARMA, D. & SAHARAN, B. S. 2018. *Microbial cell factories*, CRC Press.
- SINGH, H. B., SARMA, B. K. & KESWANI, C. 2016. *Agriculturally important microorganisms*, Springer.
- SINGH, V. 2021. *Microbial Cell Factories Engineering for Production of Biomolecules*, Academic Press.
- SINGH, V., GOHIL, N., RAMIREZ GARCIA, R., BRADDICK, D. & FOFIÉ, C. K. 2018. Recent advances in CRISPR-Cas9 genome editing technology for biological and biomedical investigations. *Journal of cellular biochemistry*, 119, 81-94.
- SONENSHEIN, A. L. 2007. Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*, 5, 917-927.
- SPAEPEN, S., VANDERLEYDEN, J. & REMANS, R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews*, 31, 425-448.
- SPEROTTO, G., STASIAK, L. G., GODOI, J. P. M. G., GABIATTI, N. C. & DE SOUZA, S. S. 2021. A review of culture media for bacterial cellulose production: complex, chemically defined and minimal media modulations. *Cellulose*, 28, 2649-2673.
- STÜLKE, J., MARTIN-VERSTRAETE, I., ZAGOREC, M., ROSE, M., KLIER, A. & RAPOPORT, G. 1997. Induction of the *Bacillus subtilis* ptsGHI operon by glucose is controlled by a novel antiterminator, GlcT. *Molecular microbiology*, 25, 65-78.
- SU, Y., LIU, C., FANG, H. & ZHANG, D. 2020. *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial Cell Factories*, 19, 1.
- TAJSOLEIMAN, T., MEARS, L., KRÜHNE, U., GERNAEY, K. V. & CORNELISSEN, S. 2019. An industrial perspective on scale-down challenges using miniaturized bioreactors. *Trends in biotechnology*, 37, 697-706.
- TANAKA, K., HENRY, C. S., ZINNER, J. F., JOLIVET, E., COHOON, M. P., XIA, F., BIDNENKO, V., EHRlich, S. D., STEVENS, R. L. & NOIROT, P. 2013. Building the repertoire of dispensable chromosome regions in *Bacillus subtilis* entails major refinement of cognate large-scale metabolic model. *Nucleic acids research*, 41, 687-699.
- THIELE, I. & PALSSON, B. Ø. 2010. A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nature protocols*, 5, 93-121.
- TJALSMA, H., ANTELMANN, H., JONGBLOED, J. D. H., BRAUN, P. G., DARMON, E., DORENBOS, R., DUBOIS, J.-Y. F., WESTERS, H., ZANEN, G. & QUAX, W. J. 2004. Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the “secrets” of the secretome. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68, 207-233.
- WAGI, S. & AHMED, A. J. P. 2019. *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA. 7, e7258.
- WONG, S.-L. 1995. Advances in the use of *Bacillus subtilis* for the expression and secretion of heterologous proteins. *Current opinion in biotechnology*, 6, 517-522.

- YANG, S., ZHANG, Q., GUO, J., CHARKOWSKI, A. O., GLICK, B. R., IBEKWE, A. M., COOKSEY, D. A. & YANG, C.-H. 2007. Global effect of indole-3-acetic acid biosynthesis on multiple virulence factors of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Applied and environmental microbiology*, 73, 1079-1088.
- ZAIDI, S., USMANI, S., SINGH, B. R. & MUSARRAT, J. 2006. Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. *Chemosphere*, 64, 991-997.
- ZEIGLER, D. R., PRÁGAI, Z., RODRIGUEZ, S., CHEVREUX, B., MUFFLER, A., ALBERT, T., BAI, R., WYSS, M. & PERKINS, J. B. 2008. The origins of 168, W23, and other *Bacillus subtilis* legacy strains. *Journal of bacteriology*, 190, 6983-6995.
- ZHANG, C.-C., ZHOU, C.-Z., BURNAP, R. L. & PENG, L. 2018. Carbon/nitrogen metabolic balance: lessons from cyanobacteria. *Trends in plant science*, 23, 1116-1130.
- ZHANG, X., AL-DOSSARY, A., HUSSAIN, M., SETLOW, P., LI, J. & PETTINARI, M. J. 2020. Applications of *Bacillus subtilis* Spores in Biotechnology and Advanced Materials. 86, e01096-20.
- ZHAO, Y. 2010. Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual review of plant biology*, 61, 49.
- ZHU, Z. & ZHANG, Y. H. P. 2017. In vitro metabolic engineering of bioelectricity generation by the complete oxidation of glucose. *Metabolic engineering*, 39, 110-116.
- ZOU, M., GUO, F., LI, X., ZHAO, J. & QU, Y. 2014. Enhancing production of alkaline polygalacturonate lyase from *Bacillus subtilis* by fed-batch fermentation. *PLoS One*, 9, e90392.
- ZWEERS, J. C., BARÁK, I., BECHER, D., DRIESSEN, A. J., HECKER, M., KONTINEN, V. P., SALLER, M. J. & VAN DIJL, J. M. J. M. C. F. 2008. Towards the development of *Bacillus subtilis* as a cell factory for membrane proteins and protein complexes. 7, 1-20.

# ANEXOS

## ANEXO A

### CROMATOGRAMAS

*Determinación de la producción de AIA y el consumo de Trp*



**C8 (Waters, Corporation)**  
**Fase Móvil: 70% HAc 1%/30% Acetonitrilo**  
**Flujo: 1 mL/min a T= 28°C**  
**Detector UV a 280nm**

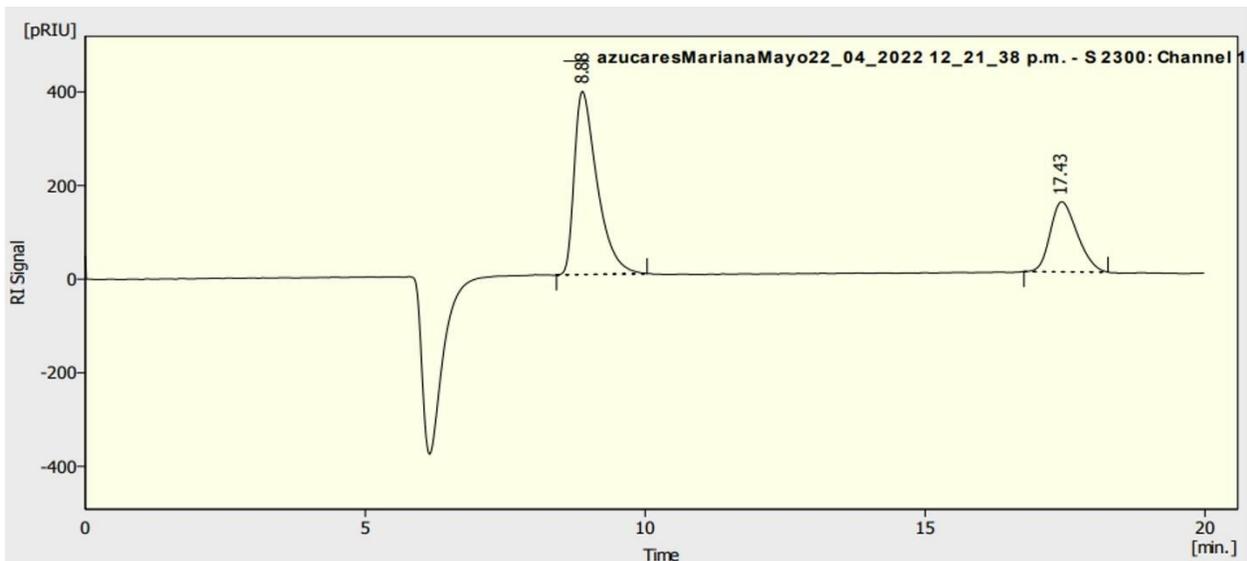


**HPLC Varian ProStar**

*Determinación del consumo de sustratos: Glucosa y Propionato*



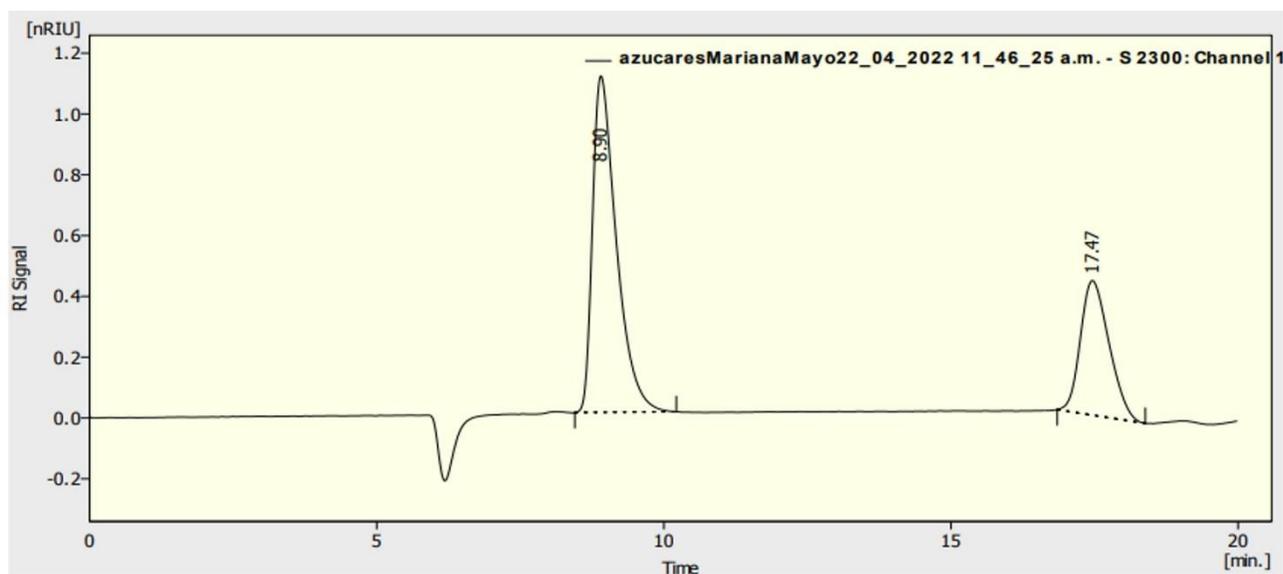
**Aminex HPX-87H (Bio-Rad Laboratories Inc., USA)**  
**Fase Móvil: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mM**  
**Flujo: 0.6 mL/min a T= 50°C**  
**Detector IR**



Result Table (Uncal - azucaresMarianaMayo22\_04\_2022 12\_21\_38 p.m. - S 2300: Channel 1)

	Reten. Time [min.]	Area [mRIU.s]	Height [mRIU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min.]	Compound Name
1	8.883	0.0111	0.000	68.8	72.4	0.43	<b>GLU</b>
2	17.433	0.0050	0.000	31.2	27.6	0.53	<b>PRO</b>
	Total	0.0161	0.001	100.0	100.0		

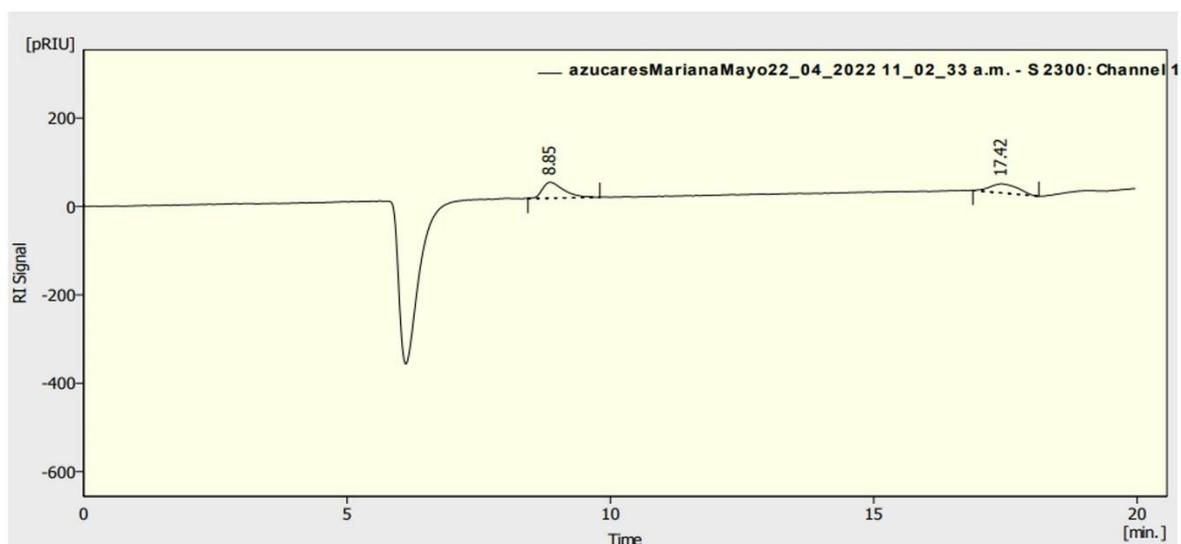
**Figura 1.** Cromatograma HPLC para estándar 5g/L de glucosa y propionato



Result Table (Uncal - azucaresMarianaMayo22\_04\_2022 11\_46\_25 a.m. - S 2300: Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mRIU.s]	Height [mRIU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Compound Name
1	8.900	0.0319	0.001	67.5	71.4	0.45	<b>GLU PRO</b>
2	17.467	0.0154	0.000	32.5	28.6	0.57	
	Total	0.0473	0.002	100.0	100.0		

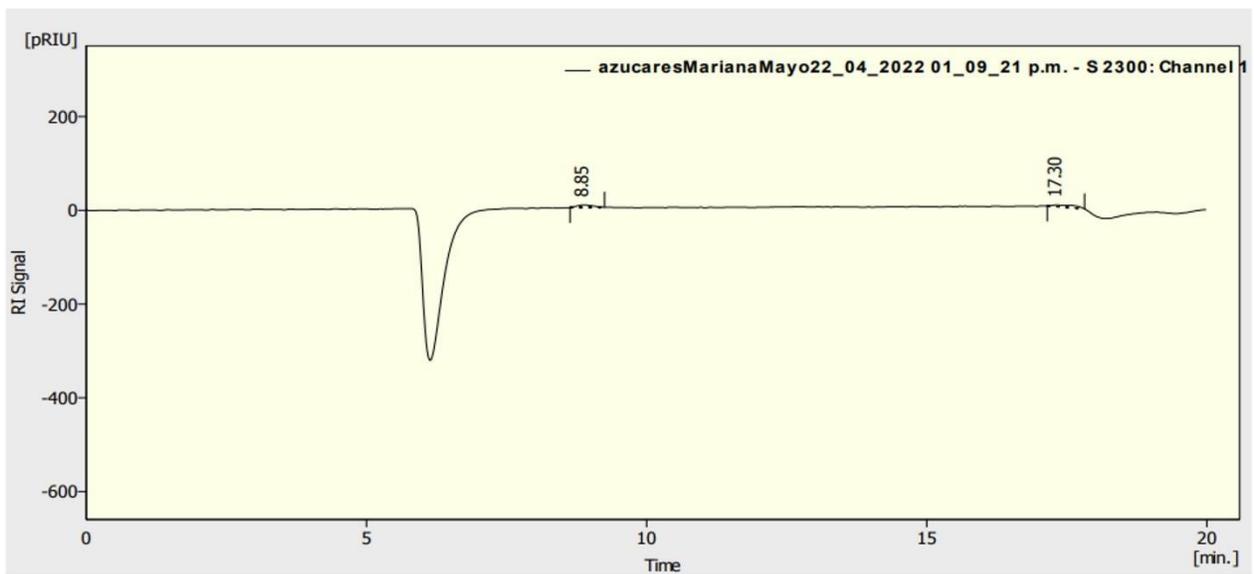
Figura 2. Cromatograma HPLC para estándar 1g/L de glucosa y propionato



Result Table (Uncal - azucaresMarianaMayo22\_04\_2022 11\_02\_33 a.m. - S 2300: Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mRIU.s]	Height [mRIU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Compound Name
1	8.850	0.0010	0.000	56.6	63.8	0.45	<b>GLU PRO</b>
2	17.417	0.0008	0.000	43.4	36.2	0.62	
	Total	0.0018	0.000	100.0	100.0		

Figura 3. Cromatograma HPLC para estándar 0.1g/L de glucosa y propionato



Result Table (Uncal - azucaresMarianaMayo22\_04\_2022 01\_09\_21 p.m. - S 2300: Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mRIU.s]	Height [mRIU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Compound Name
1	8.850	0.0001	0.000	42.1	61.2	0.30	<b>GLU</b>
2	17.300	0.0001	0.000	57.9	38.8	0.48	<b>PRO</b>
	Total	0.0002	0.000	100.0	100.0		

Figura 4. Cromatograma HPLC para estándar 0.01g/L de glucosa y propionato

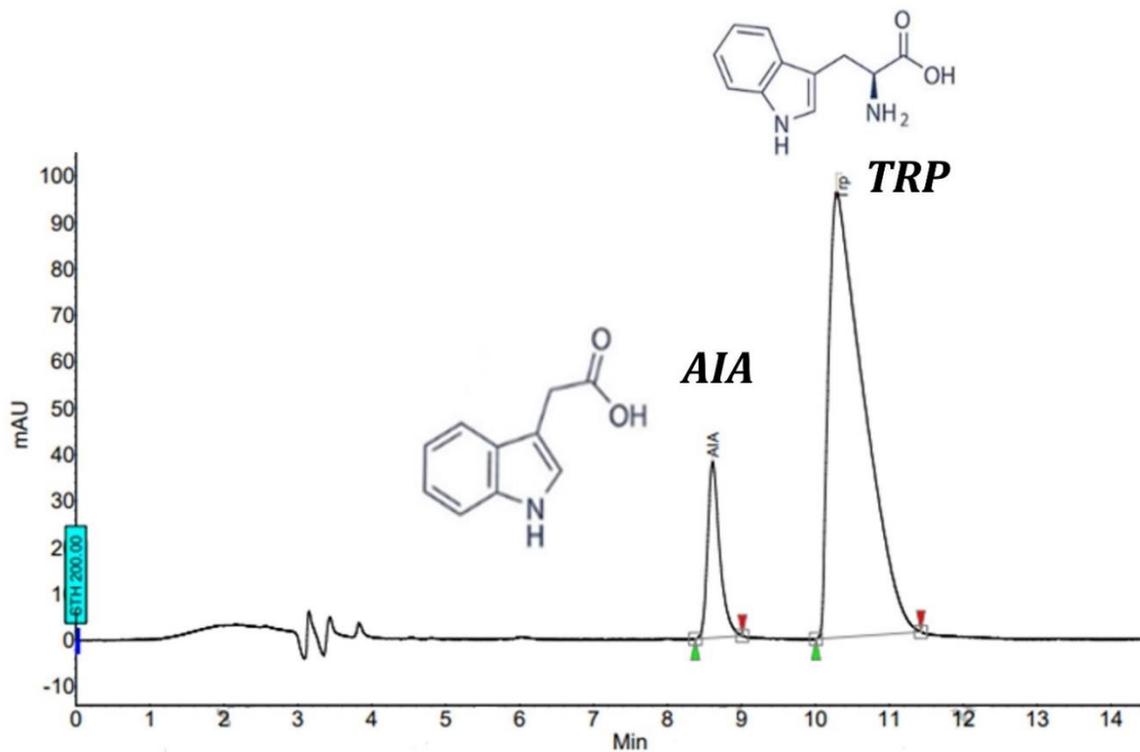
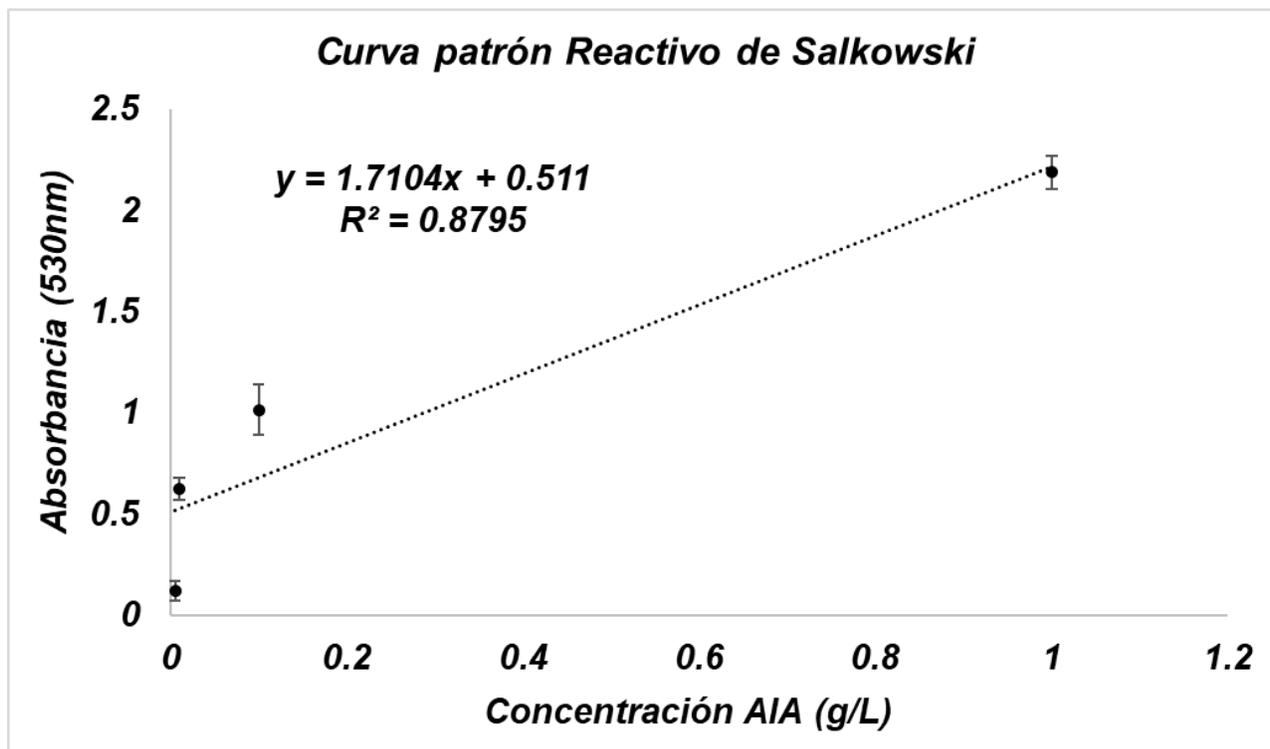


Figura 5. Cromatograma RP-HPLC para detección y cuantificación de Trp y AIA

## ANEXO B

### CURVA PATRÓN AIA. REACTIVO DE SALKOWSKI



Concentración AIA (g/L)	Absorbancia 530nm	Absorbancia 530nm Réplica	Absorbancia 530nm Promedio	Desviación estándar Abs
0.005	0.1217	0.2218	0.17175	0.05005
0.01	0.6241	0.7346	0.67935	0.05525
0.1	1.0163	1.2636	1.13995	0.12365
1	2.189	2.3494	2.2692	0.0802

## ANEXO C

### CÁLCULO DE PARÁMETROS CINÉTICOS

La tasa específica de crecimiento,  $\mu$  ( $h^{-1}$ ), se calculó mediante una regresión lineal de la concentración de biomasa vs IVC (Área bajo la curva utilizando el método numérico de Simpson). De igual manera se calculan los parámetros cinéticos  $q_s$  para cada sustrato y el consumo de *Trp* así como el valor de  $q_p$  para AIA en cada experimento.

