



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

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

**Análisis de modelos metabólicos a escala genómica de *Bacillus subtilis*
para la producción de ácido 3-indolacético.**

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

Presenta: FREDDY CASTILLO ALFONSO

Director: DR. ROBERTO OLIVARES HERNÁNDEZ

Asesor: DR. JUAN GABRIEL VIGUERAS RAMÍREZ

Asesor: DR. LUIS MANUEL ROSALES COLUNGA

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE, 2020

MÉXICO

DEDICATORIA

Los sentimientos de valor sólo pueden florecer en un ambiente donde se aprecien las diferencias individuales, se toleren los errores, donde la comunicación sea abierta y las reglas sean flexibles, el tipo de ambiente que se encuentra en una familia cariñosa.

A todas las personas que me rodean y me hacen sentir cada día en familia.

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. Además, contó para su realización con la colaboración del Laboratorio de Biotecnología Agroindustrial de la Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, bajo la asesoría del Dr. Luis Manuel Rosales Colunga y el laboratorio de Biotecnología del Departamento de Procesos y Tecnología (DPT) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa, bajo la asesoría del Dr. Juan Gabriel Vigueras Ramírez.

Freddy Castillo Alfonso contó con beca de posgrado CONACyT (CVU 943715) para realizar este trabajo.

Además se contó con el apoyo de la Dra. Gloria Soberón Chavéz y la M. en C. Alejandra Abigail González Valdéz del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.



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-práctico, fue conducido por el Dr Roberto Olivares Hernández de septiembre-2018 a noviembre-2020 en la UAM Cuajimalpa. El procedimiento experimental se llevó a cabo entre el Laborartrio de Bioprocesos de la Unidad Cuajimalpa y el Labororatorio de Biotecnología Agroindustrial de la Facultad de Ingeniería,Universidad Autónoma de San Luis Potosí.



DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F. el día 30 del mes de noviembre del año 2020, el (la) que suscribe Freddy Castillo Alfonso alumno (a) 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 (a) intelectual de la presente idónea comunicación de resultados titulada; “**Análisis de modelos metabólicos a escala genómica de *Bacillus subtilis* para la producción de ácido 3-indolacético**” realizada bajo la dirección de Roberto Olivares Hernández 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 (la) director (a) del trabajo como representante de la UAM. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: rolivares@correo.cua.uam.mx

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

Freddy Castillo Alfonso

Nombre y firma del alumno



DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“El que suscribe, Freddy Castillo Alfonso, alumno (a) 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 otras (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.”

Freddy Castillo Alfonso 

Nombre y firma del alumno



DECLARACIÓN DE NO LUCRO

El que suscribe, Freddy Castillo Alfonso, 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 Freddy Castillo Alfonso.

Freddy Castillo Alfonso 

Nombre y firma del alumno

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
I INTRODUCCIÓN	5
INTRODUCCIÓN	5
1.1 Justificación	6
II ANTECEDENTES	8
2.1 Características generales de los microorganismos y el metabolismo.	8
2.2 Bacterias como fábricas celulares	10
2.3 AIA como auxina	12
2.4 Microorganismos productores de AIA	14
2.4.1 <i>Bacillus subtilis</i>	14
2.5 Fuentes de carbonos utilizadas por <i>B. subtilis</i> para su crecimiento	16
2.5.1 Utilización de sustratos gluconeogénicos en la producción de compuestos de interés industrial.	17
2.6 Síntesis de AIA por <i>B. subtilis</i>	18
2.6.1 Vías metabólicas de síntesis de AIA	18
2.6.2 Vía indol-3-piruvato (IPA)	18
2.6.3 Vía indol-3-acetamida (IAM)	19

2.7	Ingeniería metabólica en microorganismos (IM)	20
2.7.1	FBA y Modelos Metabólicos	21
2.8	Modelos metabólicos a escala genómica de <i>B. subtilis</i>	25
2.9	Análisis del metabolismo celular utilizando herramientas computacionales . . .	27
III HIPÓTESIS		30
IV Objetivo		31
4.1	Objetivo general	31
4.1.1	Objetivos específicos	31
V METODOLOGÍA		33
5.1	Medios de cultivo y condiciones de cultivo	33
5.2	Toma de muestras	34
5.3	Análisis de muestras	35
5.3.1	Determinación de biomasa	35
5.3.2	Determinación de consumo de fuentes de carbono	35
5.3.3	Determinación de la producción de AIA	36
5.4	Cálculo de parámetros cinéticos	37
5.5	Extensión del modelo metabólico <i>iBSU147</i> de <i>B. subtilis</i>	37
5.6	Análisis del metabolismo por medio del modelo a escala genómica <i>iBSU1147+1</i>	38
VI RESULTADOS y DISCUSIÓN		39
6.1	Cultivo de <i>B. subtilis</i> utilizando cinco fuentes de carbono diferentes	39
6.2	Análisis de flujos metabólicos	45
6.2.1	Extensión del modelo metabólico a escala genómica <i>iBSU1147</i> de <i>Bacillus subtilis</i>	46

6.2.2	Modificación del modelo metabólico iBSU 1147	47
6.2.3	Predicción del crecimiento celular en diferentes fuentes de carbono utilizando el modelo metabólico iBSU 1147+1	48
6.2.4	Análisis de los flujos metabólicos utilizando el modelo metabólico a escala genómica de <i>Bacillus subtilis</i>	53
6.2.5	Análisis de eliminación de genes	57
6.2.6	Análisis de robustez y fenotipos de fase plana (PhPP)	59
VII CONCLUSIONES		64
VIIIPERSPECTIVAS		66
REFERENCIAS		87
Anexos		88
A Cromatogramas.		89
B Curva patrón de AIA.		92
C Cromatogramas.		94
D Cálculo de parámetros cinéticos.		96
E Búsqueda de genes metabólicos		98
F Prueba de Tukey <i>a posteriori</i>		99
G STRING (Herramienta de interacciones genes / proteínas)		101

H	BLASTtp (Herramienta de búsqueda de homología de genes)	103
I	Extensión del modelo <i>i</i>BSU1147 en lenguaje SBML 2.0	105
J	Distribuciones de flujos	106
K	Distribuciones de flujos	109
L	Restricciones de flujos	112

Índice de tablas

2.1	Modelos a escala genómica de <i>B. subtilis</i>	27
5.1	Medio mineral con diversas fuentes de carbono para los inóculos y producción de AIA.	34
6.1	Velocidad específica de crecimiento exponencial (μ), velocidades específica de consumo de sustratos (q_s FC y q_s Trp), velocidad específica de producción de producto (qp), rendimiento biomasa-sustrato $Y_{x/s}$ y rendimiento producto-sustrato $Y_{p/s}$ de <i>B. subtilis</i> en MMS suplementado con diferentes fuentes de carbono y Trp	42
6.2	Balance de carbono teniendo en cuenta los $Y_{x/s}$ y $Y_{p/s}$ obtenidos. El valor de la sumatoria de los rendimeeintos esta expresado en %	44
6.3	Comparación de parámetros cinéticos obtenidos a partir de datos experimentales y simulaciones computacionales.	49
6.4	Valor de flujo obtenido para producción de AIA al aplicar la estrategia de eliminación de genes. Se muestran resultados superiores a los obtenidos por la cepa silvestre.	59
5.1	98
10.1	Valores de la distribución de flujo simulada para <i>B. subtilis</i> utilizando GLU en fase exponencial A y estacionaria B . Los flujos se expresan en $mmol/gWC/h$	106
11.1	Valores de la distribución de flujo simulada para <i>B. subtilis</i> utilizando GLU , ACE , PRO , CITS y GLI como fuentes de carbono. Los flujos se expresan en $mmol/gWC/h$	109
11.1	Valores de la distribución de flujo simulada para <i>B. subtilis</i> utilizando GLU , ACE , PRO , CITS y GLI como fuentes de carbono. Los flujos se expresan en $mmol/gWC/h$	110

11.1	Valores de la distribución de flujo simulada para <i>B. subtilis</i> utilizando GLU , ACE , PRO , CITS y GLI como fuentes de carbono. Los flujos se expresan en <i>mmol/gWC/h</i>	111
12.1	Valores de flujo utilizados para restringir el modelo metabólico <i>iBSU1147+1</i> . Los flujos se expresan en <i>mmol/gWC/h</i>	112

Índice de figuras

2.1	Resumen esquemático del diseño, la optimización y la producción industrial por medio de las fábricas de células microbianas. (Tomado de "Engineering microbial cell factories for the production of plant natural products: from design principles to industrial-scale production" (p.3), [Liu et al., 2017], <i>Microbial Cell Factories</i> ,16(125)	11
2.2	Incorporación al metabolismo celular de los ácidos orgánicos acetato, citrato y propionato.	16
2.3	Vías de síntesis de AIA dependientes e independientes de <i>Trp</i> en microorganismos. (Tomado de "Efecto de diferentes concentraciones de ácido antranílico en el crecimiento del maíz" (p.58), [Hernández-Mendoza et al., 2010], <i>Revista Colombiana de Biotecnología</i> ,12(57-63))	19
2.4	Representación esquemática del metabolismo celular de un microorganismo(Tomado de "Yeast System Biology" (p.495), por Castrillo y Oliver, 2011, <i>Human Press</i> , (483-497))	24
6.1	Cinética de crecimiento de <i>B. subtilis</i> en MMS suplementado con <i>Trp</i> y diversas fuentes de carbono: A: GLU, B: ACE, C: PRO, D: CITs y E: GLI a las 0, 12, 18, 24, 36, 42 y 48 h.(Sustrato, Biomasa, AIA)	40
6.2	Comparación de la distribución del flujo de carbono en el metabolismo central utilizando GLU: Fase exponencial y Fase estacionaria. Los valores de flujo estan reportadas en $mmol/gWC/h$.	51
6.3	Distribución del flujo de carbono en el metabolismo central en cinco fuentes de carbono: GLU, ACE, PRO, CITs y GLI bajo las mismas condiciones de simulación: Max AIA. Los valores de flujo estan reportadas en $mmol/gWC/h$.	54

6.4 **Valores de flujo normalizado a distintas velocidades de crecimiento. Las velocidades de consumo de PRO qp son 3.5, 3.0 y 2.5 $mmol/L/h^{-1}$ correspondientes a las tasas de crecimiento μ_s de 0.06, 0.08 y 0.1 h^{-1} , respectivamente. Los flujos se normalizaron por las velocidades de consumo de PRO base de 100. 61**

Abreviaturas

Trp: triptófano

AIA: ácido 3-indolacético

GLU : Glucosa

ACE : Acetato de sodio

PRO: Propionato de sodio

CITs: Citrato de sodio

GLI: Glicerol

MMS: Medio Mínimo de Sales

G3P: gliceraldehído 3-fosfato

E4P: eritrosa 4-fosfato

PEP: fosfoenolpiruvato

SHI: shikimato

COR: corismato

PYR: piruvato

ATP: trifosfato de adenosina

NADH: difosfato de nicotidamina

3PG: 3-fosfoglicerato

TCA: ácidos tricarbónicos

PP: pentosas fosfato

R5P: ribosa 5-fosfato

IGP: indolglicerol fosfato

mCIT: metilisocitrato

CIT: citrato

MAL: malato

OAA: oxaloacetato

PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxyquinasa

isoCHO: isocorismato

IPA: indolpiruvato

RESUMEN

El ácido 3-indolacético (AIA) es una fitohormona que promueve el crecimiento radicular de las plantas permitiendo un mejor aprovechamiento de los nutrientes, su aplicación en la agroindustria ha ido incrementando en los últimos años para mejorar los rendimientos de los cultivos de semillas, frutas o legumbres. Las bacterias del género *Bacillus* son capaces de producir esta fitohormona bajo diversas condiciones de crecimiento con lo cual las hacen candidatas para ser ocupadas como fábricas celulares para la producción de AIA. Para comprender la capacidad de productiva de AIA y las rutas metabólicas involucradas, se pueden utilizar modelos metabólicos que permiten caracterizar el funcionamiento del metabolismo y plantear escenarios de producción óptima. Por tal motivo, en este trabajo se desea caracterizar, con apoyo de un modelo metabólico a escala genómica, la capacidad de producción de AIA de *Bacillus subtilis* cuando es cultivada en distintas fuentes de carbono, la cuales son: glucosa, acetato, propionato, citrato y glicerol; además se utiliza L-triptófano (*Trp*) como inductor. Con base en los datos cinéticos obtenidos experimentalmente, se observa que la mayor tasa de crecimiento exponencial se logró con glucosa como fuente de carbono ($\mu = 0.12 \text{ h}^{-1}$) y la más baja fue utilizando propionato ($\mu = 0.10 \text{ h}^{-1}$). Por el otro lado, la mayor concentración de biomasa se obtuvo con glucosa como fuente de carbono con un valor de 1.74 g/L y la menor concentración fue de 0.20 g/L cuando se utilizó citrato, el mejor rendimiento de producción de AIA se obtuvo utilizando propionato $Y_{p/s} = 0.98 \text{ (g AIA/g Trp)}$ y el más bajo se obtuvo con glucosa $Y_{p/s} = 0.80 \text{ (g AIA/g Trp)}$. Los datos cinéticos de cultivo se ocuparon en el cálculo de la distribución de flujos utilizando el modelo metabólico a escala genómica de *Bacillus subtilis*, el cual fue modificado para poder simular la producción de AIA. El modelo metabólico de escala genómica inicial iBSU1147 fue modificado añadiendo nuevos elementos como el gen IBSU19020; una reacción de síntesis

de **IAM** , una reacción de transporte de AIA al espacio extracelular y un nuevo metabolito , $AIA_{extracelular}$ que permitieron construir el modelo iBSU1147+1. Este nuevo modelo se utilizó para llevar a cabo las simulaciones en **COBRA Toolbox** 3.0 del software MATLAB® 2019. A partir del cálculo de la distribución de flujos se llevó a cabo un análisis comparativo entre las distintas fuentes de carbono y la capacidad de producción de AIA, además de diferentes análisis metabólicos basados en restricciones. Además del cálculo de distribución de flujos, se llevó a cabo el análisis de eliminación sencilla de genes el cual propone que existen 11 genes candidatos que pueden favorecer la producción de AIA. Los análisis de robustez mostraron a las enzimas que participan en la síntesis de **E4P** y **G3P** como posibles metabolitos limitantes en la síntesis de AIA.

ABSTRACT

3-indoleacetic acid (IAA) is a phytohormone that promotes plant root growth, allowing better use of nutrients and improving crop yield. Bacteria of the genus *Bacillus* are capable of producing this phytohormone under various growth conditions. To understand the difference in IAA productivity and the metabolic pathways responsible for producing it, metabolic models can be used that allow for optimal production scenarios. In this work we want to characterize with the support of a genomic-scale metabolic model the IAA production capacity of *Bacillus subtilis* with five carbon sources: glucose, acetate, propionate, citrate and glycerol, and using L-tryptophan (*Trp*) as an inducer. Based on the kinetic data obtained experimentally, it is observed that the highest growth rate was achieved with glucose as a carbon source ($\mu = 0.12 h^{-1}$) and the lowest was using propionate ($\mu=0.10 h^{-1}$). On the other hand, the highest concentration of biomass was obtained with glucose as a carbon source with a value of 1.74 g / L and the lowest concentration was 0.20 g / L when citrate was used, the best production performance of IAA was obtained using propionate $Y_{p/s} = 0.98$ (g IAA / g *Trp*) and the lowest was obtained with glucose $Y_{p/s} = 0.80$ (g IAA / g *Trp*). The culture kinetic data were used in calculating the flux distribution using the genomic-scale metabolic model of *Bacillus subtilis*, which was modified to simulate IAA production. The initial genomic scale metabolic model *iBSU1147* was modified by adding new elements such as the *IBSU 19020* gene; a synthesis reaction of **AMI**, a transport reaction of IAA to the extracellular space and a new metabolite, $IAA_{extracellular}$ that allowed to build the *iBSU1147+1* model. This new model was used to carry out the simulations in **COBRA Toolbox** 3.0 of the MATLAB ®2019 software. Based on the calculation of the flux distribution, a comparative analysis was carried out between the different carbon sources and the production capacity of IAA, in addition to different metabolic analyzes based on re-

strictions. Simple gene deletion analysis demonstrated the possibility of deleting 11 genes that may favor IAA production. The robustness analyzes showed the enzymes that participate in the synthesis of **E4P** and **G3P** as possible limiting metabolites in the synthesis of IAA.

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

El ácido 3-indolacético (AIA) es la principal auxina nativa de las plantas superiores [Zhao, 2010]. El AIA está involucrado en el crecimiento y desarrollo de las plantas, principalmente en una serie de procesos fisiológicos que incluyen el alargamiento y división celular, diferenciación de tejido y fototropismo [Davies, 2013]. En bacterias, la producción de AIA es una capacidad metabólica relevante [Lee et al., 2004], las plantas superiores exudan, entre otros componentes el aminoácido L-triptófano (*Trp*), y este es el principal precursor para la biosíntesis de AIA microbiano [Patten and Glick, 1996]. Se ha propuesto que el 80 % de las bacterias de la rizósfera son capaces de producir AIA y que se conserva un alto grado de similitud en las vías de síntesis de AIA entre plantas y bacterias [Patten and Glick, 2002], adicionalmente, diferentes vías de síntesis de AIA han sido identificadas en bacterias. Las vías de síntesis de AIA dependientes de triptófano más importantes y ampliamente distribuidas entre los microorganismos son la vía indol-3-piruvato (IPA) y la vía indol-3-acetamida (IAM) [Patten and Glick, 2002]; aunque se han descrito otras vías de síntesis de AIA independientes de *Trp*, que han sido estudiadas mediante mutantes y marcaje isotópico [Reyes-García et al., 2019].

La producción mundial de AIA contaba con un mercado de 8.5 millones de dólares en 2013 y continua su expansión en la actualidad. En México tiene un costo de 106.8 pesos por gramos de

AIA (CAS Number: **87-51-4**) y para la germinación de una plántula de *Solanum tuberosum* var. *Maria Reiche* se necesitan 0.25 gramos como suplemento de crecimiento [Medina et al., 2019].

La utilización de microorganismos como productores de compuestos químicos de interés comercial reduce el impacto medioambiental y su obtención a escala industrial resulta económicamente más atractiva [Castillo et al., 2005]. De esta manera, la necesidad por caracterizar las capacidades de producción de compuestos de valor industrial en los microorganismos ha propiciado el uso de datos genómicos y herramientas matemáticas. En los últimos años una aproximación matemática ampliamente utilizada es el Análisis de Balance de Flujos (**FBA**, siglas en inglés), que nos permite estudiar la distribución de flujos metabólicos a través de la red metabólica. Y en donde el flujo metabólico consiste en la distribución del carbono dentro de una red metabólica, es decir, la cantidad de materia en *mmol* de carbono por gramos de biomasa seca en el tiempo [Ramírez-Alvarado et al., 2018]. Con base en esta estrategia matemática es posible construir modelos metabólicos a escala genómica que permite abordar la distribución de materia en redes metabólicas. Este análisis ha guiado estrategias de ingeniería metabólica para la obtención de diferentes bioproductos. También ha facilitado la comprensión de la estructura biológica a escala genómica de diversos microorganismos y simular diversos escenarios metabólicos utilizando diferentes condiciones de cultivo celular [Orth et al., 2010].

1.1 Justificación

El AIA es un producto de interés agrobiotecnológico debido a su efecto de promotor del crecimiento vegetal. Para lograr su producción de manera rentable por medio de de forma rentable, es necesario optimizar los rendimientos y productividades. Para esto, se pueden utilizar herramientas de biología de sistemas e ingeniería metabólica como el modelado matemático y análisis del metabolismo. En particular, el análisis de flujos metabólicos puede hacer posible

explorar el balance de carbono a lo largo de la red metabólica y descubrir diferentes cuellos de botella en las rutas metabólicas, además de dilucidar mecanismos de regulación del sistema. Por lo tanto, es posible evaluar objetivos de producción para realizar ingeniería metabólica o modificaciones en las estrategias de cultivo que favorezcan la formación de un producto interés.

Aprovechando las ventajas del modelado matemático de redes metabólicas, con la presente propuesta se busca evaluar un sistema biológico como *Bacillus subtilis* y así poder aprovechar su potencial metabólico nativo para abordar estrategias en la producción de auxinas promotoras del crecimiento vegetal; en específico, AIA. Con el modelo del metabolismo se lleva a cabo una caracterización a nivel sistema con la finalidad de definir las capacidades metabólicas y estrategias de ingeniería que permitan optimizar la sobreproducción de estas fitohormonas. Como parte del proceso, se consideraron diferentes condiciones de cultivo teniendo como objetivo metabólico la producción de AIA. La evaluación de la producción del metabolito utilizando el modelo matemático se apoya con datos cinéticos experimentales.

Capítulo II

ANTECEDENTES

2.1 Características generales de los microorganismos y el metabolismo.

Los microorganismos se encuentran en todos los ambientes de nuestro planeta y participan en ciclos biogeoquímicos indispensables para la vida, poseen una gran adaptabilidad a diversas condiciones ambientales, además de distribuirse en la naturaleza en poblaciones mixtas [Olivares, 2016]. Los microorganismos procariotas, tienen algunas características como:

- Sus ribosomas, tiene un coeficiente de sedimentación de 70S, a diferencia de las células eucariotas, que es de 80S.
- La organización de su material genético es muy sencilla, pues consta solo de un cromosoma circular.
- La replicación del cromosoma bacteriano es bidireccional y posee un solo sitio de inicio de la replicación.

Para su reproducción y crecimiento, los microorganismos requieren de la formación de

biomoléculas que son sintetizadas por la misma célula, o se encuentran presentes en el medio donde crecen, este crecimiento necesita una fuente de energía para llevarse a cabo y así poder sintetizar compuestos fundamentales, para esto, llevan a cabo procesos ordenados de reacciones químicas, conocido como metabolismo[Castañeda Guillot, 2018]. Puesto que el metabolismo está compuesto por un gran número de reacciones las cuales deben funcionar de forma coordinada, existen mecanismos que permiten la regulación de este. Los aspectos generales del metabolismo son los siguientes:

1. Los sustratos son degradados e integrados a macromoléculas por una serie de reacciones entrelazadas, las cuales se denominan vías metabólicas.
2. El ATP se acopla a las vías que requieren o liberan energía. Las coenzimas NAD^+ , $NADP$, y $NADPH$, entre otras, están involucradas en reacciones de transferencia de grupos, así éstas se consumen y se reciclan continuamente en el metabolismo.
3. La oxidación del carbono proporciona la energía para la formación de ATP.
4. Existe un número ilimitado de reacciones y de intermediarios que son comunes en muchas rutas.
5. La regulación en el metabolismo se lleva a cabo de manera jerárquica y compleja, dado que existen factores de regulación globales y locales que se coordinan entre sí para dar paso a la expresión genética dependiendo de las condiciones ambientales.
6. Las vías metabólicas pueden clasificarse en dos grandes grupos: catabolismo y anabolismo

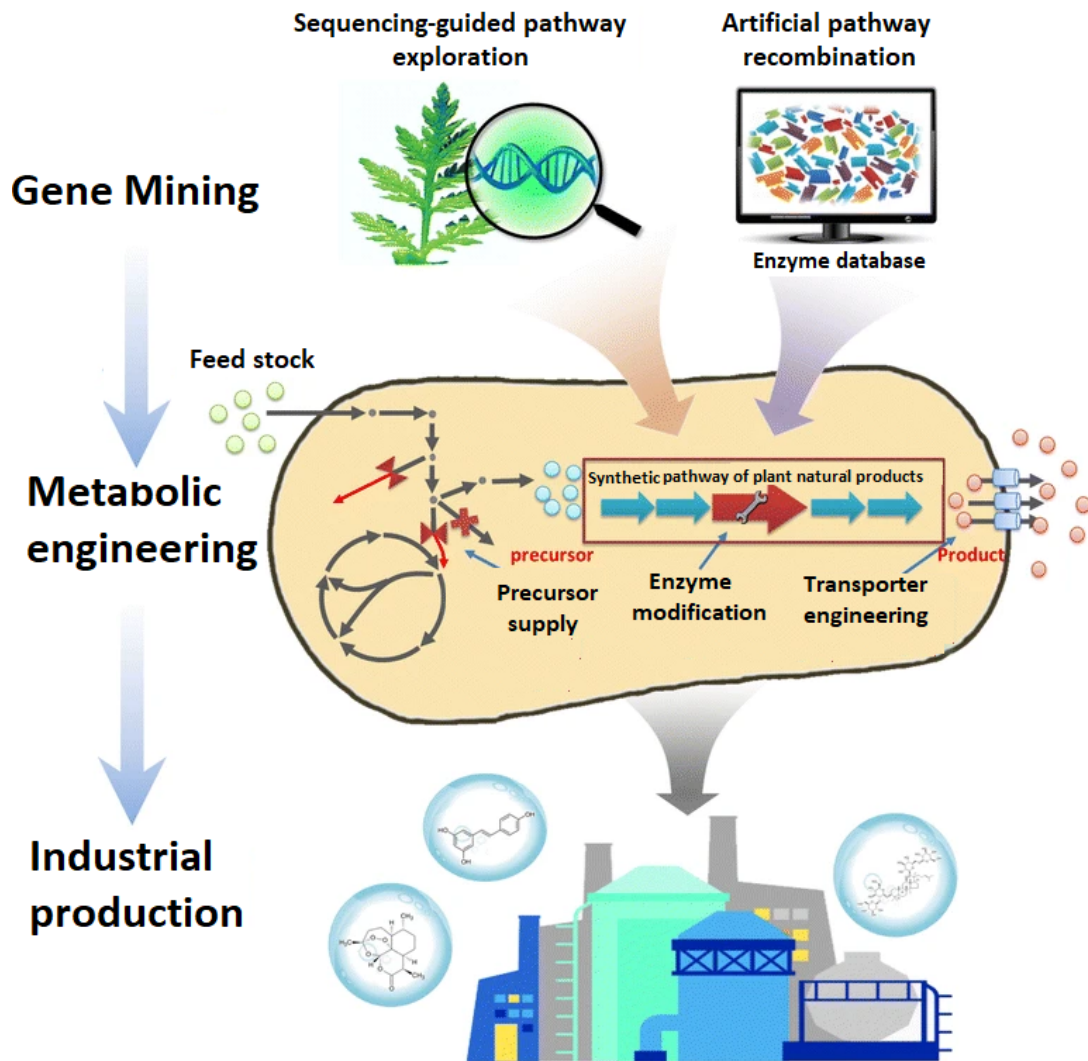
La energía producida en el catabolismo se utiliza en el anabolismo para formar estructuras complejas a partir de formas sencillas, ejemplo, ADN, ARN o proteínas. A algunas vías se les denomina vías anfibólicas, pues pueden ser tanto anabólicas como catabólicas. Como ya se mencionó anteriormente, las bacterias son muy versátiles, por lo que, para su crecimiento no son muy exigentes. Los requerimientos de oxígeno se reflejan según su metabolismo, y según

su relación con él, tenemos bacterias: anaerobias obligatorias, aerobias facultativas, aerobias estrictas y microaerófilos [Arias Negrete et al., 2018].

2.2 Bacterias como fábricas celulares

El uso de microorganismos como parte de las actividades humanas tiene registro desde las civilizaciones más antiguas, aunque fue en apenas poco más de un siglo que se comenzó a entender su existencia y función. De esta manera, la microbiología industrial se ha convertido en una tecnología clave para las industrias química y farmacéutica debido a la disminución de los recursos naturales y al aumento de las preocupaciones ecológicas [Nielsen and Keasling, 2016]. La protección del medio ambiente y la sustentabilidad son las promesas centrales. Sin embargo, para tener éxito, los procesos de producción microbiana deben ser económicamente viables para competir con las rutas clásicas de fabricación de productos químicos. El éxito económico de un enfoque microbiano para la producción química está dictado por tres puntos principales: la fuente de carbono renovable, el proceso de bioconversión y la purificación del producto [Punt et al., 2002]. Y es en el proceso de bioconversión en donde intervienen muchas de las estrategias de ingeniería celular.

Conforme se ha incrementado la necesidad de procesos de producción sustentable, el uso de microorganismos como los principales actores en el diseño de procesos ha generado una visión sobre éstos que es el de considerarlas como fábricas celulares (*del inglés, cell factories*). La Figura 2.1 describe las interrelaciones de los diferentes elementos dentro del diseño de fábricas celulares. Para crear un bioproducto industrial, una fuente de carbono renovable y económica debe transformarse por medio de un proceso económicamente factible alcanzando rendimientos y productividades altas de el producto interés y con la calidad deseada [Baeshen et al., 2014]. Uno de los enfoques para lograr este tipo de procesos se centra en las fábricas celulares, que tienen que adaptarse al sustrato y sus impurezas, y que dicta las necesidades de procesamiento posterior; mayor cantidad de unidades aumentan el costo global del proceso. En



2.1: Resumen esquemático del diseño, la optimización y la producción industrial por medio de las fábricas de células microbianas. (Tomado de "Engineering microbial cell factories for the production of plant natural products: from design principles to industrial-scale production" (p.3), [Liu et al., 2017], Microbial Cell Factories,16(125) .

consecuencia, un tema importante para la biotecnología industrial es la provisión del microorganismo con el metabolismo óptimo para alcanzar las condiciones de producción a gran escala [Marienhagen and Bott, 2013].

2.3 AIA como auxina

El AIA es un compuesto orgánico cuya fórmula molecular es $C_8H_6NCH_2COOH$. Es un ácido monocarboxílico que tiene un rol importante como hormona del crecimiento vegetal, por lo que pertenece al grupo de las fitohormonas denominadas auxinas. Entre sus funciones fundamentales se encuentra: aumentar la velocidad de crecimiento del xilema y de la raíz; ayudar en el mejoramiento de la longitud de la raíz, aumentando el número de ramificaciones de esta; aumentar la densidad de los pelos radiculares y raíces laterales que ayudan en la toma de nutrientes de los alrededores; estimular la proliferación de células en la zonas jóvenes de la planta, contribuye a la diferenciación de tejidos vasculares: xilema y floema, y tiene influencia en el aumento del diámetro del tallo. En particular, las fitohormonas son sustancias endógenas bioactivas presentes en las plantas que controlan diversos procesos del desarrollo vegetal [Brumos et al., 2018].

Las aplicaciones prácticas de estos compuestos son muy diversas, y su utilización actual en agricultura es frecuente y en continuo aumento [Grossmann, 2010]. La industria agroquímica proporciona un amplio repertorio de fitorreguladores que, en general, se obtienen por síntesis química. Por otra parte, la agricultura industrial, se enfrenta a una problemática importante debido a una mayor sensibilidad de la sociedad ante los problemas medioambientales y una mayor valoración de los productos ecológicos por los consumidores de los países desarrollados. Por tanto, existe un interés creciente en desarrollar una agricultura sostenible que sustituya la utilización masiva de plaguicidas, fertilizantes y reguladores del crecimiento sintéticos por productos naturales [Bhardwaj et al., 2014]. La síntesis microbiológica de fitohormonas puede constituir una alternativa viable en el contexto de una agricultura ecológica sostenible, ya que el desarrollo de procesos basados en fermentación para la producción de estos compuestos reduce el impacto medioambiental y su obtención a escala industrial puede resultar económicamente más atractiva. La eficacia de estas fitohormonas de origen biológico se ha comprobado en diversos estudios en los que se ha demostrado que su aplicación produce un aumento en los rendimientos y la calidad de las cosechas [Galavi et al., 2013].

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 conserva del suelo desde el punto de vista de fertilidad y biodiversidad [Paneque-Pérez, 2010]. En la actualidad el uso de bioinoculantes aplicados dentro de los sistemas de producción agrícola está teniendo un gran auge, especialmente para lograr una mayor disponibilidad de nutrientes que permitan un rendimiento sostenible de los cultivos, con la conservación del medio ambiente y una mayor producción. A nivel comercial, las auxinas se incluyen como ingrediente activo de numerosas preparaciones empleadas en horticultura. Entre las aplicaciones más populares citamos la inducción del desarrollo de raíces, así como el favorecimiento de floración uniforme, cuajado de frutos y prevención de caída prematura de frutos [Michelena et al., 2002].

La producción mundial de AIA contaba con un mercado de 8.5 millones de dólares en 2013, según Research Cosmos; para el 2016 se había incrementado a 10.7 millones de dolares [Cosmos, 2018]. Este incremento en el consumo de AIA es debido al aumento de su utilización como fertilizante en la producción de cultivos orgánicos. Sin embargo, es todavía insuficiente debido a la creciente demanda de hormonas promotoras del crecimiento vegetal en el mercado de vitroplantas y la germinación de semillas [Calzada et al., 2015]. Las tecnologías más empleadas para la producción de AIA son la síntesis química y la producción bacteriana [Sánchez García et al., 2014].

Los valores de productividad obtenidos por vía biológica son bajos comparados con la síntesis química, los métodos de purificación y concentración de este bioproducto son costosos; encareciendo así el valor de mercado de este producto [Cosmos, 2018]. Por este motivo, algunas técnicas como la inmovilización de microorganismos en diversos sustratos, la manipulación genética de los microorganismos productores y la utilización de herramientas bioinformáticas para la optimización del proceso de producción ofrecen posibles vías de desarrollo con el fin de disminuir los costos de este producto y aumentar la eficiencia en la síntesis de AIA [Palacios López, 2015].

2.4 Microorganismos productores de AIA

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (*del inglés*, **PGPR**) producen diversas auxinas como el AIA. Esta importante auxina secretadas por bacterias contribuiría a la reserva endógena de hormonas de la planta, imitando el efecto de la aplicación de AIA exógeno [Glick et al., 1999]. De esta forma, el AIA bacteriano estimularía el desarrollo del sistema radical y el crecimiento general de la planta huésped. Al mismo tiempo, el consecuente incremento en la producción de metabolitos vegetales, utilizados por las bacterias para su propio crecimiento, pondría de manifiesto un beneficio recíproco en la relación planta-bacteria [Patten and Glick, 2002].

Entre los microorganismos, las bacterias tienen especial importancia en la relación suelo-planta y son responsables del incremento o disminución en el suministro de nutrientes, así como también en la producción de fitohormonas; las bacterias pertenecientes a los géneros: *Azotobacter sp.*, *Azospirillum sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, se destacan por su potencial como biofertilizantes e inciden grandemente en el rendimiento y en la calidad de los cultivos [Dobbelaere et al., 2003].

La promoción de crecimiento radical es uno de los principales factores por los cuales se evalúa el efecto benéfico de las distintas **PGPR** (Tilak et al., 2006). La producción bacteriana de AIA y la alta sensibilidad de las raíces a dicha hormona sería fundamental en la respuesta a la inoculación (Turan et al., 2006). Bacterias que secretan bajos niveles de AIA estimularían la elongación de raíces, mientras que bacterias altamente productoras de auxinas promoverían la formación de raíces laterales o el desarrollo de pelos absorbentes (Glick et al., 1999).

2.4.1 *Bacillus subtilis*

El género *Bacillus sp.* destaca como uno de los principales géneros de **PGPR** utilizados para promover el crecimiento de las plantas [Patten and Glick, 2002]. *B. subtilis* es una bacteria Gram-positiva, esporuladora, en forma de bastón o bacilo, que tiene como hábitat natural la

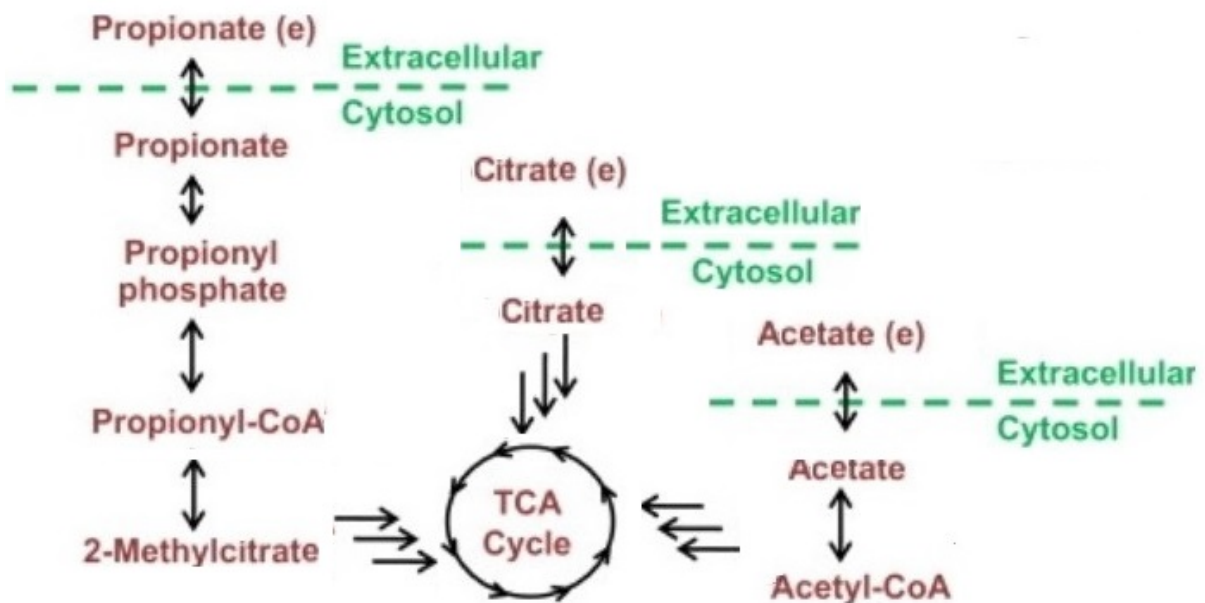
rizósfera de las plantas. Tiene una gran importancia en el crecimiento de las plantas y también en el control de enfermedades.

La primera aplicación biotecnológica conocida de *B. subtilis* se remonta a más de mil años, cuando ya se usaba para producir *natto*, un producto alimenticio japonés de soja fermentada. Hoy en día, es una bacteria mejor conocida como una fuente de enzimas útiles y productos bioquímicos finos, y como un huésped atractivo para la producción de proteínas heterólogas. Muchas proteasas y amilasas de uso comercial se originan a partir de *B. subtilis* y especies relacionadas de *Bacillus sp.* y se han utilizado en la industria para una amplia gama de bioprocesos [Schallmey et al., 2004]. Es importante destacar que es capaz de producir y segregar grandes cantidades de proteínas en el medio de cultivo ([Schallmey et al., 2004] [Bolhuis et al., 1999] [Meima et al., 2004]). Por lo tanto, es considerado como una fábrica de celular para la producción de enzimas industriales y productos biofarmacéuticos .

B. subtilis es altamente susceptible genéticamente y desarrolla de forma natural competencia genética para la incorporación de ADN exógeno en estado estacionario [López García, 2015]. Esta es una de las razones principales por las que estos bacilos se han utilizado ampliamente en investigación científica aplicada y fundamental durante más de 50 años. En 1990 se inició una colaboración de investigación entre Europa y Japón, con el objetivo de secuenciar todo el genoma de la cepa 168. Esto ha llevado a la publicación de toda la secuencia del genoma anotado en 1997 ([Kobayashi et al., 2003];[Tjalsma et al., 2004],[Zeigler et al., 2008]). Un proyecto internacional posterior llevó a cabo la identificación de todos los genes esenciales [Zeigler et al., 2008]. Hoy en día, el metabolismo de *B. subtilis* es uno de los más comprendidos y se ha convertido en la bacteria Gram positiva más estudiada. Se dispone de conjuntos de datos detallados sobre el transcriptoma [Wolff et al., 2007], el endoproteoma y exoproteoma [Tjalsma et al., 2004], componentes del secretoma [Clair et al., 2010] y el metaboloma [Meyer et al., 2013] que representan una fuente de datos extensa y confiable para la investigación sobre esta especie.

2.5 Fuentes de carbonos utilizadas por *B. subtilis* para su crecimiento

Una de las principales bases para comprender el potencial biotecnológico de *B. subtilis* es el conocimiento de su metabolismo central del carbono. Estas bacterias prefieren los azúcares y amoníaco como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. La fuente de carbono preferida es la glucosa [Buffing et al., 2018], la cual es absorbida y fosforilada a través del sistema PTS [Gu et al., 2017]. La incorporación de esta fuente de carbono conlleva a la oxidación de glucosa a dióxido de carbono y la generación de ATP, una fuerza motriz de protones, potencial reductora e intermediarios para todas las reacciones anabólicas. Adicionalmente, *B. subtilis* es capaz de consumir otras fuentes alternas a los azúcares, tales como lo ácidos orgánicos. Posee todos los genes que codifican para las enzimas que participan en ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) y puede crecer en la mayoría de los intermediarios del ciclo de TCA como únicas fuentes de carbono [Michna et al., 2016]. En la 2.2 se aprecia como se incorporan diversos ácidos orgánicos al metabolismo celular al nivel del TCA.



2.2: Incorporación al metabolismo celular de los ácidos orgánicos acetato, citrato y propionato.

La capacidad de este organismo de crecer en citrato y glicerol como fuente de carbono ha sido reportada [Halmschlag et al., 2020]. La absorción de glicerol está mediada por la proteína facilitadora GlpF y luego de ser internalizado es fosforilado por la glicerol quinasa [Yang et al., 2020]; la incorporación de citrato ocurre a través de dos transportadores, CitM y CitH codificados por el gen *yxiQ* [Soares-Silva et al., 2020]. También posee la capacidad de crecer en diferentes ácidos orgánicos, tales como: acetato, propionato, butirato, succinato y formato [Galushko and Kuever, 2019].

2.5.1 Utilización de sustratos gluconeogénicos en la producción de compuestos de interés industrial.

B. subtilis ha sido utilizado ampliamente para producir a través de fermentaciones aeróbicas diferentes compuestos de alto valor industrial como enzimas, antibióticos, nucleótidos y polihidroxitirato (**PHB**) [Zhang et al., 2011]. Tradicionalmente, estos procesos productivos se han llevado a cabo utilizando principalmente glucosa u otros azúcares como fuente de carbono [Fischer et al., 2008]. Se ha demostrado que según el punto de entrada al metabolismo celular de una fuente de carbono puede causar variaciones en los valores de flujos a través de las reacciones más cercanas y así favorecer la formación de ciertos intermediarios metabólicos [Zhao and Shimizu, 2003]. Existen casos de éxito de utilización de sustratos gluconeogénicos como fuente de carbono en procesos productivos como son :

- Producción de γ -PGA (33.84–35.34 g/L) por *Bacillus sp.* utilizando citrato de sodio como fuente de carbono [Peng et al., 2015].
- Producción de polihidroxiálcanoatos (PHA) (1.27 g/L) por *E. coli* utilizando acetato como fuente de carbono [Chen et al., 2018]

2.6 Síntesis de AIA por *B. subtilis*

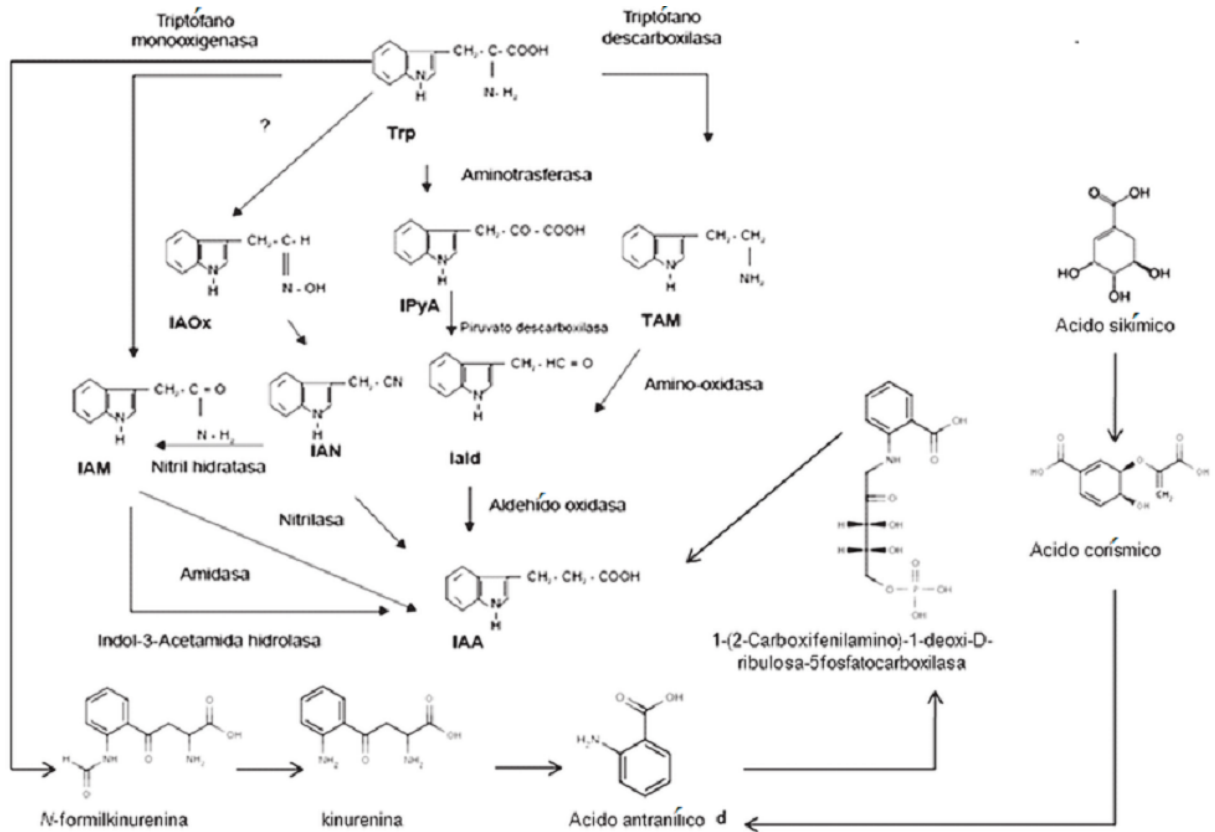
La producción de AIA por bacterias puede variar entre diferentes especies y está determinada por las condiciones del cultivo, la etapa de crecimiento y la disponibilidad de sustrato [Latif Khan et al., 2016]. La síntesis de AIA está considerada parte del metabolismo secundario de *B. subtilis* y su formación se lleva cabo durante la fase estacionaria del crecimiento ([Ali et al., 2009], [Sivasakthi et al., 2013a]).

2.6.1 Vías metabólicas de síntesis de AIA

El AIA se puede sintetizar a partir de *Trp* (rutas dependientes) o a partir de un precursor de *Trp* (rutas independientes). El *Trp* puede ser convertido a AIA por medio de distintas rutas biosintéticas como se muestra en la Figura 2.3.

2.6.2 Vía indol-3-piruvato (IPA)

La vía IPA es considerada como la más conservada en plantas superiores, aunque muchos genes y enzimas no han sido identificados en este tipo de organismos [Kamilova et al., 2006]. Esta vía metabólica también ha sido descrita en algunos géneros bacterianos como *Bradyrhizobium sp.*, *Azospirillum sp.*, *Rhizobium sp.*, además, de algunas cianobacterias. Esta vía convierte *Trp* a IPA por una aminotransferasa. Luego el IPA se descarboxila a ácido indol-3-acetaldehído, siendo esta la etapa limitante de la síntesis. El gen *ipdC* que codifica para la enzima **IPDC** ha sido caracterizado en algunas bacterias como *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas putida* [Orth et al., 2010].



2.3: Vías de síntesis de AIA dependientes e independientes de *Trp* en microorganismos. (Tomado de "Efecto de diferentes concentraciones de ácido antranílico en el crecimiento del maíz" (p.58), [Hernández-Mendoza et al., 2010], Revista Colombiana de Biotecnología,12(57-63)) .

2.6.3 Vía indol-3-acetamida (IAM)

La vía IAM se encuentra ampliamente descrita y presente en la mayoría de las bacterias que sintetizan AIA, pero no ha sido descrita en plantas [Spaepen et al., 2007]. Esta vía contribuye a la virulencia de algunos microorganismos patógenos debido a la excesiva producción de AIA [Persello-Cartieaux et al., 2003]. Esta ruta metabólica ha sido ampliamente caracterizada y comprende dos etapas, primera, el triptófano es convertido en IAM por la enzima triptófano 2-monooxigenasa. En la segunda etapa, el IAM es convertido a AIA y amonio. Esta vía se ha documentado en *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas aureginosa*, *Pseudomonas syringae* y *Bacillus subtilis* [Yang et al., 2007].

2.7 Ingeniería metabólica en microorganismos (IM)

La biosíntesis de compuestos de interés comercial utilizando microorganismos ha surgido como una alternativa a los procesos de síntesis química, o a su extracción de plantas superiores, ya sean modificadas genéticamente o no. La ingeniería de microorganismos ofrece muchas ventajas sobre los sistemas vegetales en cuanto a producción y purificación. Las ventajas más importantes son: en primer lugar, el conocimiento genético y metabólico, que permite analizar mejores estrategias de ingeniería genética y en segundo lugar, el conocimiento de procesos biotecnológicos y de los protocolos de escalamiento que han sido ampliamente trabajados, lo que reduce el tiempo en el desarrollo de una plataforma de producción.

Para poder establecer un organismo como plataforma de producción de algún compuesto de interés es necesario aumentar los flujos de carbono hacia las síntesis de dicho compuesto. Existen las estrategias de eliminación, inserción y sobreexpresión de los genes que codifican a las enzimas que catalizan los pasos limitantes, es a través de estas estrategias que se pueden redirigir los flujos del metabolismo. Sin embargo, debido a los complejos mecanismos de interacción y control genético que existen entre las rutas biosintéticas, es difícil predecir las mínimas modificaciones genéticas para explotar la máxima capacidad de productividad en función del fenotipo deseado [Asadollahi et al., 2009].

La ingeniería metabólica ha sido ampliamente utilizada para mejorar las capacidades metabólicas de muchos microorganismos entre los que se encuentra *B. subtilis*. Por mencionar solo algunos casos de la utilización de esta herramienta con éxito en este organismo están los siguientes:

- Creación de un circuito de expresión génica bifuncional *in vivo* a través de un mecanismo regulador basado en aptámeros para ajustar el circuito regulador de la expresión génica sensible a la trombina y aumentar la producción de 2-fucosilactosa, oligosacárido de la leche humana [Deng et al., 2019]

- Creación de un operón sintético que contiene los genes que codifican para las enzimas de la vía del el 2-*C*-metil-*D*-eritritol-4-fosfato (MEP) y así poder sobreexpresar estas enzimas que participan en la biosíntesis de taxadieno como primer paso comprometido para la producción de taxol [Abdallah et al., 2019]
- Inserción del gen *ldhA* que contiene la información para la síntesis de la enzima D-lactato deshidrogenasa para la producción de *D*-ácido láctico en este microorganismo; estrategia elegida debido a que carece de este gen en su genoma [Awasthi et al., 2018]
- Manipulación de la vía biosintética de la *L*-valina eliminando factores de regulación transcripcional y alostéricos utilizando el sistema **CRISPR** para la sobreproducción de *L*-valina [Westbrook et al., 2018]

2.7.1 FBA y Modelos Metabólicos

Las estrategias de la ingeniería metabólica pueden ser auxiliadas por medio de herramientas matemáticas y computacionales. Por ejemplo, se construyen modelos metabólicos a escala genómica los cuales representan la interacción entre genes y reacciones metabólicas en un organismo. Una de las aproximaciones comúnmente usadas para modelar matemáticamente el metabolismo celular son los denominados modelos estequiométricos los cuales se construyen con base en la estequiometría de las reacciones. Por medio de llevar a cabo los balances de materia en cada metabolito es posible contruir un problema de programación lineal, a esta metodología se le denomina FBA (**Flux Balance Analysis**) [Asadollahi et al., 2009]. Este tipo de análisis permite calcular la distribución de los flujos metabólicos intracelulares y evaluar las posibles estrategias de ingeniería para aumentar la producción del metabolito de interés.

El primer paso en el FBA es la construcción matemática a partir de las reacciones metabólicas para lo cual se requiere de una red metabólica que represente las reacciones más importantes del sistema estudiado. Para la construcción de dicho modelo matemático se debe establecer un balance de masa sobre cada metabolito interno involucrado en la red metabólica. Se generan

un conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias las cuales se pueden representar en forma matricial:

$$\frac{dC}{dt} = S \cdot \vec{v} - \mu C \quad (2.1)$$

En donde C es el vector de concentración de cada metabolito al interior de la célula, μ es la velocidad específica de crecimiento, \vec{v} es el vector de tasas de reacción (valores del flux) y S es la matriz estequiométrica de dimensión $m \times n$; con m metabolitos y n reacciones. Una reacción muy importante en esta matriz es la síntesis de biomasa, la cual es matemáticamente representada al adicionar una reacción cuyos coeficientes estequiométricos son los valores requeridos de moléculas de ARN, ADN, proteínas y otras biomoléculas utilizadas para formar un gramo de biomasa. [Ramírez-Alvarado et al., 2018]. La ecuación 2.1 se puede reducir suponiendo un estado pseudoestacionario del crecimiento celular, el cual se logra durante la fase exponencial. El cual implica que la concentración de cada metabolito al interior de la célula permanece constante durante el periodo de tiempo en el que se hace el cálculo de la distribución de flujos; generalmente es el estado estacionario. Este supuesto es razonable debido a que el metabolismo opera a escalas mucho más rápidas que la dinámica extracelular [Terzer et al., 2009].

$$0 = S \cdot \vec{v} \quad (2.2)$$

La ecuación 2.2 es un sistema de ecuaciones el cual se tiene que resolver para encontrar la distribución de flujos \vec{v} . Debido al tamaño de la red metabólica se tienen mayor número de incógnitas que ecuaciones, por lo que el sistema tiene un alto número de grados de libertad, los cuales son experimentalmente difíciles de cubrir. Debido a esto, se planteó un problema de optimización lineal, y a este planteamiento se le denominó FBA.

Durante el desarrollo de esta estrategia se imponen restricciones al flujo de las reacciones como establecer límites superiores e inferiores permitiendo generar un espacio solución. FBA no requiere de parámetros cinéticos, a diferencia de modelos que basados en ecuaciones diferenciales ordinarias y que requieren de parámetros cinéticos difíciles de obtener [Orth et al., 2010]. Restricciones adicionales a menudo son consideradas para reducir el espacio nulo, de tal forma que las predicciones del FBA puedan ser mejoradas. Algunos ejemplos de estas restricciones son: la compartimentalización de metabolitos y de reacciones, la reversibilidad de las mismas, el mínimo y máximo teórico para algunos flujos, la cantidad de ATP requerida para mantener, o la mínima y máxima tasa de crecimiento [Cardoso Chicué and Prieto Cristacho, 2016].

El segundo paso en el análisis FBA es la optimización de uno o más flujos. En un sistema de ecuaciones subdeterminado, como los que existen en los modelos a escala genómica ($n > m$), existen múltiples soluciones dentro del espacio nulo. Dicho espacio define el rango de todos los fenotipos permisibles, de los cuales sólo un conjunto particular suele ser de interés, o puede ser viable biológicamente. Para encontrar tal conjunto hay que establecer una función objetivo que represente al estado biológico buscado, que posteriormente se debe optimizar. Además, cabe 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 [Otero et al., 2010]. El planteamiento matemático final se expresa como:

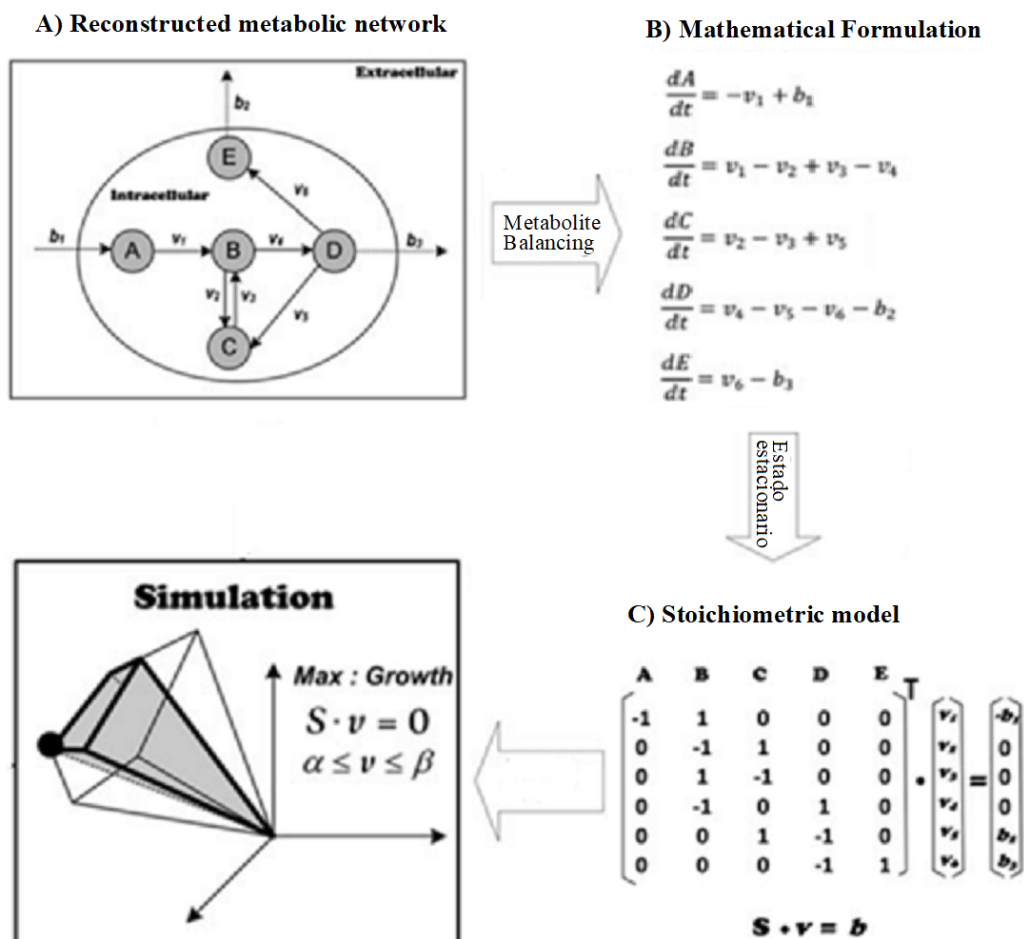
$$\max/\min Z = c^T \cdot \vec{v} \quad (2.3)$$

$$\text{sa. } S \cdot \vec{v} = 0 \quad (2.4)$$

$$lb_j \leq v_j \leq ub_j \quad (2.5)$$

Donde lb_j y ub_j son los límites de flujo inferiores y superiores para la reacción j , y donde c^T es un vector de ponderación que indica la contribución de cada reacción a la función objetivo.

De esta forma, el sistema de ecuaciones puede ser resuelto usando algoritmos de programación lineal, para determinar un conjunto de flujos que optimice la función objetivo [Orth et al., 2010]. Las funciones objetivo pueden ser utilizadas para probar las capacidades de la red metabólica y para representar posibles diseños que la mejoren. Hasta la fecha, la función objetivo más utilizada ha sido la maximización de biomasa, que ha entregado predicciones coincidentes con datos experimentales [Mahadevan et al., 2002]. Sin embargo, hay que tener especial cuidado en la definición de dicha ecuación ya que se ha visto un aumento en las discrepancias entre los datos experimentales y las predicciones si se utiliza una composición de biomasa errónea, ya sea por tomar referencia de otro organismo o una medición e implementación incorrecta [Pramanik and Keasling, 1997].



2.4: Representación esquemática del metabolismo celular de un microorganismo (Tomado de "Yeast System Biology" (p.495), por Castrillo y Oliver, 2011, Human Press, (483-497)) .

En la Figura 2.4 se muestra de manera simplificada y esquemática el razonamiento biológico-

matemático-computacional que se debe llevar a cabo para realizar un FBA.

Aunque el modelado matemático basado en la estequiometría se basa en la suposición de un estado pseudoestacionario, el análisis sigue siendo válido incluso en condiciones transitorias siempre que el cambio en las concentraciones de metabolitos intracelulares sea relativamente menor en comparación con los flujos a través de la reacción [Martínez et al., 2013]. Iwatani *et al* en 2007 utilizaron el análisis de marcaje con carbono isotópico (C^{13}) combinando el modelado estequiométrico para calcular las distribuciones de masa de los aminoácidos proteínogénicos en diferentes estados del crecimiento y así determinar las distribuciones de flujo metabólico en diferentes etapas a lo largo del cultivo [Iwatani et al., 2007]. Usando este enfoque, y a partir de la comparación de las distribuciones de flujo en las fases exponencial y estacionaria, identificaron un aumento significativo en el valor de flujo metabólico asociado con el ciclo de PEP-glioxilato; quedando demostrada la sensibilidad del método aplicado en la cuantificación de flujos. Alam *et al* en 2010 utilizaron modelado estequiométrico para estudiar la transición de fase exponencial a la estacionaria (“**switch**” metabólico) en *Streptomyces coelicolor*. Este estudio demostró que se puede estudiar mediante este tipo de modelado el cambio o transición dinámica de una fase de crecimiento a otra [Alam et al., 2010] .

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

La secuenciación del genoma de *B. subtilis* y su posterior anotación funcional ha permitido la construcción de redes metabólicas a escala del genoma con un alto número de reacciones interrelacionadas con los datos de genes y enzimas. El primero en secuenciar el genoma de *B. subtilis* fue Kunst et al., en 1997 y fueron reportados 4100 genes que codifican a proteínas, la secuencia del genoma anotada impulsó los estudios para las construcciones de redes metabólicas de *B. subtilis* y de esta manera fueron construidos los primeros modelos metabólicos a escala genómica (*del inglés, GSMM*)[Kunst et al., 1997]. En consecuencia, los primeros tres GSMM publicados fueron por parte de: Oh et al., 2007; Goelzer et al., 2008 y Henry et al., 2009 ;

pueden considerarse como la primera generación de GSMM de *B. subtilis* [Goelzer et al., 2008]. Estos modelos se basaron en la anotación del genoma de Kunst et al., en 1997 (Tabla 2.1). A partir de entonces, los GSMM de segunda generación de Tanaka et al., 2013 y Hao et al., 2013, fueron reconstruidos después de la anotación del genoma de Barbe et al., 2009 ([Barbe et al., 2009],[Tanaka et al., 2013]).

El primer modelo a escala genómica de *B. subtilis* fue el *iYO844* [Oh et al., 2007]. Esta red consiste en 844 genes, 1020 reacciones y 988 metabolitos. Las predicciones de dicho modelo se ajustan a los datos experimentales de distintos cultivos y considerando diversas eliminaciones de genes. A partir de dicha reconstrucción, se han desarrollado varios modelos por diversos equipos de investigación, los cuales han ido aportando al conocimiento del metabolismo de *Bacillus subtilis*.

El modelo *iBSU1103* introdujo mayor cantidad de genes asociados a reacciones y logro identificar una mayor cantidad de metabolitos. Este modelo contiene 1103 genes [Henry et al., 2009]. El modelo fue validado contra un conjunto de datos experimentales que consta de 1, 500 condiciones distintas y fue validado mediante el uso de un método de optimización de modelo mejorado para aumentar la precisión del modelo de 89.7 a 93.1 %.

Posteriormente el modelo *iBSU1147* añadió 43 nuevos genes metabólicos al modelo anterior que se había reportado para este organismo [Hao et al., 2013]. Este consiste en 1147 genes, 1742 reacciones (1198 metabólicas; 290 de transporte; 254 de intercambio) y 1456 metabolitos (1202 intracelulares; 254 extracelulares). La calidad de *iBSU1147* fue validada mediante predicciones de crecimiento en diferentes fuentes de carbono, y la eliminación de genes esenciales y genes no esenciales.

Todas estas reconstrucciones se realizaron independientemente, usando distintos datos e integrando la información de literatura, lo que ha motivado al desarrollo de modelos metabólicos de diferentes generaciones y con distinto nivel de profundidad en la anotación. Estas reconstrucciones se han apoyado en herramientas de integración de datos, diversas bases de datos y diversos algoritmos de optimización [Hao et al., 2013].

Tabla 2.1: Modelos a escala genómica de *B. subtilis*

Anotación del genoma	Modelo metabólico (GEM)	Aplicación
Kunst et al., 1997	Oh et al., 2007	Producción de Biomasa
Kunst et al., 1997	Goelzer et al., 2008	Producción de Biomasa
Kunst et al., 1997	Henry et al., 2009	Producción de Biomasa
Barbe et al., 2009	Tanaka et al., 2013	Producción de Biomasa
Barbe et al., 2009	Hao et al., 2013	Producción de Biomasa, riboflavina

2.9 Análisis del metabolismo celular utilizando herramientas computacionales

El modelado matemático del metabolismo celular tiene como un posible objetivo generar escenarios de producción óptima, proporcionando un ahorro considerable de tiempo y experimentos, por este motivo, apoyan la realización de trabajos de ingeniería metabólica. Existen varios tipos de análisis basados en imponer restricciones o perturbaciones a un modelo metabólico a escala genómica para lograr evaluar escenarios que permitan predecir incremento en la productividad y desempeño del sistema biológico. [Fernández-Oliva et al., 2012].

Un análisis de eliminación de genes consiste en la remoción de un gen del modelo metabólico a escala genómica y la posterior optimización de una función objetivo determinada. Los métodos de eliminación de genes dependen de la configuración adecuada de la matriz de reacción de genes, así como de las reglas que definen la relación booleana entre genes y reacciones. Las reacciones que se ven afectadas por la delección de un gen tienen sus límites de flujo superior e inferior establecidos en cero y, por lo tanto, no son funcionales. El conjunto de reacciones sobre las que tiene un efecto la delección de un gen se calcula utilizando la asociación y las reglas de la reacción del gen [Lavoie et al., 2020]. Basándose en el modelo de gene-proteína-reacción (**GPR**, según sus siglas en inglés) de *S. cerevisiae* *iND750* y el método de análisis basado en restricciones, se determinó el impacto de la delección de 438 genes calculables, uno por uno, y su impacto en la redistribución del flujo metabólico de *S. cerevisiae* [Xu et al., 2008]. Esta técnica de eliminación de componentes genéticos y reguladores ha sido utilizada como herramienta de

análisis para lograr sobreproducir compuestos. En *B. licheniformis* se eliminó el gen que codifica la piruvato quinasa (**PYK**) para favorecer la acumulación de **PEP** durante la producción de shikimato [Zuo et al., 2018]. En *S. cerevisiae* se ha reportado la eliminación del gen *Aro4* que codifica para la enzima 3-desoxi-*D*-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintasa y así aumentar la producción del aminoácido aromático *L*-Tirosina [Gold et al., 2015].

Las características fenotípicas de un organismo pueden ser investigadas a través del estudio de su estructura, su metabolismo y la regulación genética, entre otras. En sistemas biológicos, la robustez es la capacidad que posee el organismo para mantener su fenotipo a pesar de ser sometido a perturbaciones (internas o externas) [Kitano, 2004]. En redes metabólicas, la robustez puede relacionarse con el cambio en el valor de la función objetivo cuando se generan perturbaciones en un flujo de una reacción metabólica particular [Larhlmi et al., 2011]. Por tanto, se espera que un análisis basado en redes metabólicas de un sistema biológicos ofrezca la posibilidad de relacionar la robustez del sistema con la estructura y la interconexión de los componentes del sistema. Los análisis de robustez basados en optimización asumen que la red metabólica se puede modificar para optimizar la formación de un compuesto dado y así conocer como cambia la magnitud del flujo metabólico a través de una reacción específica de interés cuando se evalúa una función objetivo específica. A partir del grado de dependencia de la red con ese nodo de reacción se puede analizar la importancia de esa reacción a manera global en todo el sistema [Becker et al., 2007]. Existen diversos métodos para normalizar los datos obtenidos de este tipo de análisis, Zang et al., en 2008 analizaron la robustez del metabolismo del glicerol en *Klebsiella pneumoniae* normalizaron sus datos estableciendo que todos los valores de flujos obtenidos debían ser divididos por el consumo de sustrato y luego reportarse en escala de 100.

Un estudio de Fenotipos de Fase Plana (**PhPP**, según sus siglas en inglés), se utiliza para conocer como pueden impactar en el fenotipo de un microorganismo diversas variaciones externas. Computacionalmente, se lleva a cabo una proyección bidimensional del conjunto factible de soluciones para el crecimiento o producción de un compuesto y a su vez se puede variar dos o más parámetros simultáneamente, con base en esto se desea observar el comportamiento del

fenotipo al trazar los diversos planos obtenidos [Edwards and Palsson, 2000]. Estas variaciones impactan de manera significativa en el fenotipo mostrado por la cepa utilizada en función del tiempo de crecimiento y el consumo de los diferentes sustratos empleados. Edwards y Palsson en el año 2000 utilizaron este tipo de estudio para analizar el comportamiento de posibles mutantes de *E. coli* al crecer en medio mínimo con glucosa y el impacto de eliminar productos génicos asociados al metabolismo aerobio de esta bacteria.

Capítulo III

HIPÓTESIS

Por medio del modelo metabólico a escala genómica de *Bacillus subtilis* se puede calcular la distribución de flujos para evaluar la producción de AIA utilizando distintas fuentes de carbono y plantear escenarios para optimizar su producción.

Capítulo IV

Objetivo

4.1 Objetivo general

Calcular la distribución de flujos y evaluar la capacidad de producción de AIA en *Bacillus subtilis* utilizando el modelo metabólico a escala genómica.

4.1.1 Objetivos específicos

1. Llevar a cabo cultivos de *Bacillus subtilis* utilizando cinco diferentes fuentes de carbono: glucosa, acetato, propionato, citrato y glicerol.
2. Evaluar la cinética de crecimiento y producción de AIA para cada una de las fuentes de carbono analizadas.
3. Modificar el modelo metabólico a escala genómica *iBSU 1147* incluyendo las reacciones para la síntesis de AIA que se encuentran reportadas en la literatura.
4. Calcular y comparar los flujos metabólicos para cada una de las fuentes de carbono utilizando el modelo metabólico a escala genómica modificado: *iBSU1147+1*.

5. Con base en el modelo metabólico a escala genómica generar: un análisis de eliminación simple de genes, un análisis de robustez y fenotipos de fase planas para evaluar la optimización de la producción de AIA.

Capítulo V

METODOLOGÍA

5.1 Medios de cultivo y condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa de *Bacillus subtilis* W168 del banco celular del laboratorio de Biotecnología de la UAM-Cuajimalpa. Esta cepa es protótrofa y esporuladora [Zeigler et al., 2008].

Para los cultivos se partió de cepas bacterianas almacenadas en crioviales en medio LB, usando glicerol como crioprotector al 25 %, a una temperatura de -80 °C. A partir de los crioviales, las cepas se sembraron en agar L, se inoculó utilizando el método de estriado, y las placas se incubaron por 24 horas a 28 °C. Los inóculos se realizaron en matraces bafleados con 25 mL de medio mínimo de sales M9 modificado [Andrzejczak and Lonc, 2008] suplementados con *Trp* y diversas fuentes de carbono: Glucosa, Acetato, Propionato, Citrato y Glicerol (Tabla 5.1). Fueron inoculados con 3 colonias aisladas tomadas de las placas cultivadas anteriormente. Los matraces se incubaron con agitación de 220 rpm durante 24 horas a 30 °C. Cada inóculo contó con una sola fuente de carbono presente en el medio de cultivo.

A partir del inóculo obtenido fueron realizadas las cinéticas de crecimiento en matraces bafleados con 50 mL de medio mínimo con diversas fuentes de carbono suplementado con *Trp* (Tabla 5.1) inoculando con 0.01 g/L de biomasa tomadas de los inóculos cultivados anterior-

Tabla 5.1: Medio mineral con diversas fuentes de carbono para los inóculos y producción de AIA.

Componente	Concentración (g/L)
Cloruro de Sodio	24
Cloruro de Potasio	0.7
Fosfato de Potasio	2.0
Sulfato de Magnesio heptahidratado	1.0
Fosfato ácido di sódico	3.0
Nitrato de Amonio	1.0
Glucosa	2.0
Acetato de sodio	1.25
Propionato de sodio	1.25
Citrato de sodio	1.25
Glicerol	1.5
<i>Trp</i>	0.12

mente. Los matraces se incubaron con agitación de 220 rpm durante 48 horas a 28 °C.

5.2 Toma de muestras

En las cinéticas de crecimiento de *Bacillus subtilis* se tomaron muestras a los siguientes tiempos de cultivo: 0, 12, 18, 24, 36, 42 y 48 horas. Se tomó un volumen de 2 mL de muestra para determinar crecimiento celular, consumo de sustrato y producción de AIA. Las muestras se centrifugaron a 15,000 rpm durante 2 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.

5.3 Análisis de muestras

5.3.1 Determinación de biomasa

El incremento de biomasa en los cultivos se determinó mediante peso seco de las muestras de pellet obtenidas. 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).

5.3.2 Determinación de consumo de fuentes de carbono

El consumo de los diferentes sustratos fue determinado a partir de los sobrenadantes de las muestras obtenidas, 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). Previo al análisis de muestras mediante HPLC, estas se descongelaron y se filtraron empleando un filtro de tamaño de partícula de $0.2 \mu\text{m}$. Se utilizó un equipo de HPLC (Varian ProStar) con detector de UV (One Varian ProStar 320 UV/VIS) a una longitud de onda de 210 nm. Como fase móvil se utilizó una solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a una concentración de 5 mM. El flujo de la fase móvil fue de $0.6 \text{ mL}/\text{min}$ y un tiempo de corrida variable para las diferentes fuentes de carbono analizadas: glucosa, acetato de sodio, propionato de sodio, citrato de sodio y glicerol. La cuantificación de las fuentes de carbono analizadas se realizó a través del método de calibración de un solo punto, comparando los valores obtenidos del análisis de la muestra con un estándar y el uso de un factor de referencia conocido como Factor- K [Karlik et al., 2018]. En el Anexo A se muestran los cromatogramas obtenidos para los patrones de cada fuente de carbono.

5.3.3 Determinación de la producción de AIA

La concentración de AIA fue determinada a partir de los sobrenadantes de las muestras obtenidas, estos sobrenadantes se guardaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su análisis. La cuantificación de AIA se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 530 nm (BioPhotometer plus, Eppendorf, USA) utilizando el método de Salkowski [Sarwar et al., 1992]. Las muestras de sobrenadante se incubaron durante 30 minutos en la oscuridad con el reactivo Salkowski (2,4 g de FeCl_3 en 100 mL de H_2SO_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]. La aplicación de este método como ensayo de rutina para procesos de bioconversión en la producción de AIA, se sustenta por: i) su fácil manipulación, ii) la obtención rápida de los resultados y iii) la factibilidad económica. Por todos estos argumentos, es uno de los métodos más usados en la detección y semi-cuantificación de la producción de AIA [Torres-Rubio et al., 2000].

Los resultados de producción de AIA fueron corroborados mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con una columna C18 (Bio-Rad Laboratories Inc., USA). Previo al análisis de muestras mediante HPLC, estas se descongelaron y se filtraron empleando un filtro de tamaño de partícula de $0.2\text{ }\mu\text{m}$. 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 y acetato en proporción 50:50. El flujo de la fase móvil fue de $0.6\text{ mL}/\text{min}$ y un tiempo de corrida fue de 5 min . Las concentraciones de AIA y *Trp* se determinaron a través del método de calibración de un solo punto, comparando los valores obtenidos del análisis de la muestra con un estándar y el uso de un factor de referencia conocido como Factor-*K* [Karlik et al., 2018]. En el Anexo C se muestran los cromatogramas obtenidos para corroborar la producción de AIA y el consumo de *Trp*.

5.4 Cálculo de parámetros cinéticos

La tasa específica de crecimiento, μ (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, qs , se calculó con una regresión lineal de la concentración de sustrato respecto al IVC, la qp 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 ($g-DCWh/L$) como unidades de medida. Los rendimientos $Y_{x/s}$, $Y_{x/p}$ y $Y_{p/s}$ fueron determinados a partir de los parámetros cinéticos μ , qs , qp . El Anexo D incluye la linealizaciones realizadas a algunas de las gráficas obtenidas para obtener parámetros cinéticos.

5.5 Extensión del modelo metabólico *iBSU147* de *B. subtilis*

La modificación y revisión del modelo metabólico se realizó siguiendo pasos descritos por Thiele and Palsson (2010): búsqueda de genes, curación manual de la información y transformación a un modelo matemático [Thiele and Palsson, 2010b]. Para llevar a cabo la modificación se tomó como punto de partida la secuencia completa del genoma de *B. subtilis* (GenBank: GCA-000009045.1) y se utilizó para encontrar los genes relacionados al metabolismo de indoles y producción de triptófano mediante búsqueda de homología de secuencias de proteínas, utilizando BLAST [Coordinators, 2016]. Los genes encontrados con roles metabólicos fueron inspeccionados manualmente y asociados con las enzimas codificantes correspondiente y las reacciones bioquímicas utilizando las bases de datos KEEG [Kanehisa et al., 2019], BRENDA [Jeske et al., 2019] y MetaCyc [Caspi et al., 2016]. Los genes inspeccionados se muestran en la Tabla 1 presente en el Anexo E.

Todas las simulaciones en este trabajo se ejecutaron con COBRA Toolbox 3.0 en el software Matlab [Heirendt et al., 2019]. El análisis de balance de flujo (FBA) codificado en **COBRA**

Toolbox 3.0 del software MATLAB [Heirendt et al., 2019] se utilizó como algoritmo de optimización.

5.6 Análisis del metabolismo por medio del modelo a escala genómica *iBSU1147+1*

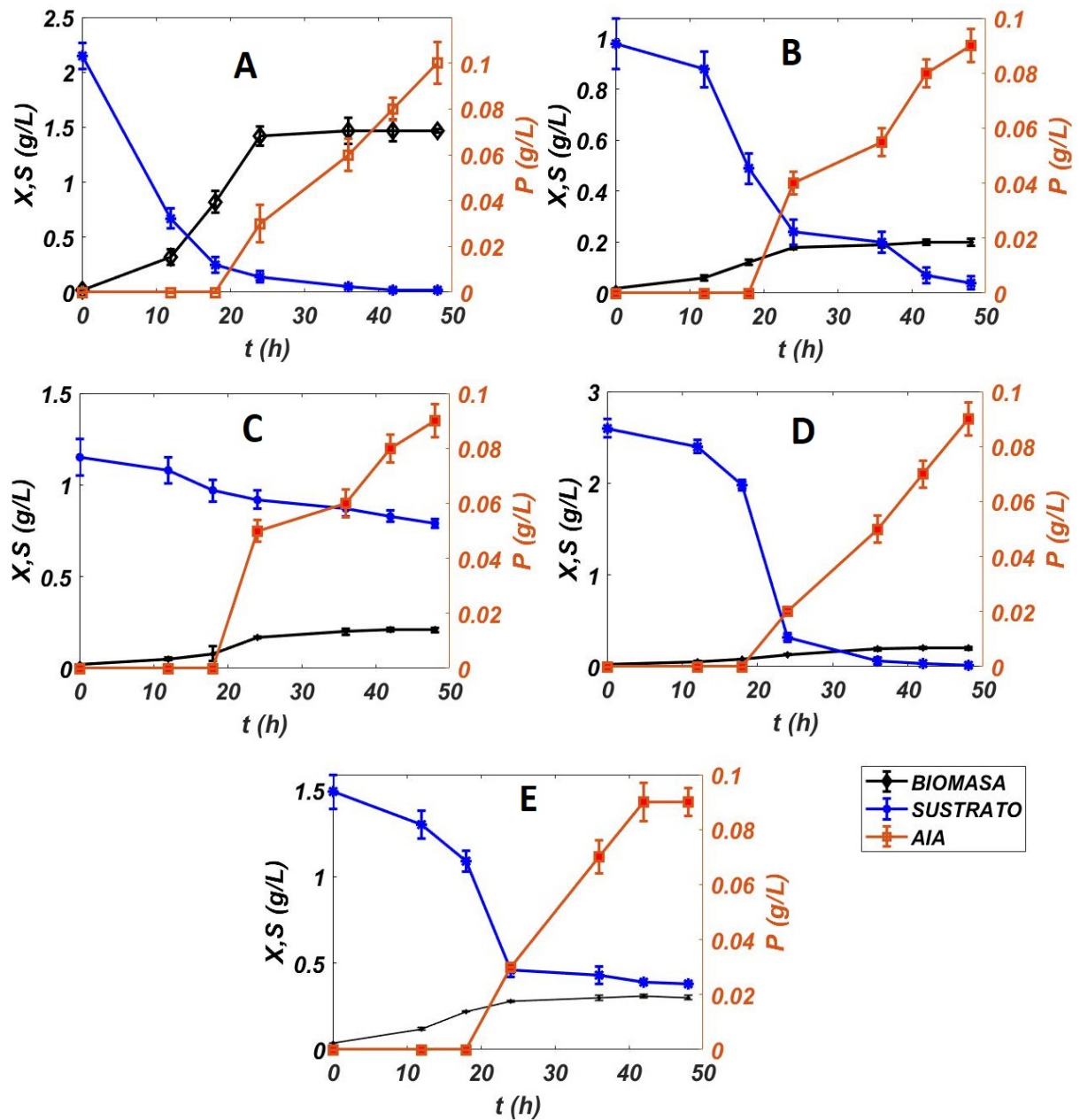
Además de realizar el cálculo de la distribución de flujos, para analizar el metabolismo utilizando el modelo a escala genómica modificado, denominado ahora *iBSU1147+1*, se llevaron a cabo diferentes análisis basados en restricciones, tales como: eliminación simple de genes [Edwards and Palsson, 2000], robustez del modelo metabólico [Tong et al., 2013] y fenotipo de fase planas [Edwards et al., 2002] de acuerdo a las metodologías planteadas por estos investigadores. Para evaluar el metabolismo con estas herramientas, fueron utilizados diversos parámetros cinéticos obtenidos mediante el cultivo en **MMS** suplementado con propionato de sodio y *Trp*. Las simulaciones se hicieron con **COBRA Toolbox** 3.0 en el software MATLAB [Heirendt et al., 2019].

Capítulo VI

RESULTADOS y DISCUSIÓN

6.1 Cultivo de *B. subtilis* utilizando cinco fuentes de carbono diferentes

A partir de las muestras obtenidas a las 0, 12, 18, 24, 36, 42 y 48 h, de los matraces de cultivo que contenían MMS suplementado con *Trp* y una fuente de carbono (**glucosa (GLU)**, **acetato (ACE)**, **propionato (PRO)**, **citrato (CITs)** y **glicerol (GLI)**), se observó que entre las 18 y 24 h de iniciado el cultivo para cada fuente de carbono se observa el final de la fase estacionaria, y al alcanzar las 24 se observa el paso a la fase estacionaria del crecimiento bacteriano (Figura 6.1). En la fase exponencial, el mayor valor de μ se obtuvo utilizando **GLU** como fuente de carbono con un valor de 0.12 h^{-1} y cuando se utilizó **CIT** se obtuvo un valor de μ de 0.08 h^{-1} , correspondiéndose con el menor valor obtenido entre las fuentes de carbono comparadas. Se utilizó como control negativo de crecimiento, medio mínimo de sales inoculado con *B. subtilis* sin suplementar con fuente de carbono. Estos ácidos orgánicos se pueden encontrar en la rizósfera donde habita *B. subtilis* debido a que se utilizan para solubilizar diversos componentes minerales presentes en el suelo por lo que es de gran atractivo conocer acerca de las capacidades metabólicas de este microorganismo en estos sustratos alternativos [López-Reyes et al., 2012].



6.1: Cinética de crecimiento de *B. subtilis* en MMS suplementado con *Trp* y diversas fuentes de carbono: A: GLU, B: ACE, C: PRO, D: CITs y E: GLI a las 0, 12, 18, 24, 36, 42 y 48 h. (Sustrato, Biomasa, AIA)

Además, el ACE se considera un producto de desecho para algunos procesos de fermentación industriales cuando se utilizan bacterias como *E. coli* [Narciandi-Díaz, 2020] y en cuanto al PRO, este ha sido considerado una fuente de carbono de bajo costo y propicia para producir polihidroxibutirato (PHB) por *Pseudomonas sp.* [Rivera-Mackintosh, 2009], aumentando así la relevancia e interés de esta caracterización fisiológica.

La biomasa producida en este intervalo de tiempo coincide con lo reportado por Madigan et al., (2016) para *Bacillus sp.*, como microorganismo de rápido crecimiento y formador de estructuras de resistencia como endosporas en etapas tardías del crecimiento. El mayor valor de biomasa obtenido fue utilizando **GLU** como fuente de carbono, 1.47 g/L de biomasa seca y en **CITs** se tiene una concentración menor alcanzándose valores de 0.20 g/L de biomasa seca, estos rangos de valores han sido reportados ([Ramos et al., 2000], [Warner and Lolkema, 2002], [Madigan et al., 2016]).

La **GLU** constituye una fuente de carbono utilizada por diferentes organismos, las tasas de crecimiento en este sustrato son altas para algunos microorganismos como *E. coli* y *B. subtilis* ([Romero-Garcia et al., 2009],[De Anda et al., 2006]). Los mayores valores de biomasa con este sustrato por encima de las fuentes de carbono de ácidos orgánicos está sustentada en las vías catabólicas que son activadas por este sustrato glicolítico y los balances de *mol ATP/mol* de sustrato consumido ([Zissi et al., 1997], [Kosono et al., 2015]). Frankena *et al.*, en 1988 compararon la producción de proteína extracelular utilizando *B. licheniformis* S1684 con **GLU** y **CITs** como fuentes de carbono, este estudio reportó que eran necesarios 1.46 – 1.73 *mmol GLU* y 2.31 – 2.77 *mmol CITs* para formar y exportar un *mol* de proteína, además el Y_{ATP} (g/mol^{-1}) fue mayor cuando se utilizaba **GLU**. *B. subtilis* es un microorganismo versátil capaz de crecer en una amplia variedad de fuentes de carbono, Kabisch et al., en el año 2013 reportaron crecimiento en **GLU** 0.02% y 0.04%, **ACE** al 0.5% y **GLI** al 0.08% como fuentes de carbono, utilizando preferentemente **GLI** por encima de **GLU** para la producción de 2.3-butanediol cuando se utilizaban ambos sustratos ([Frankena et al., 1988],[Kabisch et al., 2013]). Además, se encuentra reportado en la literatura la capacidad de crecer en ácidos orgánicos como **PRO** y **CITs**, Warner y Lolkema en 2002 reportaron crecimiento de *B. subtilis* utilizando 5 mM de **CITs** con un valor de 0.4 unidades de densidad óptica (**DO**) a 600 nm [Warner and Lolkema, 2002]. Sin embargo, no se cuenta con más evidencias experimentales de crecimiento en estas fuentes de carbono [Whitman et al., 2015].

En la Figura 6.1 se puede apreciar la producción de AIA por este microorganismo en todas las condiciones experimentales anteriormente expuestas. La cinética de producción de AIA fue

seguida mediante un método colorimétrico que emplea el reactivo de Salkowski como revelador y HPLC como método para confirmar la bioconversión de *Trp* a AIA [Sheikhian and Bina, 2016].

El estudio comparativo en la producción de AIA se llevó a cabo manteniendo como parámetro de control la misma concentración de *Trp* en el medio de cultivo. Fueron empleadas concentraciones de biomasa similares como inóculos para garantizar la misma concentración celular al inicio del cultivo; lo que permitió conocer los valores de producción de indol de manera comparativa entre las diferentes fuentes de carbono utilizadas y conocer el comportamiento de la utilización de *Trp* como inductor y sustrato de la síntesis de indol. La formación de AIA comenzó en el intervalo de 18 a 24 h de cultivo cuando según la cinética mostrada se encontraba en el final de la fase exponencial del crecimiento. En el Anexo C se puede apreciar la cuantificación por HPLC de la formación de AIA a las 18 h. Aunque este metabolito se considera secundario, varios autores confirman que su producción comienza en la fase de desaceleración de la fase exponencial ([Cacciari et al., 1989][Brader et al., 2014],[Scarcella et al., 2017]). La producción de índoles fue cuantificada para todas las fuentes de carbono analizadas, alcanzándose valores que oscilan entre los 8.6×10^{-2} y 9.5×10^{-2} g/L de AIA. Estos valores obtenidos son mayores a los 2.5×10^{-2} g/L y 5.5×10^{-2} g/L obtenidos por Sivasakthi *et al.*, en 2013 y Zaidi *et al.*, en 2006 respectivamente, pero inferiores a los 0.17 g/L obtenidos por Araujo *et al.*, en 2005 ([Araujo et al., 2005],[Zaidi et al., 2006],[Sivasakthi et al., 2013b]).

Tabla 6.1: Velocidad específica de crecimiento exponencial (μ), velocidades específica de consumo de sustratos (q_s FC y q_s *Trp*), velocidad específica de producción de producto (q_p), rendimiento biomasa-sustrato $Y_{x/s}$ y rendimiento producto-sustrato $Y_{p/s}$ de *B. subtilis* en MMS suplementado con diferentes fuentes de carbono y *Trp*

Sustrato	Glucosa	Acetato	Propionato	Citrato	Glicerol
μ	0.12 ± 0.04	0.10 ± 0.03	0.09 ± 0.07	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.08
q_{sFC}	0.20 ± 0.05	0.46 ± 0.01	0.28 ± 0.03	0.40 ± 0.09	0.22 ± 0.12
q_{pAIA}	0.32 ± 0.08	0.19 ± 0.04	0.29 ± 0.01	0.45 ± 0.02	0.29 ± 0.07
q_{sTrp}	0.40 ± 0.1	0.21 ± 0.03	0.30 ± 0.065	0.48 ± 0.05	0.35 ± 0.11
$Y_{x/s}$	0.16 ± 0.04	0.12 ± 0.07	0.16 ± 0.05	0.10 ± 0.01	0.23 ± 0.04
$Y_{p/s}$	0.59 ± 0.02	0.38 ± 0.06	0.50 ± 0.10	0.51 ± 0.12	0.44 ± 0.10
$Y_{p/s}$ (g/g)	0.80 ± 0.02	0.88 ± 0.03	0.98 ± 0.01	0.94 ± 0.02	0.84 ± 0.04

* μ (h^{-1}), * q_p (g/gDWC/h), * q_s (g/gDWC/h), * $Y_{x/s}$ (gDCW/g(FC+*Trp*)),

* $Y_{p/s}$ (gDCW/g(FC+*Trp*)), * $Y_{p/s}$ (gAIA/g*Trp*)

B. subtilis puede formar endosporas como mecanismo de resistencia bajo condiciones adversas durante su crecimiento, como falta de nutrientes o un aumento de la temperatura, sin dejar de responder a los cambios para iniciar la germinación de las esporas y reanudar una vida vegetativa [Bartels et al., 2019]. No se apreció formación de endospora bacteriana en ninguno de los ensayos realizados, según los perfiles de crecimiento mostrados el sustrato disponible en cada uno de los ensayos no se agotó por lo que no estuvo en una condición de sustrato limitante [Higgins and Dworkin, 2012]. Este microorganismo posee la capacidad de formar otros tipos de estructuras secundarias como biopelículas, diferenciarse para captar ADN foráneo o formar exotoxinas y evitar la formación de endosporas [Lopez et al., 2008]. En nuestro caso lo que se llegó a apreciar en los cultivos fueron estructuras gelatinosas parecida a una matriz de exopolisacáridos, se ha reportado la capacidad de formar estos compuestos en este microorganismo fundamentalmente cuando se encuentra creciendo en **MMS** [López et al., 2009]. La formación de este tipo de estructuras puede ser una de las causas del bajo aprovechamiento del carbono para producir AIA.

En la Tabla 6.1 se muestran los parámetros cinéticos y rendimientos obtenidos para *B. subtilis* en cada una de las fuentes de carbono utilizadas. De igual manera se calcularon los parámetros de cinéticos los valores obtenidos en la fase de desaceleración negativa de la fase exponencial y la transición a la fase estacionaria, pues en dicha fase del crecimiento se produce la fitohormona de interés, ver Tabla 6.3 [Vos et al., 2011].

Las mayores velocidades específicas de crecimiento en fase exponencial se obtuvieron en **GLU** y **ACE** con valores de $0.12 \pm 0.07 \text{ h}^{-1}$ y $0.10 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$, respectivamente y se encuentran en concordancia con los datos reportados por Romero *et al.*, en 2007 y Hao *et al.*, en 2013, que alcanzan valores de 0.11 h^{-1} y 0.10 h^{-1} en glucosa y acetato de sodio [Romero et al., 2007]. *B. subtilis* se encuentra en la rizósfera de las plantas, fundamentalmente, donde está expuesto a exudados orgánicos por parte de las plantas y de esta exposición ha desarrollado la capacidad de crecer en estos sustratos [Taiz et al., 2017]. Las diferencias en los rendimientos $Y_{x/s}$ no fueron estadísticamente significativas para un $p < 0,05$ según el análisis estadístico realizado mediante la prueba de comparación de medias de Tukey *a posteriori*; solo en citrato de sodio se

obtuvo un menor rendimiento de aproximadamente la mitad de los citados anteriormente. Un patrón similar se repitió en los rendimientos $Y_{p/s}$, donde una vez más no existieron diferencias estadísticamente significativas para un $p < 0,05$ según el análisis estadístico realizado mediante la prueba de comparación de medias de Tukey *a posteriori* para la mayoría de las fuentes de energía utilizadas, exceptuando el acetato de sodio donde se obtuvo el menor valor de rendimiento y diferencias significativas con las restantes fuentes de carbono. El anexo F contiene los datos de las pruebas estadísticas realizados para la comparación de medias utilizando Tukey *a posteriori*.

Tabla 6.2: Balance de carbono teniendo en cuenta los $Y_{x/s}$ y $Y_{p/s}$ obtenidos. El valor de la sumatoria de los rendimientos esta expresado en %

	$Y_{p/s}$ (g/g)	$Y_{x/s}$ (g/g)	Balance (%)
Glucosa	0.59± 0.02	0.16 ± 0.04	75
Acetato	0.38± 0.06	0.12± 0.07	50
Propionato	0.50± 0.10	0.16± 0.05	66
Citrato	0.51± 0.12	0.10± 0.01	61
Glicerol	0.44± 0.10	0.23± 0.04	67

Teniendo en cuenta los $Y_{x/s}$ y $Y_{p/s}$ podemos apreciar que este parámetro no permite evaluar el aprovechamiento del carbono presente en el medio, se utilizó en la formación de biomasa y del producto de interés alrededor de un 75 % del carbono que se encontraba disponible glucosa, donde se evidencia un mejor aprovechamiento del carbono, en ACE fue del 50 %, el resto del carbono en el balance debió ser empleado en algunos metabolitos no cuantificados en este trabajo. Por ejemplo, otra fitohormona de carácter indólico que produce *B. subtilis* es el ácido indol-butírico, tal como se reporta en estudios previos ([Garg et al., 2015],[Nunes et al., 2018]). Panda *et al.*, en 2018 utilizaron *B. subtilis* para la producción de PHB con glucosa como fuente de carbono y obtuvieron $Y_{p/x(g/g)}$, $Y_{x/s(g/g)}$ y $Y_{p/s(g/g)}$ de 0.31, 0.18 y 0.36, respectivamente, para un total de 85% del carbono utilizado. Un valor aceptable si comparamos con lo reportado para otros productos, por ejemplo, se ha reportado un 80% de utilización del carbono durante la producción de riboflavina en cultivo continuo [Sauer et al., 1996]. También se han reportado valores inferiores como es el caso de Dos Santos *et al* en 2016 que obtuvieron el 71.6 % durante la producción de nistosa [Dos Santos et al., 2016].

En el caso particular del **ACE**, existe un estudio realizado por Hao et al., en 2013 que plantea su utilización en la producción de riblofavina, metabolito que puede competir por el carbono e intermediarios de síntesis con el AIA, este último pudo haberse favorecido de la producción de este u otro metabolito.

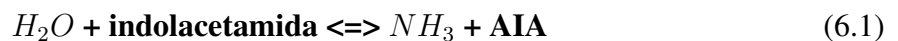
La formación de AIA a partir de *Trp* ocurre mediante una relación equimolar, cobrando alta relevancia en la producción de nuestro metabolito de interés el rendimiento $Y_{p/s}$ (**g AIA/g *Trp***) [Happold, 2009]. Este aspecto es uno de los más relevantes en el presente trabajo debido a que no ocurre formación de AIA si no existe *Trp* en el medio de cultivo debido la presencia de una ruta de síntesis dependiente de *Trp* como la IAM. Como se puede apreciar en los datos de la Tabla 6.1 mostrados anteriormente, el mayor valor de bioconversión de *Trp* hacía AIA fue del 98 % cuando se utilizó propionato de sodio como fuente de energía, lo que demuestra un mayor aprovechamiento del *Trp* canalizado a la síntesis del metabolito de interés con una diferencia estadística significativa respecto a las demás fuentes de carbono (Anexo F contiene el análisis estadístico). Por todo lo anteriormente planteado, y después de analizar los diversos parámetros como los rendimientos se puede establecer que la cepa utilizada en este estudio cuando utiliza propionato como fuente de carbono es capaz de transformar de manera más eficiente el *Trp* a AIA. Esta afirmación está basada en que posee el mayor $Y_{p/s}(g_{AIA}/g_{Trp})$ y el balance de carbono utilizado es del 66 %.

6.2 Análisis de flujos metabólicos

Para poder evaluar la capacidad metabólica que tiene *B. subtilis* para producir AIA, se propuso utilizar el modelo metabólico *iBSU1147* [Hao et al., 2013] para calcular la distribución de flujos. Sin embargo, al explorar el modelo se tuvo que añadir una reacción para la síntesis de **IAM**, debido a que se encontraba desconectado el metabolito AIA del resto de la red metabólica, generando así un modelo extendido de *B. subtilis* el cual se denominó *iBSU1147+1*.

6.2.1 Extensión del modelo metabólico a escala genómica iBSU1147 de *Bacillus subtilis*.

La información del genoma se encuentra ampliamente reportada en bases de datos como **KEGG** [Kanehisa et al., 2019], **Uniprot** [Consortium, 2015] y **SwissProt** [Bairoch and Apweiler, 2000]; entre otras. La información de las reacciones catalizadas por las diferentes enzimas en diversas bases de datos puede ser redundante o diferente incluso para un mismo gen, por lo que se debe comparar y referenciar la información con datos experimentales de diferentes publicaciones [Thiele and Palsson, 2010a]. El modelo *iBSU1147*, posee 1147 genes que codifican a proteínas que participan en el metabolismo, con base en esta información el modelo a escala genómica cuenta con 1742 reacciones y 1456 metabolitos (Hao et al., 2013). Se ha reportado la síntesis de AIA por vías metabólicas dependientes e independientes del aminoácido *Trp* ([Patten and Glick, 2002], [Persello-Cartieaux et al., 2003]); en el caso de *Bacillus sp.* existen diversas publicaciones que hacen referencia a la síntesis de AIA por la vía del indolacetamida (**IAM**) ([Yang et al., 2007], [Spaepen et al., 2007]). El modelo *iBSU1147* posee una reacción de síntesis de AIA anotada funcionalmente a partir de la vía del **IAM**, pero se está desconectada en el modelo. Es decir, uno de los metabolitos reaccionantes, la indolacetamida y el producto final de esta reacción, el AIA solo se encuentran en esa reacción enzimática:



Según la anotación del modelo, la misma reacción es catalizada por una amidasa alifática *AmiE* que está codificada por el gen BSU13570. Según datos reportados en la base de datos **BioCyc** [Caspi et al., 2016], este gen codifica para una enzima con función de oxoglutarato oxidasa, en la que se forma como producto de la reacción oxoglutarato y no AIA; esta enzima está reportada en *P. aurescens* por Farnaud et al., en 1999.

6.2.2 Modificación del modelo metabólico iBSU 1147

A partir de lo planteado anteriormente, fue necesario anotar funcionalmente una reacción de síntesis de **IAM** para conectar la producción de este metabolito con la reacción anteriormente descrita en el modelo *iBSU1147* y poder modelar el metabolismo de producción de nuestro metabolito de interés. Luego de una búsqueda de genes asociados a producción de **IAM** en diferentes bases de datos, encontramos información relativa a una enzima con función de amidasa putativa codificada por el gen *yobN* (BSU19020) en la cepa *B. subtilis subsp. subtilis* str. 168 reportada por [Borriss, 2018], y que está formada por 478 aminoácidos, con número de acceso NP389783.2 en la base de datos **NCBI** [Coordinators, 2016]. De acuerdo a su estructura y funcionalidad propuesta podía participar en una reacción de síntesis de **IAM**. Esta cepa es la referencia utilizada en la construcción de los modelos metabólicos a escala genómica de *B. subtilis* y es una cepa muy cercana filogenéticamente a la cepa W168 utilizada en este trabajo para la obtención de los parámetros cinéticos [Zeigler et al., 2008]. La reacción de referencia de síntesis de **IAM** a partir de *Trp*, reportada en la base de datos **Uniprot**[Consortium, 2015] está catalizada por la enzima *Trp* 2-monoxigenasa y la misma está caracterizada para *Pseudomonas syringae pv. savastanoi* [Gaweska, 2013].

La base de datos **STRING** [Szklarczyk et al., 2016] clasifica la enzima codificada por el gen *yobN* como una oxidasa de L-aminoácidos como en *L-Trp* basada en la presencia de dominios conservados de aminoácidos, características estructurales y homología, estos criterios de asignación se encuentran recogidos en el Anexo G. Se debe restringir esta búsqueda debido a la existencia también de *D*-aminoácidos y *D*-aspartato oxidasas [D’Aniello et al., 1993]. A partir de estas evidencias se procedió a realizar un **BLASTp** para analizar homología de secuencia de la amidasa de *B. subtilis* e intentar atribuirle otra función a esta enzima putativa. Este procedimiento de asignación ha sido utilizado por Montaña Lara en 2015 en para asignar nuevas enzimas con función lipolítica [Montaña Lara, 2015]. El alineamiento de secuencia de la enzima amidasa arrojó un resultado de homología con una enzima *Trp* 2-monoxigenasa de *B. subtilis subsp. subtilis* (Número de acceso KIL30953.1) con un 98.31 % de identidad y un

Evalue = 0. El Anexo H contiene mayor información acerca del alineamiento de secuencias realizado. Con estas evidencias bioinformáticas se procedió a asignar una reacción de síntesis de **IAM** a la enzima amidasa codificada por *yobN* e incluirla en el modelo metabólico *iBSU1147*. En resumen, se añadieron nuevos elementos al modelo entre los que se encuentran un gen cuyo producto está involucrado en la síntesis de **IAM**, el gen *IBSU19020*; una reacción de síntesis de **IAM**, una reacción de transporte libre de AIA al espacio extracelular y un nuevo metabolito, *AIA_{extracelular}*; la anotación de todos estos elementos fue llevada a cabo en lenguaje **SMBL** 2.0. El código computacional se encuentra recogido en el Anexo I.

6.2.3 Predicción del crecimiento celular en diferentes fuentes de carbono utilizando el modelo metabólico iBSU 1147+1

Para evaluar la capacidad de predicción del modelo *iBSU147+1*, se utilizaron los datos cinéticos obtenidos experimentalmente a través del cultivo de *B.subtilis* en las diferentes fuentes de carbono (Tabla 6.1 y Tabla 6.3). Durante todas las simulaciones se utilizó como referente un medio mínimo de sales con una sola fuente de carbono y *Trp* como sustrato para la síntesis de AIA, todos los demás flujos de entrada para otras fuentes de carbonos fueron restringidos a cero.

En la Tabla 6.1 se tienen los parámetros cinéticos para la fase exponencial, con los cuales se calcularon las distribuciones de flujos para la obtención de biomasa. Sin embargo, como se puede observar en la Figura 6.1 que representa las cinéticas obtenidas, la producción de AIA se inicia en la parte final de la fase exponencial. En este punto, existe una desaceleración del crecimiento para posteriormente dar inicio a la fase estacionaria. Para poder evaluar los fluxes, se calculó en este período de desaceleración se definieron las tasas de crecimiento μ_s . La aproximación de utilizar el modelo en las etapas estacionaria fue discutido en la sección **2.7.1** anteriormente. En el caso de la optimización de la producción de AIA, se utilizó este valor de μ_s para poder simular la producción óptima de este metabolito secundario. En las simulaciones se fijó esta tasa de crecimiento, de esta manera, este valor de μ_s se utiliza como una tasa de

crecimiento similar a la que se presenta en un quimiostato con una tasa de dilución a la cual es capaz el organismo de producir AIA.

La Tabla 6.3 se muestra la comparación entre los parámetros cinéticos experimentales y los estimados con el modelo. Utilizando la herramienta **Cobra Toolbox 3.0** [Heirendt et al., 2019] se simuló el valor óptimo de biomasa necesaria en la fase estacionaria para poder mantener ese valor de q_s del modelo metabólico *iBSU1147+1*, como se puede apreciar, los resultados de las simulaciones se corresponden con los datos obtenidos en el laboratorio dentro de un error del 10 % [Dauner et al., 2002].

Tabla 6.3: Comparación de parámetros cinéticos obtenidos a partir de datos experimentales y simulaciones computacionales.

Sustratos	μ_s		qp	
	Experimental	Simulación	Experimental	Simulación
Glucosa	$8.7 * 10^{-2} \pm 0.02$	$7.3 * 10^{-2}$	0.32 ± 0.08	0.32
Acetato	0.10 ± 0.03	0.09	0.19 ± 0.04	0.20
Propionato	0.09 ± 0.07	0.08	0.29 ± 0.01	0.30
Citrato	0.08 ± 0.01	0.07	0.45 ± 0.02	0.41
Glicerol	0.09 ± 0.08	0.09	0.29 ± 0.07	0.30

* μ (h^{-1}), * qp (g/gDWC/h)

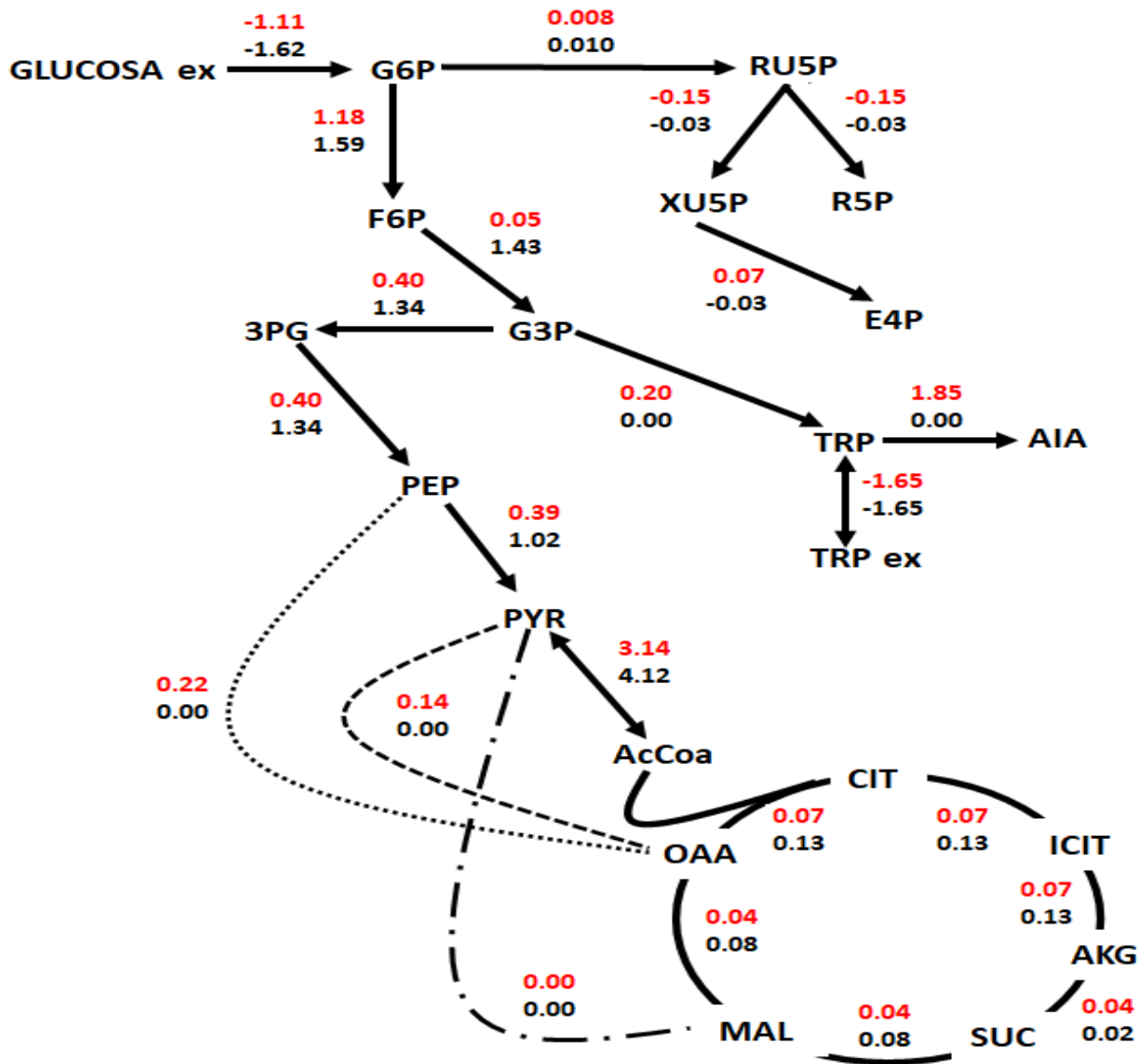
El modelo *iBSU1147+1* es una reconstrucción a partir del *iBSU1147* con un grado de similitud de 99.71% (1147/1148), por lo que la mayoría de los resultados de predicción de crecimiento son idénticos entre los dos modelos metabólicos. La alta precisión de este modelo metabólico está fundamentada en el alto grado de anotación que posee el modelo *iBSU1147* y la validación y refinamiento de éste con datos experimentales. Además, este modelo se generó para predecir la producción de varios metabolitos entre los que se encontraba la riboflavina, metabolito catalogado funcionalmente como una vitamina que participa en amplia cantidad de procesos y producida por microorganismos como parte de su metabolismo no esencial [Hao et al., 2013]. Debido al objetivo de este trabajo, existe gran cantidad de información en el modelo dedicada al metabolismo secundario de *B. subtilis*, tipo de metabolismo que se retoma en este trabajo, por lo que, sin cambios de alto impacto en la matriz estequiométrica del modelo *iBSU1147* era de esperar que se mantuviera la precisión en las simulaciones.

Las vías metabólicas centrales de *B. subtilis* consisten en: glucólisis, el TCA y la ruta de la pentosa fosfato (PP). La distribución del flujo en estas vías está fuertemente relacionado con el estado metabólico que se esté representando. Cuando la célula crece de forma exponencial en glucosa, requiere poder reductor para obtener energía. Este poder reductor en la célula se presenta en forma de cofactores como el *NADH* y *FADH₂* y generalmente se utilizan para generar ATP y suplir los demás requerimientos de energía de las células. El metabolismo central del carbono es el encargado de generar el poder reductor necesario en la célula, por tanto la actividad metabólica se ve modificada dependiendo de el estadio fisiológico. Durante la fase estacionaria del crecimiento bacteriano se reduce el consumo de energía metabólica dedicada a la formación de biomasa y generalmente puede desviarse el metabolismo a la producción de compuestos no esenciales para el crecimiento [Rühl et al., 2012]. Debido a este estado energético de la célula es necesaria una reorganización metabólica donde los flujos de carbono de las principales vías catabólicas tienen que cambiar notablemente para satisfacer nuevas vías anabólicas que comienzan a activarse preferentemente. ([Phillips and Strauch, 2002],[Link et al., 2015]).

En la Figura 6.2 se aprecian las distribuciones de flujos en el metabolismo central del carbono cuando se utiliza glucosa como fuente de carbono. Para la obtención de los valores de flujo representados en negro fue optimizada la producción de biomasa, simulando la fase exponencial del crecimiento y en rojo se muestra la distribución de flujos al simular a producción de AIA durante la fase estacionaria. La Tabla 1 presente en el Anexo J contiene las reacciones metabólicas que están reflejadas en la Figura 6.2. A continuación analizaremos las diferencias entre las dos fases representadas al nivel las principales vías metabólicas del metabolismo central del carbono:

- **Glucólisis.**

La glucólisis es la vía encargada de oxidar la glucosa para formar piruvato y nos muestra las primeras diferencias entre las dos fases del crecimiento evaluadas. El valor de flujo de formación de **F6P** a **G3P** es 28.5 veces mayor, en la generación de **PEP** a partir de **3PG** es 2.5 veces mayor y 2.61 veces mayor en la síntesis de **PYR** a partir de **PEP** durante la fase



6.2: Comparación de la distribución del flujo de carbono en el metabolismo central utilizando GLU: Fase exponencial y Fase estacionaria. Los valores de flujo están reportados en $mmol/gDWC/h$.

exponencial del crecimiento. De esta forma se aprecia una diferencia significativa en la formación de intermediarios de de esta vía y se genera una mayor concentración de ATP y poder reductor que puede ser utilizado para formar **AcCoA** y alimentar el TCA. Estas diferencias demuestran una alta actividad glicolítica durante la fase exponencial con un mayor consumo de sustrato para formar biomasa y una reducción de los valores de flujo durante la producción de AIA al encontrarse en fase estacionaria. No existe una diferencia tan marcada como se debía esperar al comparar la formación de **AcCoA** a partir de **PYR** pero sigue siendo 1.3 veces mayor.

- **TCA.**

Durante el TCA se genera la mayor cantidad de poder reductor en *B. subtilis* que pasa a formar ATP en la cadena de transporte de electrones. Durante los pasos de este ciclo que involucra la formación de **CIT** a **AKG** se aprecia un flujo 2 veces mayor durante la primera fase y 2.22 veces mayor durante la formación de **OAA** partiendo desde **SUC**, demostrando una mayor actividad metabólica y energética.

- **Ruta de las pentosa fosfato (PP).**

Otra ruta para generar poder reductor e intermediarios es la vía de las PP. La formación de **RU5P** a partir de **G6P** es 1.25 veces mayor durante el crecimiento exponencial, pero la formación de otros compuestos como **XU5P** y **R5P** mayor durante la fase estacionaria. La vía de las PP permite la generación de NADPH, pero esta producción puede suplirse por la actividad del TCA. Cuando la actividad del TCA se ve disminuida se puede activar esta vía metabólica y generar mayor cantidad de intermediarios como se aprecia al analizar los valores de flujos para otros metabolitos de las PP. Durante la simulación de la fase estacionaria se puede apreciar que se favorece la formación de **E4P** que es un intermediario en la síntesis de *Trp*.

- **Vías anapleróticas.**

Este organismo posee rutas anapleróticas como la encargada de formar **PEP** a partir de **OAA** por la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y formar **PYR** a partir de **OAA** por la enzima piruvato quinasa (PYR). No se encuentran reportados para *B. subtilis* los genes involucrados en el ciclo del glioxilato. En este caso no se aprecia flujo en estas reacciones cuando se encuentra en fase exponencial, solo en estado estacionario. También posee la capacidad de formar **PYR** a partir de **MAL** a través de las enzimas málicas codificadas en los genes *sfcA* y *maeA* pero no se aprecia valor de flujo en estas reacciones cuando se utiliza este sustrato.

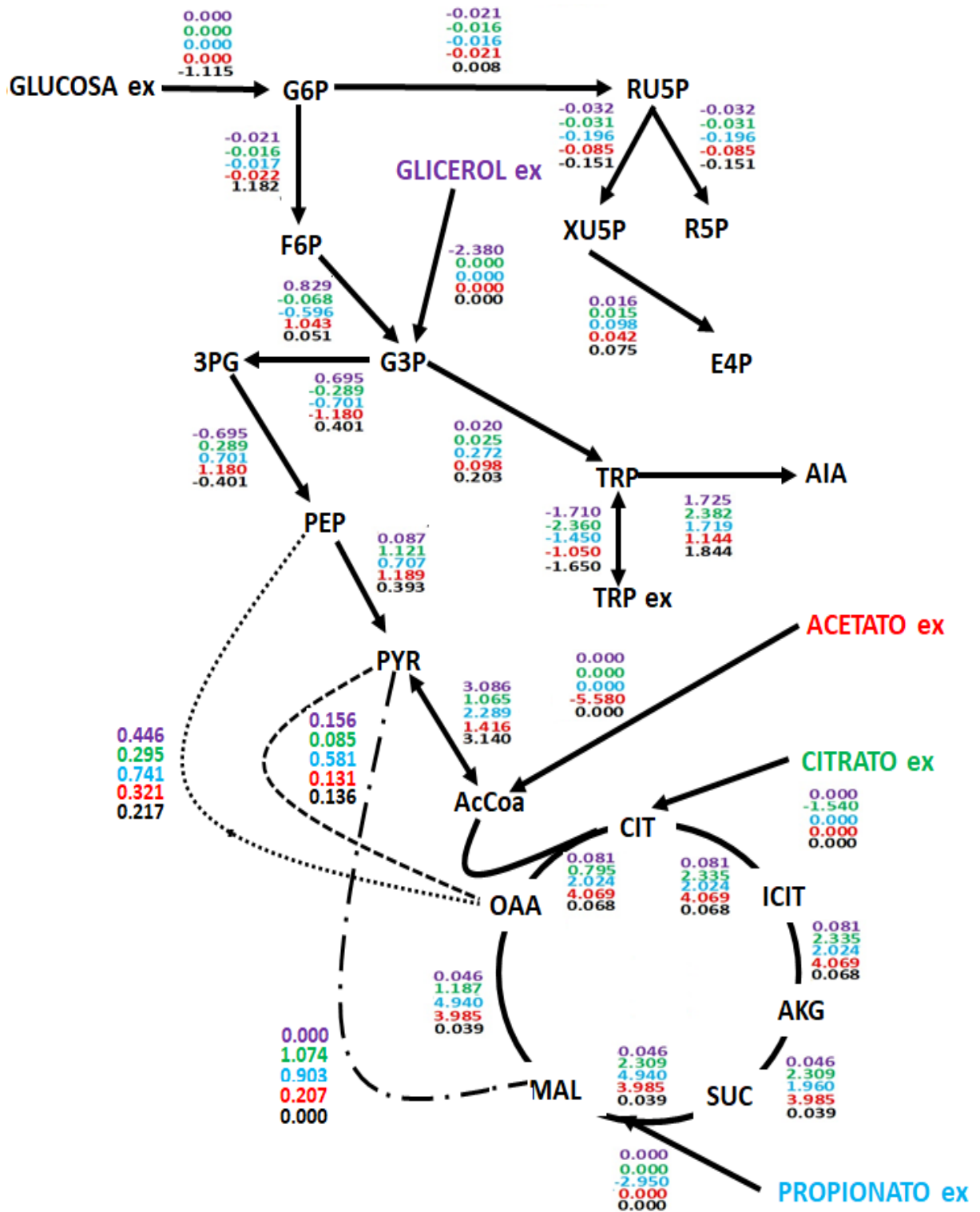
Usualmente durante el crecimiento bacteriano existe una alta demanda de compuestos nitrogenados como aminoácidos, entre los que se encuentra el *Trp*; por lo que comenzar a utilizar este

tipo de compuestos en la síntesis de otra moléculas como el AIA produce un cambio metabólico significativo [Buffing et al., 2018] e impacta en los metabolitos intermediarios de la síntesis de este aminoácido. La principal vía de síntesis de *Trp* es a través de las moléculas de **G3P**, **E4P**, **PEP**, **SHI** y **COR**, intermediarios todos de la formación de *Trp*, y por consiguiente de AIA. Por lo tanto analizar el comportamiento de la generación y consumo de estos compuestos, principalmente **G3P** Y **E4P**, nos puede ser indicativo de cómo impacta en la producción de AIA las variaciones intracelulares de estas sustancias al participar en la formación de intermediarios indólicos.

6.2.4 Análisis de los flujos metabólicos utilizando el modelo metabólico a escala genómica de *Bacillus subtilis*

Con base en los resultados en la predicción de crecimiento, se evaluó la distribución de flujos al maximizar la producción de AIA. Se obtuvo un valor óptimo de producción de AIA, lo que indica que la sensibilidad del modelo para predecir una capacidad metabólica en una condición determinada ([Hao et al., 2013],[Dauner and Sauer, 2001]). En la Figura 6.3 se presenta un esquema con la distribución de flujos del metabolismo central del carbono de *B. subtilis* obtenidas a partir de simular la producción de AIA con el modelo *iBSU1147+1*. La Tabla 1 presente en el Anexo K contiene las reacciones metabólicas que están reflejadas en la Figura 6.3, y en el Anexo L se muestran los valores de flujos restringidos durante la simulación para obtener las distribuciones de flujo que se presenta a continuación.

Al igual que muchos otros microorganismos, al consumir glucosa *B.subtilis* utiliza la vía glucolítica para obtener PYR, ATP y *NADH*. El glicerol ocupa parcialmente la vía de glucólisis para acceder formando **G3P**, uno de los intermediarios de esta vía. Excepto por la **GLU**, en todos los casos, la fuentes de carbono utilizadas utilizan la gluconeogénesis para formar precursores primordiales como **G6P** y **F6P**, invirtiendo el sentido de los flujos incluyendo a las enzimas de la vía de las Pentosas Fosfato. Por otro lado, la utilización de sustratos gluconeogénico como los ácidos orgánicos, se incorporan al metabolismo bacteriano en otros niveles



6.3: Distribución del flujo de carbono en el metabolismo central en cinco fuentes de carbono: GLU, ACE, PRO, CITs y GLI bajo las mismas condiciones de simulación: Max AIA. Los valores de flujo están reportados en $mmol/gWC/h$.

del mismo, y en donde nos es tan activa la vía glucolítica y se vuelve más activo el ciclo del TCA, siendo favorecido el metabolismo en la formación de intermediarios del TCA, interme-

diarios que pueden ir a vías anabólicas cuando la demanda energética en la célula disminuye y ya no se necesita gran cantidad de energía para crecer, como ocurre en la fase estacionaria.

Otro aspecto importante de utilizar fuentes gluconeogénicas, es la activación de diferentes vías anapleróticas. En el estudio de Lee *et al.*, en 1997, compararon la actividad de la enzima málica que cataliza la reacción $\text{MAL} + \text{NADP}^+ \Rightarrow \text{PYR} + \text{CO}_2 + \text{NADPH}$ al crecer *B. subtilis* en glucosa y citrato. La actividad de esta enzima no fue apreciable creciendo en glucosa, sin embargo, en el caso de crecimiento en citrato, la actividad de esta enzima permitió observar un incremento en el $Y_{X/ATP}$ de 23.1 a 28,1 $g/molATP$ respectivamente [Lee et al., 1997]. Al utilizar fuentes gluconeogénicas ocurren cambios en el rendimiento Y_{ATP} , el cual impacta de manera importante sobre los rendimientos de biomasa y producto. Por ejemplo, el crecimiento en glucosa genera un Y_{ATP} de 31.9 $g/molATP$, mientras que en acetato disminuye a 26.4 $g/molATP$ [Stouthamer, 1973].

El TCA es considerado por diversos investigadores el eje central del metabolismo heterótrofo de bacterias como *B. subtilis* y *E. coli* y 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 [Meyer et al., 2011]. En *B. subtilis*, la represión catabólica por presencia de glucosa está controlada por el factor de transcripción CcpA, el cual es un regulador global que controla la expresión de los genes involucrados en la vías centrales del metabolismo, reprimiendo la expresión de enzimas que participan en la vía gluconeogénicas tal como la PEPC, la cual cataliza la formación de PEP a partir de OAA [Tännler et al., 2008].

Hanson y Cox en 1967 determinaron que fuentes de carbono como glucosa y glicerol podían causar la represión de la síntesis de aconitasa (**AcontA** y **AcontB**), succinato deshidrogenasa (**SucdL**) y fumarasa (**FUM**) cuando *B. subtilis* crece en medio mínimo y que se ve aumentada la actividad específica de estas enzimas si crece en ácidos orgánicos [Hanson and Cox, 1967]. Como se aprecia en la Figura 6.3, los valores de flujos en la formación de los metabolitos que sintetizan estas enzimas mencionadas son mayores cuando se utilizan los ácidos orgánicos *versus* glucosa y glicerol. En nuestro caso cuando se utiliza **PRO** se produce el mayor valor de

flujo hacia la síntesis **OAA**, metabolito que se puede transformar directamente a **PEP** mediante la enzima PEPCK [Zamboni et al., 2004] y de esta forma favorecer la formación de compuestos aromáticos como el **SHI**, metabolito de suma importancia en la síntesis de **CHO** y *Trp*, a partir del **PEP** [Kogure et al., 2016]. Situación que ocurre en este experimento debido a la reducción considerable que manifiesta el valor de flujo de **OAA** para formar **CIT** (40.9 %). La mayor conversión de **OAA** a **PEP** con un valor de flujo de $7.42 * 10^{-1} \text{ mmol/gWC/h}$ se presenta cuando se utiliza **PRO** como sustrato.

Zhang *et al* en 2012 corroboraron que la utilización de ácido oxálico y **CITs** aumentaba la producción de ácido poli- γ -glutámico al favorecer las principales enzimas de del TCA permitiendo estos sustratos una mayor sobreproducción de su producto de interés [Zhang et al., 2012].

La formación o consumo de **E4P** esta directamente relacionada con la síntesis de AIA y otros aminoácidos aromáticos, ya que es uno de los precursores primarios para su producción. Con base a la estequiometría planteada en el modelo *iBSU1147 + 1* para la formación de esta molécula, el mayor valor de flujo metabólico hacia la formación de **E4P** ocurre cuando se utiliza **PRO** como fuente de carbono siendo 1.3 veces mayor que cuando se utiliza **GLU** y 6.5 veces mayor cuando la fuente de carbono es **GLI** O **CITs**, es decir, se ve favorecida la formación de **E4P** y **R5P**. La formación de *Trp* vía **IGP** se presenta como otro paso crítico, pues es capaz de generar *Trp de novo* que puede ser utilizado en la síntesis de derivados de éste, tal como el AIA. En este punto, el flujo de esta reacción presenta el mayor valor cuando se utiliza **PRO**, siendo hasta 1.35 veces mayor al de glucosa, demostrando así ser más favorable en la producción de *Trp*. Al encontrarse presente *Trp* en el medio no se debería sintetizar de *novo* este aminoácido debido a inhibición alostérica de las principales enzimas involucradas en su síntesis [Sander et al., 2019].

Por todo lo anteriormente planteado, el análisis de flujos de esta red metabólica de *B. subtilis*, queda demostrado que cuando se utiliza **PRO** y **CITs** como sustrato se logra una mejor utilización y distribución de los principales intermediarios en la síntesis de AIA, optimizando el uso de los diferentes metabolitos y mejorando el rendimiento de producción de AIA.

6.2.5 Análisis de eliminación de genes

Con base en los resultados anteriores, se consideró que el **PRO** como una de las mejores fuentes de carbono, por lo que se decidió llevar a cabo una simulación de eliminación de genes, como parte de estrategias para evaluar la viabilidad del crecimiento y el posible incremento en la producción de AIA. Además el valor de mercado del **PRO** (No.CAS: 137-40-6) en su versión comercial tiene un costo de \$1598 pesos mexicanos cada *Kg*, mientras que otros sustratos como el **CITs** (No.CAS: 18996-35-5) tiene un valor de \$5737 pesos mexicanos cada *Kg* [Aldrich, 2019]. La utilización de esta fuente de carbono de menor costo posibilita disminuir los costos de un posible proceso productivo y aumentar el valor agregado del AIA producido.

En esta estrategia, se eliminan genes que codifican enzimas que participan en diferentes reacciones enzimáticas y mientras que se optimiza una función objetivo planteada. En este caso particular se aborda una eliminación sencilla de genes, que consiste en eliminar cada uno de los genes y aplicar FBA en cada paso, de esta manera se tienen $n-1$ simulaciones, en donde n es el número de genes-reacciones-proteínas que contiene el modelo metabólico. El resultado de este análisis nos ofrece el valor máximo que puede alcanzar la función objetivo cuando no se encuentra ese gen y la reacción metabólica asociada al mismo en el problema de optimización, y por tanto utiliza una matriz estequiométrica diferente a la original del modelo utilizado [Gatto et al., 2015]. En el caso de que la eliminación de un gen no permita obtener una solución al modelado, este gen será considerado esencial para el crecimiento del microorganismo, así como las reacciones metabólicas donde participe la enzima codificada por este gen [Koo et al., 2017]. En el caso de utilizar esta herramienta para analizar el metabolismo del AIA u otro metabolito, la eliminación de un gen que arroje un valor de flujo inferior al valor de flujo obtenido para la cepa salvaje, será considerado este gen esencial en el metabolismo de este compuesto.

De acuerdo a los resultados obtenidos, cuando se utiliza **MMS** suplementado con **PRO** se reportan 249 genes esenciales. Se encuentran reportados para *B.subtilis* un total de 271 genes esenciales por Kobayashi et al. [Kobayashi et al., 2003] y 257 por Koo et al. [Koo et al., 2017]

al crecer en medio LB a 37 °C. De acuerdo a estos resultados durante el crecimiento en **PRO** se obtienen 22, y 8 genes esenciales menos que los obtenidos por estos investigadores.

El algoritmo **OptKnock** sugiere una estrategia de eliminación de reacciones para la sobreproducción de compuestos específicos, con base en esta estrategia se pudieron identificar los posibles genes a eliminar para optimizar la producción de AIA [Burgard et al., 2003]. El modelo metabólico a escala genómica *iBSU1147+1* contiene 1744 reacciones incluidas (1199 metabólicas; 291 de transporte; 254 de intercambio). De las 1199 reacciones anotadas, 1148 tienen la asociación gen-proteína-reacción, existen reacciones metabólicas que no poseen genes asociados debido a falta de anotación durante la reconstrucción del modelo debido a la disponibilidad de información acerca de estos genes y reacciones. Por lo tanto, pueden ser potencialmente eliminadas 1148 reacciones; debido a que las reacciones de intercambio y transporte libre no poseen ningún gen asociado que se pueda eliminar utilizando esta herramienta. Con base en estos números, los 249 genes esenciales para la producción de AIA codifican enzimas que participan en 249 reacciones metabólicas que se consideran esenciales para la producción de AIA. El modelo posee 899 reacciones que podrían ser candidatos a eliminación para optimizar la producción de AIA utilizando **PRO** como sustrato, las enzimas que participan en la catálisis de estas reacciones se encuentran codificadas por los 899 genes no esenciales que se determinaron anteriormente. Existen reacciones en el modelo metabólico que no se encuentran asociados a la síntesis de enzimas, sino que intervienen en la formación de elementos regulatorios o estructurales pero que contribuyen a la formación de la matriz estequiométrica y por tanto forman parte del modelado matemático mediante FBA.

La producción de AIA durante la simulación con el modelo *iBSU1147 + 1* utilizando **PRO** y *Trp* fue de 1.71 mmol/gWC/h , convirtiendo el 97.5% del *Trp* del flujo de *Trp* incluido en la simulación. Como se aprecia en la Tabla 6.4, al aplicar la estrategia de eliminación de genes, el flujo máximo de AIA que se logra es de 2.18 mmol/gWC/h , lo cual es el 126% más que el flujo de *Trp*, que representa el 126.75% de formación de AIA respecto a la cantidad de *Trp* utilizada como inductor y sustrato, convirtiendo así a la remoción de elementos del genoma como una vía para sobreproducir esta fitohormona. Se logra sobreproducir AIA al eliminar 11

Tabla 6.4: Valor de flujo obtenido para producción de AIA al aplicar la estrategia de eliminación de genes. Se muestran resultados superiores a los obtenidos por la cepa silvestre.

Locus	Flujo	Gen	Proteína	Function
BSU13350	2.18	<i>trpA</i>	tryptophan synthase alpha chain	Tryptophan metabolism
BSU13930	2.18	<i>splB</i>	undespore photoproduct lyase	Sporulation
BSU21920	2.15	<i>ugtP</i>	processive diacylglycerol glucosyltransferase	Glycan extension
BSU35760	1.77	<i>tagB</i>	glycerol phosphate glycerophosphotransferase	biosynthesis of teichoic acid
BSU35660	1.77	<i>mnaA</i>	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase	biosynthesis of teichoic acid
BSU35700	1.77	<i>tagH</i>	ABC transporter	Biosynthesis of teichoic acid
BSU35710	1.77	<i>tagG</i>	ABC transporter	Biosynthesis of teichoic acid
BSU35720	1.75	<i>tagF</i>	CDP-glycerol:polyglycerol phosphate glycerophosphotransferase	Biosynthesis of teichoic acid
BSU35530	1.75	<i>tagO</i>	undecaprenyl-phosphate-GlcNAc-1-phosphate transferase	Biosynthesis of teichoic acid
BSU35750	1.74	<i>tagA</i>	UDP-N-acetyl-D-mannosamine transferase	Biosynthesis of teichoic acid
BSU35730	1.72	<i>tagE</i>	UDP-glucose:polyglycerol phosphate glucosyltransferase	Biosynthesis of teichoic acid

genes de forma individual en el modelo, es decir, una a la vez al tratarse de una estrategia de delección simple. La mayor producción de AIA se logra cuando se eliminan los genes *trpA* y/o *splB*. El primero de estos elementos codifica para la enzima triptófano sintasa de cadena α y en el modelo esta enzima participa en la formación de *Trp* a partir de *L*-serina o viceversa debida a que se encuentra anotada bidireccionalmente, por lo que al encontrarse con *Trp* en el medio se ve favorecida la formación de *L*-serina a partir de *Trp*, desfavoreciendo la producción de AIA. El gen *splB* según la base de datos SubtiWiki [Michna et al., 2016] se encuentra asociado a procesos de esporulación, pero en el modelo se encuentra como gen asociado a la enzima que cataliza la reacción de interconversión entre **PYR** e **isoCHO**, metabolitos relacionados con la síntesis de **CHO**. De los restantes genes candidatos a ser eliminados se encuentran 7 elementos que participan en la síntesis de ácido teicoico y aunque la estrategia de eliminación los considera no esenciales, estos están reportados como genes esenciales para el crecimiento en medio LB en la base de datos SubtiWiki [Michna et al., 2016], por lo que no deberían ser eliminados.

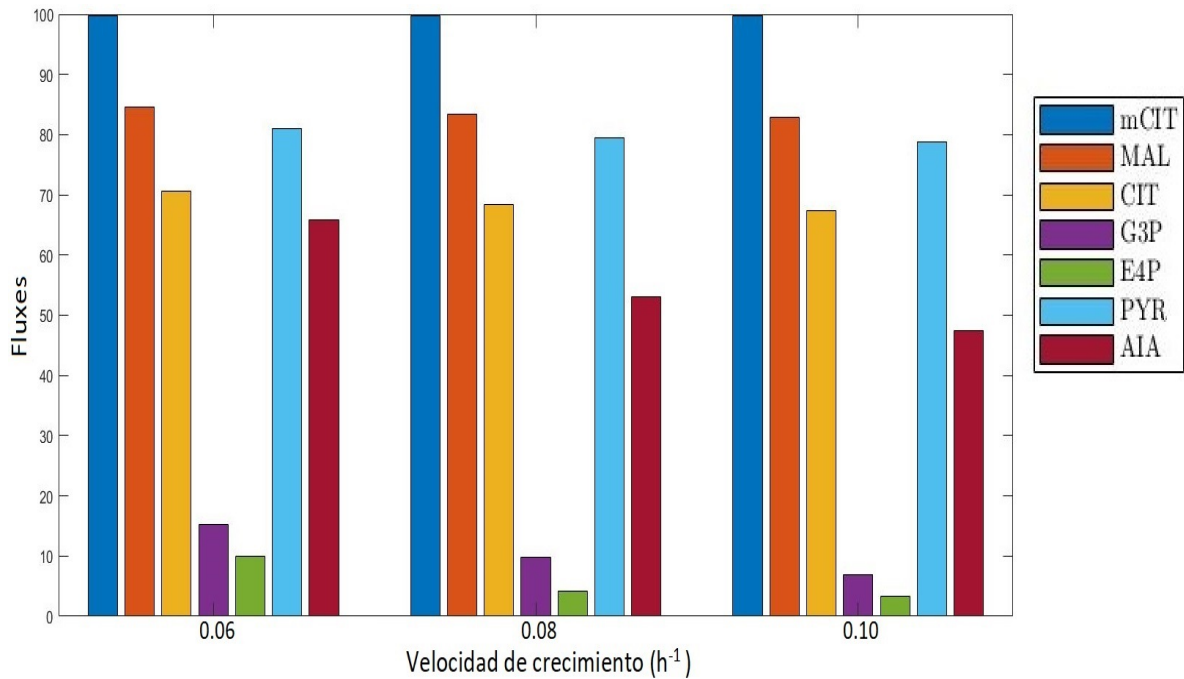
6.2.6 Análisis de robustez y fenotipos de fase plana (PhPP)

El metabolismo es un sistema dinámico que varía dependiendo de diversos factores entre los que se encuentra: tipo de sustrato, temperatura y pH. Algunas variaciones como cambios en el nivel de expresión enzimas, activarse diferentes vías de regulación o agotarse un sustrato im-

pactan en la topología de la red metabólica cambiando la forma en que interactúan los metabolitos en la misma, aumentando o disminuyendo los flujos intracelulares de algunas sustancias [Kotte et al., 2010]. De esta manera, existen análisis como el de robustez o fenotipos de fase plana, los cuales nos permiten evaluar distintos escenarios en donde varían las condiciones de cultivo cambian.

Los datos experimentales obtenidos del crecimiento en medio líquido de *B. subtilis* suplementado con **PRO** y *Trp* permitió calcular los parámetros (qs) y (qp), con los cuales se calcularon las distribuciones de flujos y que sirven como valores de control para realizar el análisis de robustez. En la Figura 6.4 se muestran los valores de flujos obtenidos para las 7 reacciones que participan en la formación de los siguientes metabolitos: **mCIT**, **MAL**, **CIT**, **G3P**, **E4P**, **PYR** y **AIA**; elementos que están involucrados en el metabolismo del propionato y la producción de AIA. Los diferentes valores de flujo para estas reacciones se obtuvieron al simular diferentes valores de biomasa (μ) [Watson et al., 2016]. Todos los valores de flujos metabólicos obtenidos fueron normalizados por el consumo de sustrato en cada caso para obtener datos independientes de la concentración inicial y poder analizar el comportamiento de la red dependiendo solamente de los valores de biomasa [Vintimilla et al., 2017].

Como se puede apreciar en la Figura 6.4, los valores de los flujos en donde se involucra la formación de **G3P**, **E4P** y **AIA** aumentan a medida que decrece la biomasa (μ) mientras se simula la óptima producción de **AIA**. **G3P** y **E4P** son precursores directos de la síntesis de esta fitohormona por lo que deben aumentar su concentración intracelular a medida que es desviado el metabolismo hacia la obtención de este producto [Genómica, 2012]. El efecto relacionado a su aumento *versus* el decrecimiento de μ_s se puede asociar a la naturaleza de metabolismo secundario que produce los derivados indólicos [López et al., 2019]. Los flujos de las reacciones que involucran la formación de **mCIT**, **CIT** y **MAL** no varían su valor de flujo normalizado a medida que cambia (μ_s), lo que indica que el metabolismo del **PRO** a nivel de **TCA** no aumenta la velocidad de transformación del **PRO** para generar precursores de síntesis de AIA, sino que optimiza la red metabólica para la formación de los intermediarios directos para la producción de AIA [Zhang et al., 2008]. A partir de este estudio se pudo determinar posibles

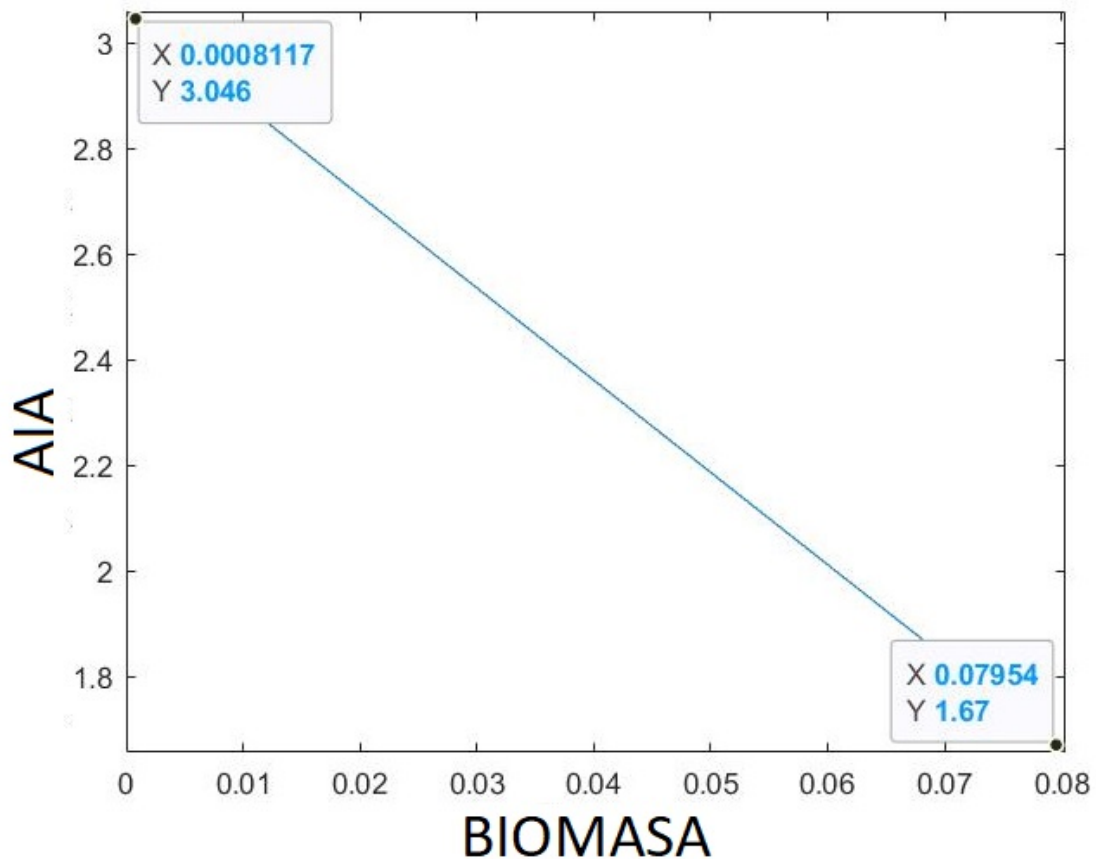


6.4: Valores de flujo normalizado a distintas velocidades de crecimiento. Las velocidades de consumo de PRO q_p son 3.5, 3.0 y 2.5 $mmol/L/h^{-1}$ correspondientes a las tasas de crecimiento μ_s de 0.06, 0.08 y 0.1 h^{-1} , respectivamente. Los flujos se normalizaron por las velocidades de consumo de PRO base de 100.

cuellos metabólicos en la síntesis de **AIA**, viendo como al disminuir la biomasa aumenta el valor de flujo hacia **AIA**, direccionando el metabolismo celular. El modelo metabólico es sensible y robusto a cambios en la composición del medio de cultivo y ha demostrado ser capaz de modelar el cambio en los valores de estos flujos metabólicos al variar valores de biomasa.

Para explorar el significado de estas variaciones combinamos el modelado y los datos cinéticos a través de un análisis de robustez utilizando **Cobra Toolbox 3.0**, el cual calcula y traza las tasas de producción óptima (eje y) *versus* las variaciones de flujo de consumo (eje x) [Tong et al., 2013].

Este análisis realizado predice el cambio y la direccionalidad del metabolismo mostrándonos como debería variar la concentración de biomasa en la formación de un metabolito específico, en este caso como impacta un aumento de la biomasa en la formación de **AIA**; quedando demostrado que a medida que disminuye (μ_s) aumenta el la formación de **AIA** al poder utilizar mayor cantidad de **Trp**, desviando la incorporación de este aminoácido a proteínas esenciales

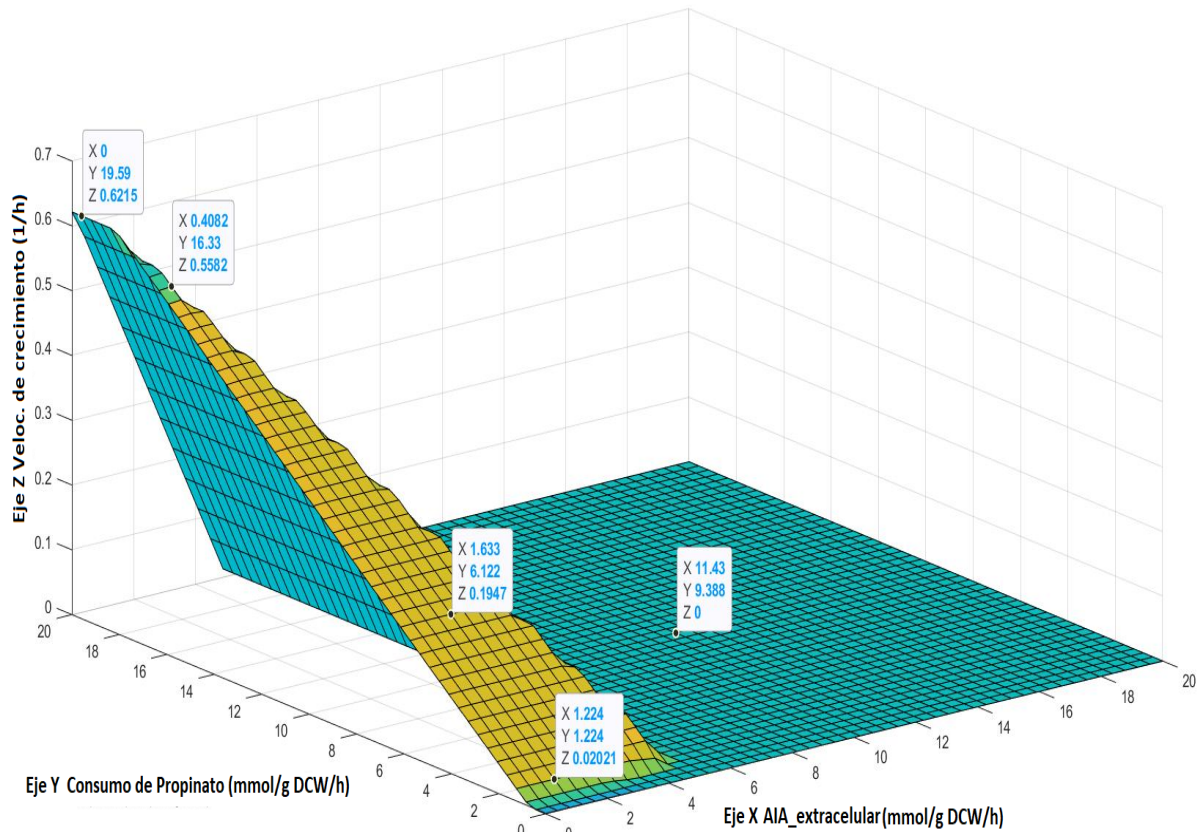


6.5: Análisis de robustez del metabolismo de formación de AIA *versus* la cantidad de biomasa.

y quedando libre para la síntesis pues se comienza a producir **AIA** en un estado donde aún se está formando biomasa.

Utilizando **Cobra Toolbox 3.0** se llevó a cabo un estudio de fenotipos de fase plana (**PhPP**) para predecir los cambios fenotípicos asociados a las perturbaciones causadas por la incorporación de los componentes presentes en el medio de cultivo durante los diferentes puntos del crecimiento bacteriano .

Todas las distribuciones de flujos en el metabolismo de *B. subtilis* están limitadas a una región de solución donde cada distribución refleja un flujo metabólico factible [Boele et al., 2012]. En este caso en particular, nos interesaba la relación entre la q_s del **PRO** y el crecimiento durante la fase exponencial y durante la formación del producto, dicha interacción de componentes nos muestra que se tiene que vencer una tasa de consumo de sustrato para poder alcanzar un



6.6: Análisis de Fenotipos de Fase Plana (PhPP) del metabolismo en función de la biomasa y PRO como fuente de carbono durante la producción de AIA.

valor de biomasa suficiente para desviar el metabolismo hacia la producción de **AIA**. Como se muestra en la Figura 6.6 a valores muy bajos de consumo de **PRO** no es suficiente para completar las funciones metabólicas requeridas para el mantenimiento celular y la producción de **AIA**. A medida que este valor de consumo se va en aumento se comienza a apreciar un incremento en la μ hasta el punto de alcanzar la μ_s y a partir de ese estadio fisiológico comenzar la producción de **AIA**.

La evolución de los diferentes planos de fases nos evidencia los cambios que se manifiestan en una célula mientras se va desarrollando como son: aumentar la μ , consumir más sustrato y producir diferentes metabolitos; por lo que este tipo de análisis nos permite ver como impactan las diferentes perturbaciones de manera significativa en el fenotipo de una cepa, y por consiguiente en la formación de un producto de interés ([Edwards et al., 2002], [Vongsangnak et al., 2016] .)

Capítulo VII

CONCLUSIONES

Se llevaron a cabo cultivos de *B. subtilis* en **GLU**, **ACE**, **PRO**, **CITs** y **GLI**, presentándose crecimiento bacteriano y producción de AIA en todas las fuentes de carbono. El mayor rendimiento observado $Y_{p/s}$ fue con un valor de 0.98 ± 0.01 (**g AIA/g Trp**) y se presentó cuando fue utilizado **PRO** como fuente de carbono en presencia de *Trp*. Para llevar a cabo la simulación de las tasas de crecimiento y distribución de flujos, se modificó el modelo *iBSU1147* generando un nuevo modelo a escala genómica llamado *iBSU1147 + 1*, que incluye 1148 genes. El modelo modificado se validó utilizando los datos cinéticos obtenidos experimentalmente.

Con base en los datos cinéticos se llevó a cabo un análisis comparativo de la distribución de flujos metabólicos calculados para cada una de las cinco distintas fuentes de carbono. Las simulaciones permitieron diferenciar los estados metabólicos, así como evaluar diversas estrategias para optimizar la producción de AIA. Como resultado de este análisis se consideró al **PRO** como la mejor fuente de carbono para producir AIA en presencia de *Trp*.

Para poder evaluar más escenarios de producción, se utilizaron análisis computacionales como la eliminación de genes, el análisis de robustez y de fenotipos de fase plana. La eliminación de genes demostró que existen 11 genes no esenciales como candidatos a ser eliminados y aumentar la producción de AIA; el mayor valor de producción se logra cuando se eliminan

los genes *trpA* y/o *spIB*. El primer gen codifica para la enzima triptófano sintasa de cadena α y en el modelo esta enzima participa en la formación de *Trp* a partir de *L*-serina; o viceversa debido a que se encuentra anotada bidireccionalmente, por lo que al encontrarse con *Trp* en el medio se ve favorecida la formación de *L*-serina a partir de *Trp*, desfavoreciendo la producción de *AIA*. El gen *spIB* se encuentra asociado a procesos de esporulación, pero en el modelo se encuentra como gen asociado a la enzima que cataliza la reacción de interconversión entre **PYR** e **isoCHO**, metabolitos relacionados con la síntesis de **CHO**. El análisis de robustez permitió conocer las principales enzimas y cuellos metabólicos a abordar para optimizar la producción de esta fitohormona, como son la síntesis de **G3P** y **E4P**. El análisis de fenotipos de fases planas permitió conocer los volaroes óptimos *qs* necesarios para obtener la máxima producción de *AIA*.

Capítulo VIII

PERSPECTIVAS

Para continuar el desarrollo de este trabajo es necesario aumentar en número de estudios cinéticos para la obtención de otros parámetros como coeficientes respiratorios, diferentes estadios de crecimiento que permitan acotar de forma más precisa el modelado metabólico. Además para mejorar la calidad de las predicciones en cuanto a la formación de AIA es necesario realizar análisis de expresión de genes para demostrar experimentalmente la presencia de los genes responsables de la síntesis de AIA en *B. subtilis*. También es necesario realizar actividades enzimáticas de algunas enzimas claves como la *Trp* monooxigenasa para caracterizar la síntesis de AIA y de esta forma ampliar la búsqueda de reacciones metabólicas asociadas a genes que permita continuar la ampliación del modelo a escala genómica *iBSU1147 + 1*

Desde el punto de vista de caracterización metabólica se podrían realizar otros análisis basados en restricciones como delección doble de genes , búsqueda de diseño genéticos locales (GDLS) y ambientes de multiproducción.

REFERENCIAS

- [Abdallah et al., 2019] Abdallah, I. I., Pramastya, H., Van Merkerk, R., Quax, W. J., et al. (2019). Metabolic engineering of bacillus subtilis toward taxadiene biosynthesis as the first committed step for taxol production. *Frontiers in microbiology*, 10:218.
- [Alam et al., 2010] Alam, M. T., Merlo, M. E., Hodgson, D. A., Wellington, E. M., Takano, E., Breitling, R., Consortium, S., et al. (2010). Metabolic modeling and analysis of the metabolic switch in streptomyces coelicolor. *BMC genomics*, 11(1):202.
- [Aldrich, 2019] Aldrich, S. (2019). Sigma aldrich. *Sigma Aldrich*.
- [Ali et al., 2009] Ali, B., Sabri, A. N., Ljung, K., and Hasnain, S. (2009). Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated bacillus spp. and their phytoestimulatory effect on vigna radiata (l.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(3):519.
- [Andrzejczak and Lonc, 2008] Andrzejczak, S. and Lonc, E. (2008). Selective isolation of bacillus thuringiensis from soil by use of l-serine as minimal medium supplement. *Polish journal of microbiology*, 57(4):333–335.
- [Araujo et al., 2005] Araujo, F. F., Henning, A. A., and 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(8-9):1639–1645.

- [Arias Negrete et al., 2018] Arias Negrete, M. F. et al. (2018). Identificación de agentes bacterianos causantes de infecciones de oído y su relación con la resistencia a los antimicrobianos. B.S. thesis, Universidad Técnica de Ambato-Facultad de Ciencias de la Salud-Carrera de
- [Asadollahi et al., 2009] Asadollahi, M. A., Maury, J., Patil, K. R., Schalk, M., Clark, A., and Nielsen, J. (2009). Enhancing sesquiterpene production in *saccharomyces cerevisiae* through in silico driven metabolic engineering. *Metabolic engineering*, 11(6):328–334.
- [Awasthi et al., 2018] Awasthi, D., Wang, L., Rhee, M. S., Wang, Q., Chauliac, D., Ingram, L. O., and Shanmugam, K. T. (2018). Metabolic engineering of *bacillus subtilis* for production of d-lactic acid. *Biotechnology and bioengineering*, 115(2):453–463.
- [Baeshen et al., 2014] Baeshen, N. A., Baeshen, M. N., Sheikh, A., Bora, R. S., Ahmed, M. M. M., Ramadan, H. A., Saini, K. S., and Redwan, E. M. (2014). Cell factories for insulin production. *Microbial cell factories*, 13(1):141.
- [Bairoch and Apweiler, 2000] Bairoch, A. and Apweiler, R. (2000). The swiss-prot protein sequence database and its supplement trembl in 2000. *Nucleic acids research*, 28(1):45–48.
- [Barbe et al., 2009] Barbe, V., Cruveiller, S., Kunst, F., Lenoble, P., Meurice, G., Sekowska, A., Vallenet, D., Wang, T., Moszer, I., Medigue, C., and Danchin, A. (2009). From a consortium sequence to a unified sequence: The *bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology (Reading, England)*, 155:1758–75.
- [Bartels et al., 2019] Bartels, J., Blüher, A., López Castellanos, S., Richter, M., Günther, M., and Mascher, T. (2019). The *bacillus subtilis* endospore crust: protein interaction network, architecture and glycosylation state of a potential glycoprotein layer. *Molecular microbiology*, 112(5):1576–1592.
- [Becker et al., 2007] Becker, S. A., Feist, A. M., Mo, M. L., Hannum, G., Palsson, B. Ø., and Herrgard, M. J. (2007). Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the cobra toolbox. *Nature protocols*, 2(3):727–738.

- [Bhardwaj et al., 2014] Bhardwaj, D., Ansari, M. W., Sahoo, R. K., and Tuteja, N. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial cell factories*, 13(1):66.
- [Boele et al., 2012] Boele, J., Olivier, B. G., and Teusink, B. (2012). Fame, the flux analysis and modeling environment. *BMC systems biology*, 6(1):8.
- [Bolhuis et al., 1999] Bolhuis, A., Tjalsma, H., Smith, H. E., De Jong, A., Meima, R., Venema, G., Bron, S., and Van Dijl, J. M. (1999). Evaluation of bottlenecks in the late stages of protein secretion in bacillus subtilis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(7):2934–2941.
- [Borriss, 2018] Borriss, R., D. A. H. C. R. M. C. R. E. P. S. A. . V. D. (2018). Bacillus subtilis, the model gram-positive bacterium: 20 years of annotation refinement. *Microbial biotechnology*, 11(1):3–17.
- [Brader et al., 2014] Brader, G., Compant, S., Mitter, B., Trognitz, F., and Sessitsch, A. (2014). Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current opinion in biotechnology*, 27:30–37.
- [Brumos et al., 2018] Brumos, J., Robles, L. M., Yun, J., Vu, T. C., Jackson, S., Alonso, J. M., and Stepanova, A. N. (2018). Local auxin biosynthesis is a key regulator of plant development. *Developmental cell*, 47(3):306–318.
- [Buffing et al., 2018] Buffing, M. F., Link, H., Christodoulou, D., and Sauer, U. (2018). Capacity for instantaneous catabolism of preferred and non-preferred carbon sources in escherichia coli and bacillus subtilis. *Scientific reports*, 8(1):1–10.
- [Burgard et al., 2003] Burgard, A. P., Pharkya, P., and Maranas, C. D. (2003). Optknock: a bilevel programming framework for identifying gene knockout strategies for microbial strain optimization. *Biotechnology and bioengineering*, 84(6):647–657.
- [Cacciari et al., 1989] Cacciari, I., Lippi, D., Pietrosanti, T., and Pietrosanti, W. (1989). Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of azospirillum and arthrobacter. *Plant and soil*, 115(1):151–153.

- [Calzada et al., 2015] Calzada, K. P., Fernández, J. C. R., and Sotolongo, M. S. (2015). Comportamiento productivo del frijol (*phaseolus vulgaris* L.) ante la aplicación de un promotor del crecimiento activado molecularmente. *Avances*, 17(4):327–337.
- [Cardoso Chicué and Prieto Cristacho, 2016] Cardoso Chicué, L. L. and Prieto Cristacho, Y. T. (2016). Desarrollo de una ruta estratégica que relaciona la proporción carbono nitrógeno (c/n) alimentado al cultivo de *chlamydomonas reinhardtii* con la calidad de biodiesel. B.S. thesis, Fundación Universidad de América.
- [Caspi et al., 2016] Caspi, R., Billington, R., Ferrer, L., Foerster, H., Fulcher, C. A., Keseler, I. M., Kothari, A., Krummenacker, M., Latendresse, M., Mueller, L. A., et al. (2016). The metacyc database of metabolic pathways and enzymes and the biocyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic acids research*, 44(D1):D471–D480.
- [Castañeda Guillot, 2018] Castañeda Guillot, C. (2018). Microbiota intestinal y salud infantil. *Revista Cubana de Pediatría*, 90(1):94–110.
- [Castillo et al., 2005] Castillo, G., Altuna, B., Michelena, G., Sánchez Bravo, J., and Acosta Echevarría, M. (2005). Cuantificación del contenido de ácido indolacético (aia) en un caldo de fermentación microbiana. *Anales de biología*, vol. 27, 2005.
- [Chen et al., 2018] Chen, J., Li, W., Zhang, Z.-Z., Tan, T.-W., and Li, Z.-J. (2018). Metabolic engineering of *escherichia coli* for the synthesis of polyhydroxyalkanoates using acetate as a main carbon source. *Microbial cell factories*, 17(1):102.
- [Clair et al., 2010] Clair, G., Roussi, S., Armengaud, J., and Duport, C. (2010). Expanding the known repertoire of virulence factors produced by *bacillus cereus* through early secretome profiling in three redox conditions. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9(7):1486–1498.
- [Consortium, 2015] Consortium, U. (2015). Uniprot: a hub for protein information. *Nucleic acids research*, 43(D1):D204–D212.
- [Coordinators, 2016] Coordinators, N. R. (2016). Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic acids research*, 44(Database issue):D7.

- [Cosmos, 2018] Cosmos, R. (2018). Indole-3-acetic acid (iaa) market analysis. *BIS Report Consulting*, page 139.
- [D’Aniello et al., 1993] D’Aniello, A., D’Onofrio, G., Pischetola, M., D’Aniello, G., Vetere, A., Petrucelli, L., and Fisher, G. H. (1993). Biological role of d-amino acid oxidase and d-aspartate oxidase. effects of d-amino acids. *Journal of Biological Chemistry*, 268(36):26941–26949.
- [Dauner and Sauer, 2001] Dauner, M. and Sauer, U. (2001). Stoichiometric growth model for riboflavin-producing bacillus subtilis. *Biotechnology and bioengineering*, 76(2):132–143.
- [Dauner et al., 2002] Dauner, M., Sonderegger, M., Hochuli, M., Szyperski, T., Wüthrich, K., Hohmann, H.-P., Sauer, U., and Bailey, J. E. (2002). Intracellular carbon fluxes in riboflavin-producing bacillus subtilis during growth on two-carbon substrate mixtures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(4):1760–1771.
- [Davies, 2013] Davies, P. J. (2013). *Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*. Springer Science & Business Media.
- [De Anda et al., 2006] De Anda, R., Lara, A. R., Hernández, V., Hernández-Montalvo, V., Gosset, G., Bolívar, F., and Ramírez, O. T. (2006). Replacement of the glucose phosphotransferase transport system by galactose permease reduces acetate accumulation and improves process performance of escherichia coli for recombinant protein production without impairment of growth rate. *Metabolic engineering*, 8(3):281–290.
- [Deng et al., 2019] Deng, J., Chen, C., Gu, Y., Lv, X., Liu, Y., Li, J., Ledesma-Amaro, R., Du, G., and Liu, L. (2019). Creating an in vivo bifunctional gene expression circuit through an aptamer-based regulatory mechanism for dynamic metabolic engineering in bacillus subtilis. *Metabolic engineering*, 55:179–190.
- [Dobbelaere et al., 2003] Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., and Okon, Y. (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical reviews in plant sciences*, 22(2):107–149.

- [Dos Santos et al., 2016] Dos Santos, D. A., Baldo, C., Borsato, D., and 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(4):391–397.
- [Edwards and Palsson, 2000] Edwards, J. S. and Palsson, B. O. (2000). Metabolic flux balance analysis and the in silico analysis of escherichia coli k-12 gene deletions. *BMC bioinformatics*, 1(1):1.
- [Edwards et al., 2002] Edwards, J. S., Ramakrishna, R., and Palsson, B. O. (2002). Characterizing the metabolic phenotype: a phenotype phase plane analysis. *Biotechnology and bioengineering*, 77(1):27–36.
- [Fernández-Oliva et al., 2012] Fernández-Oliva, O., Dustet-Mendoza, J. C., and Chico-Véliz, E. (2012). Dos aplicaciones de la técnica de análisis de flujos metabólicos. *Revista Cubana de Química*, 24(1):70–82.
- [Fischer et al., 2008] Fischer, C. R., Klein-Marcuschamer, D., and Stephanopoulos, G. (2008). Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production. *Metabolic engineering*, 10(6):295–304.
- [Frankena et al., 1988] Frankena, J., Van Verseveld, H., and Stouthamer, A. (1988). Substrate and energy costs of the production of exocellular enzymes by bacillus licheniformis. *Biotechnology and bioengineering*, 32(6):803–812.
- [Galavi et al., 2013] Galavi, M., Karimian, M. A., and Mousavi, S. R. (2013). Effects of different auxin (iba) concentrations and planting-beds on rooting grape cuttings (vitis vinifera). *Annual Research & Review in Biology*, pages 517–523.
- [Galushko and Kuever, 2019] Galushko, A. and Kuever, J. (2019). Bergey’s manual of systematics of archaea and bacteria.
- [Garg et al., 2015] Garg, V., Kukreja, K., Gera, R., and Singla, A. (2015). Production of indole-3-acetic acid by berseem (trifolium alexandrinum l.) rhizobia isolated from haryana, india. *Agricultural Science Digest-A Research Journal*, 35(3):229–232.

- [Gatica and Ares, 2012] Gatica, S. N. and Ares, O. E. (2012). La importancia de la visualización en el aprendizaje de conceptos matemáticos. *EDMETIC*, 1(2):88–107.
- [Gatto et al., 2015] Gatto, F., Miess, H., Schulze, A., and Nielsen, J. (2015). Flux balance analysis predicts essential genes in clear cell renal cell carcinoma metabolism. *Scientific reports*, 5:10738.
- [Gaweska, 2013] Gaweska, H. M., T. A. B. H. P. J. . F. P. F. (2013). Structure of the flavoprotein tryptophan 2-monooxygenase, a key enzyme in the formation of galls in plants. *Biochemistry*, 52(15):2620–2626.
- [Genómica, 2012] Genómica, M. E. C. D. B. (2012). *CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA*. PhD thesis, INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.
- [Glick et al., 1999] Glick, B., Patten, C., Holguin, G., and Penrose, D. (1999). Overview of plant growth-promoting bacteria. *Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria*", Glick, BR, Patten, CL, Holguin, G. and Penrose, DM, pages 1–13.
- [Goelzer et al., 2008] Goelzer, A., Brikci, F., Martin-Verstraete, I., Noirot, P., Bessieres, P., Aymerich, S., and Fromion, V. (2008). Reconstruction and analysis of the genetic and metabolic regulatory networks of the central metabolism of bacillus subtilis. *BMC systems biology*, 2:20.
- [Gold et al., 2015] Gold, N. D., Gowen, C. M., Lussier, F.-X., Cautha, S. C., Mahadevan, R., and Martin, V. J. (2015). Metabolic engineering of a tyrosine-overproducing yeast platform using targeted metabolomics. *Microbial cell factories*, 14(1):73.
- [Grossmann, 2010] Grossmann, K. (2010). Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 66(2):113–120.
- [Gu et al., 2017] Gu, Y., Deng, J., Liu, Y., Li, J., Shin, H.-d., Du, G., Chen, J., and Liu, L. (2017). Rewiring the glucose transportation and central metabolic pathways for overproduction of n-acetylglucosamine in bacillus subtilis. *Biotechnology Journal*, 12(10):1700020.

- [Halmschlag et al., 2020] Halmschlag, B., Putri, S. P., Fukusaki, E., and Blank, L. M. (2020). Poly- γ -glutamic acid production by bacillus subtilis 168 using glucose as the sole carbon source: A metabolomic analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*.
- [Hanson and Cox, 1967] Hanson, R. S. and Cox, D. P. (1967). Effect of different nutritional conditions on the synthesis of tricarboxylic acid cycle enzymes. *Journal of Bacteriology*, 93(6):1777–1787.
- [Hao et al., 2013] Hao, T., Han, B., Ma, H., Fu, J., Wang, H., Wang, Z., Tang, B., Chen, T., and Zhao, X. (2013). In silico metabolic engineering of bacillus subtilis for improved production of riboflavin, egl-237, (r,r)-2,3-butanediol and isobutanol. *Molecular bioSystems*, 9.
- [Happold, 2009] Happold, F. C., . L. E. (2009). *Tryptophanase-tryptophan reaction.*, volume 51.
- [Heirendt et al., 2019] Heirendt, L., Arreckx, S., Pfau, T., Mendoza, S. N., Richelle, A., Heinken, A., Haraldsdóttir, H. S., Wachowiak, J., Keating, S. M., Vlasov, V., et al. (2019). Creation and analysis of biochemical constraint-based models using the cobra toolbox v. 3.0. *Nature protocols*, 14(3):639–702.
- [Henry et al., 2009] Henry, C. S., Zinner, J. F., Cohoon, M. P., and Stevens, R. L. (2009). ibsu1103: A new genome-scale metabolic model of bacillus subtilis based on seed annotations. *Genome biology*, 10(6):R69.
- [Hernández et al., 2004] Hernández, A., Rives, N., Caballero, A., Hernández, A. N., and Heydrich, M. (2004). Caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz en la producción de metabolitos del tipo aia, sideróforos y ácido salicílico. *Revista Colombiana de biotecnología*, 6(1):6–13.
- [Hernández-Mendoza et al., 2010] Hernández-Mendoza, J. L., Moreno-Medina, V. R., Quiroz-Velásquez, J. D., García-Olivares, J. G., and Mayek-Pérez, N. (2010). Efecto de diferentes concentraciones de ácido antranílico en el crecimiento del maíz. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1):57–63.

- [Higgins and Dworkin, 2012] Higgins, D. and Dworkin, J. (2012). Recent progress in bacillus subtilis sporulation. *FEMS microbiology reviews*, 36(1):131–148.
- [Iwatani et al., 2007] Iwatani, S., Van Dien, S., Shimbo, K., Kubota, K., Kageyama, N., Iwahata, D., Miyano, H., Hirayama, K., Usuda, Y., Shimizu, K., et al. (2007). Determination of metabolic flux changes during fed-batch cultivation from measurements of intracellular amino acids by lc-ms/ms. *Journal of biotechnology*, 128(1):93–111.
- [Jeske et al., 2019] Jeske, L., Placzek, S., Schomburg, I., Chang, A., and Schomburg, D. (2019). Brenda in 2019: a european elixir core data resource. *Nucleic acids research*, 47(D1):D542–D549.
- [Kabisch et al., 2013] Kabisch, J., Pratzka, I., Meyer, H., Albrecht, D., Lalk, M., Ehrenreich, A., and Schweder, T. (2013). Metabolic engineering of bacillus subtilis for growth on overflow metabolites. *Microbial cell factories*, 12(1):72.
- [Kamilova et al., 2006] Kamilova, F., Kravchenko, L. V., Shaposhnikov, A. I., Azarova, T., Makarova, N., and Lugtenberg, B. (2006). Organic acids, sugars, and l-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(3):250–256.
- [Kanehisa et al., 2019] Kanehisa, M., Sato, Y., Furumichi, M., Morishima, K., and Tanabe, M. (2019). New approach for understanding genome variations in kegg. *Nucleic acids research*, 47(D1):D590–D595.
- [Karlik et al., 2018] Karlik, M., Fekete, J., Mindrescu, M., Grădinaru, I., Bozsó, G., Bíró, L., and Kern, Z. (2018). Natural and anthropogenic changes in a lake-forest system in bukovina (romania) since 1340 ad documented by sedimentary organic geochemistry (c, n and n-alkanes). *Quaternary International*, 493:166–175.
- [Kitano, 2004] Kitano, H. (2004). Biological robustness. *Nature Reviews Genetics*, 5(11):826–837.

- [Kobayashi et al., 2003] Kobayashi, K., Ehrlich, S. D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K., Arnaud, M., Asai, K., Ashikaga, S., Aymerich, S., Bessieres, P., et al. (2003). Essential bacillus subtilis genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8):4678–4683.
- [Kogure et al., 2016] Kogure, T., Kubota, T., Suda, M., Hiraga, K., and Inui, M. (2016). Metabolic engineering of corynebacterium glutamicum for shikimate overproduction by growth-arrested cell reaction. *Metabolic engineering*, 38:204–216.
- [Koo et al., 2017] Koo, B.-M., Kritikos, G., Farelli, J. D., Todor, H., Tong, K., Kimsey, H., Wapinski, I., Galardini, M., Cabal, A., Peters, J. M., et al. (2017). Construction and analysis of two genome-scale deletion libraries for bacillus subtilis. *Cell systems*, 4(3):291–305.
- [Kosono et al., 2015] Kosono, S., Tamura, M., Suzuki, S., Kawamura, Y., Yoshida, A., Nishiyama, M., and Yoshida, M. (2015). Changes in the acetylome and succinylome of bacillus subtilis in response to carbon source. *PloS one*, 10(6).
- [Kotte et al., 2010] Kotte, O., Zaugg, J. B., and Heinemann, M. (2010). Bacterial adaptation through distributed sensing of metabolic fluxes. *Molecular systems biology*, 6(1).
- [Kunst et al., 1997] Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., et al. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium bacillus subtilis. *Nature*, 390(6657):249–256.
- [Larhlimi et al., 2011] Larhlimi, A., Blachon, S., Selbig, J., and Nikoloski, Z. (2011). Robustness of metabolic networks: a review of existing definitions. *Biosystems*, 106(1):1–8.
- [Latif Khan et al., 2016] Latif Khan, A., Ahmed Halo, B., Elyassi, A., Ali, S., Al-Hosni, K., Hussain, J., Al-Harrasi, A., and Lee, I.-J. (2016). Indole acetic acid and acc deaminase from endophytic bacteria improves the growth of solarium lycopersicum. *Electronic Journal of Biotechnology*, 19(3):58–64.
- [Lavoie et al., 2020] Lavoie, M., Saint-Béat, B., Strauss, J., Guérin, S., Allard, A., V Hardy, S., Falciatore, A., and Lavaud, J. (2020). Genome-scale metabolic reconstruction and in silico

- perturbation analysis of the polar diatom *fragilariopsis cylindrus* predicts high metabolic robustness. *Biology*, 9(2):30.
- [Lee et al., 1997] Lee, J., Goel, A., Ataai, M., and Domach, M. (1997). Supply-side analysis of growth of *Bacillus subtilis* on glucose-citrate medium: Feasible network alternatives and yield optimality. *Applied and environmental microbiology*, 63(2):710–718.
- [Lee et al., 2004] Lee, S., Flores-Encarnacion, M., Contreras-Zentella, M., Garcia-Flores, L., Escamilla, J., and Kennedy, C. (2004). Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. *Journal of Bacteriology*, 186(16):5384–5391.
- [Link et al., 2015] Link, H., Fuhrer, T., Gerosa, L., Zamboni, N., and Sauer, U. (2015). Real-time metabolome profiling of the metabolic switch between starvation and growth. *Nature Methods*, 12(11):1091.
- [Liu et al., 2017] Liu, X., Ding, W., and Jiang, H. (2017). Engineering microbial cell factories for the production of plant natural products: from design principles to industrial-scale production. *Microbial cell factories*, 16(1):125.
- [López et al., 2009] López, D., Fischbach, M. A., Chu, F., Losick, R., and Kolter, R. (2009). Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(1):280–285.
- [Lopez et al., 2008] Lopez, D., Vlamakis, H., and Kolter, R. (2008). Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS microbiology reviews*, 33(1):152–163.
- [López García, 2015] López García, P. (2015). *Interacciones entre ácido desoxirribonucleico y la membrana plasmática durante el estado de competencia de Bacillus subtilis*. PhD thesis, Universidad Complutense de Madrid.
- [López-Reyes et al., 2012] López-Reyes, L., Hernández-Espinosa, M. Á., Ruiz-Careaga, J., Carcaño-Montiel, M. G., Medina de la Rosa, G., Portillo-Reyes, R., and Muñoz-Rojas, J.

- (2012). Adsorción de ácidos carboxílicos de origen vegetal y bacteriano en un suelo agrícola. *Terra Latinoamericana*, 30(3):261–270.
- [López et al., 2019] López, J. M. S. et al. (2019). Efecto de bacillus spp. en el control de salmonella y en el crecimiento de germinado de alfalfa.
- [Madigan et al., 2016] Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., and Stahl, D. A. (2016). *Microbiología de Brock-14ª Edición*. Artmed Editora.
- [Mahadevan et al., 2002] Mahadevan, R., Edwards, J. S., and Doyle III, F. J. (2002). Dynamic flux balance analysis of diauxic growth in escherichia coli. *Biophysical journal*, 83(3):1331–1340.
- [Marienhagen and Bott, 2013] Marienhagen, J. and Bott, M. (2013). Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products. *Journal of biotechnology*, 163(2):166–178.
- [Martínez et al., 2013] Martínez, V. S., Dietmair, S., Quek, L.-E., Hodson, M. P., Gray, P., and Nielsen, L. K. (2013). Flux balance analysis of cho cells before and after a metabolic switch from lactate production to consumption. *Biotechnology and bioengineering*, 110(2):660–666.
- [Medina et al., 2019] Medina, S. E. L., León, J. M., Rivero, A. E. G., Zavaleta, A. M. L., and Anthony, J. (2019). Efecto del ácido giberélico y del ácido indolacético en la micropropagación in vitro de solanum tuberosum var. maria reiche. *REBIOL*, 39(1):4–9.
- [Meima et al., 2004] Meima, R., Van Dijl, J. M., and Bron, S. (2004). Expression systems in bacillus. *Protein expression technologies: current status and future trends*. Horizon Bioscience, Wymondham, United Kingdom, pages 199–252.
- [Meyer et al., 2011] Meyer, F. M., Gerwig, J., Hammer, E., Herzberg, C., Commichau, F. M., Völker, U., and Stülke, J. (2011). Physical interactions between tricarboxylic acid cycle enzymes in bacillus subtilis: evidence for a metabolon. *Metabolic engineering*, 13(1):18–27.

- [Meyer et al., 2013] Meyer, H., Weidmann, H., and Lalk, M. (2013). Methodological approaches to help unravel the intracellular metabolome of bacillus subtilis. *Microbial cell factories*, 12(1):69.
- [Michelena et al., 2002] Michelena, G., Saura, G., and Altuna, B. (2002). Bioproductos y caña de azúcar. (*Dic 2000*) V. 16 (120) p. 28-32.
- [Michna et al., 2016] Michna, R. H., Zhu, B., Mäder, U., and Stülke, J. (2016). Subti wiki 2.0—an integrated database for the model organism bacillus subtilis. *Nucleic acids research*, 44(D1):D654–D662.
- [Montaña Lara, 2015] Montaña Lara, J. S. (2015). Aproximación metagenómica para la identificación de enzimas lipolíticas en suelo de busque alto andino del parque nacional natural los nevados.
- [Narciandi-Díaz, 2020] Narciandi-Díaz, Ramón Emilio y Rivera-Martin, J. M. (2020). Producción de la proteína recombinante gp-41 (vih-1) en e. coli: Efecto del campo magnético. *Revista Cubana de Química*, 32(1):3–19.
- [Nielsen and Keasling, 2016] Nielsen, J. and Keasling, J. D. (2016). Engineering cellular metabolism. *Cell*, 164(6):1185–1197.
- [Nunes et al., 2018] Nunes, G. d. O., Menezes, K. A. S., Sampaio, A. A., Leite, J., FERNANDES JUNIOR, P. I., Seido, S. L., Zilli, J., and Martins, L. M. V. (2018). Polyphasic characterization of forage legumes root nodule bacteria isolated from semiarid region in brazil. *Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.
- [Oh et al., 2007] Oh, Y.-K., Palsson, B., Park, S., Schilling, C., and Mahadevan, R. (2007). Genome-scale reconstruction of metabolic network in bacillus subtilis based on high-throughput phenotyping and gene essentiality data. *The Journal of biological chemistry*, 282:28791–9.

- [Olivares, 2016] Olivares, M. V. (2016). *Análisis de la redundancia genética en la ruta de síntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos en Argemone mexicana L.* PhD thesis, Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- [Orth et al., 2010] Orth, J. D., Thiele, I., and Palsson, B. Ø. (2010). What is flux balance analysis? *Nature biotechnology*, 28(3):245–248.
- [Otero et al., 2010] Otero, J. M., Papadakis, M. A., Udatha, D. G., Nielsen, J., and Panagiotou, G. (2010). Yeast biological networks unfold the interplay of antioxidants, genome and phenotype, and reveal a novel regulator of the oxidative stress response. *PloS one*, 5(10).
- [Palacios López, 2015] Palacios López, O. A. (2015). Estudio de la interacción microalgabacteria sobre la producción de tiamina y triptófano por *Chlorella sorokiniana* y su efecto en la biosíntesis de aia por *Azospirillum brasilense*.
- [Paneque-Pérez, 2010] Paneque-Pérez, V. M. (2010). Manual de técnicas analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos.
- [Patten and Glick, 1996] Patten, C. L. and Glick, B. R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian journal of microbiology*, 42(3):207–220.
- [Patten and Glick, 2002] Patten, C. L. and Glick, B. R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(8):3795–3801.
- [Peng et al., 2015] Peng, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W., Miao, M., and Hua, Y. (2015). High-level production of poly (γ -glutamic acid) by a newly isolated glutamate-independent strain, *Bacillus methylotrophicus*. *Process Biochemistry*, 50(3):329–335.
- [Persello-Cartieaux et al., 2003] Persello-Cartieaux, F., Nussaume, L., and Robaglia, C. (2003). Tales from the underground: molecular plant–rhizobacteria interactions. *Plant, Cell & Environment*, 26(2):189–199.

- [Phillips and Strauch, 2002] Phillips, Z. and Strauch, M. (2002). *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59(3):392–402.
- [Pramanik and Keasling, 1997] Pramanik, J. and Keasling, J. (1997). Stoichiometric model of *Escherichia coli* metabolism: Incorporation of growth-rate dependent biomass composition and mechanistic energy requirements. *Biotechnology and Bioengineering*, 56(4):398–421.
- [Punt et al., 2002] Punt, P. J., van Biezen, N., Conesa, A., Albers, A., Mangnus, J., and van den Hondel, C. (2002). Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends in Biotechnology*, 20(5):200–206.
- [Ramírez-Alvarado et al., 2018] Ramírez-Alvarado, H. M. et al. (2018). Análisis de flujos metabólicos de cepa costarricense *Chlorella vulgaris*: modelo base para ingeniería metabólica de organismos autótrofos.
- [Ramos et al., 2000] Ramos, H. C., Hoffmann, T., Marino, M., Nedjari, H., Presecan-Siedel, E., Dreesen, O., Glaser, P., and Jahn, D. (2000). Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. *Journal of Bacteriology*, 182(11):3072–3080.
- [Reyes-García et al., 2019] Reyes-García, L. J., Cid Oyanedel, P. F., and Cuevas Catalan, P. F. (2019). Composición química y actividad biológica de la secreción larval de la especie *Phoracantha recurva* Newman, 1842 (Coleoptera: Cerambycidae). *Scientia Agropecuaria*, 10(1):79–84.
- [Rivera-Mackintosh, 2009] Rivera-Mackintosh, LUIS ROBERTO y NEVÁREZ-MOORILLÓN, G. V. (2009). Fuentes de carbono económicas para la producción de bioplásticos bacterianos. *Tecnociencia Chihuahua*, 3(2):58–63.
- [Romero et al., 2007] Romero, S., Merino, E., Bolívar, F., Gosset, G., and Martínez, A. (2007). Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for ethanol production: lactate dehydrogenase plays a key role in fermentative metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16):5190–5198.

- [Romero-Garcia et al., 2009] Romero-Garcia, S., Hernández-Bustos, C., Merino, E., Gosset, G., and Martinez, A. (2009). Homolactic fermentation from glucose and cellobiose using bacillus subtilis. *Microbial cell factories*, 8(1):23.
- [Rühl et al., 2012] Rühl, M., Le Coq, D., Aymerich, S., and Sauer, U. (2012). ¹³C-flux analysis reveals nadph-balancing transhydrogenation cycles in stationary phase of nitrogen-starving bacillus subtilis. *Journal of Biological Chemistry*, 287(33):27959–27970.
- [Sánchez García et al., 2014] Sánchez García, C. et al. (2014). Purificación de ácido indolacético obtenido a partir de una fermentación microbiana y su evaluación in vitro en *spathiphyllum wallisii* var. chopin. Technical report.
- [Sander et al., 2019] Sander, T., Farke, N., Diehl, C., Kuntz, M., Glatter, T., and Link, H. (2019). Allosteric feedback inhibition enables robust amino acid biosynthesis in e. coli by enforcing enzyme overabundance. *Cell systems*, 8(1):66–75.
- [Sarwar et al., 1992] Sarwar, M., Arshad, M., Martens, D., and Frankenberger, W. (1992). Tryptophan-dependent biosynthesis of auxins in soil. *Plant and Soil*, 147:207–215.
- [Sauer et al., 1996] Sauer, U., Hatzimanikatis, V., Hohmann, H.-P., Manneberg, M., Van Loon, A., and Bailey, J. E. (1996). Physiology and metabolic fluxes of wild-type and riboflavin-producing bacillus subtilis. *Applied and environmental microbiology*, 62(10):3687–3696.
- [Scarcella et al., 2017] Scarcella, A. S. d. A., Bizarria Junior, R., Bastos, R. G., and Magri, M. M. R. (2017). Temperature, ph and carbon source affect drastically indole acetic acid production of plant growth promoting yeasts. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 34(2):429–438.
- [Schallmey et al., 2004] Schallmey, M., Singh, A., and Ward, O. P. (2004). Developments in the use of bacillus species for industrial production. *Canadian journal of microbiology*, 50(1):1–17.

- [Sheikhian and Bina, 2016] Sheikhian, L. and Bina, S. (2016). Simultaneous extraction and hplc determination of 3-indole butyric acid and 3-indole acetic acid in pea plant by using ionic liquid-modified silica as sorbent. *Journal of Chromatography B*, 1009:34–43.
- [Sivasakthi et al., 2013a] Sivasakthi, S., Kanchana, D., Usharani, G., Saranraj, P., et al. (2013a). Production of plant growth promoting substance by *pseudomonas fluorescens* and *bacillus subtilis* isolates from paddy rhizosphere soil of cuddalore district, tamil nadu, india. *Int. J. Microbiol. Res*, 4(3):227–233.
- [Sivasakthi et al., 2013b] Sivasakthi, S., Kanchana, D., Usharani, G., Saranraj, P., et al. (2013b). Production of plant growth promoting substance by *pseudomonas fluorescens* and *bacillus subtilis* isolates from paddy rhizosphere soil of cuddalore district, tamil nadu, india. *Int. J. Microbiol. Res*, 4(3):227–233.
- [Soares-Silva et al., 2020] Soares-Silva, I., Ribas, D., Sousa-Silva, M., Azevedo-Silva, J., Rendulić, T., and Casal, M. (2020). Membrane transporters in the bioproduction of organic acids: state of the art and future perspectives for industrial applications. *FEMS Microbiology Letters*, 367(15):fnaa118.
- [Spaepen et al., 2007] Spaepen, S., Vanderleyden, J., and Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews*, 31(4):425–448.
- [Stouthamer, 1973] Stouthamer, A. (1973). A theoretical study on the amount of atp required for synthesis of microbial cell material. *Antonie van Leeuwenhoek*, 39(1):545–565.
- [Szklarczyk et al., 2016] Szklarczyk, D., Morris, J. H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., Santos, A., Doncheva, N. T., Roth, A., Bork, P., et al. (2016). The string database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic acids research*, page gkw937.
- [Taiz et al., 2017] Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., and Murphy, A. (2017). *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. Artmed Editora.

- [Tanaka et al., 2013] Tanaka, K., Henry, C. S., Zinner, J. F., Jolivet, E., Cohoon, M. P., Xia, F., Bidnenko, V., Ehrlich, S. D., Stevens, R. L., and 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(1):687–699.
- [Tännler et al., 2008] Tännler, S., Fischer, E., Le Coq, D., Doan, T., Jamet, E., Sauer, U., and Aymerich, S. (2008). Ccpn controls central carbon fluxes in bacillus subtilis. *Journal of bacteriology*, 190(18):6178–6187.
- [Terzer et al., 2009] Terzer, M., Maynard, N. D., Covert, M. W., and Stelling, J. (2009). Genome-scale metabolic networks. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 1(3):285–297.
- [Thiele and Palsson, 2010a] Thiele, I. and Palsson, B. (2010a). A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nature protocols*, 5:93–121.
- [Thiele and Palsson, 2010b] Thiele, I. and Palsson, B. Ø. (2010b). A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nature protocols*, 5(1):93.
- [Tjalsma et al., 2004] Tjalsma, H., Antelmann, H., Jongbloed, J. D., Braun, P. G., Darmon, E., Dorenbos, R., Dubois, J.-Y. F., Westers, H., Zanen, G., Quax, W. J., et al. (2004). Proteomics of protein secretion by bacillus subtilis: separating the “secrets” of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68(2):207–233.
- [Tong et al., 2013] Tong, W., Chen, Z., Cao, Z., Wang, Q., Zhang, J., Bai, X., Wang, R., and Liu, S. (2013). Robustness analysis of a constraint-based metabolic model links cell growth and proteomics of thermoanaerobacter tengcongensis under temperature perturbation. *Molecular BioSystems*, 9(4):713–722.
- [Torres-Rubio et al., 2000] Torres-Rubio, M. G., Valencia-Plata, S. A., Bernal-Castillo, J., Martínez-Nieto, P., et al. (2000). Isolation of enterobacteria, azotobacter sp. and pseudomonas sp., producers of indole-3-acetic acid and siderophores, from colombian rice rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42(4):171–176.

- [Vintimilla et al., 2017] Vintimilla, C., Astudillo, F., Severeyn, E., Encalada, L., and Wong, S. (2017). Normalización de entradas de una red de kohonen para clasificación de síndrome metabólico en adultos mayores de la ciudad de cuenca. *Maskana*, 8:379–384.
- [Vongsangnak et al., 2016] Vongsangnak, W., Klanchui, A., Tawornsamretkit, I., Tatiyabornchai, W., Laoteng, K., and Meechai, A. (2016). Genome-scale metabolic modeling of *mucor circinelloides* and comparative analysis with other oleaginous species. *Gene*, 583(2):121–129.
- [Vos et al., 2011] Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H., and Whitman, W. B. (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*, volume 3. Springer Science & Business Media.
- [Warner and Lolkema, 2002] Warner, J. B. and Lolkema, J. S. (2002). Growth of *bacillus subtilis* on citrate and isocitrate is supported by the mg^{2+} -citrate transporter *citm*. *Microbiology*, 148(11):3405–3412.
- [Watson et al., 2016] Watson, E., Olin-Sandoval, V., Hoy, M. J., Li, C.-H., Lousse, T., Yao, V., Mori, A., Holdorf, A. D., Troyanskaya, O. G., Ralser, M., et al. (2016). Metabolic network rewiring of propionate flux compensates vitamin b12 deficiency in *c. elegans*. *Elife*, 5:e17670.
- [Westbrook et al., 2018] Westbrook, A. W., Ren, X., Moo-Young, M., and Chou, C. P. (2018). Metabolic engineering of *bacillus subtilis* for l-valine overproduction. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(11):2778–2792.
- [Whitman et al., 2015] Whitman, W. B. et al. (2015). *Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria*, volume 410. Wiley Online Library.
- [Wolff et al., 2007] Wolff, A. C., Hammond, M. E. H., Schwartz, J. N., Hagerty, K. L., Allred, D. C., Cote, R. J., Dowsett, M., Fitzgibbons, P. L., Hanna, W. M., Langer, A., et al. (2007). American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recom-

- mendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 131(1):18–43.
- [Xu et al., 2008] Xu, Z.-X., Sun, X., et al. (2008). Constrain-based analysis of gene deletion on the metabolic flux redistribution of *saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 1(02):121.
- [Yang et al., 2020] Yang, S., Wang, Y., Cai, Z., Zhang, G., and Song, H. (2020). Metabolic engineering of *bacillus subtilis* for high-titer production of menaquinone-7. *AIChE Journal*, 66(1):e16754.
- [Yang et al., 2007] Yang, S., Zhang, Q., Guo, J., Charkowski, A. O., Glick, B. R., Ibekwe, A. M., Cooksey, D. A., and Yang, C.-H. (2007). Global effect of indole-3-acetic acid biosynthesis on multiple virulence factors of *erwinia chrysanthemi* 3937. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(4):1079–1088.
- [Zaidi et al., 2006] Zaidi, S., Usmani, S., Singh, B. R., and 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(6):991–997.
- [Zamboni et al., 2004] Zamboni, N., Maaheimo, H., Szyperski, T., Hohmann, H.-P., and Sauer, U. (2004). The phosphoenolpyruvate carboxykinase also catalyzes c3 carboxylation at the interface of glycolysis and the tca cycle of *bacillus subtilis*. *Metabolic engineering*, 6(4):277–284.
- [Zeigler et al., 2008] Zeigler, D. R., Prágai, Z., Rodriguez, S., Chevreux, B., Muffler, A., Albert, T., Bai, R., Wyss, M., and Perkins, J. B. (2008). The origins of 168, w23, and other *bacillus subtilis* legacy strains. *Journal of bacteriology*, 190(21):6983–6995.
- [Zhang et al., 2012] Zhang, H., Zhu, J., Zhu, X., Cai, J., Zhang, A., Hong, Y., Huang, J., Huang, L., and Xu, Z. (2012). High-level exogenous glutamic acid-independent production of poly-(γ -glutamic acid) with organic acid addition in a new isolated *bacillus subtilis* c10. *Bioresource technology*, 116:241–246.

- [Zhang et al., 2008] Zhang, Q., Teng, H., Sun, Y., Xiu, Z., and Zeng, A. (2008). Metabolic flux and robustness analysis of glycerol metabolism in *klebsiella pneumoniae*. *Bioprocess and biosystems engineering*, 31(2):127–135.
- [Zhang et al., 2011] Zhang, X.-Z., Sathitsuksanoh, N., Zhu, Z., and Zhang, Y.-H. P. (2011). One-step production of lactate from cellulose as the sole carbon source without any other organic nutrient by recombinant cellulolytic *bacillus subtilis*. *Metabolic engineering*, 13(4):364–372.
- [Zhao and Shimizu, 2003] Zhao, J. and Shimizu, K. (2003). Metabolic flux analysis of *escherichia coli* k12 grown on ¹³c-labeled acetate and glucose using gc-ms and powerful flux calculation method. *Journal of biotechnology*, 101(2):101–117.
- [Zhao, 2010] Zhao, Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual review of plant biology*, 61:49–64.
- [Zissi et al., 1997] Zissi, U., Lyberatos, G., and Pavlou, S. (1997). Biodegradation of p-aminoazobenzene by *bacillus subtilis* under aerobic conditions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19(1):49–55.
- [Zuo et al., 2018] Zuo, S., Xiao, J., Zhang, Y., Zhang, X., Nomura, C. T., Chen, S., and Wang, Q. (2018). Rational design and medium optimization for shikimate production in recombinant *bacillus licheniformis* strains. *Process biochemistry*, 66:19–27.

Anexos

Anexos A

Cromatogramas.

Los cromatogramas mostrados en las Figuras 1-5 fueron obtenidos utilizando columna Aminex HPX-87H y fase móvil de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 5 mM mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Estos cromatogramas se corresponden a los patrones utilizados para determinar la concentración utilizando el Factor- K

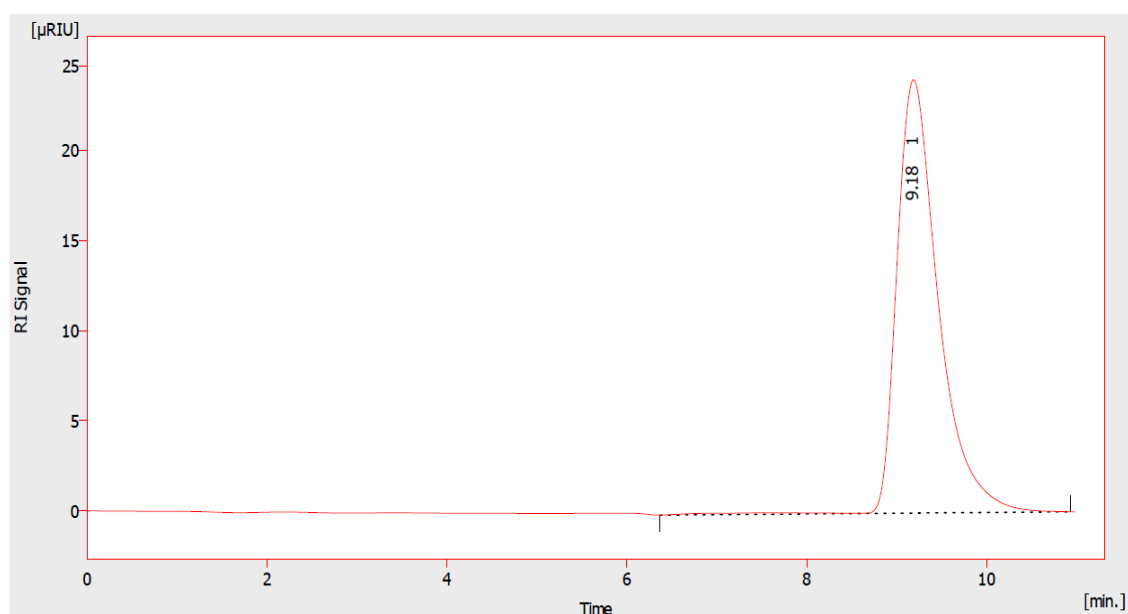


Tabla de resultados

	Tiempo de retenc [min]	Área [mRIU.s]	Altura [mRIU]	Área [%]	Altura [%]	A05 [min]	Nombre Compuesto
1	9.183	0.773	0.024	100.0	100.0	0.49	Glucosa
	Total	0.773	0.024	100.0	100.0		

Fig 1. Cromatograma obtenido utilizando HPLC para glucosa

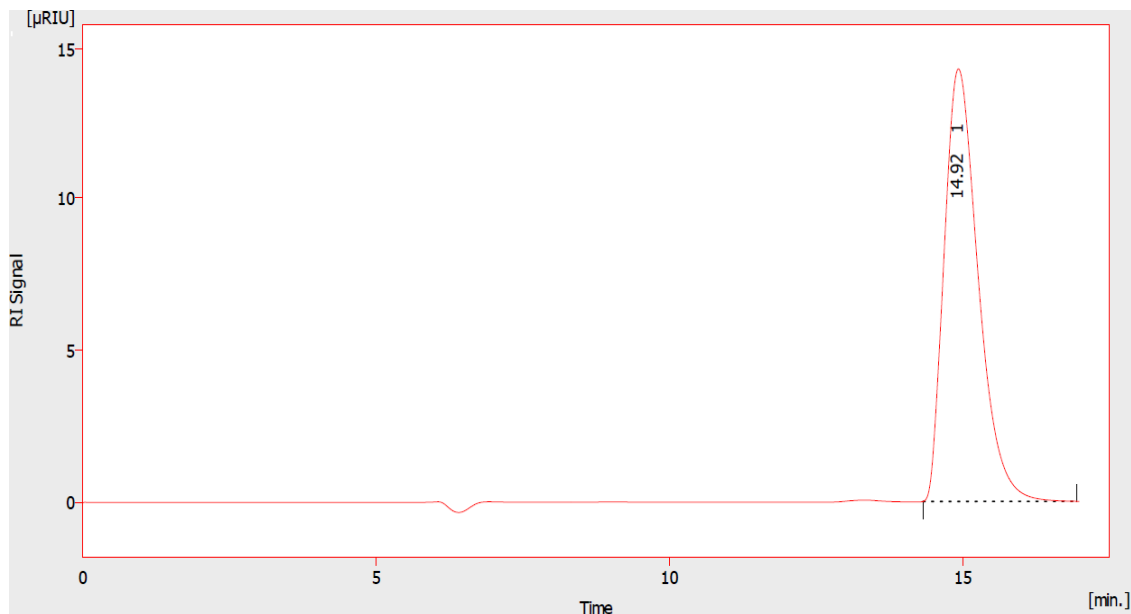


Tabla de resultados

	Tiempo de retenc [min]	Área [mRIU.s]	Altura [mRIU]	Área [%]	Altura [%]	A05 [min]	Nombre Compuesto
1	14.917	0.571	0.014	100.0	100.0	0.63	Acetato
	Total	0.571	0.014	100.0	100.0		

Fig 1. Cromatograma obtenido utilizando HPLC para acetato

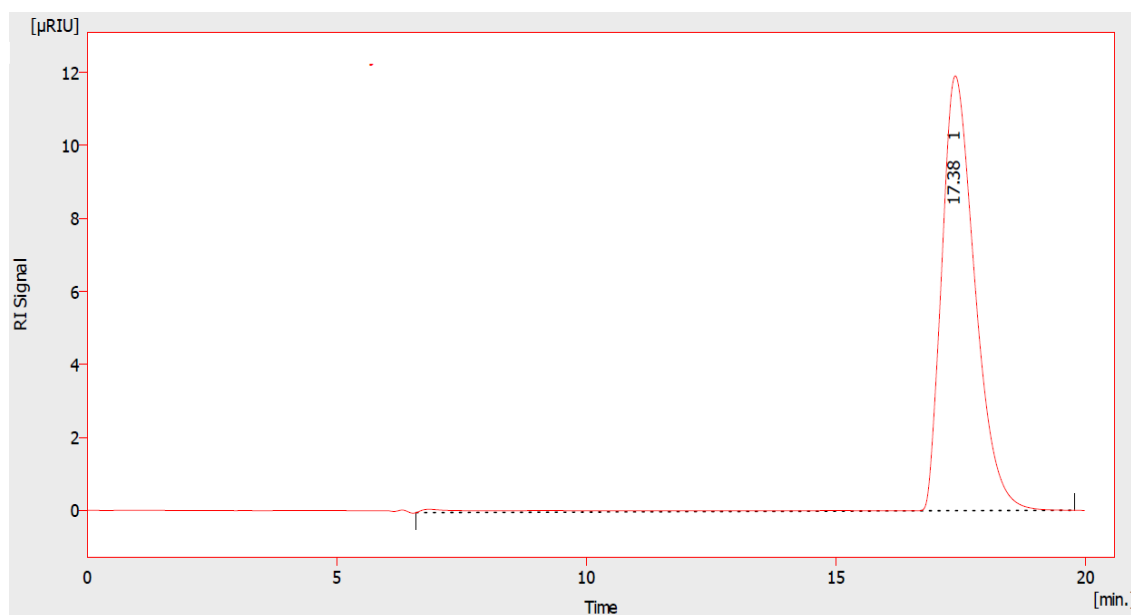


Tabla de resultados

	Tiempo de retenc [min]	Área [mRIU.s]	Altura [mRIU]	Área [%]	Altura [%]	A05 [min]	Nombre Compuesto
1	17.383	0.565	0.012	100.0	100.0	0.72	Propionato
	Total	0.565	0.012	100.0	100.0		

Fig 1. Cromatograma obtenido utilizando HPLC para propionato

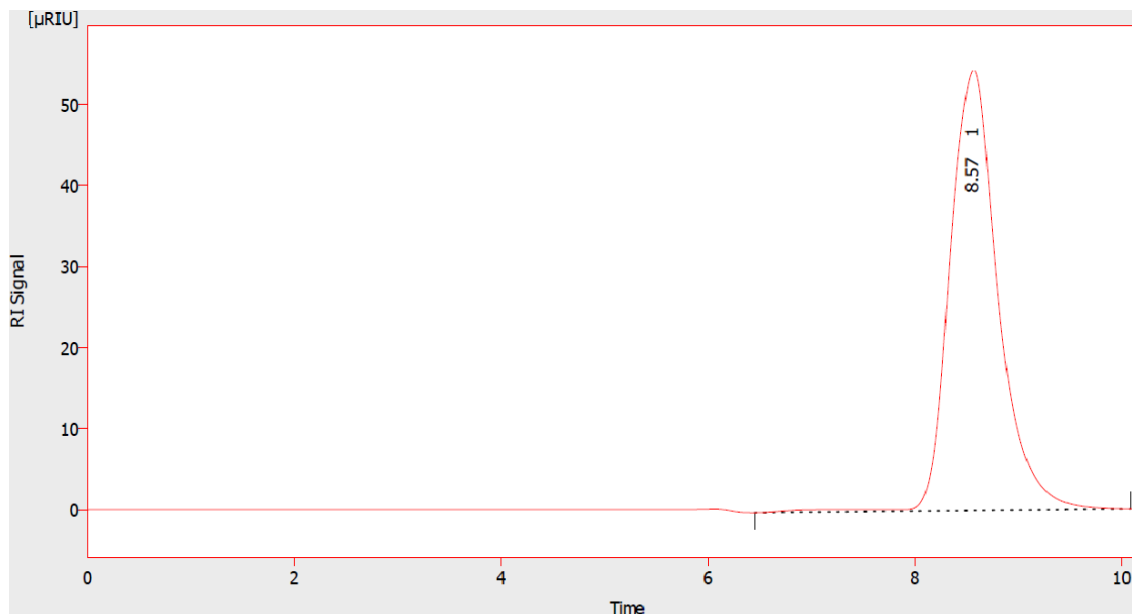


Tabla de resultados

	Tiempo de retenc [min]	Área [mRIU.s]	Altura [mRIU]	Área [%]	Altura [%]	A05 [min]	Nombre Compuesto
1	8.567	1.763	0.054	100.0	100.0	0.48	Citrato
	Total	1.763	0.054	100.0	100.0		

Fig 1. Cromatograma obtenido utilizando HPLC para citrato

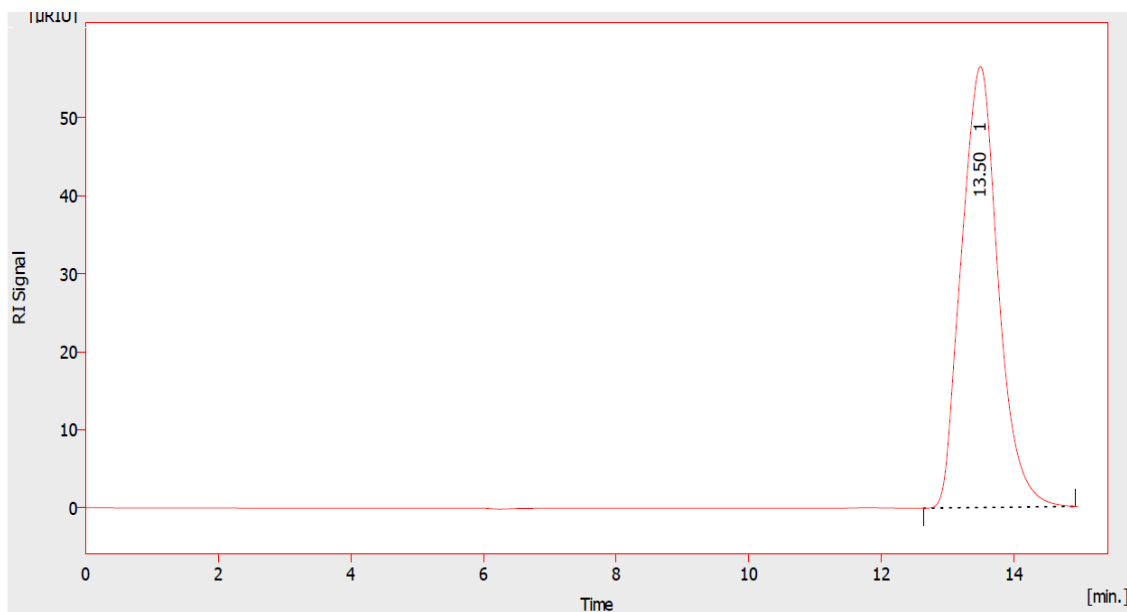


Tabla de resultados

	Tiempo de retenc [min]	Área [mRIU.s]	Altura [mRIU]	Área [%]	Altura [%]	A05 [min]	Nombre Compuesto
1	13.500	2.181	0.057	100.0	100.0	0.62	Glicerol
	Total	2.181	0.057	100.0	100.0		

Fig 1. Cromatograma obtenido utilizando HPLC para glicerol

Anexos B

Curva patrón de AIA.

La curva patrón de AIA utilizando el reactivo de Salkowski. [Sarwar et al., 1992].

1. Volumen de muestra: 500 μL y Volumen de revelador : 500 μL
2. Revelador: Reactivo de Salkowski: 12 g de FeCl_3 en 1L de H_2SO_4 7,9 mol/L .

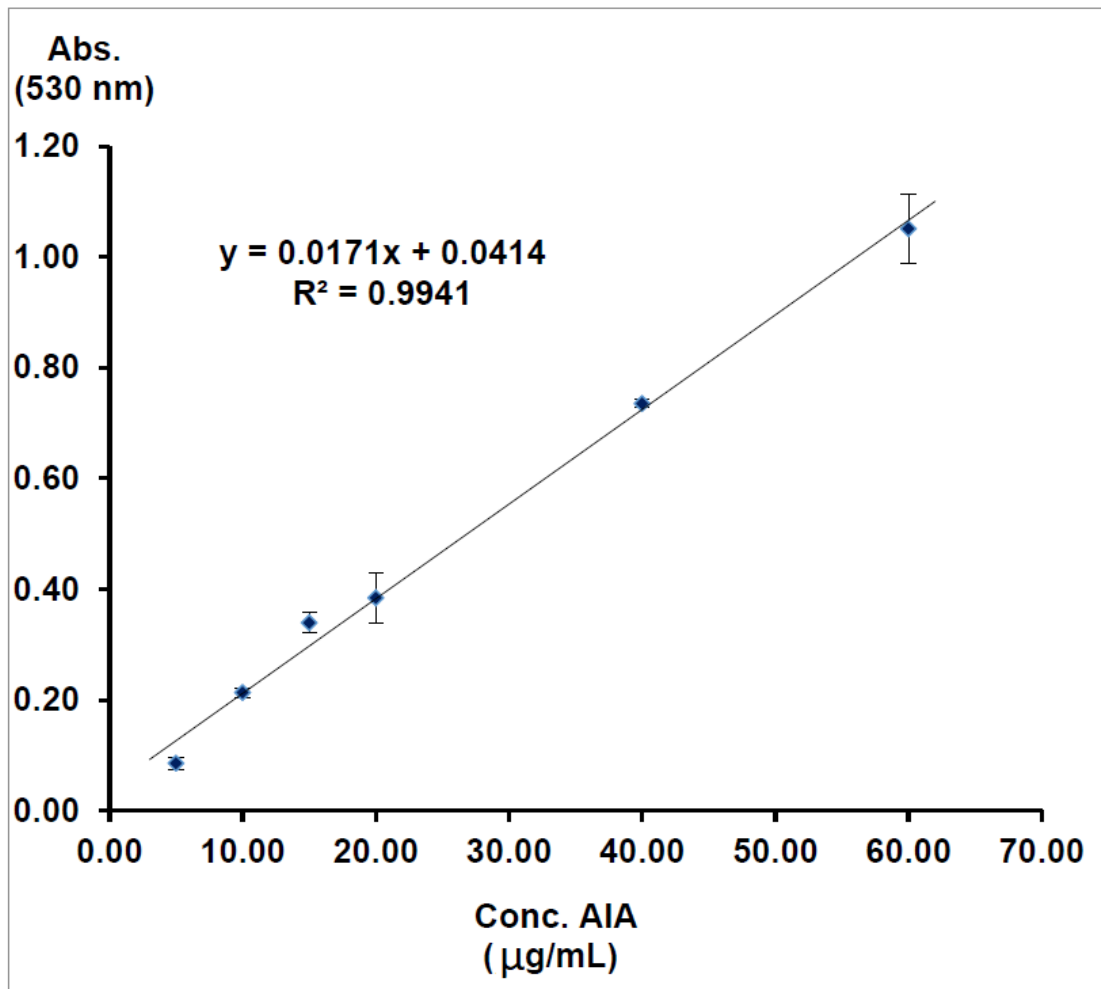
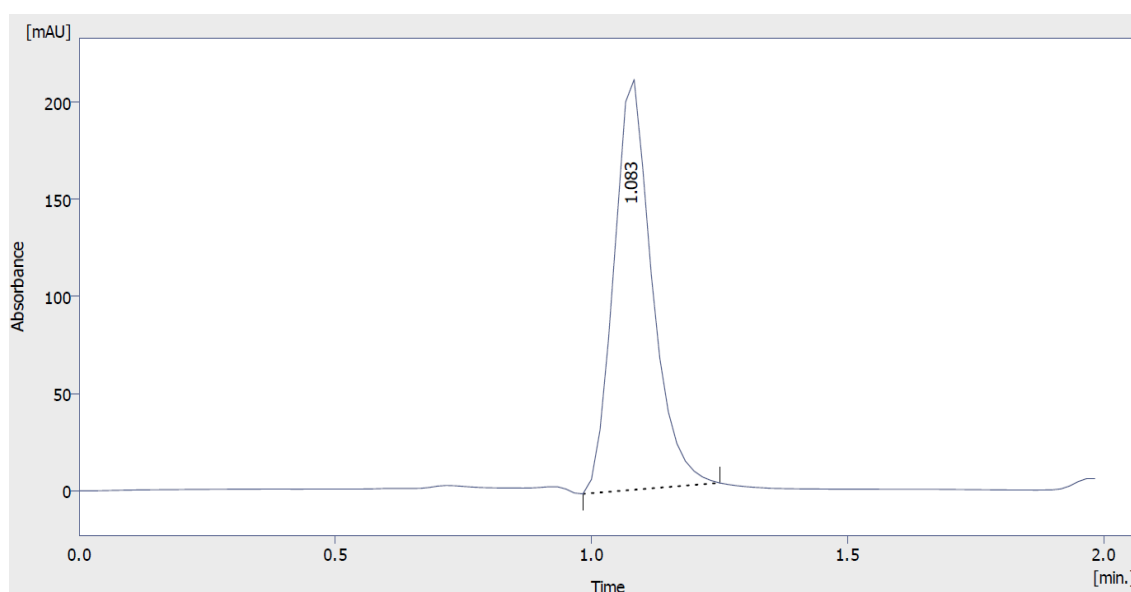


Fig 1. Curva patrón de AIA utilizando el reactivo de Salkowski

Anexos C

Cromatogramas.

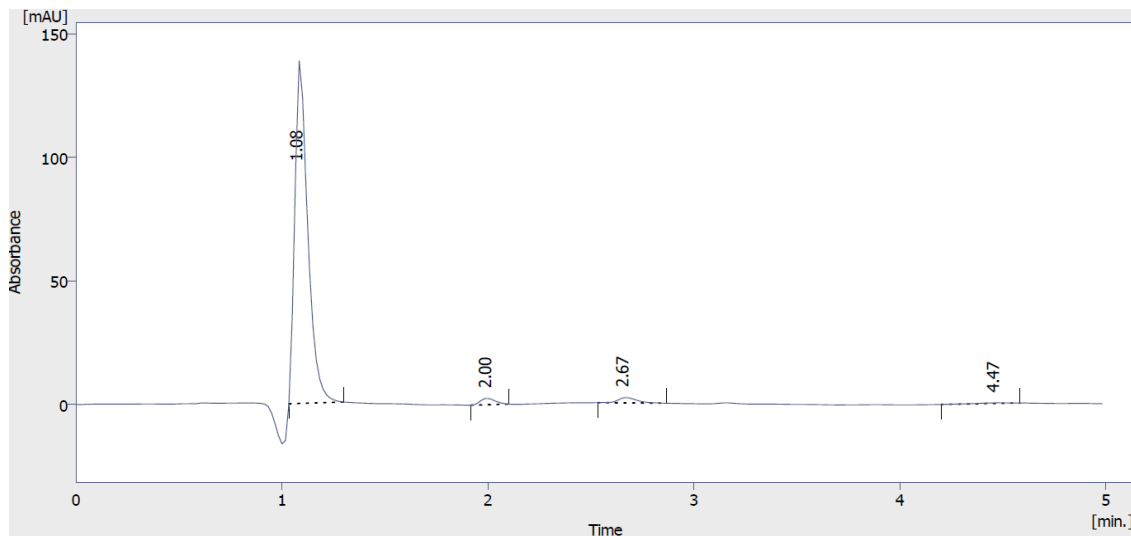
Los cromatogramas mostrados en las Figuras 1-3 fueron obtenidos utilizando columna C-18 y fase móvil de acetato y agua 50:50 mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Estos cromatogramas se corresponden a la producción de AIA utilizando glucosa como fuente de carbono.



Result Table (Uncal - I: |RESULTADOS HPLC\FREDDY INDOL\INSTRUMENT 1 - 23_01_2020 01_14_34 P.M. - S 2600: Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Compound Name
1	1.083	1093.939	211.058	100.0	100.0	0.10	Trp
	Total	1093.939	211.058	100.0	100.0		

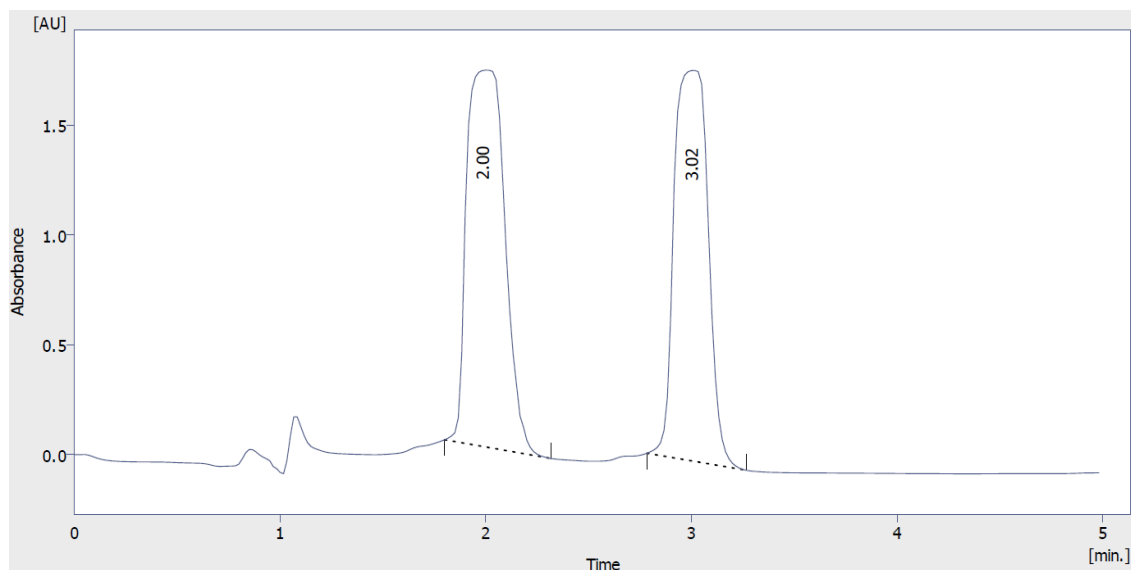
Fig 1. Cromatograma obtenido utilizando HPLC a las 0 horas



Result Table (Uncal - I:|RESULTADOS HPLC|FREDDY INDOL|INSTRUMENT 1 - 23_01_2020 01_38_31 P.M. - S 2600: Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Compound Name
1	1.083	605.595	138.596	95.4	96.6	0.08	Trp
2	2.000	12.843	2.555	2.0	1.8	0.10	AIA
3	2.667	13.606	2.143	2.1	1.5	0.12	
4	4.467	2.530	0.243	0.4	0.2	0.18	
	Total	634.574	143.538	100.0	100.0		

Fig 2. Cromatograma obtenido utilizando HPLC a las 18 horas



Result Table (Uncal - I:|RESULTADOS HPLC|FREDDY INDOL|INSTRUMENT 1 - 23_01_2020 01_22_03 P.M. - S 2600: Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Compound Name
1	2.000	22091.537	1715.195	52.0	49.1	0.23	AIA
2	3.017	20414.512	1779.727	48.0	50.9	0.20	
	Total	42506.049	3494.922	100.0	100.0		

Fig 2. Cromatograma obtenido utilizando HPLC a las 48 horas

Anexos D

Cálculo de parámetros cinéticos.

Los parámetros cinéticos μ y q_s fueron obtenidos a partir de las ecuaciones de la recta que se presentan en las gráficas. El parámetro IVC se obtuvo a partir del logaritmo neperiano (ln) de la biomasa obtenida y a partir de estos logaritmos se utilizó la regla de Simpson para calcular el IVC. Los valores numéricos de μ y q_s fueron obtenidos a partir de la integración numérica del área bajo la curva.

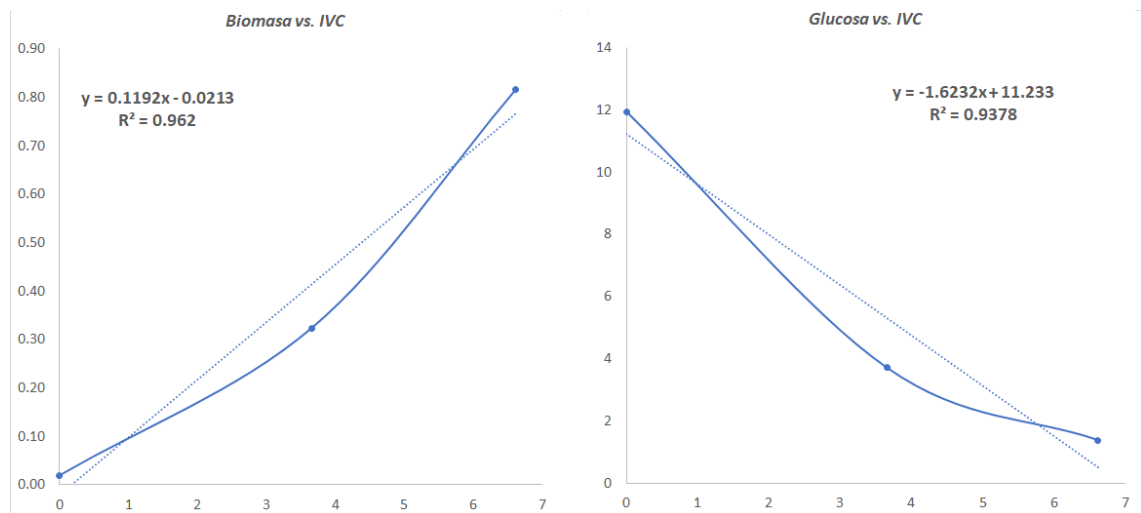


Fig 1. Parámetros cinéticos μ y q_s obtenidos para GLU.

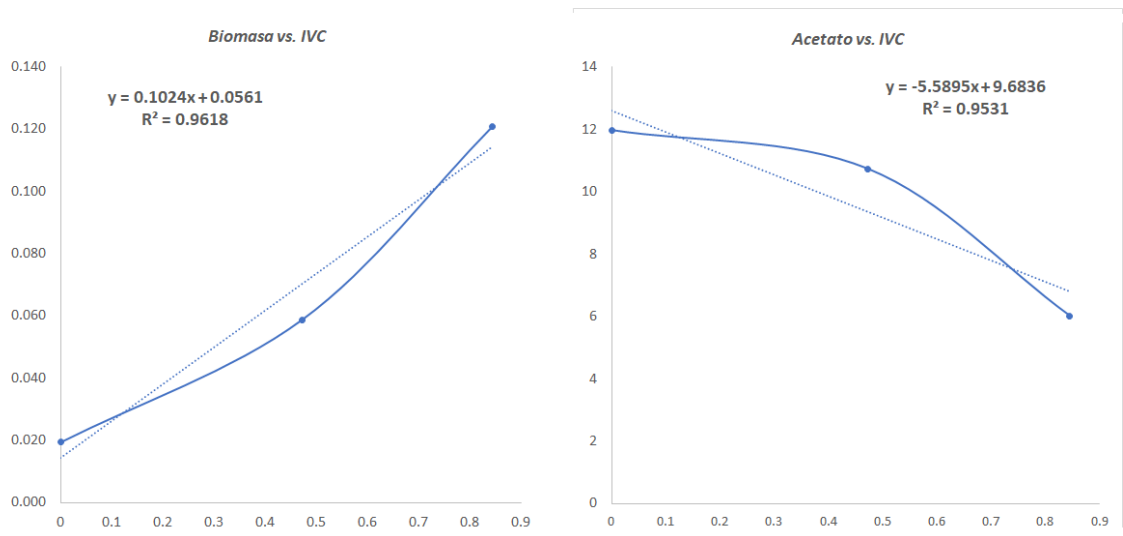


Fig 2. Parámetros cinéticos μ y qs obtenidos para CIT.

Anexos E

Búsqueda de genes metabólicos

Estos son los genes que se examinaron para la extensión del modelo.

Tabla 5.1:

Proteína	Genes	Organismo	Tamaño
2-oxoglutamato amidase (EC 3.5.1.111)	A3772-07430, B4122-1654, B4417-3817 C7M23-03357 GII81-07285	<i>Bacillus subtilis</i>	259
Carbon-nitrogen family hydrolase	BH660-07560 GN311-02630	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	259
Carbon-nitrogen family hydrolase	HCN55-07425	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis str. SMY</i>	259
Putative hydrolase (EC 3.5.1.-)	<i>mntU C663-1398</i>	<i>Bacillus subtilis XF-1</i>	259
CN hydrolase domain-containing protein	BSSC8-29340	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis str. SC-8</i>	259
Hidrolase MtnU	D9C22-07310	<i>Bacillus sp. WR11</i>	259
NAD(P)-binding protein	GN311-05510	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	478
Flavin monoamine oxidase family	HCN55-10310	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis str. SMY</i>	478
Monoamine oxidase	<i>aofH BS16045-02028</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	478

Anexos F

Prueba de Tukey *a posteriori*

La prueba de comparación de medias de Tukey *a posteriori* utilizando análisis de varianza de factor simple fue realizada entre los $Y_{p/s}$ (g AIA/g Trp) alcanzados por *B. subtilis* para cada fuente de carbono analizada. Se aprecian diferencias significativas entre todas las medias analizadas, excepto entre las medias de Glicerol y Glucosa.

SUMMARY					
Groups	Count	Sum	Average	Variance	
Column 1	3	241.0679	80.3559741	0.006934	
Column 2	3	264.3052	88.101732	0.15544	
Column 3	3	293.4567	97.8188931	0.065827	
Column 4	3	280.3004	93.433458	0.120625	
Column 5	3	250.9502	83.65008	0.025833	

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	605.995777	4	151.498944	2021.821	1.72E-14	3.47805
Within Groups	0.749319302	10	0.07493193			
Total	606.7450963	14				

HSD					
	HSD	0.684322			
	Multiplicador	4.33			
	Mse	0.074932			
	n	3			
	Glucosa	Acetato	Propionato	Citrato	Glicerol
Glucosa		-7.74576	-17.462919	-13.1775	-3.29411
Acetato			-9.717161	-5.43173	4.451652
Propionato				4.385435	14.16881
Citrato					9.883378
Glicerol					

Fig 1. Analisis de varianza (Anova) de factor simple realizado en Excel 2020.

La prueba de comparación de medias de Tukey *a posteriori* utilizando análisis de varianza de factor simple fue realizada entre los valores de balance de carbono para cada fuente de carbono analizada. Se aprecian diferencias significativas entre todas las medias analizadas, excepto entre las medias de Glicerol-Propionato .

<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
Glucosa	3	226.5311	75.51035	0.022608
Acetato	3	155.8356	51.94518	0.026394
Propionato	3	195.4016	65.13385	0.943817
Citrato	3	181.6901	60.56338	0.012195
Glicerol	3	203.4699	67.82338	0.012195

ANOVA						
<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	884.4473	4	221.1118	1086.856	3.81E-13	3.47805
Within Groups	2.034417	10	0.203442			
Total	886.4817	14				

	HSD	1.12758			
	Multiplicad				
	or	4.33			
	Mse	0.203442			
	n	3			
	Glucosa	Acetato	Propionato	Citrato	Glicerol
Glucosa		23.56517	10.3765	14.94697	7.686971
Acetato			-13.1887	-8.6182	-15.8782
Propionato				4.57047	-2.68953
Citrato					-7.26
Glicerol					

Fig 1. Analisis de varianza (Anova) de factor simple realizado en Excel 2020.

Anexos G

STRING (Herramienta de interacciones genes / proteínas)

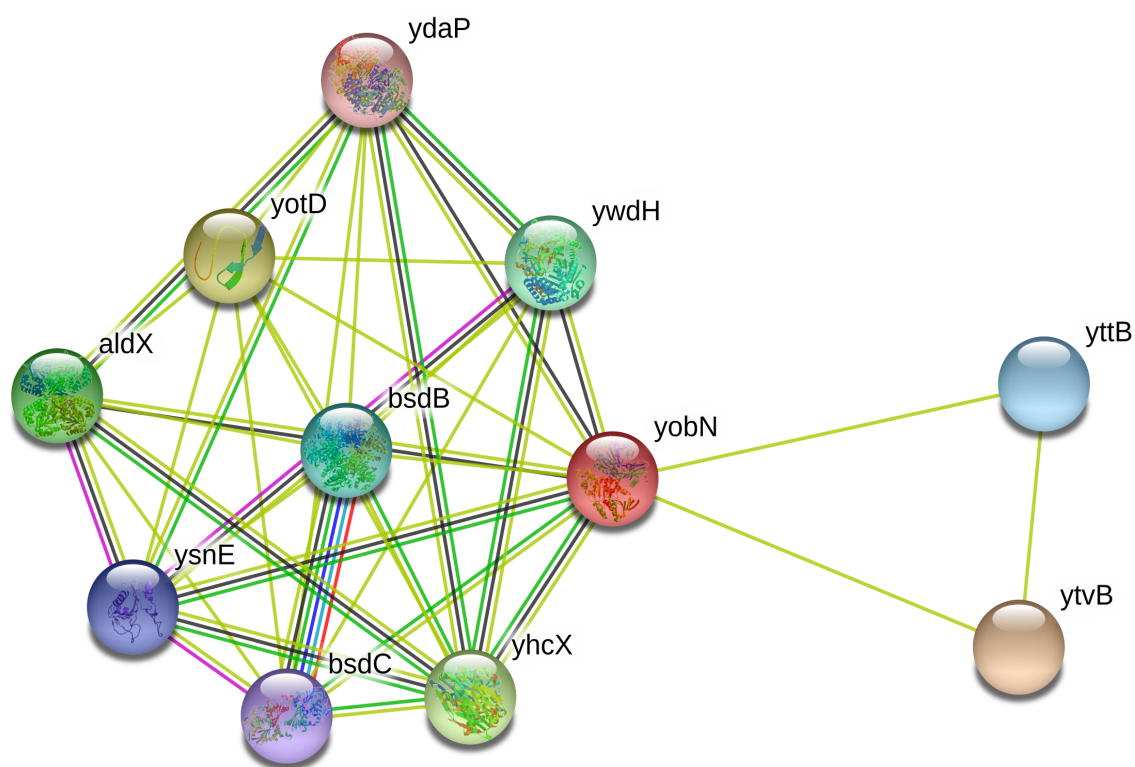


Fig 1B. Correlación entre nodos de una red (proteínas).El número de edges, representa la interconexión proteína-proteína

La red mostrada cuenta con 11 nodos (proteínas) y 38 edges (conexiones) entre proteínas con función oxidasa y flavin transferasa. Los nodos más interconectados poseen una mayor cantidad de información para su asignación funcional. La base de datos STRING asigna la función de oxidasa putativa de L-aminoácidos basada en 3 evidencias: la presencia de dominios conservados, similitud estructural y homología limitada (36.3% proteína-proteína)

Anexos H

BLASTtp (Herramienta de búsqueda de homología de genes)

Alineamiento de secuencia realizado entre la enzima amino oxidasa y la *Trp* 2- monooxigenasa de *B. subtilis*. Se aprecia un 99% de identidad con 470/474 positivos en el alineamiento

Sequence ID: [KIL30953.1](#) Length: 499 Number of Matches: 1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
973 bits(2515)	0.0	Compositional matrix adjust.	468/474(99%)	470/474(99%)	0/474(0%)
Query 1	MNDDMVKIIIRNGLSASQHPKHILVIGAGLSGLVSASLLKNAGHRVTILEASGRAGGRVCT				60
Sbjct 26	MNDDMVKIIIRNGLSASQHPKHILVIGAGLSGLVSASLLKNAGHRVTILEASGR GGRVCT				85
Query 61	LRSPFSDDLVFNAGPMRIPNNHSLTLEYIKKFKLPTNVFINRTPMDIIYANGIKTRLQVF				120
Sbjct 86	LRSPFSDDLVFNAGPMRIPNNHSLTLEYIKKFKLPTNVFINRTPMDIIYANGIKTRLQVF				145
Query 121	ERAPGILRYPVAPNEQGKTSEELMLSLQPIILNFINQNPARNWRIVEEQYKNHSLSSFLN				180
Sbjct 146	ERAP ILRYPVAPNEQGKTSEEL+LSLLQPIILNFINQNPARNWRIVEEQYKN+SLSSFLN				205
Query 181	TYFSYGAIDMIGVLLDMEAYMGMSLVEVLRESIFFSSPAHFYEITGGMDLLPHAFLPQLK				240
Sbjct 206	TYFSYGAIDMIGVLLDMEAYMGMSLVEVLRESIFFSSPAHFYEITGGMDLLPHAFLPQLK				265
Query 241	TNILYHQMMKMSQGENRVTIHCQHQQTAEFSTADLAIVTIPFSTLRFVKVEPYHSFS				300
Sbjct 266	TNILYHQMMKMSQGENRVTIHCQHQQTAEF SFTADLAIVTIPFSTLRFVKVEPYHSFS				325
Query 301	YYKRAIRELNYISATKIGIEFKSRFWEKAGQHGGKSITDLPPIRFYYPSRNIGANGHAV				360
Sbjct 326	YYKRAIRELNYISATKIGIEFKSRFWEKAGQ GGSITDLPPIRFYYPSRNIGANGHAV				385
Query 361	ILASYTWADEALIWDSLSEGERIQYTLNLSEIYGDIVWSEFVSGTSFWSQYPYSAGGF				420
Sbjct 386	ILASYTWADEALIWDSLSEGERIQYTLNLSEIYGDIVWSEFVSGTSFWSQYPYSAGGF				445
Query 421	TAFEPGQELELYPIPVPEGRVHFAGEHASLTHAWMQGAIESGIRVAYEVNRLP				474
Sbjct 446	TAFEPGQELELYPIPVPEGRVHFAGEHASLTHAWMQGAIESGIRVAYEVNRLP				499

Fig 1C.Alineamiento de secuencias

De acuerdo a los sitios conservados encontrados para esta proteína, la misma puede ser incluida en la familia de las monoamino oxidadsas, reponsables del transporte y metabolismo de aminoácidos como el *Trp*. Esta proteína coincide del intervalo de aminoácidos de 47-499 con en Evalue de $2.78 e^{-174}$ con la superfamilia de enzimas flavinas monooxidasa.

Tryptophan 2-monoxygenase [Bacillus subtilis subsp. subtilis]

Protein Classification

flavin monoamine oxidase family protein (domain architecture ID 11440890)
 flavin monoamine oxidase family protein catalyzes the FAD-dependent oxidative deamination of biogenic and xenobiotic amines

Graphical summary Zoom to residue level [show extra options >](#)

Query seq. 75 150 225 300 375 450 499

Specific hits YobN

Superfamilies YobN superfamily

[Search for similar domain architectures](#) [Refine search](#)

List of domain hits

Name	Accession	Description	Interval	E-value
[H] YobN	COG1231	Monoamine oxidase [Amino acid transport and metabolism];	47-499	2.78e-174

References:

- Marchler-Bauer A et al. (2017), "CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures.", **Nucleic Acids Res.**45(D)200-3.
- Marchler-Bauer A et al. (2015), "CDD: NCBI's conserved domain database.", **Nucleic Acids Res.**43(D)222-6.
- Marchler-Bauer A et al. (2011), "CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins.", **Nucleic Acids Res.**39(D)225-9.
- Marchler-Bauer A, Bryant SH (2004), "CD-Search: protein domain annotations on the fly.", **Nucleic Acids Res.**32(W)327-331.

Fig 2C. Dominios conservados

Anexos I

Extensión del modelo *i*BSU1147 en lenguaje SBML 2.0

Metabolito AIA extracelular

```
/notes>
</species>
<species id="M_C00954_e" name="Indole-3-acetate"
  Indole-3-acetic acid|Indole-3-yl)acetate|Indoleacetate|Indoleacetic acid, extracellular" compartment="C_e">
</notes>
<html
xmlns="http://www.w3.org/1999/xhtml"
><p>FORMULA: C10H13N5O7P, extracellular</p></html>
```

Reacción de transporte de AIA

```
</reaction>
<reaction id="AIA_ext" name="AIA transporter"
reversible="false">
<notes>
<html xmlns="http://www.w3.org/1999/xhtml">
<p>GENE_ASSOCIATION: BSU13570</p>
<p>GENE_LIST: BSU13570</p>
<p>SUBSYSTEM: Amino Acids and Derivatives</p>
</html>
</notes>
<listOfReactants>
<speciesReference species="M_C00954_c"/>
</listOfReactants>
<listOfProducts>
<speciesReference species="M_C00954_e"/>
</listOfProducts>
<kineticLaw>
<math
xmlns="http://www.w3.org/1998/Math/MathML">
<ci> FLUX_VALUE </ci>
</math>
<listOfParameters>
<parameter id="LOWER_BOUND" value="0"
units="mmol_per_gDW_per_hr"/>
<parameter id="UPPER_BOUND" value="1000"
units="mmol_per_gDW_per_hr"/>
<parameter id="OBJECTIVE_COEFFICIENT"
value="0"/>
</listOfParameters>
</kineticLaw>
```

Reacción de síntesis de Indol 3-acetamida

```
</reaction>
<reaction id="Indolacetamide" name="Putative L-amino-acid
oxidase YobN" reversible="false">
<notes>
<html xmlns="http://www.w3.org/1999/xhtml">
<p>GENE_ASSOCIATION: BSU19020</p>
<p>GENE_LIST: BSU19020</p>
<p>SUBSYSTEM: Amino Acids and Derivatives</p>
</html>
</notes>
<listOfReactants>
<speciesReference species="M_C00078_c"/>
<speciesReference species="M_C00007_c"/>
</listOfReactants>
<listOfProducts>
<speciesReference species="M_C00011_c"/>
<speciesReference species="M_C02693_c"/>
<speciesReference species="M_C00001_c"/>
</listOfProducts>
<kineticLaw>
<math xmlns="http://www.w3.org/1998/Math/MathML">
<ci> FLUX_VALUE </ci>
</math>
<listOfParameters>
<parameter id="LOWER_BOUND" value="0"
units="mmol_per_gDW_per_hr"/>
<parameter id="UPPER_BOUND" value="1000"
units="mmol_per_gDW_per_hr"/>
<parameter id="OBJECTIVE_COEFFICIENT" value="0"/>
</listOfParameters>
</kineticLaw>
```

Fig 1D. Genes, Reacciones y Metabolitos añadidos al modelo *i*BSU1147

Anexos J

Distribuciones de flujos

En este anexo se presentan las distribuciones de flujos obtenidas para *B. subtilis* utilizando la herramienta **COBRA Toolbox** 3.0 del software MATLAB® 2019. Se simuló un cultivo con glucosa y suplementado con *Trp* para un estado exponencial (A) y estado estacionario (B). En ambos casos se maximizó la función objetivo, el caso de A se utilizó fue la biomasa y en caso B la producción de AIA.

Tabla 10.1: Valores de la distribución de flujo simulada para *B. subtilis* utilizando **GLU** en fase exponencial **A** y estacionaria **B**. Los flujos se expresan en *mmol/gWC/h*.

Vía/Reacción	Gen	Enzima	A	B
Glicólisis				
$g6p \rightleftharpoons f6p$	<i>pgi</i>	PGI	1.59	1.18
$atp + f6p \rightleftharpoons adp + f1,6bf$	<i>pfk</i>	PFK	1.43	0.05
$f1,6bf \rightleftharpoons g3p + dhp$	<i>fbaA</i>	FBA	1.43	0.05
$g3p + nad + pi \rightleftharpoons 13dpg + h + nadh$	<i>gapA</i>	GAP	1.34	0.40
$atp + h + 3pg \rightleftharpoons adp + 13dpg$	<i>pgk</i>	PGK	1.34	0.40
$2pg \rightleftharpoons 3pg$	<i>pgm</i>	PGM	1.34	-0.04

Table 10.1 continued from previous page

Vía/Reacción	Gen	Enzima	A	B
2pg <==> h2o + pep	<i>eno</i>	ENO	1.34	-0.04
adp + pep <==>atp + pyr	<i>pyk</i>	PYK	1.02	0.39
pyr + coa + nad <==>acoa + nadh + co2	<i>pdh</i>	PDH	4.12	3.14
Ciclo del TCA				
acoa + h2o + oaa <==> h + coa + cit	<i>citZ</i>	CIT	0.13	0.07
cit <==> acon-C + h2o	<i>acnB</i>	ACONTa	0.13	0.07
acon-C + h2o <==> icit	<i>acnB</i>	ACONTb	0.13	0.07
icit + nadp <==> akg + co2 + nadph	<i>icd</i>	ICDH	0.13	0.07
akg + coa + nad -> co2 + nadh + succoa	<i>sucAB</i>	AKGDH	0.02	0.04
atp + coa + succ <==> adp + pi + succoa	<i>sucCD</i>	SUCOAS	0.02	0.04
q8 + succ -> fum + q8h2	<i>sdhC</i>	SUCDI	0.08	0.04
fum + h2o <==> mal-L	<i>fumA</i>	FUM	0.08	0.04
mal-L + nad <==> h + nadh + oaa	<i>mdh</i>	MDH	0.08	0.04
Vía de las Pentosas Fosfato				
ru5p <==> xu5p	<i>rpe</i>	RPE	-0.03	-0.02
r5p <==> ru5p	<i>rpiA</i>	RPI	-0.03	-0.02
e4p + xu5p-D <==> f6p + g3p	<i>tktA</i>	TKT2	-0.03	0.08
Gluconeogenesis and anaplerosis				
atp + oaa -> adp + co2 + pep	<i>pck</i>	PPCK	0.00	0.22
atp + hco3 + pyr <==> adp + pi +h+oaa	<i>pycA</i>	PYK	0.00	0.14
mal-L + nad -> co2 + nadh + pyr	<i>sfcA</i>	ME1	0.00	0.00
mal-L + nadp -> co2 + nadph + pyr	<i>maeA</i>	ME2	0.00	0.00
Metabolismo AIA/Triptófano				
ser + igp <==> g3p + h2p + trp	<i>trpA</i>	TRP	-0.15	0.20
trp <==> iam	<i>yobN</i>	IaaM	0.00	1.85

Table 10.1 continued from previous page

Vía/Reacción	Gen	Enzima	A	B
$\text{h}_2\text{O} + \text{iam} \rightleftharpoons \text{nh}_4 + \text{aia}$	mtnU	IaaH	0.00	1.85

*Las abreviaturas son las siguientes: glucosa 6-fosfato (g6p), fructosa 6-fosfato (f6p), fructosa 1,6-bifosfato (f1,6bf), gliceraldehido 3 fosfato g3p), dihidroxyacetonafofosfato (dhp), 1,3 bifosfoglicerato (13dpg), 3-fosfoglicerato (3pg), 2-fosfoglicerato (2pg), fosfoenolpiruvato (pep), piruvato (pyr), acetilcoa (acoa), oxalacetato (oaa), citrato (cit), cis-aconitato (acon-C), isocitrato (icit), alfa-cetoglutarato (akg), succinil-coa (succoa), succinato (succ), fumarato (fum), malato (mal), ribulosa 5-fosfato (ru5p), xilulosa 5-fosfato (xu5p), ribosa 5-fosfato (r5p), eritrosa 4-fosfato (e4p), serina (ser), indolglicerolfosfato (igp), triptófano (trp), indolacetamida (iam)

Anexos K

Distribuciones de flujos

En este anexo se presentan las distribuciones de flujos obtenidas para *B. subtilis* utilizando la herramienta **COBRA Toolbox** 3.0 del software MATLAB® 2019. Se simuló un cultivo con una sola fuente de carbono (todos los fluxes de entrada al modelo metabólico de otros sustratos restringidos a 0) y suplementado con *Trp*,

Tabla 11.1: Valores de la distribución de flujo simulada para *B. subtilis* utilizando **GLU**, **ACE**, **PRO**, **CITS** y **GLI** como fuentes de carbono. Los flujos se expresan en *mmol/gWC/h*.

Vía/Reacción	Gen	Enzima	GLU	ACE	PRO	CITs	GLI
Glicólisis							
$g6p \rightleftharpoons f6p$	<i>pgi</i>	PGI	1.182	-0.02	-0.017	-0.016	-0.021
$atp + f6p \rightleftharpoons adp + f1,6bf$	<i>pfk</i>	PFK	0.051	1.043	-0.596	-0.068	0.829
$f1,6bf \rightleftharpoons g3p + dhp$	<i>fbaA</i>	FBA	0.051	1.043	-0.596	-0.068	0.829
$g3p + nad + pi \rightleftharpoons 13dpg + h + nadh$	<i>gapA</i>	GAP	0.401	1.18	0.701	-0.289	0.695
$atp + h + 3pg \rightleftharpoons adp + 13dpg$	<i>pgk</i>	PGK	0.401	1.18	0.701	-0.289	0.695
$2pg \rightleftharpoons 3pg$	<i>pgm</i>	PGM	-0.041	-1.18	0.701	0.289	-0.695

Tabla 11.1: Valores de la distribución de flujo simulada para *B. subtilis* utilizando **GLU**, **ACE**, **PRO**, **CITS** y **GLI** como fuentes de carbono. Los flujos se expresan en *mmol/gWC/h*.

Vía/Reacción	Gen	Enzima	GLU	ACE	PRO	CITs	GLI
2pg <=>h2o + pep	<i>eno</i>	ENO	-0.041	-1.18	0.701	0.289	-0.695
adp + pep <=>atp + pyr	<i>pyk</i>	PYK	0.393	1.188	0.707	1.122	0.087
pyr + coa + nad <=>acoa+nadh+co2	<i>pdh</i>	PDH	3.140	1.416	2.289	1.065	3.086
Ciclo del TCA							
acoa + h2o + oaa <=>h +coa+cit	<i>citZ</i>	CIT	0.068	4.069	2.024	2.335	0.081
cit <=>acon-C + h2o	<i>acnB</i>	AcontA	0.068	4.069	2.024	2.335	0.081
acon-C + h2o <=>icit	<i>acnB</i>	AcontB	0.068	4.069	2.024	2.335	0.081
icit + nadp <=>akg + co2 + nadph	<i>icd</i>	ICDH	0.068	4.069	2.024	2.335	0.081
akg + coa + nad->co2+nadh+succoa	<i>sucAB</i>	AkdgH	0.039	4.069	2.024	2.335	0.081
atp + coa + succ<=>adp+pi+succoa	<i>sucCD</i>	SucoaS	0.039	4.069	2.024	2.335	0.081
q8 + succ ->fum + q8h2	<i>sdhC</i>	SudcI	0.039	3.986	4.9038	2.309	0.047
fum + h2o <=>mal-L	<i>fumA</i>	FUM	0.039	3.986	4.94	2.309	0.047
mal-L + nad <=>h + nadh + oaa	<i>mdh</i>	MDH	0.039	3.986	4.94	1.187	0.047
Vía de las Pentosas Fosfato							
ru5p <=>xu5p	<i>rpe</i>	RPE	-0.015	-0.09	-0.196	-0.031	-0.032
r5p <=>ru5p	<i>rpiA</i>	RPI	-0.015	-0.09	-0.196	-0.031	-0.032
e4p + xu5p-D <=>f6p + g3p	<i>tktA</i>	TKT2	0.076	0.042	0.098	0.016	0.016
Gluconeogenesis and anaplerosis							
atp + oaa ->adp + co2 + pep	<i>pck</i>	PPCK	0.217	0.321	0.741	0.295	0.446
atp +pyr<=>adp+pi +h+oaa	<i>pycA</i>	PYK	0.136	0.131	0.581	0.085	0.156
mal-L + nad ->co2 + nadh + pyr	<i>sfcA</i>	ME1	0.000	0.139	0.661	0.093	0.000
mal-L + nadp ->co2 + nadph +pyr	<i>maeA</i>	ME2	0.000	0.068	0.242	0.981	0.000

Tabla 11.1: Valores de la distribución de flujo simulada para *B. subtilis* utilizando **GLU**, **ACE**, **PRO**, **CITS** y **GLI** como fuentes de carbono. Los flujos se expresan en *mmol/gWC/h*.

Vía/Reacción	Gen	Enzima	GLU	ACE	PRO	CITs	GLI
Metabolismo AIA/Triptófano							
ser + igp <=>g3p + h2p + trp	<i>trpA</i>	TRP	0.203	0.098	0.272	0.025	0.020
trp <=>iam	<i>yobN</i>	IaaM	1.849	1.144	1.719	2.382	1.725
h2o+ iam <=>nh4 + aia	<i>mtnU</i>	IaaH	1.849	1.144	1.719	2.382	1.725

*Las abreviaturas son las siguientes: glucosa 6-fosfato (g6p), fructosa 6-fosfato (f6p), fructosa 1,6-bifosfato (f1,6bf), gliceraldehido 3 fosfato g3p), dihidroxyacetonafofosfato (dhp), 1,3 bifosfoglicerato (13dpg), 3-fosfoglicerato (3pg), 2-fosfoglicerato (2pg), fosfoenolpiruvato (pep), piruvato (pyr), acetilcoa (acoa), oxalacetato (oaa), citrato (cit), cis-aconitato (acon-C), isocitrato (icit), alfa-cetoglutarato (akg), succinil-coa (succoa), succinato (succ), fumarato (fum), malato (mal), ribulosa 5-fosfato (ru5p), xilulosa 5-fosfato (xu5p), ribosa 5-fosfato (r5p), eritrosa 4-fosfato (e4p), serina (ser), indolglicerolfosfato (igp), triptófano (trp), indolacetamida (iam)

Anexos L

Restricciones de flujos

Tabla 12.1: Valores de flujo utilizados para restringir el modelo metabólico *iBSU1147+1*. Los flujos se expresan en *mmol/gWC/h*.

Reacción	Glucosa	Acetato	Propionato	Citrato	Glicerol
[e]: Glucosa <==>	-1.15	0.00	0.00	0.00	0.00
[e]: Acetato <==>	0.00	-5.58	0.00	0.00	0.00
[e]: Propionato <==>	0.00	0.00	-4.49	0.00	0.00
[e]: Citratato <==>	0.00	0.00	0.00	-1.54	0.00
[e]: Glicerol <==>	0.00	0.00	0.00	0.00	-2.38
[c]: H ₂ O +atp -> adp + PO ₄ + H ⁺	5.85	5.85	5.85	5.85	5.85
[e]: Triptófano <==>	-1.65	-1.05	-1.45	-2.36	-1.71
[e] : O ₂ <==>	-15.00	-15.00	-15.00	-15.00	-15.00
[e] : C ₂ <==>	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
[e] : NH ₄ <==>	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
[e] : Fumarato <==>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
[e] : Malato<==>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
[e]: Maltosa <==>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Table 12.1 continued from previous page

Reacción	Glucosa	Acetato	Propionato	Citrato	Glicerol
[e] : Chorismato <==>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
[e] : Fosfo-D-gluconato <==>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
[e] : 2-Fosfo-D-glicerato <==>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00