



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
METROPOLITANA

---

---

UNIDAD CUAJIMALPA

POSGRADO EN CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA

COMPARACIÓN FISIOLÓGICA Y TRANSCRIPCIONAL DEL  
CATABOLISMO DE ACETATO ENTRE *Escherichia coli* JM101 Y  
*Acinetobacter schindleri* ACE

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA

PRESENTA:

I.B. LUCY QUIROZ PALACIOS

DIRECTOR:

DR. JUAN CARLOS SIGALA ALANÍS

ASESOR:

DR. ALVARO RAÚL LARA RODRÍGUEZ

CUAJIMALPA, CIUDAD DE MÉXICO, 2019

El presente trabajo se realizó en laboratorio de Biotecnología del Departamento de Procesos y Tecnología (DPT) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa bajo la dirección del Dr. Juan Carlos Sigala Alanís. Contó para su realización del patrocinio del CONACyT (CB-2012-183813), de PROMEP-SEP (103.5/12/3530/UAM-PTC-302) y de la Dirección de Superación Académica (PRODEP-SEP) a través del proyecto “Desarrollo de plataformas robustas para el análisis transcripcional en diversos modelos celulares” (Conv. 2019 Fortalecimiento de Cuerpos Académicos en Formación) otorgado al cuerpo académico UAM-C-CA-42-Biotecnología Celular y Tisular.

Lucy Quiroz Palacios contó con beca de posgrado CONACyT (CVU 706969) para realizar este trabajo.

Esta idónea comunicación de resultados fue realizada dentro del Programa de Maestría del **Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería** de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa. El trabajo experimental, fue realizado de septiembre-2015 a septiembre-2017 en laboratorios del DPT de la DCNI

## DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F. el día 06 del mes de septiembre del año 2019, el (la) que suscribe Lucy Quiroz Palacios 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; “Comparación fisiológica y transcripcional del catabolismo de acetato entre *Escherichia coli* JM101 y *Acinetobacter schindleri* ACE” realizada bajo la dirección de Juan Carlos Sigala Alanis 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: [jsigala@correo.cua.uam.mx](mailto:jsigala@correo.cua.uam.mx)

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

---

Nombre y firma del alumno

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“El que suscribe, Lucy Quiroz Palacios, 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.”

---

Nombre y firma del alumno

## DECLARACIÓN DE NO LUCRO:

El que suscribe, Lucy Quiroz Palacios, 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 Lucy Quiroz Palacios.

---

Nombre y firma del alumno

## **A MI FAMILIA:**

A mis papás por apoyarme siempre en cada decisión que he tomado, por impulsarme a crecer profesionalmente y como ser humano. Por educarme con valores y enseñarme con su ejemplo y sobre todo por darme su amor incondicional.

A mis abuelitos por formar a los padres que tengo, por consentirme y darme todo su amor.

A mis hermanos por acompañarme a lo largo de mi vida, por ser mis cómplices, por preocuparse por mí y aguantar mis berrinches y mal genio.

A mis sobrinos que me llenan de felicidad con solo sonreír, por sus abrazos, sus travesuras y ocurrencias.

A mi esposo por ser mi compañero de aventuras, por sus consejos, por su apoyo incondicional, por toda la paciencia que me ha tenido y por motivarme a ser mejor cada día.

A mi hijo por llegar a mi vida cuando menos imaginé y enseñarme cosas nuevas cada día.

A la familia Ruíz Reyes por todo su apoyo y cariño.

**MUCHAS GRACIAS.**

## **AGRADECIMIENTOS.**

Al Dr. Juan Carlos Sigala Alanis por aceptarme como su alumna, por compartir sus conocimientos conmigo desde los primeros trimestres de la Licenciatura, por todo el apoyo y paciencia que me tuvo, por ser amable, alegre y tener palabras positivas siempre.

A mis compañeros de Laboratorio por sus consejos y ayuda en la realización de mi proyecto.

A mis amigos por hacer mis días más bonitos, por las risas, por compartir momentos de estrés, por todo el apoyo.

Al CONACyT por impulsar estudios de posgrado a través de becas.

**MUCHAS GRACIAS.**

## ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS.....	10
INDICE DE TABLAS.....	11
INDICE DE GRÁFICAS.....	12
INDICE DE ECUACIONES.....	13
ABREVIATURAS.....	14
NOMENCLATURA.....	15
1 INTRODUCCIÓN.....	17
2 ANTECEDENTES.....	19
2.1 <i>Escherichia coli</i> como cepa modelo en procesos biotecnológicos.....	19
2.2 Sobreflujo metabólico.....	19
2.3 Switch de acetato.....	20
2.4 Producción de acetato.....	22
2.5 Consumo de acetato.....	23
2.5.1 Transporte de acetato.....	23
2.5.2 Ruta Pta-AckA y Acs.....	24
2.5.3 Ciclo de los acidos tricarboxilicos y ruta del glioxilato.....	27
2.5.4 Rutas anapleróticas y gluconeogénesis.....	31
2.5.5 Glucólisis y vía de las pentosas fosfato.....	35
2.6 Acetato como compuesto tóxico.....	35
2.7 El género <i>Acinetobacter</i> .....	36
2.7.1 <i>Acinetobacter schindleri</i> ACE.....	37
3 HIPÓTESIS.....	39
4 OBJETIVOS.....	40
4.1 Objetivo general.....	40
4.2 Objetivos particulares.....	40
5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
5.1 Cepas bacterianas usadas.....	41
5.2 Medios de cultivo y condiciones de cultivo.....	41
5.3 Toma de muestras.....	43
5.4 Análisis de muestras.....	43
5.4.1 Determinación de biomasa.....	43
5.4.2 Determinación de consumo de acetato.....	44
5.4.3 Calculo de parámetros cinéticos $\mu$ , $q_S$ y $Y_{xs}$ .....	45

<b>5.5</b>	<b>Análisis de gases</b>	45
5.5.1	Cálculo de la velocidad específica de consumo de oxígeno ( $q_{O_2}$ ), velocidad específica de producción de dióxido de carbono ( $q_{CO_2}$ ) y coeficiente respiratorio ( $RQ$ ).	45
<b>5.6</b>	<b>Extracción, purificación y determinación de la calidad del RNA.</b>	48
<b>5.7</b>	<b>Análisis de transcripción de genes del catabolismo de acetato entre JM101 y ACE por RT-qPCR.</b>	49
5.7.1	Diseño de primers.	49
5.7.2	Síntesis de cDNA.	51
5.7.3	Pruebas de amplificación.	51
5.7.4	Selección del gen de referencia para la cuantificación por RT-qPCR.	52
5.7.5	Análisis de expresión relativa por RT-qPCR.	54
<b>6</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	55
6.1	Caracterización fisiológica de JM101 y ACE utilizando acetato como única fuente de carbono.	55
6.2	Evaluación de la concentración y calidad del RNA.	58
6.3	Elección del gen de referencia.	61
6.3.1	Pruebas de eficiencia de la RT-qPCR del gen <i>gyrA</i> de JM101 y ACE.	62
6.4	Análisis de expresión de genes del metabolismo de acetato entre JM101 y ACE.	63
6.4.1	Transporte de acetato.	66
6.4.2	Ruta Pta-AckA y Acs.	66
6.4.3	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos y ruta del glioxilato.	68
6.4.4	Rutas anapleróticas y gluconeogénesis.	71
6.4.5	Glucólisis y vía de las pentosas fosfato.	72
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES.</b>	74
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS.</b>	75
<b>9</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	76
<b>10</b>	<b>ANEXOS.</b>	83
10.1	Anexo A. Carátula de artículo publicado.	83
10.2	Anexo B. Niveles de expresión de genes relativo entre ACE y JM101.	84
10.3	Anexo C. Pruebas de primers.	85

## INDICE DE FIGURAS.

**Figura 1.** “Switch de acetato” en *E. coli* bajo condiciones aerobias en medio mineral con glucosa como única fuente de carbono. Abreviaturas: (OD) en el tiempo, la concentración de glucosa [glc] y la concentración de acetato a lo largo de la cinética [ace] (Modificado de Wolfe 2005).

**Figura 2.** Rutas de producción y consumo de acetato en *E. coli*.

**Figura 3.** Reacciones que conforman el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CATC) y la ruta del glioxilato (RG).

**Figura 4.** Reacción mediada por la Ppc y la Pck bajo condiciones glucolíticas y condiciones gluconeogénicas, respectivamente (Kwon *et al.* 2008).

**Figura 5.** Nodo PEP-PYR-OAA. Genes anapleróticos y gluconeogénicos, *maeB*, *sfcA*, *ppc*, *pck* y *ppsA*.

**Figura 6.** Comprobación de la pureza de RNA sin contaminación por DNA. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TBE 0.5 X.

**Figura 7.** Gel virtual de las muestras de RNA. Las muestras 1 y 2 corresponden al lote 1 y 2 de los cultivos de ACE, mientras que los carriles 3 y 4 corresponden a las muestras de RNA del lote 1 y 2 de JM101.

**Figura 8.** Catabolismo de acetato en ACE y JM101. Metabolitos y genes involucrados. Valores de expresión significativos (mayores a 2 o menores a -2). Las flechas en rojo representan sobreexpresión y las flechas en verde subexpresión de los genes de ACE comparados con la expresión de genes de JM101. Las flechas punteadas indican ausencia de la reacción en ACE. Se utilizó como gen de referencia la expresión de *gyrA*.

## INDICE DE TABLAS.

**Tabla 1.** Medio mineral M9 con 3 g/L de acetato para los inóculos (volumen total 25 mL).

**Tabla 2.** Medio mineral M9 con 4 g/L de acetato (600 mL).

**Tabla 3.** Primers empleados para amplificar genes de ACE y de JM101. Forward (F), Reverse (R).

**Tabla 4.** Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), rendimiento biomasa-sustrato ( $Y_{x/s}$ ) y velocidad específica de consumo de sustrato ( $q_s$ ) de JM101 y ACE en reactor con medio mínimo M9 y 4 g/L de acetato.

**Tabla 5.** Velocidad específica de consumo de oxígeno ( $q_{O_2}$ ), velocidad específica de producción de dióxido de carbono ( $q_{CO_2}$ ) y coeficiente respiratorio ( $RQ$ ) de JM101 y ACE en reactor con medio mínimo M9 y 4 g/L de acetato.

**Tabla 6.** Concentración de RNA de ACE y JM101. Valores de réplicas biológicas.

**Tabla 7.** Concentración y pureza del RNA después de la digestión con DNAsa.

**Tabla 8.** Eficiencia de la reacción de amplificación del gen *gyrA* en JM101 y ACE, y coeficiente de correlación obtenido.

## INDICE DE GRÁFICAS.

**Gráfica 1.** Velocidad de absorción del O<sub>2</sub> respecto a la cantidad de biomasa generada en la fase de crecimiento exponencial, donde la pendiente es  $q_{O_2}$ .

**Gráfica 2.** Velocidad de liberación del CO<sub>2</sub> respecto a la cantidad de biomasa generada en la fase de crecimiento exponencial, donde la pendiente es  $q_{CO_2}$ .

**Gráfica 3.** Cinéticas de producción de biomasa (líneas continuas) y concentración de acetato (líneas punteadas) de JM101 y ACE.

**Gráfica 4.** Curva patrón del gen *gyrA* de la cepa JM101.

**Gráfica 5.** Curva patrón del gen *gyrA* de la cepa ACE.

**Gráfica 6.** Niveles de expresión relativos de la cepa ACE respecto a los genes de la cepa de referencia JM101 y tomando como control interno el gen *gyrA*, normalizando a 1 el nivel de expresión de los genes de JM101. Las barras en rojo representan sobreexpresión de genes, las barras en verde indican subexpresión, mientras que las barras grises indican que no hubo un cambio significativo en la expresión de los genes de JM101 y ACE. La línea punteada representa el límite del cambio significativo en la expresión de genes de ACE respecto a la cepa de referencia, correspondiendo a un valor de  $\pm 2$  veces.

## **INDICE DE ECUACIONES.**

**Ecuación 1.** Definición de velocidad de absorción de O<sub>2</sub> (OUR).

**Ecuación 2.** Definición de velocidad de liberación de CO<sub>2</sub> (CER).

**Ecuación 3.** Definición de velocidad de absorción de O<sub>2</sub> (OUR) en mmol O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> cuando la transferencia de O<sub>2</sub> disuelto es constante.

**Ecuación 4.** Definición de velocidad de absorción de CO<sub>2</sub> (CER) mmol CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> cuando la transferencia de O<sub>2</sub> disuelto es constante.

**Ecuación 5.** Definición de coeficiente respiratorio (*RQ*).

**Ecuación 6.** Número de copias del DNA.

**Ecuación 7.** Eficiencia de la reacción de PCR.

## **ABREVIATURAS.**

<i>E. coli:</i>	<i>Escherichia coli.</i>
JM101:	<i>Escherichia coli</i> JM101.
ACE:	<i>Acinetobacter schindleri</i> ACE.
RG:	Ruta del glioxilato.
CATC:	Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos.
VPF:	Vía de las pentosas fosfato.
CPD:	Complejo Piruvato deshidrogenasa.
Acetil-CoA:	acetil coenzima A.
CoA-SH:	acetil coenzima A libre.
NADH:	Nicotin Adenin Dinucleotido.
NADPH:	Nicotin Adenin Dinucleotido Fosfato.
ATP:	Adenosin trifosfato.
FAD:	Flavin Adenin dinucleotido.
acetil-F:	acetil fosfato.
Sistema PTS:	Sistema de Fosfotransferasa.
RIN:	Número de Integridad del RNA.
DNA:	Ácido Desoxirribonucleico.
RNA:	Ácido Ribonucleico.
cDNA:	Ácido Desoxirribonucleico complementario o de cadena simple.
gB:	Gramos de Biomasa

## **NOMENCLATURA.**

$\mu$ :	Velocidad específica de crecimiento.
$Y_{x/s}$ :	Rendimiento biomasa sustrato.
$q_s$ :	Velocidad específica de consumo de sustrato.
$O_2$ :	Oxígeno.
$CO_2$ :	Dióxido de carbono.
$q_{O_2}$ :	Velocidad específica de consumo de oxígeno.
$q_{CO_2}$ :	Velocidad específica de producción de dióxido de carbono.
$RQ$ :	Coefficiente respiratorio.
h:	horas.
g:	gramos.
mmol:	milimol.
ng:	nanogramos.
pmol:	picomol.
nm:	nanómetro.
$\mu L$ :	Micro litro.
L:	litro.
g/L:	gramos x litro.
%:	por ciento.
$^{\circ}C$ :	grados centígrados.
rpm:	revoluciones por minuto.
$FeSO_4$ :	Sulfato de hierro.
$MgSO_4$ :	Sulfato de magnesio.

CaCl<sub>2</sub>: Cloruro de calcio.  
HCl: Ácido clorhídrico.  
F: primer forward.  
R: primer reverse.  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.  
RT- qPCR: PCR cuantitativa con retrotranscripción.

## 1 INTRODUCCIÓN.

Los microorganismos en la naturaleza se enfrentan a cambios en la disponibilidad de fuentes de carbono debiéndose adaptar fisiológicamente para sobrevivir a estas variaciones. Un ejemplo de esta situación ocurre cuando ciertos microorganismos primero agotan sustratos acetogénicos y posteriormente comienzan a utilizar ácidos orgánicos considerados como subproductos. El acetato es uno de los subproductos más importantes del catabolismo de glucosa en *Escherichia coli*. Esta bacteria cataboliza glucosa como fuente de carbono primaria y posteriormente, cuando la glucosa se agota, es capaz de consumir acetato. Cuando *E. coli* JM101 crece en glucosa como fuente de carbono alcanza una velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de  $0.7 \text{ h}^{-1}$ , mientras que en acetato disminuye su  $\mu$  a  $0.28 \text{ h}^{-1}$  (Flores *et al.* 2005).

Por otra parte, existen otras bacterias como las del género *Acinetobacter*, que utilizan compuestos como el acetato como fuente de carbono primaria. Particularmente, la cepa *Acinetobacter schindleri* ACE no tiene la capacidad de utilizar pentosas ni hexosas como fuente de carbono. Sin embargo, crece a una alta velocidad específica de crecimiento de  $0.9 \text{ h}^{-1}$  empleando el acetato como única fuente de carbono (Sigala *et al.* 2017), siendo este valor incluso superior a la  $\mu$  de JM101 en glucosa ( $0.7 \text{ h}^{-1}$ ) (Martínez *et al.* 2012; Sabido *et al.* 2014).

Las bacterias del género *Acinetobacter*, si bien, han sido poco estudiadas en comparación con *E. coli*, se sabe que poseen gran diversidad metabólica y por lo general son buenas degradadoras de acetato, ácidos orgánicos y compuestos aromáticos (Sigala *et al.* 2017). Esta es la razón por la que han cobrado mayor relevancia en el área biotecnológica en especial sobre temas relacionados a biorremediación (Towner 2006).

Con el objetivo de entender las diferencias en el catabolismo de acetato entre JM101 y ACE, en el presente trabajo se caracterizaron fisiológica y transcripcionalmente estas dos bacterias utilizando acetato como única fuente de carbono.

## **2 ANTECEDENTES.**

### **2.1 *Escherichia coli* como cepa modelo en procesos biotecnológicos.**

En procesos biotecnológicos donde se utilizan microorganismos, es común que se emplee como fábrica celular a la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*). Esto se debe a que es una bacteria estudiada ampliamente, hay información disponible sobre su genoma, es de fácil manipulación genética y su cultivo es simple (Dittrich, Bennett y San 2005).

*E. coli* se usa para producir proteínas recombinantes siendo el hospedero más importante para este fin (Lara 2011). Sin embargo, otros microorganismos como *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium* están cobrando cada vez mayor relevancia. Esta bacteria también se utiliza para producir aminoácidos, azúcares, lípidos, entre otros metabolitos. Estos productos son obtenidos usando glucosa como principal sustrato (Dittrich, Bennett y San 2005).

### **2.2 Sobreflujo metabólico**

*E. coli* utiliza preferencialmente sustratos acetogénicos como la glucosa, lo que le permite entrar a un estado de rápido crecimiento. Cuando se cultiva *E. coli* bajo condiciones aerobias en un medio con glucosa en exceso, se origina un fenómeno metabólico denominado sobreflujo metabólico en el que se genera acetato como producto de desecho.

Esto es resultado primordialmente de un desbalance de flujos de carbono entre la glucólisis y el Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CATC), provocando una acumulación de acetil-coenzima A (acetil-CoA) la cual se transforma a acetato y se excreta (De Anda *et al.* 2006; Lara 2011; Enjalbert, Letisse y Portais 2013). Aproximadamente del 15 % al 30 % de acetil-CoA se transforma a acetato lo que permite regenerar a la coenzima A libre (CoA-SH) (Castaño-Cerezo *et al.* 2009; Renilla *et al.* 2012).

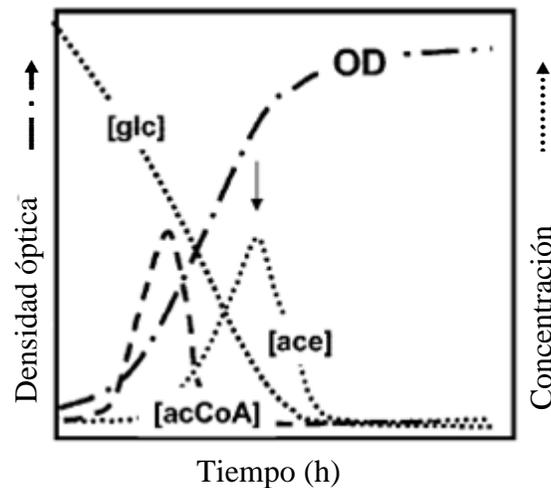
La producción aerobia de acetato también depende de otros factores como el medio de cultivo que se utiliza en el proceso, las estrategias de alimentación de glucosa e incluso de la cepa que se esté utilizando. Como se mencionó, el acetato es el subproducto principal del metabolismo aerobio de *E. coli* (Chang *et al.* 1999).

### **2.3 Switch de acetato**

El éxito de la adaptación de *E. coli* y otros microorganismos a cambios nutrimentales constantes, como puede ser pasar de un ambiente rico a uno de escasez de nutrientes, depende principalmente de la habilidad del microorganismo a cambios metabólicos; como pasar de un estado de producción a otro de consumo de acetato (El-Mansi *et al.* 2006). El acetato es una fuente potencial de carbono y energía debido a que es un metabolito parcialmente oxidado (Castaño-Cerezo 2009). *E. coli* tiene la capacidad de catabolizar el acetato como única fuente de carbono incluso en presencia de glucosa residual, a lo que se le conoce como switch de acetato (Wolf 2005). El switch de acetato se define como el momento en el cual los niveles de producción de acetato igualan los niveles de consumo del mismo. Es el punto donde los microorganismos cambian gradualmente la maquinaria enzimática de producción de acetato a la de consumo de acetato (El-Mansi *et al.* 2006; Wolf 2005). Es en este punto en el que se activa el metabolismo gluconeogénico (Enjalbert, Letisse y Portais 2013).

Antes de que la glucosa se agote, *E. coli* co-utiliza el acetato que excretó anteriormente junto con la glucosa residual justo en la transición de la fase exponencial de crecimiento a la fase estacionaria (Figura 1) (Wolfe 2005; El-Mansi *et al.* 2006).

Particularmente, JM101 alcanza un valor de  $\mu$  de  $0.7 \text{ h}^{-1}$  en medio mineral con glucosa como única fuente de carbono (Flores *et al.* 2005), mientras que cuando se cultiva en acetato como única fuente de carbono, JM101 crece a un valor de  $\mu$  de  $0.28 \text{ h}^{-1}$  (Sigala *et al.* 2009). El switch del metabolismo de glucosa al metabolismo de acetato está acompañado por una disminución de la producción de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y un incremento en la eficiencia de la conversión de carbono a biomasa (El-Mansi *et al.* 2006; Zhao y Shimizu 2003).



**Figura 1.** “Switch de acetato”. Cinética de crecimiento de *E. coli* a través del tiempo (h), bajo condiciones aerobias utilizando medio mineral con glucosa como única fuente de carbono. Donde: OD es densidad óptica, [glc] es concentración de glucosa y [ace] es la concentración de acetato (Modificado de Wolfe 2005).

Para que el consumo de acetato se lleve a cabo, es necesaria la expresión de genes que codifican a las enzimas responsables del catabolismo de acetato, por ejemplo: *acs*, *pta-ackA*, *aceBAK*, *mdh*, *gltA*, *acnB* entre otros (El-Mansi *et al.* 2006). Algunos estudios sobre la respuesta de *E. coli* al estrés de acetato reportan que los genes *acs* y el operón *aceBAK* están inducidos por acetato (Chong *et al.* 2013).

## 2.4 Producción de acetato.

El primer paso para que *E. coli* produzca acetato es descarboxilar piruvato a acetil-CoA. La descarboxilación oxidativa que ocurre bajo condiciones aerobias es catalizada por el complejo piruvato deshidrogenasa (CPD), en el que se generan dos moléculas de Nicotin Adenin Dinucleotico (NADH) por molécula de glucosa (Wolfe 2005). Posteriormente, el acetil-CoA es convertido en acetato por dos rutas metabólicas alternativas (Dittrich, Bennett y San 2005).

Durante el crecimiento en sustratos acetogénicos como la glucosa, el flujo hacia la producción de acetato a partir de acetil-CoA se logra mediante la actividad de la enzima fosfato acetiltransferasa (Pta) y de la acetato cinasa (AckA), codificadas por los genes *pta* y *ackA*, respectivamente. En esta ruta de 2 pasos, la enzima Pta transforma acetil-CoA en un intermediario de alta energía llamado acetil-fosfato (acetil-F), que posteriormente es convertido en acetato por la acción de la enzima AckA (Enjalbert *et al.* 2017). Mediante esta vía, se generan 2 moléculas de Adenosin Trifosfato (ATP) por molécula de glucosa con el consumo de equivalentes no reducidos NAD<sup>+</sup> o Flavin adenin dinucleotido (FAD) (Figura 2). El funcionamiento de la vía de producción de acetato Pta-AckA depende sólo de la concentración extracelular de acetato (Enjalbert *et al.* 2017).

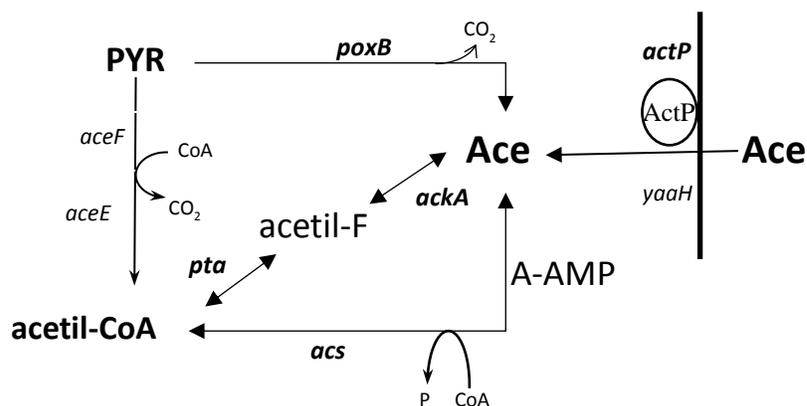


Figura 2. Rutas de producción y consumo de acetato en *E. coli*.

Otra enzima importante para la producción de acetato es la acetil CoA sintetasa (Acs) que esta codificada en el gen *acs*. El gen *acs* en *E. coli* se encuentra en un operón junto con el gen *actP* que codifica para un transportador de acetato (Gimenez *et al.* 2003). Este operón es controlado transcripcionalmente por el complejo CRP-AMPc (Wolfe 2005). El cAMP es un metabolito señal que regula la expresión de varios genes en *E. coli* (Perrenoud y Sauer 2005). En ausencia de Acs, *E. coli* emplea a la piruvato oxidasa (PoxB) que está codificada por el gen *poxB*, esta enzima lleva a cabo la descarboxilación oxidativa de piruvato a acetato, generando CO<sub>2</sub> y FAD (Enjalbert *et al.* 2017; Wolf 2005). El gen *poxB* no es esencial en el inicio de la fase de crecimiento estacionaria de *E. coli* bajo condiciones aerobias, pero juega un papel importante en la eficiencia del crecimiento en *E. coli* al mantener la reserva de CoA-SH (Dittrich, Bennett y San 2005). De hecho, la eliminación del gen *poxB* causa la reducción del rendimiento de biomasa y provoca la pérdida de la eficiencia del crecimiento aerobio de *E. coli* utilizando glucosa como fuente de carbono (Valgepea *et al.* 2010).

Por todo lo anterior, en procesos aerobios con glucosa como fuente de carbono, las rutas principales para la producción de acetato son AckA-Pta y PoxB (Dittrich, Bennett y San 2005).

## **2.5 Consumo de acetato.**

### **2.5.1 Transporte de acetato.**

Si bien el acetato en su forma no disociada permea libremente a través de la membrana celular, se reportó la existencia en *E. coli* de proteínas involucradas en el transporte de acetato. Una acetato permeasa (ActP) codificada por el gen *actP* (Gimenez *et al.* 2003) y la proteína YaaH codificada por el gen *yaaH* (Sá-Pessoa *et al.* 2013) (Figura 2). Aún cuando se

inactivaron los genes *actP* y *yaaH* en *E. coli*, el transporte de acetato ocurre (Sá-Pessoa *et al.* 2013), lo cual sugiere la existencia de otros transportadores más o que la simple difusión del ácido orgánico toma lugar.

La proteína ActP pertenece a la familia de transportadores de sodio y es altamente específica para los compuestos con cadenas cortas de carbono como el acetato, glicolato y propionato. Por otro lado, la proteína YaaH parece comportarse como un transportador secundario dependiente de la fuerza protón motriz, y está involucrada en el transporte de acetato y del succinato principalmente (Sá-Pessoa *et al.* 2013).

### **2.5.2 Ruta Pta-AckA y Acs**

En *E. coli*, hay dos vías de activación del acetato para poder ser catabolizado. Se puede generar acetyl-CoA por la ruta de dos pasos AckA-Pta, y mediante la enzima Acs (Valgepea *et al.* 2010). Las rutas Pta-AckA y Acs son dependientes de ATP, esto implica un gasto de energía para las células para comenzar el catabolismo de acetato (Figura 2).

La ruta AckA-Pta bajo condiciones aerobias es reversible, es decir, que funciona para la producción de acetato como para el consumo del mismo (Figura 2). Como se ha mencionado, la dirección del flujo de carbono está regulada termodinámicamente y sólo depende de la concentración extracelular del acetato (Enjalbert *et al.* 2017). La ruta AckA-Pta es de baja afinidad (km de 7 - 10 mM), por lo que tiene una alta capacidad para la activación del acetato cuando se encuentra en altas concentraciones (Renilla *et al.* 2012). Los genes *pta-ackA* forman parte de un operón que se expresa constitutivamente (Castaño-Cerezo *et al.* 2009). Como se mencionó previamente, esta ruta genera un intermediario denominado acetyl-F (Figura 2), el cual es rico en energía y podría actuar como señal global en procesos como la

regulación de la división celular, la formación de biopelículas y está relacionado con ciertos procesos patogénicos (El-Mansi *et al.* 2006). La enzima Pta actúa como un sensor para la concentración intracelular de CoA-SH. Así mismo, se sabe que en *E. coli* el acetil-F regula algunos procesos celulares por fosforilación o acetilación de proteínas y otras moléculas (Enjalbert *et al.* 2017). Esta molécula actúa como un donador de fosfato directa o indirectamente en miembros de rutas de transducción de señales de dos componentes (El-Mansi *et al.* 2006; Bologna, Andreo y Drincovich 2007). Además, el acetil-F es crítico para la degradación eficiente de proteínas dañadas o desplegadas por proteasas dependientes de ATP. Esta molécula puede influenciar en la regulación de casi 100 genes (Valgepea *et al.* 2010). Durante el crecimiento en acetato como única fuente de carbono, AckA-Pta podría controlar la concentración de acetil-F (Figura 2), siendo la producción de este metabolito el posible propósito del metabolismo de acetato (Kakuda *et al.* 1994). En condiciones tanto aerobias como anaerobias la expresión de los genes *pta-ackA* se consideran importantes para que el flujo de carbono esté balanceado en la fase de crecimiento exponencial de *E. coli* (Dittrich, Bennett y San 2005).

Por otra parte, el gen *acs* se encuentra dentro de un operón junto con otros dos genes involucrados en el transporte de acetato, estos son *yaaH* y *actP* (Castaño-Cerezo *et al.* 2009). La ruta *acs* es irreversible y al igual que la ruta *pta-ackA* produce acetil-CoA a partir de acetato (Figura 2). Esta vía es de alta afinidad ( $K_m$  de 200  $\mu\text{M}$ ) y permite sensar concentraciones bajas de acetato del medio extracelular.

La función de Acs está relacionada al catabolismo de acetato y la expresión de este gen está regulada a distintos niveles, transcripcionalmente y también post-traduccionalmente.

El gen *acs* está regulado directamente por el factor transcripcional global CRP y por las nucleoproteínas IHF y Fis, e indirectamente por otros factores transcripcionales (Renilla *et al.* 2012; Gallego 2018). El factor  $\sigma^{70}$  es el principal responsable de transcribir el gen *acs*, mientras que el  $\sigma^s$  reprime su transcripción (Castaño-Cerezo *et al.* 2009). La transcripción del operón en el que se encuentra *acs*, se activa en *E. coli* durante la fase estacionaria para habilitarla a utilizar acetato como fuente de carbono y es dependiente de CRP-AMPc (Castaño-Cerezo *et al.* 2009; Lin, Castro y Bennett 2006; Enjalbert *et al.* 2017; Renilla *et al.* 2012). En exceso de glucosa, los niveles de AMPc son bajos puesto que la adenilato ciclasa esta inhibida y la proteína receptora de AMPc (CRP, proteína activadora de la transcripción) está inactiva (Enjalbert *et al.* 2017; Valgepea *et al.* 2010; Perrenoud y Sauer 2005). En ausencia de glucosa, se produce gradualmente una mayor concentración de AMPc, el cual puede unirse a CRP y así permitir la expresión de genes y operones involucrados en el catabolismo de fuentes de carbono alternativas a la glucosa, genes del CATC y otros genes gluconeogénicos. (Valgepea *et al.* 2010). Post-traduccionalmente Acs está regulada mediante acetilación de lisina (Renilla *et al.* 2012; Gallego 2018).

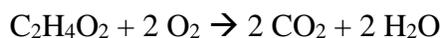
El gen *acs* no es esencial para un rápido crecimiento de *E. coli* (Valgepea *et al.* 2010) pero si se sobreexpresa, mejora la asimilación de acetato en cultivos en glucosa o acetato, tanto en medio mínimo como complejo (Lin, Castro y Bennett 2006). La sobreexpresión del gen *acs* en *E. coli* potencia la asimilación de acetato y la activación de acetil-CoA (Lin, Castro y Bennett 2006).

El acetil-CoA cumple diversas funciones en el metabolismo de carbono, como el de generación de energía a través de la oxidación aerobia, procesos de fermentación y sobreflujo de acetato, en procesos biosintéticos de lípidos, pared celular, lipopolisacáridos y

aminoácidos, como afectador alostérico de algunas enzimas y en algunas modificaciones a moléculas (Renilla *et al.* 2012). Este metabolito es un factor clave en la síntesis de biomasa, el balance redox y el rendimiento energético. El nodo acetato/acetil-CoA determina en gran parte el control que ejerce el metabolismo central de carbono (MCC) en el rendimiento de algunos bioprocesos (Castaño-Cerezo *et al.* 2009).

### **2.5.3 Ciclo de los ácidos tricarboxílicos y ruta del glioxilato.**

El acetil-CoA es una molécula que conecta el metabolismo de acetato, la glucólisis y el CATC (Figura 3). Esta molécula se condensa con Oxaloacetato (OAA) para entrar al CATC y seguir el proceso de oxidación hasta CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. La oxidación del acetato hasta CO<sub>2</sub> y agua se representa en la siguiente ecuación:



Una de las funciones del CATC es la de generar poder reductor en forma de NADPH y NADH para procesos anabólicos y la obtención de energía por el proceso de respiración aerobia, respectivamente.

Además, algunos intermediarios del CATC son precursores biosintéticos (Kornberg 1966). Por ejemplo, el OAA es un precursor de aminoácidos como el aspartato; posteriormente, a partir del aspartato se pueden sintetizar metionina, lisina, treonina e isoleucina (Lehninger 1970; Cunningham, Gruer y Guest 1997; Kornberg 1966). De igual forma, el  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG) es un metabolito importante para la biosíntesis de glutamato (Lehninger 1970).

La enzima aconitato hidratasa (Acn) codificada por el gen *acn*, cataliza la reacción de citrato (CIT) a isocitrato (ICT) constituyendo la segunda reacción del CATC. Hay dos genes diferentes en *E. coli* que codifican para esta enzima: *acnA* y *acnB* (Figura 3). La proteína

AcnB es la principal enzima del CATC y se expresa en la fase de crecimiento exponencial, mientras que la proteína AcnA tiene mayor relevancia en la fase de crecimiento estacionaria y es usada bajo estrés oxidativo o nutricional (Cunningham, Gruer y Guest 1997). El gen *acnB* está sujeto a represión por las proteínas ArcA, Fis y FruR y se activa por CRP, mientras que el gen *acnA* es reprimido por ArcA y FNR y activado por FruR, CRP, Fur y SoxRS (Cunningham, Gruer y Guest 1997; Martínez *et al.* 2012).

Se determinó que hay una sobreexpresión de los genes *acnA* y *acnB* cuando JM101 se cultivó en glicerol en comparación con su cultivo en glucosa (Flores *et al.* 2012). De igual forma, se detectó la sobreexpresión del gen *acnB* en cepas creciendo en acetato como única fuente de carbono (Cunningham, Gruer y Guest 1997; Martínez *et al.* 2012).

Posteriormente, el ICT se puede descarboxilar para formar  $\alpha$ -KG y liberar NADPH, reacción catalizada por la enzima isocitrato deshidrogenasa (Icd) codificada por el gen *icd*. La forma fosforilada de Icd es inactiva y consecuentemente, para que esta enzima sea activa debe estar desfosforilada. Se demostró que la fosforilación/inactivación de Icd es un requisito para el crecimiento de *E. coli* en acetato (El-Mansi *et al.* 2006) y está mediada por la acción del regulador AceK, que se transcribe a partir del operón *aceBAK* que codifica para enzimas de la ruta del glioxilato (RG). *E. coli* EM1017, una cepa deficiente de Icd, fue incapaz de utilizar acetato como fuente de carbono. Esto sugiere que el flujo a través de *icd* es esencial para el catabolismo de acetato y para la operación del switch de acetato (El-Mansi *et al.* 2006).

Una segunda descarboxilación del  $\alpha$ -KG genera succinil-CoA (SUC-CoA) y NADPH, reacción catalizada por la  $\alpha$ -cetoglutarato descarboxilasa (*sucAB*). El SUC-CoA se transforma a succinato (SUC) por la acción de la enzima succinil-CoA sintetasa (SucA) codificada en el gen *sucA* (Figura 3). Subsecuentemente, el SUC se transforma a fumarato (FUM) a través de

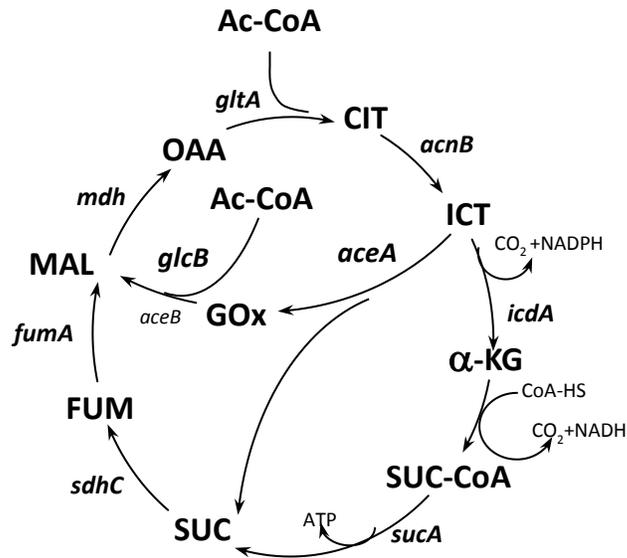
la enzima succinato deshidrogenasa (SdhC) codificada por el gen *sdhC*. Después FUM genera malato (MAL), reacción que es catalizada por la enzima fumarato hidratasa (FumAB) y codificada por el gen *fumAB*. Se reportó la sobreexpresión de los genes *fumA* y *fumB* en *E. coli*, utilizando como fuente de carbono el glicerol en comparación con su cultivo en glucosa (Martínez *et al.* 2012).

Finalmente, el MAL puede convertirse en piruvato mediante la acción de la enzima malato deshidrogenasa (Mdh) codificada por el gene *mdh* (Figura 3).

El CATC está sujeto al control transcripcional en *E. coli*. ArcA controla la expresión de algunos genes del MCC incluyendo los del CATC (Perrenoud y Sauer 2005). El sistema de transducción de señales de dos componentes ArcA y ArcB, regula la expresión de genes en respuesta a condiciones redox y de reguladores transcripcionales en el switch aeróbico-anaeróbico (Perrenoud y Sauer 2005; Martínez *et al.* 2012).

La RG opera para producir un mol de malato a partir de dos moles de acetil-CoA a través de las enzimas isocitrato liasa (AceA) y malato sintasa (AceB) (Kim *et al.* 2012). Esta ruta es necesaria durante el crecimiento de unidades de dos carbonos como el acetato para poder generar biomasa y evitar las descarboxilaciones de la parte baja del CATC, siendo inactiva en cultivos en exceso de glucosa (Renilla *et al.* 2012). La RG hace uso de 6 de las 8 reacciones del CATC (Figura 3). Como se señaló, el operón *aceBAK* codifica a la isocitrato liasa (AceA) y a la malato sintasa (AceB) que conjuntamente convierten isocitrato y acetil-CoA en malato y succinato (El-Mansi *et al.* 2006, Renilla *et al.* 2012).

Cuando se inactivó el gen *aceA* en *E. coli* se perdió la capacidad de crecer en acetato pero conservó su capacidad de utilizar glucosa e intermediarios del CATC como fuentes de carbono con la misma facilidad que la cepa silvestre (Kornber *et al.* 1966).



**Figura 3.** Reacciones que conforman el Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CATC) y la Ruta del glioxilato (RG).

El segundo componente de la RG es la enzima malato sintasa, codificada en *E. coli* por dos genes, *aceB* y *glcB* (Figura 3). Esta enzima cataliza la condensación del acetil-CoA y el glioxilato (GOx) para producir MAL y acetil-CoA (El-Mansi *et al.* 2006; Kornberg 1966). Se encontró que el acetato actúa como un inductor directo para la síntesis de las enzimas AceA y AceB en *E. coli* (Kornberg *et al.* 1966). Cuando esta bacteria se cultivó en glucosa, piruvato o intermediarios del CATC, no hubo un incremento significativo de la actividad específica de estas enzimas; cuando el acetato se empleó como único sustrato, la actividad de AceA se vio ampliamente favorecida (Kornberg *et al.* 1966). Se cultivó a *E. coli* en acetato como única fuente de carbono y se determinó que hay actividad suficiente de las enzimas de la RG que sustentan su crecimiento (Kornberg *et al.* 1966). Por tanto, *aceA* y *aceB* son esenciales para el consumo de acetato (Valgepea *et al.* 2010). También se estableció que cuando *E. coli* se

cultivó con fuentes de carbono diferentes al acetato, como por ejemplo la glucosa, la presencia de enzimas de la RG fue menor en comparación con su cultivo en acetato.

AceA e Icd compiten por el ICT, que es su sustrato común, los flujos de carbono a través de la RG o de la parte baja del CATC están regulados por la fosforilación reversible de Icd a través de la proteína cinasa fosfatasa bifuncional (AceK) codificada en el operon *aceBAK* (Castaño-Cerezo *et al.* 2014; Chong *et al.* 2013; Renilla *et al.* 2012). El nodo del isocitrato es un punto de regulación importante para el anabolismo y catabolismo (Castaño-Cerezo *et al.* 2014). Además de la regulación del nodo del isocitrato mediante fosforilación, AceA también se regula mediante acetilación para inhibir parcialmente la RG (Castaño-Cerezo *et al.* 2014). Se reportó que el sistema ArcA/B también tiene un efecto sobre el operon *aceBAK*, este sistema responde a limitaciones de oxígeno bajo condiciones microaerobias (Son *et al.* 2011). IclR es un represor específico del operon *aceBAK* que es regulado por GOx y piruvato. Mutaciones en el gen *iclR* afecta indirectamente la expresión de *acs* (Renilla *et al.* 2012).

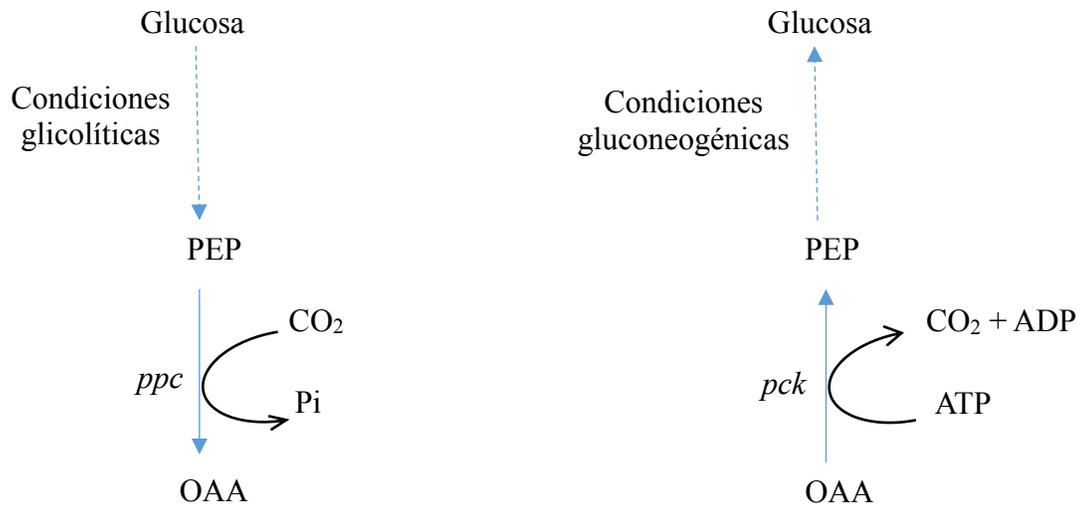
En una cepa silvestre de *E. coli* se determinó que aproximadamente el 20 % del acetato entrante se distribuye a través de la RG mientras que el 55 % va a la parte baja del ciclo del CATC (Zhao y Shimizu 2003).

Otro grupo de genes que son importantes para el metabolismo de acetato son los que interconectan rutas metabólicas a través de metabolitos comunes, conocidas como rutas anapleróticas (RA).

#### **2.5.4 Rutas anapleróticas y gluconeogénesis.**

La fosfoenolpiruvato carboxilasa (Ppc) es una enzima anaplerótica que media la carboxilación de fosfoenolpiruvato (PEP) a OAA bajo condiciones glucolíticas en *E. coli*.

Bajo condiciones gluconeogénicas, Ppc se reprime y se expresa la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (Pck) (Figura 4). La enzima Pck es conocida por ser responsable del suministro de flujo de carbono del CATC a las vías gluconeogénicas en cultivos con acetato como fuente de carbono (Oh *et al.* 2002).



**Figura 4.** Reacción mediada por la Ppc y la Pck bajo condiciones glicolíticas y condiciones gluconeogénicas, respectivamente (Kwon *et al.* 2008).

La carboxilación de PEP a OAA mediada por la enzima Pck puede ocurrir solo con el enriquecimiento del medio de cultivo con una fuente de gas  $\text{CO}_2$  o con la utilización de un medio de cultivo complejo (Kwon *et al.* 2008).

Kwon y col. (2008) estudiaron el efecto de la sobreexpresión de los genes *ppc* o *pck* en *E. coli* W3110 sobre los niveles intracelulares de ATP y determinaron que las células que sobreexpresan el gen *pck* producen aproximadamente el doble de ATP intracelular, respecto a las células que sobreexpresan *ppc* utilizando medio mínimo y glucosa como fuente de carbono. Cabe mencionar que la sobreexpresión del gen *pck* en *E. coli* W3110 favoreció el rendimiento biomasa-sustrato ( $Y_{x/s}$ ) (Kwon, Lee y Kim 2008).

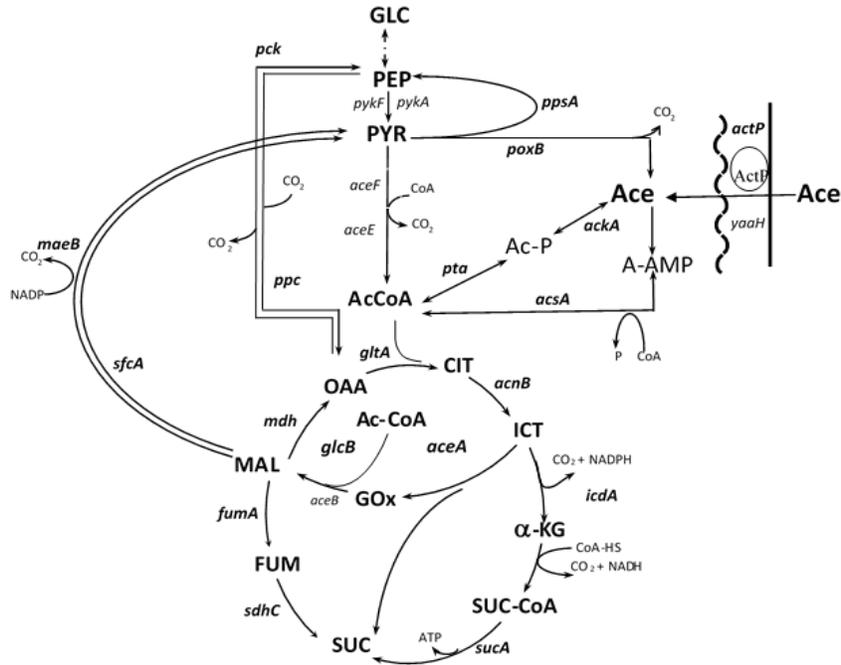
Se propuso que la reacción mediada por la enzima Pck ayuda a incrementar la generación de biomasa y la producción de biomoléculas como el succinato debido a que en esta reacción se produjo más energía en forma de ATP que la reacción catalizada por la enzima Ppc, la cual libera fosfato (Figura 4) (Kwon, Lee y Kim 2008; Martínez *et al.* 2012).

La concentración intracelular de ATP es uno de los factores más importantes en la fisiología celular. Los niveles de ATP regulan muchos eventos, como por ejemplo, la síntesis de ARN ribosómico que es potenciada por altas concentraciones de ATP y rutas metabólicas como la glucólisis, la RG y el sistema PTS (Kwon, Lee y Kim 2008; Martínez *et al.* 2012).

La inactivación del gen *pck* en JM101 creciendo en glicerol como fuente de carbono generó una fase de adaptación mayor que la cepa silvestre, teniendo como consecuencia la disminución del valor de la  $\mu$  en un 10 %. Por otro lado, cuando se inactivó la expresión del gen *ppc* en JM101, esta bacteria perdió la capacidad de crecer en glicerol o glucosa como fuente de carbono, indicando que este gen es esencial para el catabolismo de estos sustratos (Martínez *et al.* 2012).

El gen *ppsA* codifica a la enzima fosfoenolpiruvato sintasa (PpsA) y cataliza la conversión de piruvato a PEP (Figura 5). Oh y col. (2002) determinaron que el gen *ppsA* en *E. coli* usando acetato como fuente de carbono se sobreexpresó comparándolo con la expresión de este gen cuando se utiliza glucosa.

Se han estudiado cepas de *E. coli* que carecen de los genes *pck*, *ppsA* y la doble mutante *pck-ppsA*. Las inactivaciones individuales de estos genes no afectó la  $\mu$  en acetato, mientras que la doble mutante *ppsA-pck* ya no fue capaz de crecer. Aunque la expresión del gen *ppsA* por sí solo no es esencial en el metabolismo gluconeogénico, podría jugar un papel importante durante el crecimiento en acetato en conjunto con la expresión de las enzimas málicas *maeB* y *sfcA*, pudiendo realizar la misma función que el gen *pck* (Oh *et al.* 2002).



**Figura 5.** Nodo PEP-PYR-OAA. Genes anapleróticos y gluconeogénicos, *maeB*, *sfcA*, *ppc*, *pck* y *ppsA*.

Las enzimas málicas SfcA-MaeB junto con Pck son esenciales para el crecimiento en intermediarios del CATC o en sustratos que entran en el metabolismo central a través de acetil-CoA como es el caso de acetato (Figura 5) (Bologna, Andreo y Drincovich 2007). Las enzimas málicas catalizan la reacción de malato a PYR y forman parte del nodo PEP-PYR-OAA que une la glucólisis, la gluconeogénesis y el CATC. En *E. coli* estos dos genes presentan un alto grado de homología, la enzima SfcA es dependiente de  $\text{NAD}^+$  mientras que MaeB es dependiente de NADP (Bologna, Andreo y Drincovich 2007). Durante el metabolismo de acetato de *E. coli*, se indujo la expresión de los genes *maeB* y *sfcA*, en comparación con la expresión de estos genes al cultivar *E. coli* en glucosa como fuente de carbono (Oh *et al.* 2002). La regulación de las actividades de MaeB y SfcA parece estar correlacionada con la activación de la reacción mediada por el gen *pta* que es responsable de la interconversión de acetil-CoA y acetil-F (Bologna, Andreo y Drincovich 2007).

### **2.5.5 Glucólisis y vía de las pentosas fosfato.**

Al cultivar a *E. coli* en acetato como fuente de carbono la mayor parte de los genes de la ruta de la glucólisis (*pfkAB*, *fba*, *gapA*, *pgk*) se subexpresan en comparación con su cultivo en glucosa (Oh *et al.* 2002) y funcionan en sentido inverso. El último punto de control gluconeogénico es aquel en el que la enzima fosfofructocinasa (Pfk) codificada por el gen *pfkAB*, genera fructosa-6-fosfato a partir de fructosa-1,6-bisfosfato.

Finalmente, una vez que se genera glucosa-6-fosfato, en *E. coli* puede seguirse la vía oxidativa de las pentosas fosfato, cuyos genes *zwf* y *gnd* también se subexpresan utilizando acetato como fuente de carbono, en comparación con su cultivo en glucosa (Oh *et al.* 2002).

### **2.6 Acetato como compuesto tóxico.**

El ácido acético es un ácido carboxílico débil que puede disociarse en solución acuosa. Su pKa es de 4.76 por lo que a pH de 7 el ión acetato representa más del 99 % (Sá-Pessoa *et al.* 2013).

El acetato a cierta concentración es tóxico para las células ya que permea fácilmente las membranas desacoplando el gradiente de pH transmembranal. El protón liberado acidifica el citoplasma mientras que el anión incrementa la presión osmótica interna e interfiere con la biosíntesis de metionina (Wolfe 2005). El crecimiento celular de diferentes cepas de *E. coli* se suele inhibir cuando la concentración de acetato está entre 5 a 10 g/L (Shiloach *et al.* 1996). La forma protonada del acetato puede penetrar las membranas celulares, resultando en una reducción del pH intracelular y una acumulación de aniones en el citoplasma celular, ambas podrían contribuir a la inhibición del crecimiento (Chong *et al.* 2013).

Como se mencionó anteriormente, la producción de acetato bajo condiciones aerobias debido a altas velocidades de consumo de glucosa es un problema constante en los cultivos de *E. coli*. La producción de acetato es indeseable ya que representa un derroche de esqueletos carbonados, afecta el pH y el gradiente de protones transmembranal, entre otros efectos (Lara 2011). Para intentar revertir los efectos del acetato, se han llevado a cabo estrategias para disminuir la toxicidad del acetato mediante la adición de metionina, glicina, arginina, treonina y lisina (Chong *et al.* 2013).

El acetato afecta los bioprocesos porque inhibe el crecimiento de cepas sobreproductoras de metabolitos y moléculas de interés, impidiendo llegar a cultivos de alta densidad celular que se traduce a la disminución del rendimiento de producto (Castaño-Cerezo *et al.* 2009; Lara 2011).

Aunque *E. coli* tolera cierta concentración de acetato y lo puede emplear para seguir creciendo, si la concentración de acetato en el medio incrementa considerablemente, el acetato inhibe el crecimiento de esta bacteria. Sin embargo, existen cepas de *E. coli* que tienen una tolerancia mayor al acetato (Shiloach *et al.* 1996).

## **2.7 El género *Acinetobacter*.**

El género *Acinetobacter* pertenece al orden *Pseudomonadales* y comprende bacterias Gram-negativas, aerobias estrictas y no fermentativas que se pueden encontrar en agua, suelo y en piel humana (Sigala *et al.* 2017). Son bacterias saprofitas ubicuas que se encuentran en hábitats muy diversos (Towner 2006).

Los miembros del género *Acinetobacter* crecen en un rango amplio de temperatura (20-42 °C), pero su temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C y pueden emplear medio mineral enriquecido con una sola fuente de carbono y energía para crecer (Towner 2006).

Pocas cepas de *Acinetobacter* pueden utilizar glucosa como fuente de carbono pero hace uso de una gran variedad de compuestos orgánicos, entre los que se encuentran ácidos orgánicos y compuestos fenólicos. Otros compuestos que pueden ser catabolizados por estas bacterias son los alcoholes alifáticos, algunos aminoácidos y ácidos grasos. Debido a la diversidad metabólica de *Acinetobacter*, este grupo de microorganismos podrían jugar un papel importante en procesos de biodegradación de contaminantes ambientales (Towner 2006).

### **2.7.1 *Acinetobacter schindleri* ACE.**

La cepa *Acinetobacter schindleri* ACE (ACE) fue aislada en el laboratorio de nuestro grupo de trabajo como contaminante de una mutante de *E. coli* PB12 *maeB*::lx cultivada en medio mineral M9 con acetato como fuente de carbono y kanamicina (Sigala *et al.* 2017). ACE es capaz de catabolizar sustratos gluconeogénicos como el acetato, el succinato y el lactato. Es posible que esta cepa haya evolucionado para degradar compuestos que son metabolizados vía acetyl-CoA como ácidos dicarboxílicos y ácidos grasos. ACE tiene genes que codifican para el transporte y degradación de ácidos grasos (Sigala *et al.* 2017).

Esta cepa no puede crecer en glucosa porque no tiene genes de la ruta de Entner-Doudoroff, carece de enzimas glucolíticas importantes como la glucocinasa, 6-fosfofructocinasa (PfkA), piruvato cinasa (Pyk) y proteínas del sistema fosfotransferasa (PTS). Además, carece de los genes *gnd* y *zwf* de la parte oxidativa de la vía de las pentosas fosfato. ACE no puede utilizar compuestos aromáticos y no es capaz de crecer en fuentes de carbono comunes como la

glucosa, xilosa, glicerol y citrato. Sin embargo, una de las características principales de la cepa ACE es que crece en acetato a una  $\mu$  muy elevada y con un rendimiento de biomasa mayor que *Acinetobacter baylyi* ADP1 (ADP1), una cepa que está cobrando mayor relevancia en el ámbito biotecnológico por su diversidad metabólica y sus capacidades de recombinación genética. En medio mínimo M9 con acetato como única fuente de carbono ACE tuvo una  $\mu$  de 0.89 al mantener una tensión de oxígeno disuelto >20 % y pH 7 (Sigala *et al.* 2017).

Se han reportado valores diferentes de  $\mu$  para especies diferentes de *Acinetobacter* usando acetato como fuente de carbono. Por ejemplo, *Acinetobacter calcoaceticus* alcanzó una  $\mu$  de 0.7 h<sup>-1</sup> y *Acinetobacter* sp. HO1-N tuvo una  $\mu$  de 0.59 h<sup>-1</sup>. Lo anterior demuestra que las especies de *Acinetobacter* usualmente crecen rápido en acetato.

Para entender mejor las capacidades catabólicas de acetato de ACE, en el presente trabajo se hace una comparación a nivel fisiológico y transcripcional del metabolismo de acetato de ACE tomando como referencia el crecimiento de JM101 bajo las mismas condiciones de cultivo

### **3 HIPÓTESIS.**

Debido a que *Acinetobacter schindleri* ACE alcanza una velocidad específica de crecimiento mayor que *Escherichia coli* JM101 al utilizar acetato como única fuente de carbono, existirán diferencias importantes en el análisis de transcripción de genes involucrados en el catabolismo de acetato, a saber, *actP*, *ackA*, *pta*, *aceA*, *glcB*, *icdA*, *sdh*, *fumA*, *pck*, *ppsA*, *maeB*, *sfcA* y *fbp*.

## **4 OBJETIVOS.**

### **4.1 Objetivo general.**

Comparar el metabolismo de acetato entre ACE y JM101 a nivel fisiológico mediante la estimación de parámetros cinéticos de crecimiento y mediante un análisis transcripcional relativo.

### **4.2 Objetivos particulares.**

- Calcular parámetros cinéticos como velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), rendimiento biomasa sustrato  $Y_{x/s}$ , velocidad específica de consumo de sustrato ( $q_s$ ); velocidad específica de consumo de oxígeno ( $q_{O_2}$ ), velocidad específica de producción de CO<sub>2</sub> ( $q_{CO_2}$ ) y coeficiente respiratorio ( $RQ$ ) a partir de cinéticas de crecimiento de ACE y JM101 en medio mineral con acetato como fuente de carbono.
- Determinar el gen de referencia común entre ACE y JM101 para el análisis de expresión relativa por RT-qPCR.
- Analizar la expresión relativa de genes del metabolismo central de carbono de ACE comparativamente con el de JM101 mediante RT-qPCR.

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS.

### 5.1 Cepas bacterianas usadas

Se utilizaron las cepas de JM101 y de ACE del banco celular del laboratorio de biotecnología de la UAM-Cuajimalpa.

### 5.2 Medios de cultivo y condiciones de cultivo.

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 LB como medio de cultivo, se inoculó utilizando el método de estriado, y las placas se incubaron por 24 horas a 30 °C para ACE y a 37 °C para JM101. Los inóculos se hicieron en matraces bafleados con 25 mL de medio mineral M9 con 3 g/L de acetato (Tabla 1) inoculando con 3 colonias aisladas tomadas de las placas cultivadas anteriormente. Los matraces se incubaron con agitación de 250 rpm durante 24 horas a 30 °C o 37 °C.

Componente	Volumen mL
Sales M9 10 X	2.5
Agua	19.6
FeSO <sub>4</sub> 10 X	2.5
Acetato 20 %	0.375
MgSO <sub>4</sub> 1 M	0.05
Tiamina 1 mg/mL	0.005
CaCl <sub>2</sub> 1 M	0.0025
Kanamicina 30 mg/mL	0.0025

**Tabla 1.** Medio mineral M9 con 3 g/L de acetato para los inóculos (volumen total 25 mL).

Las cinéticas de crecimiento se llevaron a cabo en un reactor instrumentado de 1 L (BioStat B Plus, Sartorius Stedim, Melsungen, Alemania) y se mantuvo un volumen de trabajo de 600 mL, se utilizó medio mínimo mineral M9 y 4 g/L de acetato como única fuente de carbono (Tabla 2). Se partió de una DO inicial de 0.2 y una agitación inicial de 350 rpm, se mantuvo una tensión de oxígeno disuelto (TOD) >20 %, pH de 7 ajustado con HCl al 20 % y un flujo de aire de 1vvm. Al inicio de la cinética se agregaron 600 µL de antiespumante al 30 %.

Componente	Volumen (mL)
Sales M9 10 X	60
Agua	465.42
FeSO <sub>4</sub> 10 X	60
Acetato 20 %	12
MgSO <sub>4</sub> 1 M	1.2
Tiamina 1 mg/mL	0.12
CaCl <sub>2</sub> 1 M	0.06
Antiespumante 30 %	0.6
Kanamicina 30 mg/mL	0.6

**Tabla 2.** Medio mineral M9 con 4 g/L de acetato (600 mL).

Nota: 466.62 mL de agua si no contiene kanamicina.

Las condiciones de cultivo de ambas bacterias fueron las mismas, solo cambió la temperatura de incubación. En todo el proceso, JM101 se incubó a una temperatura de 37 °C mientras que la cepa ACE se incubó a una la temperatura de 30 °C y se adicionó kanamicina a una concentración de 30 µg/mL a los medios de cultivo ya que es resistente a este antibiótico (Sigala *et al.* 2017). Todos los experimentos se hicieron por duplicado.

### **5.3 Toma de muestras.**

En las cinéticas de crecimiento de JM101 se tomaron muestras al inicio del cultivo, después de 2 horas y luego cada hora hasta el final del cultivo. Se tomó un volumen de 5 mL de muestra para determinar crecimiento celular y consumo de sustrato. En la fase de crecimiento exponencial se tomó una muestra de 15 mL y se le agregó el mismo volumen de RNA protect (RNeasy Mini Kit, QIAGEN USA) en un tubo falcón de 50 mL estéril. La mezcla de muestra y RNA protect se alicuotó inmediatamente en tubos eppendorf de 1.5 mL, se centrifugaron a 13,000 rpm durante 1 min (centrífuga minispin Eppendorf 5452, USA), se descartó el sobrenadante y se repitió la operación para tener el contenido celular de 3 mL de muestra por tubo. El pellet celular se almacenó a -80 °C hasta el momento de la extracción de RNA. Se siguió la misma metodología para la toma de muestras del cultivo de ACE pero cambió el tiempo de muestreo: al inicio del cultivo, después de 1 hora y luego cada 30 min hasta el final del cultivo. La muestra para extraer RNA también fue tomada en la fase de crecimiento exponencial con aproximadamente 1.5-2 DO al igual que JM101.

### **5.4 Análisis de muestras.**

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

El incremento de biomasa en los cultivos se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 600 nm (BioPhotometer plus, Eppendorf, USA). Las muestras se diluyeron 1:10 con agua destilada, una vez que las muestras estaban homogéneas, se procedió a medir la DO con el espectrofotómetro a la longitud de onda anteriormente indicada. Las determinaciones se realizaron por duplicado. La formación de biomasa se determinó con las

siguientes relaciones:  $1 \text{ OD}_{600\text{nm}} = 0.55 \text{ g}_B \text{ L}^{-1}$  para ACE o  $1 \text{ OD}_{600\text{nm}} = 0.35 \text{ g}_B \text{ L}^{-1}$  para JM101 (Sigala *et al.* 2017).

#### **5.4.2 Determinación de consumo de acetato.**

Se centrifugó 1.5 mL de muestra a 10,000 rpm durante 8 min, se desechó el pellet y el sobrenadante se guardó a  $-20^\circ\text{C}$  hasta el momento de su análisis. La cuantificación de acetato se realizó por Cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con una columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) y mediante el uso del kit enzimático Enzytec™ Acetic Acid UV method (r-biopharm, Darmstadt, Alemania).

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 5 mM de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). El flujo de la fase móvil fue de  $0.6 \text{ mL/min}$  y se fijó un tiempo de corrida de 16 min. La concentración de acetato se calculó como el área bajo la curva de los cromatogramas y con la construcción de una curva estándar.

Para determinar la concentración de acetato en las muestras con el kit enzimático previamente mencionado, se siguió el protocolo del fabricante. El fundamento de este kit se basa en tres reacciones enzimáticas. La primera es la conversión de acetato a acetil-CoA, la segunda es la condensación de acetil-CoA y oxaloacetato para formar citrato. Para obtener el oxaloacetato para la segunda reacción es necesario que el malato reaccione y se produzca la reducción del cofactor  $\text{NAD}^+$  ( $\text{NADH}$ ), mismo que se mide espectrofotométricamente a una longitud de onda de 365 nm (BioPhotometer plus eppendorf, USA).

### 5.4.3 Cálculo de parámetros cinéticos $\mu$ , $q_s$ y $Y_{x/s}$ .

La  $\mu$  se calculó con una regresión lineal del ln de la concentración de biomasa respecto al tiempo, el  $Y_{x/s}$  se estimó como el coeficiente de la regresión lineal de la concentración de biomasa contra el consumo de acetato y la  $q_s$  se determinó como la relación de la  $\mu$  respecto al  $Y_{x/s}$  (Doran 1988).

## 5.5 Análisis de gases

### 5.5.1 Cálculo de la velocidad específica de consumo de oxígeno ( $q_{O_2}$ ), velocidad específica de producción de dióxido de carbono ( $q_{CO_2}$ ) y coeficiente respiratorio ( $RQ$ ).

A lo largo de la cinética de crecimiento se llevó a cabo el monitoreo de gases del cultivo. La composición de los gases en el proceso de fermentación puede ayudar a entender el metabolismo celular de las bacterias cultivadas. La composición del gas puede cambiar dependiendo de la fuente de energía que la célula está usando. Al biorreactor se acoplaron sensores de gases en línea (Gas Analyzer BlueInOne Ferm, BlueSens, Alemania) para medir la concentración de  $O_2$  y de  $CO_2$ , la humedad absoluta, relativa y la presión a la entrada y a la salida del mismo. Mediante estos datos se calcularon la velocidad de absorción de  $O_2$  (OUR) y la tasa de liberación de  $CO_2$  (CER) que se definen de la siguiente manera (Ecuación 1 y Ecuación 2)

$$OUR = \frac{\dot{P}_e}{RT_e} F_e (y_{O_2,e} - R_i y_{O_2,s})$$

**Ecuación 1.** Definición de velocidad de absorción de  $O_2$  (OUR).

$$CER = \frac{P_e}{RT_e} F_e (R_i y_{CO_2,s} - y_{CO_2,e})$$

**Ecuación 2.** Definición de velocidad de liberación de  $CO_2$  (CER).

Donde:

Pe es Presión a la entrada del reactor (bar)

R es la constante de los gases ideales (0.0821 bar L K<sup>-1</sup>)

Te es Temperatura en la entrada del reactor (K)

Fe es Flujo de aire en la entrada (L h<sup>-1</sup>)

y<sub>O<sub>2</sub>,e</sub> es fracción molar de oxígeno en la entrada

y<sub>O<sub>2</sub>,s</sub> es fracción molar de oxígeno en la salida

y<sub>CO<sub>2</sub>,e</sub> es fracción molar de dióxido de carbono en la entrada

y<sub>CO<sub>2</sub>,s</sub> es fracción molar de dióxido de carbono en la salida

R<sub>i</sub> es Relación de la fracción de gases diferentes del oxígeno y dióxido de carbono de entrada y salida

Cuando la transferencia de oxígeno disuelto (TOD) es constante en el medio de cultivo la velocidad de absorción de O<sub>2</sub> y la velocidad de liberación de CO<sub>2</sub> es igual a la velocidad específica de consumo de oxígeno y a la velocidad específica de producción de CO<sub>2</sub> respectivamente multiplicado por la biomasa y el volumen del líquido (Ecuaciones 3 y 4).

$$OUR = q_{O_2} X V_L$$

**Ecuación 3.** Definición de velocidad de absorción de O<sub>2</sub> (OUR) en mmol O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> cuando la transferencia de O<sub>2</sub> disuelto es constante.

$$CER = q_{CO_2} X V_L$$

**Ecuación 4.** Definición de velocidad de absorción de CO<sub>2</sub> (CER) mmol CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> cuando la transferencia de O<sub>2</sub> disuelto es constante.

Donde:

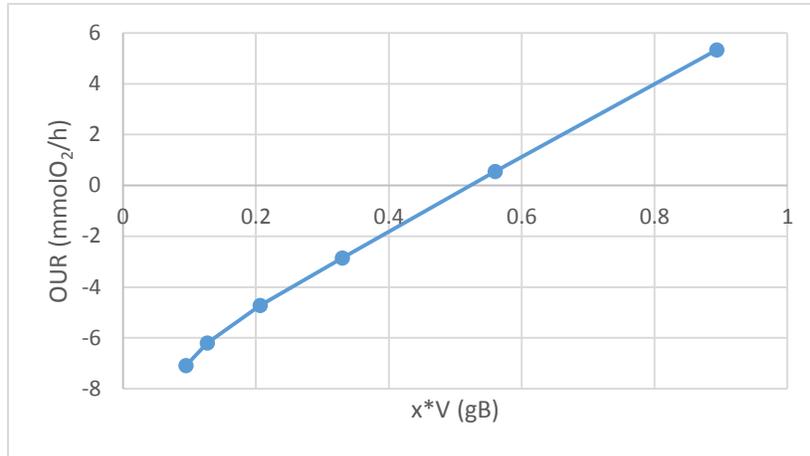
X es Biomasa (gB/L)

V<sub>L</sub> es el Volumen del líquido en el reactor (L).

q<sub>O<sub>2</sub></sub> es velocidad específica consumo de O<sub>2</sub> (mmolO<sub>2</sub> gB<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>).

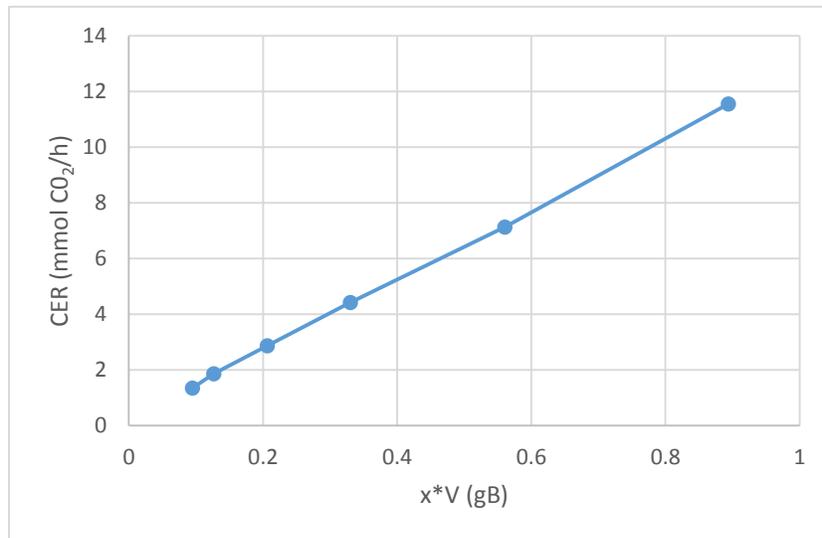
q<sub>CO<sub>2</sub></sub> es velocidad específica de producción de CO<sub>2</sub> (mmolCO<sub>2</sub> gB<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>).

Para calcular q<sub>O<sub>2</sub></sub> se graficó OUR contra el producto de la biomasa por el volumen del líquido del reactor, siendo la pendiente la q<sub>O<sub>2</sub></sub>.



**Gráfica 1.** Velocidad de absorción del O<sub>2</sub> respecto a la cantidad de biomasa generada en la fase de crecimiento exponencial, donde la pendiente es  $q_{O_2}$ .

Del mismo modo, se graficó el CER respecto al producto de la biomasa por el volumen del medio de cultivo, la pendiente en este caso corresponde  $q_{CO_2}$  (Gráfica 2)



**Gráfica 2.** Velocidad de liberación del CO<sub>2</sub> respecto a la cantidad de biomasa generada en la fase de crecimiento exponencial, donde la pendiente es  $q_{CO_2}$ .

El coeficiente de respiración ( $RQ$ ) se calculó dividiendo  $q_{O_2}$  entre  $q_{CO_2}$  (Andersen *et al.* 1980).

$$RQ = \frac{q_{O_2}}{q_{CO_2}}$$

**Ecuación 5.** Definición de coeficiente respiratorio (RQ)

Donde:

$q_{O_2}$  es la velocidad específica de consumo de  $O_2$ .

$q_{CO_2}$  es la velocidad específica de producción de  $CO_2$ .

## **5.6 Extracción, purificación y determinación de la calidad del RNA.**

Se hizo la extracción de RNA total de 2 cinéticas independientes por cepa haciendo uso de un kit comercial (RNeasy Mini Kit, QUIAGEN USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la extracción se midió la concentración del RNA obtenido mediante espectrofotometría con un Nano-Drop (Thermo Fisher Scientific USA).

Para eliminar una posible contaminación de DNA, el RNA se trató con una DNAsa (Turbo DNA-free kit, Ambrion, USA) de acuerdo a instrucciones del fabricante.

Después de la digestión enzimática se midió la concentración del RNA y se estimó la pureza del RNA obtenido. La pureza del RNA se determinó mediante espectrofotometría usando un Nano-Drop (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific USA), mediante las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230.

Se corroboró la ausencia de DNA en las muestras de RNA. Se intentó amplificar el gen 16S ribosomal por PCR tomando como plantilla las muestras de RNA libre de DNA de ACE y JM101 de manera independiente y como control positivo se utilizó como plantilla el DNA genómico correspondiente.

Se midió la integridad del RNA mediante una electroforesis capilar en un chip de RNA en un bioanalizador 2100 de acuerdo con las indicaciones del fabricante (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

## 5.7 Análisis de transcripción de genes del catabolismo de acetato entre JM101 y ACE por RT-qPCR.

### 5.7.1 Diseño de primers.

Se seleccionaron genes del metabolismo central de carbono de ACE, y se buscó la secuencia de nucleótidos de cada gen en una base de datos (Sigala *et al.* 2017). A partir de las secuencia de genes se diseñaron los primers forward (F) y reverse (R) con el programa primer design del NCBI. Como parámetros de diseño se fijó un tamaño de amplicón de 101 pb, con una temperatura de alineamiento (Tm) con un intervalo de 59-61 °C (Tabla 3). De la misma forma se diseñó el par de primers de 10 posibles genes de referencia (Rocha, Santos y Pacheco 2015) de ambas cepas para llevar a cabo el análisis de expresión relativo, en la siguiente tabla solo se reporta el gen de referencia que se utilizó para la RT-qPCR (*gyrA*). Para la cepa JM101 se utilizaron las secuencias de primers reportadas por Flores y col. en 2005 (Tabla 3).

Gen	Oligo	JM101	ACE
<i>actP</i>	F	CCT CCG GCT ATG ACG GCT TA	CTGGTATGGCAGTTGCAGGA
	R	GCA ACC ACC GCG AGG ATA GT	AAGCGTTGCGCCTACGAAAA
<i>Acs</i>	F	GTGCGTAAAGAGATTGGCCC	CGGGCATATCGTGGACAAAC
	R	CGCAGAATACGGCGCATAAT	CACTTTCACGCACAAAGGCA
<i>ackA</i>	F	CTGGTCTGAACTGCGGTAGTTC	TCCAGCACACCTGATTGGAA
	R	GGCAGGTGGAAACATTCGG	GTGCTGGCATGGTTTGTATGG
<i>Pta</i>	F	ACAATGTTGATCCGGCGAAG	TCGCCCTGACCTGTTGATTG
	R	CATATCGATCGCACGAGTCG	CACGACCAGCTACTTGGGAG
<i>gltA</i>	F	AGGCACGCTGGGTCAAGAT	CACGCTGACCACGAACAAAA
	R	TAGATTTCGAGGATGCGGTT	AGTGCAGAGATAACCAGCAGC
<i>acnB</i>	F	CCTGGTGTGTTGGTCCGAT	TGTGCGATCACGCTTTCTGA
	R	TTACGCGAAGAACCCGTACC	GTACGAGCATCGCCATAGCC
<i>aceA</i>	F	ACATGGGCGGCAAAGTTTTA	TGGCTTATGTTGCTGGCGTA
	R	AACCAGCAGGGTTGGAACG	TTTGTGGTCGTCACCGATGT
<i>glcB</i>	F	CTCCAGCACAGTTTGTTCGGTT	GCCAACACCAACTGGACAGA
	R	ATTGGCATCGATTTGCAGCT	CCCACACCCAGATCAACCC

Continuación Tabla 5.			
Gen	Oligo	JM101	ACE
<i>icdA</i>	F	GACCGAAGCGGCTGACTTAA	GTGTCAGGTGAAAGACGCAC
	R	GCAGTTTAGCGCCATCCATC	GGTACGGGTCAAGCCAGAAG
<i>sucA</i>	F	GCGGCAAAGAAACCATGAAA	CGTGCAGTTCTGTTGGTTG
	R	TTCGGTGCTGGTAATGTGCA	AGGTCAGCCGGGTTTTTACC
<i>sdhC</i>	F	TGGCGTATCACGTCGTCGTA	TCGTGCGTTTTTGTGTATGGG
	R	AAAGGAGATTTTGGCGGAGC	CAGTTCTTCTGCAACGCCAA
<i>fumA</i>	F	ATGTCGATCAACTGCAAGCG	TTGGACGATGCGATCAACGA
	R	GAAGCCGCCGTGTTTTTTAC	TTCTTACGACCGAATGCAGGG
<i>mdh</i>	F	CGGGTCTGCAACCCTGTCTA	TAAACGTGGTGCTGCGATCA
	R	CGTAGGCACATTTCGACAACG	TAGTGCCAAGAGCCCAATCG
<i>maeB</i>	F	TGGTTTGCATTCAAAGGC	CCCATGAAGCACGTTACAGAC
	R	GAGGGTACGTTTGCCGTCAT	TGCGCCACGGAAGATGTATG
<i>sfcA</i>	F	ATAAAGGCAGTGCCTCAGCA	CAACATCATGCGATGCCACT
	R	TGCTCGTTCCGCTTGTCTT	ATCAGGCTACCCACTGCAAC
<i>ppc</i>	F	CAGAAATCACCGTCAGCAGC	AACGTGCCACACTCGATGAA
	R	CATAATGCGACGCCAGCTCT	TGCCACATCACCATCTGCTT
<i>pck</i>	F	ACATGTTTATTCGCCCGAGC	-
	R	CTGTTCTTTCCACTGCGGGT	-
<i>pckC</i>	F	-	TGTTGTCCGTCGTGATCCAT
	R	-	TCTCGCCAACTTTCTCACCC
<i>ppsA</i>	F	TCAGCAGGAAACCTTCCTCAA	TCACCGCTTCTTACGGTCTG
	R	GATAAGAGATGGCGCGATCG	CGCGTGCTTACCAGCATTTA
<i>pgk</i>	F	AGATTACCTCGACGGCGTTG	TCTTGGGTTTATTGGCTGCT
	R	TGGACAGGGTTTCGTCGTCT	TGCTTTCGCAGTTTCTGGAC
<i>gapA</i>	F	GGCTCCGCTGGCTAAAGTTA	AACGCGATCACTCCAACACT
	R	GGCCATCAACGGTTTTCTGA	ATCAGGTTCTGGTCGTTCTG
<i>fbp</i>	F	AAACAGGTTGCGGCAGGTTA	TGCAGGCAAAACTGGTCCTC
	R	CCGAGCGAAGGATCGTAAGT	TGAAGATAACCGCTACGGCAC
<i>pgi</i>	F	ACTAACGGTCAGCACGCGTT	TACGCCTGTGGCTGGAAAAA
	R	TCAGAGAGCGGGTTATGGGT	TCCCCAAGCGGTCATTTTCT
<i>tktA</i>	F	AGTCCTGTGGCGTGATTTCC	CACCGTTGAAGCAGCGATTT
	R	AGATCAGCATGGAGCCGTG	TACGGGTCTGGAATGGCAAG
<i>talA</i>	F	CTCAAAATCGTACCCGGTCTG	AGATTGCATCGACCTGGGAA
	R	TACAAGTCCACCAGATGGCG	ATGTGCCTGATGCTGACCAA
<i>rpiA</i>	F	GATGGGCGGCACTTCAGTAT	TTAGGCGTCGGTACTGGGA
	R	GCCTTTCATTGTACCGAGCG	CGTTGTGCAGTGGCTTCAG
<i>rpe</i>	F	GCCAATGGTGCTGAAATCCT	TGACTTTGCCCGCTTAGGTG
	R	CAGCGAAATCAGGCACAATG	TCAGGTTTGGCACATAGTGGT

Continuación Tabla 5.			
Gen	Oligo	JM101	ACE
<i>gyrA</i>	F	CACCCAGGAAGATGTGGTCG	TGCGATTACTGACGGTGAACA
	R	ATTTACCTTTCCCGCCACGA	TGGCTGAACGACCCATTGAA

**Tabla 3.** Primers empleados para amplificar genes de ACE y de JM101. Forward (F), Reverse (R).

Las secuencias de oligonucleótidos se mandaron sintetizar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

### 5.7.2 Síntesis de cDNA.

Se utilizó un kit para sintetizar cDNA a partir del RNA de JM101 y ACE de manera independiente siguiendo las instrucciones del fabricante (RevertAid First Strand cDNA Synthesis, Thermo Fisher Scientific USA). Para cada reacción se usaron 5 ng de RNA de ACE o JM101 y una mezcla correspondiente de primers reverse a una concentración de 10 pmol/ $\mu$ L (Flores *et al.* 2005; Sabido *et al.* 2014).

### 5.7.3 Pruebas de amplificación.

Se hizo una prueba para determinar que los oligonucleótidos servían para el RT-qPCR. Para ello, se llevaron a cabo PCRs de punto final de todos los genes de estudio, y para ambas cepas. Se utilizó como plantilla ADN genómico de ACE o de JM101. Esto también se hizo con el objetivo de probar la especificidad de los primers. Las condiciones de las PCR fueron: 95 °C por 2 min, 30 ciclos: 95 °C por 45 s, 56 °C por 30 s, 72 °C por 1 min y 72 °C por 5 min.

Después de realizar las PCR se corrieron geles de electroforesis en gel de agarosa al 3 % y buffer TBE 0.5 X, se usó el marcador de peso molecular GeneRuler Low Range DNA Ladder. Cada reacción de PCR da un solo amplicón de un tamaño de 101 pb (Anexo C).

#### **5.7.4 Selección del gen de referencia para la cuantificación por RT-qPCR.**

La PCR cuantitativa con retrotranscripción (RT-qPCR) es una técnica empleada en biología molecular para llevar a cabo la cuantificación absoluta o relativa del mRNA presente en una muestra de RNA total. En esta técnica el mRNA se convierte en DNA complementario (cDNA) mediante la acción de una transcriptasa reversa. El cDNA servirá como plantilla para realizar una PCR cuantitativa (qPCR) con el objetivo de medir la expresión de uno o varios genes (Biorad 2017).

La RT-qPCR permite seguir la reacción de PCR en tiempo real mediante la utilización de un agente intercalante, en este caso se utilizó SYBR green que se une a los productos de amplificación en cada ciclo de la PCR y da una señal de fluorescencia que es proporcional al aumento del DNA (Biorad 2017; Thermo Fisher Scientific 2017).

Un parámetro importante en la utilización de la RT-qPCR es el ciclo de cuantificación (C<sub>q</sub>), que es el ciclo de la PCR donde la señal de fluorescencia es suficiente para llevar a cabo la cuantificación del DNA molde en la muestra.

El valor del C<sub>q</sub> depende de la cantidad de DNA plantilla al inicio de la reacción de amplificación. Si al inicio de la amplificación, hay una gran cantidad de DNA plantilla, se necesitaran menor número de ciclos de amplificación para que la señal de fluorescencia esté por encima de la línea base, en este caso el C<sub>q</sub> tendrá un valor pequeño. De modo contrario si la cantidad de DNA al inicio de la reacción de amplificación es pequeño, se requerirán mayor cantidad de ciclos de PCR para obtener una señal de fluorescencia importante, el C<sub>q</sub>

en este caso será un valor grande. Para la determinación del Cq se establece un valor arbitrario de fluorescencia (threshold o umbral) cuyo único requisito es que se encuentre en la fase exponencial de amplificación de todas las muestras (Biorad 2017).

Para seleccionar el gen de referencia se hicieron RT-qPCR de los 10 genes candidatos: *gyrA*, *gyrB*, *secA*, *dnaG*, *adk*, *gmk*, *ftsZ*, *recA*, *rpoB*, y *rpoC* (Rocha, Santos y Pacheco 2015) y se compararon los valores de Cq que se obtuvieron. Se seleccionó el gen que tuviera el Cq más parecido entre JM101 y a ACE, este gen fue *gyrA*.

Se hicieron pruebas para determinar la eficiencia de la reacción de RT-qPCR del gen *gyrA* haciendo ensayos tomando como plantilla cDNA en diluciones seriadas (1:10 y 1:5) partiendo de una concentración de 75 ng/μL y 5 ng/μL. Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C durante 10 min, 40 ciclos: 95 °C por 15 s y 60 °C por 60 s. Para la curva de disociación: 95 °C por 15 s, 60 °C durante 1 min y 95 °C por 15 s y 60 °C por 15 s.

Después se calculó el número de copias de DNA de la siguiente manera (Ecuación 6).

$$\text{Copias DNA} = \frac{6.022141 \times 10^{23} \text{ (copias/mol)} \times \text{cantidad DNA (g)}}{\text{longitud DNA (pb)} \times 660 \text{ (g/mol/pb)}}$$

**Ecuación 6.** Número de copias del DNA.

Para calcular la eficiencia de la reacción se graficó el Cq obtenido de la RT-qPCR contra el número de copias de DNA. Se ajustaron los datos a un modelo lineal para obtener la pendiente y finalmente calcular la eficiencia mediante la siguiente ecuación (Bustin *et al.* 2009).

$$E = 10^{(-1/m)} - 1$$

**Ecuación 7.** Eficiencia de la reacción de PCR.

Donde:

E es la eficiencia de la reacción de PCR.

m es la pendiente.

### **5.7.5 Análisis de expresión relativa por RT-qPCR.**

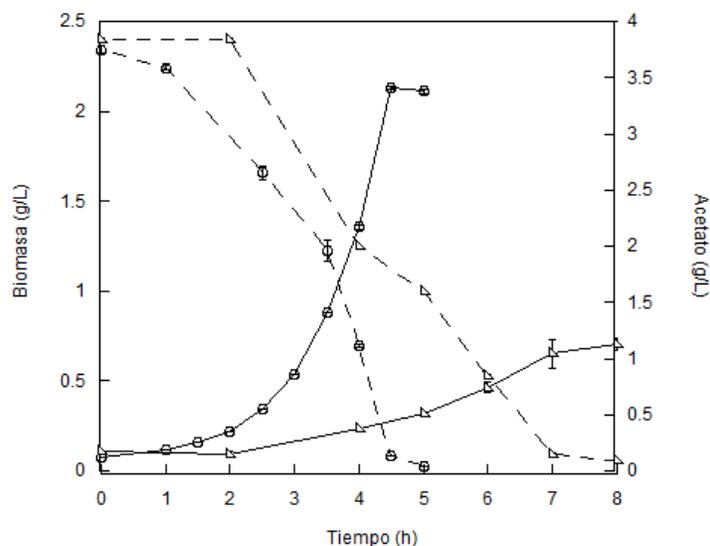
Para el análisis de expresión de genes por RT-qPCR se usó un kit SYBR Green PCR master mix (Perkin-Elmer/Applied Biosystems), se utilizó como plantilla el cDNA que se sintetizó previamente para cada cepa. En las reacciones se utilizó 5 ng de cDNA plantilla y 10 pmol/ $\mu$ L de primers específicos en un volumen de reacción de 12  $\mu$ L. En todos los casos se incluyó una reacción sin plantilla por gen como control negativo. El ensayo se llevó a cabo en un termociclador ABI 7500 Real Time PCR System (PerkinElmer/Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 10 min a 95 °C y un ciclo de 2 pasos a 95 °C por 15 s y 60 °C por 60 s por un total de 40 ciclos (Flores *et al.* 2005; Sabido *et al.* 2014). Como control interno se usó el gen *gyrA* para normalizar los datos. Se escogió *gyrA* como gen de referencia porque se detectó el mismo nivel de expresión en JM101 y ACE en las condiciones en las en las cuales las bacterias fueron cultivadas, permitiendo así llevar a cabo el análisis relativo de la expresión de genes del catabolismo de acetato entre 2 bacterias de distinto género. Se usó el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  como técnica de cuantificación para analizar los datos (Livak and Schmittgen 2001). Todos los experimentos se hicieron por duplicado para cada gen a partir del RNA de dos cultivos independientes por cepa. Se obtuvieron valores de  $C_q$  similares entre las réplicas biológicas de cada cepa, con una desviación estándar <0.3 (Sabido *et al.* 2014).

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 6.1 Caracterización fisiológica de JM101 y ACE utilizando acetato como única fuente de carbono.

Con la finalidad de conocer las diferencias a nivel fisiológico entre JM101 y ACE al utilizar acetato como única fuente de carbono se hicieron cinéticas de crecimiento en medio mineral M9 enriquecido con 4 g/L de acetato. Esto se hizo mediante la estimación de parámetros de crecimiento como la  $\mu$ ,  $Y_{x/s}$ ,  $q_s$ ,  $q_{CO_2}$ ,  $q_{O_2}$  y  $RQ$ . Estos parámetros son muy importantes porque nos dan una idea sobre lo que ocurre en el metabolismo al utilizar una fuente de carbono particular. En este caso nos interesó conocer las diferencias del catabolismo de acetato entre JM101 y ACE.

Se siguió la generación de biomasa a lo largo del tiempo, así como también la disminución de la concentración de acetato a lo largo de la cinética. Con los datos obtenidos se generó la Gráfica 3 donde el eje “x” representa el tiempo del cultivo, el eje “y” primario corresponde a la concentración de biomasa y el eje “y” secundario se refiere a la concentración de acetato.



**Gráfica 3.** Cinéticas de producción de biomasa (líneas continuas) y concentración de acetato (líneas punteadas) de JM101 (△) y ACE (⊖). Las cinéticas se llevaron a cabo en modo lote y se utilizó un reactor instrumentado de 1 L, con un volumen de trabajo de 600 mL. El medio de cultivo que se utilizó fue medio

mineral M9 con 4 g/L de acetato como única fuente de carbono. Se mantuvo una TOD >20 % y un flujo de aire de 1 vvm.

La  $\mu$  nos dice que tan rápido se reproduce un microorganismo en función del tiempo. Al utilizar acetato como única fuente de carbono, la  $\mu$  de JM101 tuvo un valor de  $0.33 \pm 0.09$  mientras que la  $\mu$  ACE fue de  $0.93 \pm 0.02$  (Tabla 4).

Por otro lado, el rendimiento  $Y_{x/s}$  es un parámetro que representa la cantidad de biomasa que se genera a lo largo del cultivo respecto a la cantidad de sustrato consumido. Para este caso, el  $Y_{x/s}$  de JM101 fue de  $0.29 \pm 0.05$  y el  $Y_{x/s}$  de ACE fue de  $0.58 \pm 0.02$  (Tabla 4).

Otro parámetro importante es la tasa de consumo de sustrato en función de la concentración de biomasa, el cual se denomina  $q_s$ . JM101 tuvo una  $q_s$  con un valor de  $1.11 \pm 0.14$  mientras que ACE tuvo una  $q_s$  con un valor de  $1.60 \pm 0.10$  (Tabla 4).

Cepa	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{x/s}$ (gB/gAce)	Biomasa final (gB/L)	$q_s$ (gS/gB*h)
ACE	$0.93 \pm 0.02$	$0.58 \pm 0.02$	$2.11 \pm 0.07$	$1.60 \pm 0.10$
JM101	$0.33 \pm 0.09$	$0.29 \pm 0.05$	$0.88 \pm 0.06$	$1.11 \pm 0.14$

**Tabla 4.** Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), rendimiento biomasa-sustrato ( $Y_{x/s}$ ) y velocidad específica de consumo de sustrato ( $q_s$ ) de JM101 y ACE en reactor con medio mínimo M9 y 4 g/L de acetato.

Al analizar los datos podemos decir que ACE creció 3 veces más rápido que JM101 y produjo aproximadamente el doble de biomasa al final del cultivo con 4 g/L de acetato como fuente de carbono (Tabla 4), así mismo ACE tuvo una  $q_s$  superior que JM101 con un valor 44 % más elevado. Acorde con estos resultados ACE consumió la totalidad del acetato en cuatro horas y media del cultivo, mientras que JM101 lo hace hasta la hora 7 (Gráfica 3). Con todos estos resultados en conjunto se puede establecer que la cepa ACE presenta un catabolismo de acetato más eficiente que el de JM101.

Hay reportes en la bibliografía donde JM101 alcanzó un valor de  $\mu$  de  $0.71 \text{ h}^{-1}$  al utilizar glucosa como única fuente de carbono (Flores *et al.* 2002; Martínez *et al.* 2012). Esto es interesante porque ACE alcanzó un valor de  $\mu$  superior utilizando acetato como única fuente de carbono, sustrato que se considera una fuente de carbono y energía pobre en comparación con la glucosa.

Cabe mencionar que el valor de  $Y_{x/s}$  de ACE es alto en comparación con el valor de  $Y_{x/s}$  de otras bacterias del género *Acinetobacter* como por ejemplo, ADP1 que alcanzó un  $Y_{x/s}$  de  $0.18 \pm 0.01$  en cultivos en lote en medio mineral M9 con 5.5 g/L de acetato como única fuente de carbono (Sigala *et al.* 2017), lo cual hace aún más interesante a ACE como cepa de estudio. También se calcularon parámetros respiratorios como la  $q_{O_2}$ ,  $q_{CO_2}$  y el  $RQ$ , encontrando diferencias mínimas entre ambas bacterias (Tabla 5).

Cepa	$q_{O_2}$ (mmolO <sub>2</sub> /gB*h)	$q_{CO_2}$ (mmolCO <sub>2</sub> /gB*h)	RQ (mmolCO <sub>2</sub> /mmolO <sub>2</sub> )
ACE	$14.06 \pm 1.19$	$12.07 \pm 0.55$	$0.86 \pm 0.03$
JM101	$15.38 \pm 1.09$	$14.10 \pm 1.21$	$0.92 \pm 0.01$

**Tabla 5.** Velocidad específica de consumo de oxígeno ( $q_{O_2}$ ), velocidad específica de producción de dióxido de carbono ( $q_{CO_2}$ ) y coeficiente respiratorio ( $RQ$ ) de JM101 y ACE en reactor con medio mínimo M9 y 4 g/L de acetato.

El valor de  $q_{O_2}$  de JM101 fue de  $15.38 \pm 1.09$  mientras que el valor de  $q_{O_2}$  de ACE fue de  $14.06 \pm 1.19$  (Tabla 5), ambas bacterias requieren aproximadamente la misma cantidad de oxígeno para la oxidación del acetato. Se han reportado cultivos de *E. coli* utilizando acetato como fuente de carbono con un valor de  $q_{O_2}$  de  $18 \pm 2.9$  (Andersent y Von-Meyenburg 1980) siendo cercano al  $q_{O_2}$  calculado en este trabajo.

Por otra parte, el valor de  $q_{CO_2}$  de JM101 fue de  $14.10 \pm 1.21$  y el de ACE fue de  $12.07 \pm 0.55$  (Tabla 5), esto representa una disminución del valor de  $q_{CO_2}$  de ACE del 14.4 % respecto a JM101.

La  $q_{CO_2}$  en ACE podría estar sugiriendo que en esta bacteria la ruta del glioxilato está más activa respecto a JM101, puesto que la ruta del glioxilato evade los pasos de descarboxilación en forma de  $CO_2$  que de forma natural ocurre en el CATC.

El  $RQ$  teórico para la oxidación completa del acetato hasta  $CO_2$  tiene un valor de 1. El valor de  $RQ$  experimental para JM101 fue de  $0.92 \pm 0.01$  mientras que para la cepa ACE se estimó un  $RQ$  de  $0.86 \pm 0.03$  (Tabla 5). Esto indica que ambas bacterias consumen más  $O_2$  del  $CO_2$  que producen.

## 6.2 Evaluación de la concentración y calidad del RNA.

Uno de los puntos críticos en trabajos de expresión de genes por RT-qPCR es la concentración y la calidad del RNA. El término de calidad de RNA se define como la pureza e integridad de RNA, si el RNA es de mala calidad hay interferencia en la reacción de RT-qPCR.

Una vez que se extrajo el RNA se midió la concentración por espectrofotometría y se construyó la siguiente tabla (Tabla 6), donde podemos ver que se obtuvieron concentraciones de RNA suficientes para proseguir con los siguientes experimentos, siendo cercanas a 300 ng/ $\mu$ L.

Cepa	Concentración [ng/ $\mu$ L]
ACE	$349.8 \pm 17.9$
JM101	$338.1 \pm 56.2$

**Tabla 6.** Concentración de RNA de ACE y JM101. Valores de réplicas biológicas.

Para asegurarnos de que el RNA estuviera libre de DNA se realizó una digestión enzimática con DNAsas y posteriormente se midió la concentración de RNA y la relación de absorbancia 260/280 y 260/230 (Tabla 7).

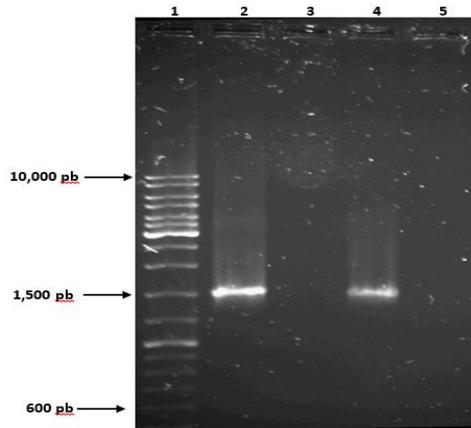
Cepa	[ng/ $\mu$ L]	260/280	260/230
ACE	242 $\pm$ 4.1	2.06 $\pm$ 0.01	1.715 $\pm$ 0.13
JM101	245.2 $\pm$ 30	2.075 $\pm$ 0.00	1.625 $\pm$ 0.15

**Tabla 7.** Concentración y pureza del RNA después de la digestión con DNAsa.

A una longitud de onda de 230 nm hay absorción de contaminantes como sales y fenol; los ácidos nucleicos tienen una absorción máxima a 260 nm y las proteínas a 280 nm. Las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 se usan como indicadores de la pureza del RNA; relaciones de 1.8 a 2 indican que el RNA está libre de contaminantes (Taylor *et al.* 2010; Becker *et al.* 2010).

Después de la digestión del RNA con DNAsa, la relación de absorbancia 260/280 es cercana a 2 y la relación de absorbancia 260/230 aproximadamente 1.8 (Tabla 7), esto indicó que la pureza del RNA obtenido fue adecuada para seguir con los experimentos de expresión de genes por RT-qPCR.

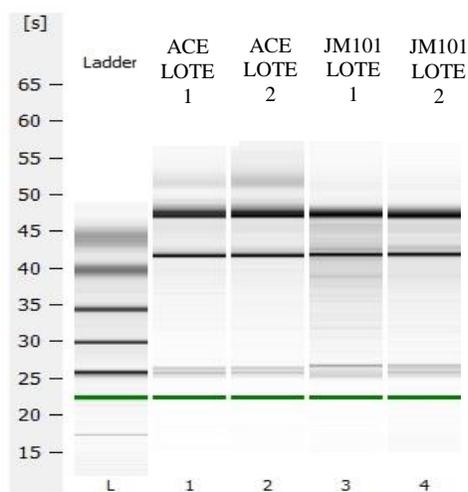
Posteriormente se realizó una amplificación del gen 16S ribosomal de ACE y JM101 con el objetivo de corroborar la ausencia de DNA en las muestras de RNA. Se tomó como plantilla el RNA libre de DNA y como controles positivos se utilizó como plantilla DNA genómico (Figura 6)



**Figura 6.** Comprobación de la pureza de RNA sin contaminación por DNA. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TBE 0.5 X. Donde 1 es Marcador de peso molecular GeneRuler DNA Ladder Mix- Thermo Fisher Scientific USA, 2 es el PCR del gen 16 S ribosomal en JM101 tomando como templado DNA genómico, 3 es el PCR del gen 16 S ribosomal tomando como templado el RNA de JM101 libre de DNA, 4 es el PCR del gen 16 S ribosomal de ACE tomando como templado DNA genómico y 5 es el PCR del gen 16 S ribosomal de ACE tomando como templado RNA libre de ADN. La electroforesis se corrió a 100 V en buffer TBE 0.5 X.

El RNA de JM101 y de ACE estuvo libre de ADN puesto que no amplificó el gen que codifica al 16S ribosomal (Carril 3 y 5 respectivamente) mientras que los controles positivos si amplificaron la secuencia del gen 16S ribosomal (Carril 2 y 4) (Figura 6).

Finalmente para estimar la integridad del RNA se llevó a cabo una electroforesis capilar. A continuación se presenta el gel virtual que generó el bioanalizador (Figura 7).



**Figura 7.** Gel virtual de las muestras de RNA. Donde las muestras 1 y 2 corresponden al lote 1 y 2 de los cultivos de ACE, mientras que los carriles 3 y 4 corresponden a las muestras de RNA del lote 1 y 2 de JM101.

El bioanalizador generó un electroferograma y un gel virtual. El equipo calcula una relación 23S/16S (subunidades ribosomales) al evaluar los picos y las bandas obtenidas. Para simplificar el ensayo el software calcula un valor numérico denominado número de integridad del RNA (RIN). Los valores del RIN pueden tomar valores del 1 al 10, donde 10 representa RNA intacto (Taylor *et al.* 2010).

El lote 1 de ACE obtuvo un RIN de 8.8 mientras que el lote 2 tuvo 8.9. Por otro lado, el lote 1 de JM101 obtuvo un RIN de 7.2 y el lote 2 de 8 (Figura 7). Los valores de RIN que obtuvieron los RNA son mayores a 5 que se interpretan como RNA de buena calidad, si el RIN está por arriba de 8 el RNA se considera de perfecta calidad para ensayos de RT-qPCR (Derveaux, Vandesompele y Hellemans 2010).

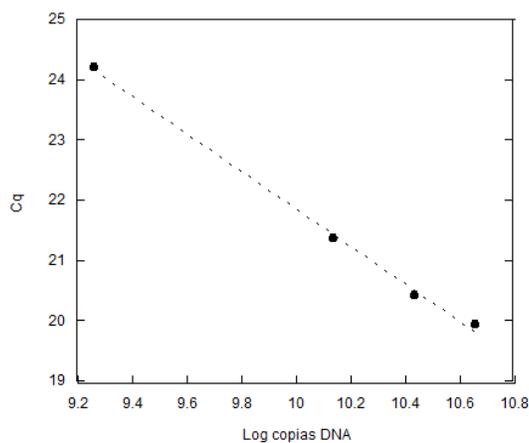
### **6.3 Elección del gen de referencia.**

El Cq del gen *gyrA* de JM101 tuvo un valor de  $19.5 \pm 0.6$ , mientras que el Cq del gen *gyrA* de ACE obtuvo un Cq de  $19.1 \pm 0.4$ , lo que indica que bajo las condiciones experimentales establecidas, la diferencia de Cq del gen *gyrA* entre ACE y JM101 es menor a 1 ciclo, esto quiere decir que la cantidad de cDNA al inicio de la reacción de RT-qPCR es la misma tanto en la cepa JM101 como en ACE, estableciendo así que el nivel de expresión del gen *gyrA* es el mismo en ambas bacterias. Este gen codifica a la enzima DNA girasa A que está implicada en el proceso de replicación del DNA.

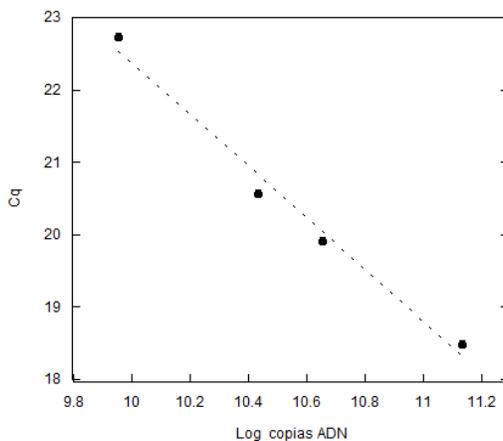
### 6.3.1 Pruebas de eficiencia de la RT-qPCR del gen *gyrA* de JM101 y ACE.

La precisión de ensayos de RT-qPCR se correlaciona con la eficiencia de la reacción de PCR, la cual es importante cuando se realiza una cuantificación relativa de transcritos haciendo uso de genes de referencia (Bustin *et al.* 2009).

Para calcular la eficiencia de la reacción se hicieron diluciones seriadas del cDNA para llevar a cabo RT-qPCR del gen *gyrA* para cada cepa. Con los datos obtenidos se graficó el Cq del gen *gyrA* contra el Log del número de copias del DNA y después se ajustaron los datos a un modelo lineal (Gráfica 4 y 5).



**Gráfica 4.** Curva patrón del gen *gyrA* de la cepa JM101



**Gráfica 5.** Curva patrón del gen *gyrA* de la cepa ACE.

Del modelo lineal se utilizó el valor de la pendiente para calcular la eficiencia de la reacción de la RT-qPCR del gen *gyrA* de JM101 y ACE. Se obtuvieron pendientes entre -3.11 y -3.6 con una  $R^2 > 0.98$  que se consideran aceptables (Tabla 8). Para que un ensayo sea óptimo, se deben obtener curvas estándar lineales con una  $R^2 > 0.98$  con una eficiencia de amplificación alta de 90 a 105 % (Taylor *et al.* 2010), en los ensayos se obtuvieron valores de eficiencia del 90 al 100 % (Tabla 8).

Curva	Pendiente	Eficiencia %	R <sup>2</sup>
JM101	-3.11	100	0.997
ACE	-3.58	90	0.985

**Tabla 8.** Eficiencia de la reacción de amplificación del gen *gyrA* en JM101 y ACE, pendiente y coeficiente de correlación obtenido.

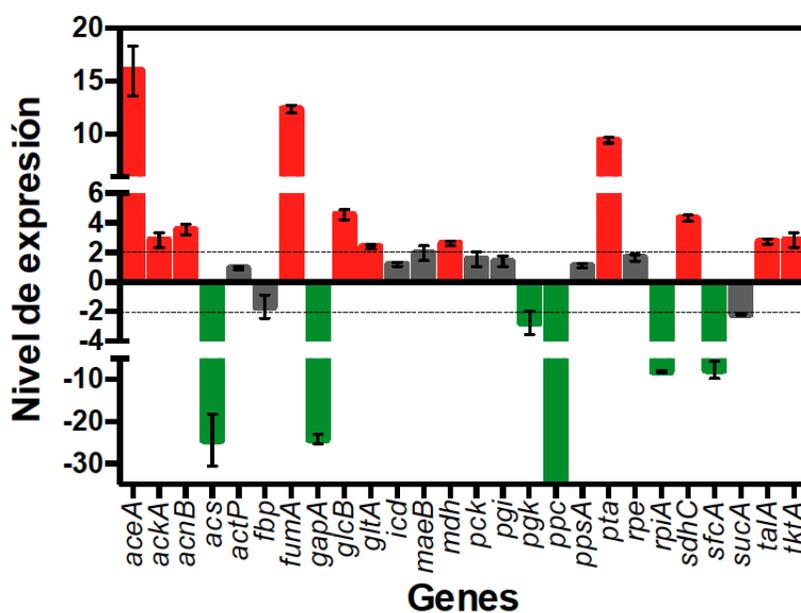
Con los resultados anteriores podemos decir que los ensayos de RT-qPCR del gen *gyrA* fueron óptimos y se pudo utilizar como gen de referencia para el análisis de expresión de genes relativo entre JM101 y ACE.

#### **6.4 Análisis de expresión de genes del metabolismo de acetato entre JM101 y ACE.**

Se llevaron a cabo RT-qPCR de genes involucrados en el catabolismo de acetato en JM101 y ACE con el objetivo de conocer las diferencias en el nivel de expresión de genes relativo entre ambas bacterias.

Como método de cuantificación se utilizó el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak y Schmittgen 2001) y como gen de referencia se utilizó el gen *gyrA*. Los datos se normalizaron a un valor de uno, es decir que el nivel de expresión de los genes del catabolismo de acetato en JM101 siempre es uno.

Se construyó una gráfica de barras con los niveles de expresión de genes de ACE, donde las barras en rojo representan genes que se sobreexpresaron en esta bacteria respecto a JM101 mientras que las barras en color verde corresponden a los genes que se subexpresan en ACE y las barras en gris son genes donde no hubo cambio de expresión significativo entre JM101 y ACE. Para que el cambio en el nivel de expresión de genes entre JM101 y ACE sea significativo este debe ser mayor a dos o menor a menos dos, este límite se representó mediante una línea punteada (Gráfica 6).



**Gráfica 6.** Niveles de expresión relativos de la cepa ACE respecto a los genes de la cepa de referencia JM101 y tomando como control interno el gen *gyrA*, normalizando a uno el nivel de expresión de los genes de JM101. Las barras en rojo representan sobreexpresión de genes, las barras en verde indican subexpresión, mientras que las barras grises indican que no hubo un cambio significativo en la expresión de los genes de JM101 y ACE. La línea punteada representa el límite del cambio significativo en la expresión de genes de ACE respecto a la cepa de referencia, correspondiendo a un valor de  $\pm 2$  veces.

También se realizó un esquema del metabolismo de acetato con la finalidad de poner en contexto los resultados presentados en la gráfica 6. Este esquema inicia en la introducción del acetato al interior de la célula para que posteriormente este metabolito se transforme en acetil-CoA y sea metabolizado a través del CATC, RG, rutas anapleróticas, gluconeogénesis,



(R5P), eritrosa-4-fosfato (E4P), pseudoheptulosa-7-fosfato (S7P). Enzimas que llevan a cabo las reacciones entre metabolitos y entre paréntesis el gen que codifica a estas proteínas: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*gapA*), fosfoglicerato cinasa (*pgk*), fructosa-1,6-bisfosfatasa (*fbp*), ribosa 5-fosfato isomerasa (*rpiA*), ribulosa-fosfato 3-epimerasa (*rpe*), transcetolasa (*tktA*), transaldolasa (*talA*), acetato cinasa (*ackA*), acetil-coenzimaA-sintetasa (*acsA*), acetato permeasa (*pta*), citrato sintasa (*gltA*), aconitato hidratasa (*acnB*), Isocitrato liasa (*aceA*), malato sintasa (*glcB*), succinato deshidrogenasa (*sdhC*), Fumarato hidratasa (*fumA*), malato deshidrogenasa (*mdh*), malato deshidrogenasa (*sfcA*), malato deshidrogenasa (*maeB*), fosfoenolpiruvato carboxicinasa (*pck*), fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*), Isocitrato deshidrogenasa (*icd*), succinil-coenzimaA-sintetasa (*sucA*).

#### 6.4.1 Transporte de acetato.

El gen *actP* que codifica a la enzima acetato permeasa, y que está involucrada en el transporte de acetato al interior de la célula en *E. coli* (Gimenez *et al.* 2003), no tiene un nivel de expresión diferente entre JM101 y ACE, el nivel de expresión de este gen en ACE fue de  $0.9 \pm 0.1$  veces respecto a la cepa de referencia (Gráfica 6). Por lo tanto, las diferencias en el catabolismo de acetato entre JM101 y ACE parece ser que no se deben a una cuestión de transporte mediado por esta proteína

Como se mencionó anteriormente, ACE tiene un  $q_s$  mayor a la de JM101 (Tabla 7), esto nos hace pensar que al igual que en JM101, en ACE podría existir otra proteína involucrada en el transporte de acetato, aunque por el momento no hay evidencia de esto. De hecho se sabe que ACE no tiene el gen *yaaH*, pero siempre cabe la posibilidad de que el acetato permea libremente a través de la célula.

#### 6.4.2 Ruta Pta-AckA y Acs.

Las enzimas Pta y AckA catalizan la transformación de acetato a acetil-CoA, estas proteínas se encuentran codificadas por los genes *pta-ackA* y se sobreexpresaron  $2.8 \pm 0.4$  y  $9.4 \pm 0.2$  veces respectivamente en ACE en comparación con JM101 (Gráfica 6, Figura 8).

Otra vía alternativa en bacterias para generar acetil-CoA a partir de acetato está mediada por la actividad de la enzima Acs codificada por el gen *acs*. De modo contrario a los genes *ackA-*

*pta*, *acs* se subexpresó  $-24.4 \pm 4.4$  veces en comparación con la cepa de referencia (Gráfica 6, Figura 8).

Estas dos rutas de asimilación de acetato *pta-ackA* y *acs* son de suma importancia en el metabolismo de acetato, pero también desde el punto de vista de regulación enzimática. Esto se debe a que las formas metabólicas activas del acetato, es decir, el acetil-CoA y el acetil-F son donadores de grupos acilo y grupos fosfato para la acetilación y fosforilación de proteínas respectivamente (Bernal, Castaño-Cerezo y Cánovas 2016; Gallego 2018)

De manera particular en bacterias como *E. coli* el mecanismo principal para la acetilación de proteínas es mediante compuestos acilados, lo cual podría afectar la actividad enzimática, teniendo un efecto sobre la regulación global del metabolismo (Bernal, Castaño-Cerezo y Cánovas 2016; Gallego 2018)

Tanto el acetil-CoA como el acetil-F pueden acumularse en la célula. Probablemente en ACE exista una mayor acumulación de estos metabolitos en comparación con JM101 debido a la sobreexpresión de los genes *pta-ackA*. Esto podría tener un efecto sobre el metabolismo de acetato y sobre la regulación enzimática de esta bacteria. Además, se ha observado que una ruta *pta-ackA* más activa beneficia el crecimiento celular (Dittrich, Bennett y San 2005).

En *E. coli*, la función de *acs* es principalmente catabólica, su expresión está ligada a *ackA* y *pta*, así como a la ruta del glioxilato. La enzima Acs está regulada por acetilación y desacetilación enzimática por medio de PatZ y CobB respectivamente.

De acuerdo a los niveles de expresión, obtenidos en este estudio, parece ser que de modo contrario a JM101 (Dittrich, Bennett y San 2005; Enjalbert *et al.* 2017; Oh *et al.* 2002), ACE utiliza la ruta *pta-ackA* para catabolizar acetato sobre la ruta *acs* (Gráfica 6).

### 6.4.3 Ciclo de los ácidos tricarboxílicos y ruta del glioxilato.

Los genes que codifican para las primeras enzimas del CATC, *gltA* y *acnB* (citrato sintasa y aconitato hidratasa), se encuentran sobreexpresados en ACE en comparación con JM101, el primer gen se expresó  $2.4 \pm 0.1$  veces mientras que el segundo  $3.6 \pm 0.3$  veces (Gráfica 6, Figura 8). La sobreexpresión de estos genes en ACE podría ser relevante en el catabolismo de acetato de esta bacteria tomando en cuenta que cuando *E. coli* crece en acetato como fuente de carbono se induce la síntesis de GltA representando un paso limitante de la gluconeogénesis (Walsh y Koshland 1985). Por otro lado, se ha reportado que el gen *acnB* se sobreexpresó en cultivos de *E. coli* al utilizar fuentes de carbono gluconeogénicas como el glicerol y el acetato en comparación con su cultivo en glucosa (Martínez *et al.* 2012; Cunningham, Gruer y Guest 1997).

Un punto clave del metabolismo gluconeogénico en bacterias es la partición de carbono entre la RG y la parte baja del CATC a partir de isocitrato. Las reacciones catalizadas por la isocitrato deshidrogenasa (Icd) y la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa (SucAB) generan poder reductor en forma de NADPH y NADH pero con la consecuente pérdida de CO<sub>2</sub>. En contraste, la RG mediada por las enzimas isocitrato liasa (AceA) y las malato sintasas (GlcB) generan succinato y malato con el fin de subsecuentemente incorporar carbono a la síntesis de biomasa.

No hay cambios significativos en la expresión del gen *icd* entre JM101 y ACE ( $1.2 \pm 0.1$ ), sin embargo este punto es importante en la regulación del flujo de carbono a través del CATC y la RG.

El caso en particular de la Icd es interesante, en *E. coli* la afinidad de esta enzima por el isocitrato es mayor que la de AceA (Hoyt, Johnson y Reeves 1991). Sin embargo, cuando *E.*

*coli* crece en acetato, la afinidad de la Icd hacia el isocitrato disminuye por efecto de la fosforilación de la enzima mediada por la proteína reguladora AceK y el flujo de carbono se dirige preferencialmente hacia la RG (El-Mansi *et al.* 2006). Las cepas de *Acinetobacter calcoaceticus* y ADP1 poseen dos distintas Icd de diferente tamaño. Una es similar en tamaño a la de *E. coli* denominada Icd-1 de 418 aminoácidos y 436 aminoácidos y la segunda enzima de mayor tamaño es la Icd-2 de 745 aminoácidos y 743 aminoácidos para *A. calcoaceticus* y ADP1, respectivamente. En contraste, ACE tiene una sola Icd de 745 aminoácidos que es homóloga a la Icd-2 de *A. calcoaceticus* con un 83% de identidad.

Se ha reportado que cuando *A. calcoaceticus* crece en acetato, las actividades de la Icd-2 y de AceA incrementan simultáneamente, mientras que la actividad de la Icd-1 disminuye (Reeves, O'Neil y Weitzman 1986; Hoyt y Reeves 1992). De manera interesante, el glioxalato regula alostéricamente la actividad de Icd-2 pero no de la Icd-1 en *A. calcoaceticus* (Reeves, O'Neil y Weitzman 1986). Esta regulación podría explicar el incremento concertado en las actividades de la Icd-2 y de AceA en cepas de *Acinetobacter* pero no en *E. coli*, lo cual podría ser un aspecto metabólico importante para explicar las diferencias en el crecimiento en sustratos gluconeogénicos entre ambos géneros bacterianos. Mediante análisis de balance de flujos (FBA, por sus siglas en inglés), recientemente se obtuvieron flujos de carbono mayores simultáneamente tanto para la parte baja del CATC y RG en *A. schindleri* ACE en comparación con JM101 (Sigala *et al.* 2019, Anexo A). Finalmente, dado que ACE no cuenta con los genes de la parte oxidativa de la vía de las pentosas fosfato (*zwf* y *gnd*), la principal fuente de NADPH en esta bacteria deberá ser generado de la actividad de la Icd-2.

Por otra parte, la expresión del operón *sucABCD* de la parte baja del CATC en ACE ( $-2.2 \pm 0.1$ ) no presentó cambios significativos en comparación con JM101 (Gráfica 6 y Figura 8).

Los genes de este operón codifican para los complejos de enzimas  $\alpha$ -cetoglutarato descarboxilasa y succinil-CoA sintetasa. Lo anterior es acorde a los resultados de los parámetros respiratorios reportados en secciones anteriores, donde no hay diferencias significativas entre JM101 y ACE.

Los valores de expresión de genes relativo parecen indicar que la ruta del glioxilato está más activa en ACE que en JM101 ya que los genes *aceA*, *glcB*, *sdhC*, *fumA* y *mdh* que codifican para las enzimas isocitrato liasa, malato sintasa, succinato deshidrogenasa, fumarato hidratasa y malato deshidrogenasa, se sobreexpresan en ACE con valores de  $15.9 \pm 1.6$ ,  $4.6 \pm 0.3$ ,  $4.3 \pm 0.2$ ,  $12.4 \pm 0.3$  y  $2.6 \pm 0.1$  respectivamente (Figura 8 y Gráfica 6).

Como se ha mencionado anteriormente, la RG es necesaria para el crecimiento de *E. coli* en acetato ya que los genes *aceA* y *glcB* son esenciales para el consumo de este sustrato (Kornberg *et al.* 1966; Valgepea *et al.* 2010; Oh *et al.* 2002). Cuando se inactivó el gen *aceA* en *E. coli* que codifica a la enzima isocitrato liasa, este microorganismos perdió su capacidad de crecer en acetato (Kornberg *et al.* 1966). Este gen tiene el nivel de sobreexpresión más alto en la cepa ACE en comparación con JM101, con un valor de  $15.9 \pm 1.6$  veces (Gráfica 6).

Como se mencionó anteriormente, en *E. coli* Icd es regulada mediante fosforilación permitiendo así el flujo a través de la RG, sin embargo, podría ser que la regulación de la enzima Icd en ACE sea diferente. Es posible que en ACE la expresión del gen *aceA* deba ser mayor para balancear el flujo de carbono entre la ruta del glioxilato y el TCA.

#### 6.4.4 Rutas anapleróticas y gluconeogénesis.

Los genes *maeB* y *sfcA* que codifican para las enzimas málicas dependientes de NADP<sup>+</sup> y NAD<sup>+</sup>, respectivamente, descarboxilan el malato en piruvato y son una conexión entre el CATC y la gluconeogénesis (Bologna, Andreo y Drincovich 2007). Durante el crecimiento de *E. coli* en acetato, la expresión de los genes *maeB* y *sfcA* se induce (Oh *et al.* 2002). En el presente trabajo, el gen *maeB* se expresa 1.9 veces y el gen *sfcA* se subexpresa -7.7 veces en ACE respecto a JM101 (Gráfica 6 y Figura 8). Por tanto, la cepa ACE expresa el gen *maeB* preferencialmente sobre *sfcA*. Como se ha mencionado, debido a que ACE carece de la fase oxidativa de la vía de las pentosas fosfato donde se genera poder reductor en forma de NADPH, la actividad de MaeB junto con la de la Icd son las fuentes principales de poder reductor en esta bacteria.

El gen *ppc* codifica para la enzima Ppc que genera OAA a partir de PEP y está activa bajo condiciones glucolíticas. Este gen es el que presenta un nivel de expresión más bajo (0) en ACE en comparación con JM101, indicando que en esta cepa se activa la expresión de *pck*, como era de esperarse debido a que el catabolismo de acetato es gluconeogénico. De manera interesante, cuando JM101 con una mutación en el gen *ppc* se cultivó en glicerol como fuente de carbono, esta bacteria no fue capaz de crecer (Martínez *et al.* 2012), lo cual evidencia un posible rol de la actividad Pck/Ppc incluso en condiciones gluconeogénicas, situación metabólica poco probable en ACE.

Por otra parte, la enzima fosfoenolpiruvato carboxinasas codificada por el gen *pck* y que cataliza la reacción inversa es decir, la generación de PEP tomando como sustrato el oxalocetato, se expresó  $1.6 \pm 0.3$  veces respecto a la cepa JM101 (Gráfica 6). El gen *pck* es responsable del flujo de carbono del CATC a las vías gluconeogénicas en cultivos con acetato

como fuente de carbono (Oh *et al.* 2002; Martínez *et al.* 2012; Kwon, Lee y Kim 2008); de hecho, este gen se sobreexpresa en cultivos de *E. coli* en acetato como fuente de carbono. De manera interesante, cuando se sobreexpresa el gen *pck* en *E. coli* y se cultiva en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono, el rendimiento biomasa sustrato es superior respecto a la cepa silvestre (Kwon, Lee y Kim 2008). Un flujo de carbono mayor a través de Pck pudiera estar asociado con el  $Y_{x/s}$  superior en ACE respecto a JM101, situación simulada en el modelo recientemente descrito (Sigala *et al.* 2019, Anexo A) en el que incluso se predicen bajos flujos de carbono de las enzimas málicas y donde el piruvato se destina exclusivamente a la síntesis de biomasa pues el flujo de Pps es cero.

Los genes *pck*, *sfcA* y *maeB* son esenciales para el crecimiento en intermediarios del CATC o en sustratos que entran al MCC a través de acetyl-CoA como es el caso de acetato (Bologna, Andreo y Drincovich 2007).

#### **6.4.5 Glucólisis y vía de las pentosas fosfato.**

ACE no tiene los genes de la parte oxidativa de la vía de las pentosas fosfato, *zwf* y *gnd*, que codifican para las enzimas glucosa-6-deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa respectivamente (Sigala *et al.* 2017). Por tal motivo, la glucosa-6-fosfato que se genera gluconeogénicamente se debe destinar básicamente a la formación de biomasa. Por otro lado, la formación de ribosa-5-fosfato y eritrosa-4-fosfato, que igualmente se requieren para la síntesis celular, se deben obtener a partir de las triosas de la vía glucolítica. Lo anterior está en concordancia con la sobreexpresión de los genes *tktA* y *talA*, se sobreexpresan  $2.9 \pm 0.3$  y  $2.7 \pm 0.1$  veces que en JM101 respectivamente (Gráfica 6 y Figura 8). En el modelo de flujos metabólicos mencionado anteriormente (Sigala *et al.* 2019, Anexo A), se predice un flujo de

gliceraldehído-3-P hacia ribosa-5-fosfato y eritrosa-4-fosfato en sentido inverso al que ocurre naturalmente en *E. coli*. Las enzimas trascetolasa y transaldolasa están codificadas por los genes *tktA* y *talA* y forman parte de la fase no oxidativa de las pentosas fosfato. La primera enzima genera ribosa-5-fosfato y xilulosa-5-fosfato a partir de gliceraldehído-3-fosfato y pseudoheptulosa-7-fosfato. La segunda enzima produce gliceraldehído-3-fosfato y pseudoheptulosa-7-fosfato tomando como sustrato eritrosa-4-fosfato y fructosa 6-fosfato F6P. Otro aspecto que apoya lo anterior es el hecho de que el gen *rpiA* codifica a la enzima ribosa-5-fosfato isomerasa, que cataliza la producción de ribosa-5-fosfato utilizando como sustrato la ribulosa-5-fosfato, y que en la cepa ACE este gen se subexpresa  $-8.1 \pm 0.2$  veces respecto a la cepa de referencia JM101 (Gráfica 6 y Figura 8). La sobreexpresión de los genes *talA*, *tktA* apoyaría el supuesto de que en la cepa de ACE habría una mayor disponibilidad de precursores metabólicos como la ribosa-5-fosfato importante para la síntesis de nucleótidos, y de eritrosa-4-fosfato que es precursor de aminoácidos aromáticos involucrados en la síntesis de proteínas, lo que podría contribuir a la diferencia del  $Y_{x/s}$  entre ACE y JM101. Como se ha mencionado, ACE carece de los genes *pykAF* y *pfkAB* que codifican para las piruvato cinasas y las fosfofructo cinasas, respectivamente (Sigala *et al.* 2017). Las correspondientes enzimas gluconeogénicas en estos puntos metabólicos son la PpsA y la Fbp (fosfoenol piruvato sintasa y la fructosa bifosfatasa). La expresión de los genes *ppsA* y *fbp* no cambia entre las cepas ACE y JM101 en acetato (Gráfica 6 y Figura 8). Finalmente, genes como *pgk* que codifica para la enzima fosfoglicerato cinasa y *gapA* que genera gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa se subexpresan en ACE ( $-2.8 \pm 0.6$  y  $-24.2 \pm 0.8$  respectivamente) en comparación con JM101 (Gráfica 6 y Figura 8). En *E. coli* estos genes también se subexpresaron al utilizar acetato en comparación con su cultivo en glucosa (Oh *et al.* 2002).

## 7 CONCLUSIONES.

El catabolismo de acetato es más eficiente en ACE que en JM101 debido a que tiene una  $\mu$  tres veces más elevada y con un  $Y_{x/s}$  dos veces mayor.

Los niveles de expresión de los genes *ackA-pta* y *acs*, sugieren que la ruta preferencial de ACE para la asimilación del acetato es la ruta de 2 pasos ACKA-PTA en ACE, de modo contrario a JM101 que prefiere la ruta mediada por ACS.

Existe una sobreexpresión de los genes *aceA* y *glcB* de la ruta del glioxilato en ACE respecto a JM101 y posiblemente la sobreexpresión de estos genes ayude a ACE a ahorrar esqueletos de carbono que podría contribuir al  $Y_{x/s}$  superior en esta cepa, así como mayor cantidad de precursores metabólicos provenientes del CATC. Esto está en concordancia con el hecho de que el  $RQ$  es menor en ACE en comparación al de JM101.

La sobreexpresión de los genes *talA* y *tktA* en ACE sugiere que debido a que esta bacteria no cuenta con la vía oxidativa de las pentosas fosfato, la producción de ribosa 5-P y eritrosa 4-P requeridos para la síntesis de biomasa, deberán ser producidos a partir de triosas.

## **8 PERSPECTIVAS.**

Para complementar los resultados de expresión de genes relativo del presente estudio, se podrían determinar en ACE y JM101 las actividades de las enzimas más relevantes para el catabolismo de acetato. Tal es el caso de Pta-AckA, Icd, AceA, Pck y las enzimas málicas, entre otras.

También se podrían analizar los efectos de sobreexpresar genes de ACE como *ackA*, *icdh* o *aceA* en *E. coli* para determinar si tienen un efecto positivo en el catabolismo de acetato. Incluso, estos estudios de sobreexpresión se podrían hacer en cepas de *E. coli* PTS- y con los genes *pykAF* inactivos para emular una estructura del metabolismo central equivalente al de ACE (Sabido *et al.* 2014).

Se podría hacer un estudio sobre transportadores de acetato en ACE, mediante la utilización de sustratos marcados radioactivamente y ver si la eficiencia del catabolismo de acetato de esta bacteria está relacionada a una cuestión de transporte.

Por último, con los resultados obtenidos podríamos pensar en utilizar a ACE como un agente detoxificador de acetato en hidrolizados de biomasa lignocelulósicos. Incluso, se podría desarrollar un sistema de detoxificación donde se inmovilice a ACE para facilitar los procesos de separación subsecuentes.

## 9 BIBLIOGRAFÍA.

- Andersen KB, Von Meyerburg K. Are growth rates of *Escherichia coli* in batch cultures limited by respiration?. *J Bacteriol* 1980;**144**(1):114-123.
- Becker C, Hammerle-Fickinger A, Redmaier I *et al.* mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods* 2010;**50**(4):237-243.
- Bernal V, Castaño-Cerezo S, Cánovas M. Acetate metabolism regulation in *Escherichia coli*: carbon overflow, pathogenicity, and beyond. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016(100):8985-9001.
- Biorad Laboratories Inc. Real Time PCR Applications Guide. 2017.
- Biorad Laboratories Inc. What is gene expression analysis?. 2017.
- Bologna FP, Andreo CS, Drincovich MF. *Escherichia coli* malic enzymes: two isoforms with substantial differences in kinetic properties, metabolic regulation, and structure. *J Bacteriol* 2007;**189**(16):5937–5946.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;**55**(4):611-622.
- Castaño-Cerezo S, Bernal V, Blanco-Catalá J *et al.* Camp-CRP co-coordinates the expression of the protein acetylation pathway with central metabolism in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 2011;**82**(5):1110-1128.
- Castaño-Cerezo S, Bernal V, Post H *et al.* Protein acetylation affects acetate metabolism, motility and acid stress response in *Escherichia coli*. *Molecular Systems Biology* 2014;**10** (762).

- Castaño-Cerezo S, Pastor J, Renilla S *et al.* An insight into the role of phosphotransacetylase (*pta*) and the acetate/acetyl-CoA node in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* 2009;**8**(54).
- Chang DE, Shin S, Rhee JS *et al.* Acetate metabolism in a *pta* mutant of *Escherichia coli* W3110: importance of maintaining acetyl coenzyme A flux for growth and survival. *J Bacteriol* 1999;6656-6663.
- Chong H, Yeow J, Wang I *et al.* Improving acetate tolerance of *Escherichia coli* by rewiring its global regulator cAMP receptor protein. *PLOS ONE* 2013;(10).
- Cunningham L, Gruer MJ, Guest JR. Transcriptional regulation of the aconitase genes *acnA* and *acnB* of *Escherichia coli*. *Microbiology* 1997;**143**:3795-3805.
- Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods* 2010;**50**(4):227-230.
- Dittrich CR, Bennett GN, San KY. Characterization of the acetate-producing pathways in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 2005;**21**:1062-1067.
- Doran PM. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Editorial Acribia 1988.
- El-Mansi M, Cozzone AJ, Shiloach J *et al.* Control of flux through enzymes of central and intermediary metabolism during growth of *Escherichia coli* on acetate. *Current Opinion in Microbiology* 2006;**9**:173-179.
- Enjalbert B, Letisse F, Portais JC. Physiological and molecular timing of the glucose to acetate transition in *Escherichia coli*. *Metabolites* 2013;**3**:820-837.
- Enjalbert B, Millard P, Dinclaux M *et al.* Acetate fluxes in *Escherichia coli* are determined by the thermodynamic control of the Pta-AckA pathway. *Scientific reports* 2017;**7**.

- Flores N, Flores S, Escalante A *et al.* Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Metab Eng* 2005;**7**(2):70–87.
- Gallego J. Metabolismo del acetate en *Escherichia coli*: caracterización y regulación. Tesis de Doctorado. Universidad de Murcia. Julio 2018.
- Gimenez R, Nuñez MF, Badía J *et al.* The gene *yjcG*, cotranscribed with the gene *acs*, encodes an acetate permease in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2003;**185**(21):6448-6455.
- Hoyt JC, Johnson KE, Reeves HC. Purification and characterization of *Acinetobacter calcoaceticus* isocitrate lyase. *J Bacteriol* 1991;**173**:6844–8.
- Hoyt JC, Reeves HC. Phosphorylation of *Acinetobacter* isocitratelase. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;**182**:367–71.
- Kakuda H, Hosono K, Shiroishi K *et al.* Identification and characterization of the *ackA* (acetate kinasa A) - *pta* (phosphotransacetylase) operon and complementation analysis of acetate utilization by an *ackA-pta* deletion mutant of *Escherichia coli*. *J. Biochem* 1994;**116**:916-922.
- Kornberg HL. The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal* 1966;**99**(1):1–11.
- Kwon YD, Lee SY, Kim P. A physiology study of *Escherichia coli* overexpressing phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008;**72**:1138–1141.
- Lara AR. Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Rev. Mex. Ing. Quím* 2011;**10**(2):209-223.

- Lehninger AL, Nelson DL, y Cox MM. Lehninger principles of biochemistry. New York: Worth Publishers 1979.
- Leone S, Sannino F, Tutino ML *et al.* Acetate: friend or foe? Efficient production of a sweet protein in *Escherichia coli* BL21 using acetate as a carbon source. *Microbial Cell Factories* 2015;**14**(106).
- Lin H, Castro NM, Bennett GN. Acetyl-CoA synthetase overexpression in *Escherichia coli* demonstrates more efficient acetate assimilation and lower acetate accumulation: a potential tool in metabolic engineering. *App Microbiol Biotechnol* 2006;**71**:870-874.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  method. *Methods* 2001;**25**:402–8.
- Martínez-Gómez K, Flores N, Castañeda H *et al.* New insights into *Escherichia coli* metabolism: carbon scavenging, acetate metabolism and carbon recycling responses during growth on glycerol. *Microbial Cell Factories* 2012;**11**(46).
- Oh MK, Rohlin L, Kao KC *et al.* Global expression profiling of acetate-grown *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2002;**277**(15):13175–13183
- Perrenoud A, y Sauer U. Impact of global transcriptional regulation by ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr, and Mlc on glucose catabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2005;3171-3179.
- Reeves HC, O'Neil S, Weitzman PDJ. Changes in NADP-isocitrate dehydrogenase isoenzyme levels in *Acinetobacter calcoaceticus* in response to acetate. *FEMS Microbiol Lett* 1986;**35**:229–32.

- Renilla S, Bernal V, Fuhrer T *et al.* Acetate scavenging activity in *Escherichia coli*: interplay of acetyl-CoA synthetase and the PEP-glyoxylate cycle in chemostat cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012;**93**:2109-2124.
- Rocha D, Santos C, Pacheco L. Bacterial reference genes for gene expression studies by RT-qPCR: survey and analysis. *Antonie van Leeuwenhoek* 2015;**108**:685–693.
- Sá-Pessoa J, Paiva S, Ribas D *et al.* SATP (YaaH), a succinate–acetate transporter protein in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal* 2013;**454**(3):585-595.
- Sabido A, Sigala JC, Hernández-Chávez G *et al.* Physiological and transcriptional characterization of *Escherichia coli* strain lacking interconversion of phosphoenolpyruvate and pyruvate when glucose and acetate are coutilized. *Biotechnol Bioeng* 2014;**111**(6).
- Salcedo-Vite K, Sigala JC, Segura D *et al.* *Acinetobacter baylyi* ADP1 growth performance and lipid accumulation on different carbon sources. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019;**103**(15):6217-6229.
- Sigala JC, Flores S, Flores N *et al.* Acetate metabolism in *Escherichia coli* strains lacking phosphotransferase system; evidence of carbon recycling strategies and futile cycles. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2009;**16**(3,4):224–235.
- Sigala JC, Quiroz L, Arteaga E *et al.* Physiological and transcriptional comparison of acetate catabolism between *Acinetobacter schindleri* ACE and *Escherichia coli* JM101. *FEMS Microbiol Lett*. 2019; **366**(12).
- Sigala JC, Suárez BP, Lara AR *et al.* Genomic and physiological characterization of a laboratory-isolated *Acinetobacter schindleri* ACE strain that quickly and efficiently catabolizes acetate. *Microbiology* 2017;**163**(7):1052-1064.

- Shiloach J, Kaufman J, Guillard S *et al.* Effect of Glucose Supply Strategy on Acetate Accumulation, Growth, and Recombinant Protein Production by *Escherichia coli* BL21 (λDE3) and *Escherichia coli* JM109. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996;**49**:421-428.
- Son Y, Phue J, Trinh L *et al.* The role of Cra in regulating acetate excretion and osmotic tolerance in *E. coli* K-12 and *E. coli* B at high density growth. *Microbial Cell Factories*, 2011;**10**(52).
- Sooran S, Chang D y Pan JG. Acetate consumption activity directly determines the level of acetate accumulation during *Escherichia coli* W3110 growth. *J. Microbiol. Biotechnol* 2009;**19**(10):1127-1134.
- Suárez B. Caracterización fisiológica de un aislado bacteriano con capacidad potencial para detoxificar hidrolizados de biomasa lignocelulósica. Tesis de Licenciatura. Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Acapulco. Febrero 2014.
- Suárez B. Estudio de cepas de *Acinetobacter* como agentes detoxificadores de mezclas de compuestos inhibidores simulando un hidrolizado de biomasa lignocelulósica. Tesis de Maestría del PCNI. UAM-Cuajimalpa. Julio 2017.
- Taylor S, Wekem M, Dijkman G *et al.* A practical approach to RT-qPCR—publishing data that conform to the MIQE guidelines, *Methods* 2010;**50**(4)
- Thermo Fisher Scientific. Reverse Transcription-A brief introduction. 2017.
- Touchon M, Cury J, Yoon EJ *et al.* The genomic diversification of the whole *Acinetobacter* genus: origins, mechanisms, and consequences. *Genome Biology and Evolution*, 2014;**6**(10): 2866–2882.
- Towner K. The genus *Acinetobacter*. *Prokaryotes*, 2006;**6**:746-758.

- Valgepea K, Adamberg K, Nahku R *et al.* Systems biology approach reveals tan overflow metabolim of acetate in *Escherichia coli* is triggered by carbon catabolite repression of acetyl-CoA synthetase. *BMC Systems Biology* 2010;**4**(166).
- Walsh K, Koshland DE. Characterization of rate-controlling steps *in vivo* by use of an adjustable expression vector. *Proc Natl Acad Sci* 1985; **82**(11):3577-3581
- Wang H, Wang F, Wang W *et al.* Improving the expression of recombinant proteins in *E. coli* BL21 (DE3) under acetate stress: an alkaline pH shift approach. *PLOS ONE* 2014;**9**(11).
- Wei B, Shin S, Laporte *et al.* Global regulatory mutations in *csrA* and *rpoS* cause severe central carbon stress in *Escherichia coli* in the presence of acetate. *J Bacteriol* 2000;**182**(6):1632-1640.
- Weinert BT, Iesmantavicius V, Wagner SA *et al.* Acetyl-phosphate is a critical determinant of lysine acetylation in *E. coli*. *Molecular Cell*, 2013;**51**:265-272.
- Wolfe AJ. The acetate switch. *Microbiol Mol Biol Rev* 2005;**6**(1):12–50.
- Zhao J, Shimizu K. Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* K12 grown on <sup>13</sup>C-labeled acetate and glucose using GC-MS and powerful flux calculation method. *J Biotechnol* 2003;**101**:101–17.

## 10 ANEXOS.

### 10.1 Anexo A. Carátula de artículo publicado.



FEMS Microbiology Letters, 366, 2019, fnz151

doi: 10.1093/femle/fnz151

Advance Access Publication Date: 0 2019

Research Letter

RESEARCH LETTER – Physiology & Biochemistry

## Physiological and transcriptional comparison of acetate catabolism between *Acinetobacter schindleri* ACE and *Escherichia coli* JM101

Juan-Carlos Sigala<sup>1,\*†</sup>, Lucy Quiroz<sup>2</sup>, Eduardo Arteaga<sup>2</sup>, Roberto Olivares<sup>1</sup>, Alvaro R. Lara<sup>1</sup> and Alfredo Martinez<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa. Av. Vasco de Quiroga 4871, Col. Santa Fe Cuajimalpa, Delegación Cuajimalpa, Ciudad de México 05348, México,

<sup>2</sup>Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa, Ciudad de México 05348, México and <sup>3</sup>Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Mor. 62210, México

\*Corresponding author: Juan-Carlos Sigala, Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa. Av. Vasco de Quiroga 4871, Col. Santa Fe Cuajimalpa, Delegación Cuajimalpa, Ciudad de México 05348, México. Tel: +52 55 5814 6500; Ext: 3871; E-mail: [jsigala@correo.cua.uam.mx](mailto:jsigala@correo.cua.uam.mx)

One sentence summary: *A. schindleri* ACE showed more efficient acetate catabolism than *E. coli* JM101. ACE had increased expression and fluxes in the AckA-PTA pathway TCA cycle and glyoxylate shunt, compared to JM101.

Editor: LÁgia Saraiva

†Juan-Carlos Sigala, <http://orcid.org/0000-0002-1665-5680>

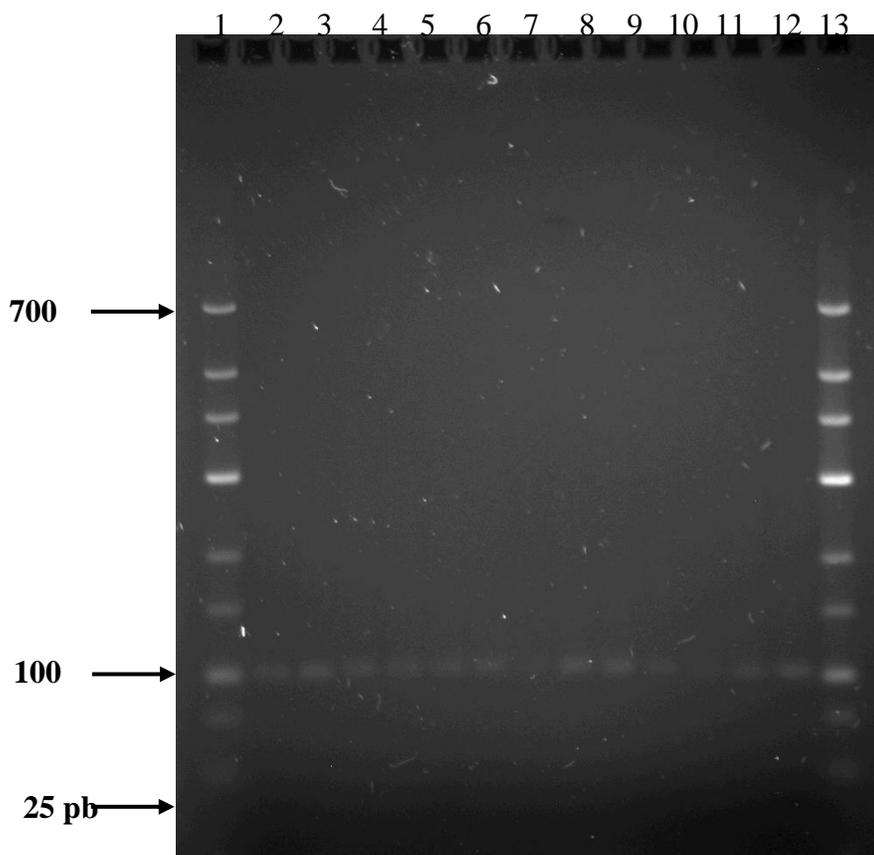
## 10.2 Anexo B. Niveles de expresión de genes relativo entre ACE y JM101.

Ruta metabólica y genes analizados.	Expresión de genes
a) Rutas de consumo de acetato y genes anapleróticos.	
<i>actP</i>	0.9 ± 0.1
<i>ackA</i>	2.8 ± 0.4
<i>Pta</i>	9.4 ± 0.2
<i>acsA</i>	-24.4 ± 4.4
<i>ppsA</i>	1.1 ± 0.1
<i>fbp</i>	-1.7 ± 0.6
<i>pck</i>	1.6 ± 0.3
<i>ppc</i>	0
<i>sfcA</i>	-7.7 ± 1.4
<i>maeB</i>	1.9 ± 0.4
b) Ciclo de los ácidos tricarboxílicos y ruta del glioxilato	
<i>icdA</i>	1.2 ± 0.1
<i>gltA</i>	2.4 ± 0.1
<i>sucA</i>	-2.2 ± 0.1
<i>sdhC</i>	4.3 ± 0.2
<i>acnB</i>	3.6 ± 0.3
<i>fumA</i>	12.4 ± 0.3
<i>mdh</i>	2.6 ± 0.1
<i>glcB</i>	4.6 ± 0.3
<i>aceA</i>	15.9 ± 1.6
c) Vía de las pentosas fosfato	
<i>tktA</i>	2.9 ± 0.3
<i>talA</i>	2.7 ± 0.1
<i>rpiA</i>	-8.1 ± 0.2
<i>rpe</i>	1.6 ± 0.1
d) Glucólisis	
<i>pgi</i>	1.4 ± 0.2
<i>pgk</i>	-2.8 ± 0.6
<i>gapA</i>	-24.2 ± 0.8

**Tabla 9.** Niveles de expresión de genes de ACE en comparación con los de JM101. Los valores de RT-qPCR fueron obtenidos de 2 cultivos independientes en reactor con menos de un 30% de variación.

### 10.3 Anexo C. Pruebas de primers.

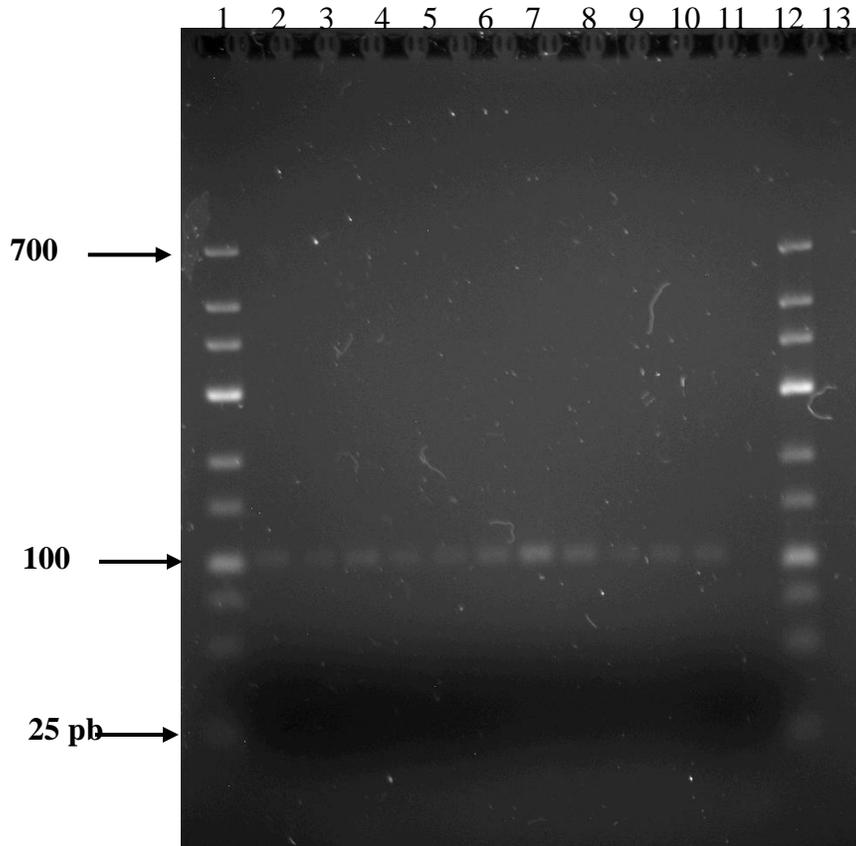
Se llevó a cabo PCR's de cada gen de estudio para comprobar que los primers amplifican y para determinar la especificidad de los mismos.



**Figura 9.-** Electroforesis en gel de agarosa al 3% y buffer TBE al 0.5X. 1=Marcador de peso molecular GeneRuler Low Range DNA Ladder, del carril 2 al 14 amplicones de 101 pb de los genes presentes en *Acinetobacter schindleri*: 2= *actP*, 3=*acsA*, 4=*acs*, 5=*ackA*, 6=*ptaA*, 7=*adh1*, 8=*adh2*, 9=*adh3*, 10=*gltA*, 11=*acnB*, 12=*aceA*, 13=*glcB*, 14=*icdA*, 15=Marcador de peso molecular GeneRuler Low Range DNA Ladder. La electroforesis se corrió a 70 V en buffer TBE 0.5X durante 1 hora y 20 min.

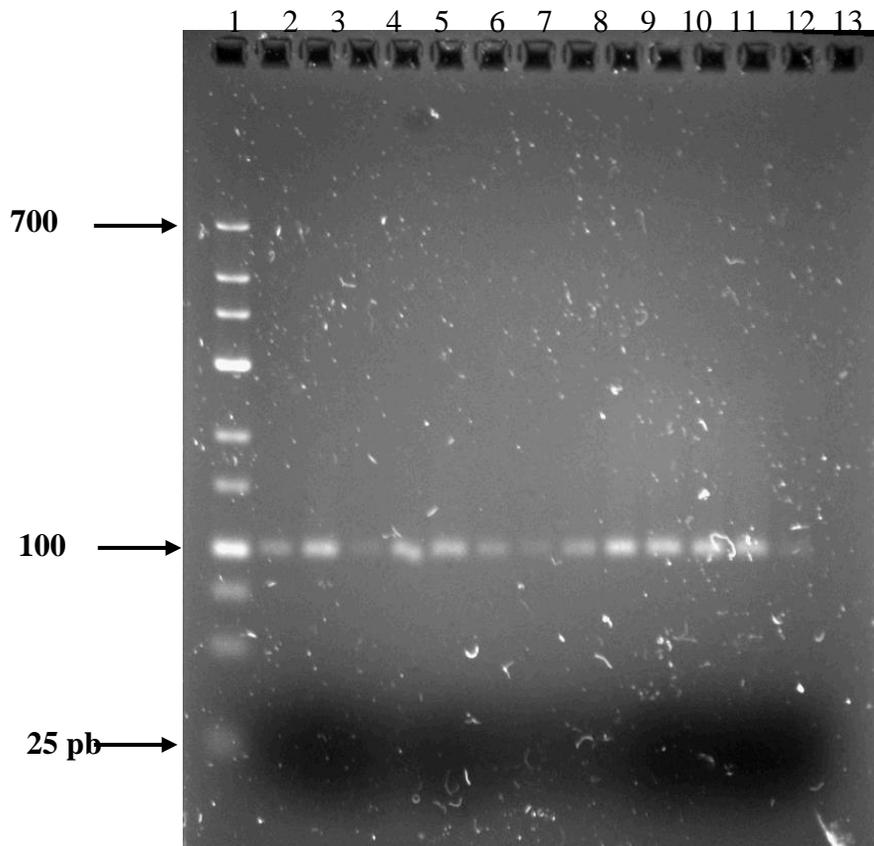
En el carril 8 de la imagen 9 no se ve el producto de PCR del gen *adh2*. Las bandas de los productos de PCR de los genes restantes si se visualizan y además tienen un tamaño aproximado de 100 pb.

El siguiente gel de electroforesis también corresponde a PCR's de genes de *A. schindleri* (Figura 10).



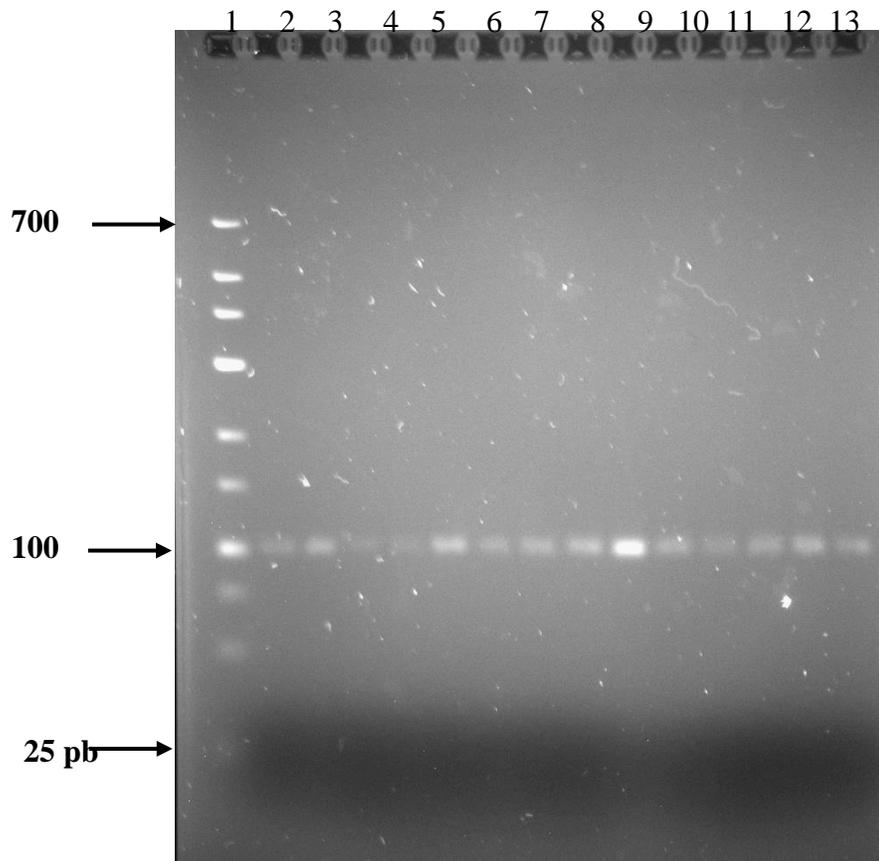
**Figura 10.-** Electroforesis en gel de agarosa al 3% y buffer TBE al 0.5X. 1=Marcador de peso molecular GeneRuler Low Range DNA Ladder, del carril 2 al 15 amplicones de 101 pb de los genes presentes en *A. schindleri*: 2= *ppc*, 3=*pckC*, 4=*ppsA*, 5=*pgkA*, 6=*gapA1*, 7=*gapA2*, 8=*gyrA*, 9=*secA*, 10=*dnaG*, 11=*tktA*, 12=*talA*, 13=*rpiA*, 14=Marcador de peso molecular GeneRuler Low Range DNA Ladder, 15=pozo sin muestra. La electroforesis se corrió a 70 V en buffer TBE 0.5X durante 1 hora y 20 min.

En el carril 13 del gel de electroforesis tampoco hay producto de PCR del gen *rpiA*, de igual manera, se distinguen bandas de aprox. 100 pb de las PCR's de los genes *ppc*, *pckC*, *ppsA*, *pgkA*, *gapA1*, *gapA2*, *gyrA*, *secA*, *dnaG*, *tktA* y *talA* (Figura 10).



**Figura 11.-** Electroforesis en gel de agarosa al 3% y buffer TBE al 0.5X. 1=Marcador de peso molecular GeneRuler Low Range DNA Ladder, del carril 2 al 15 amplicones de 101 pb de los genes presentes en *A. schindleri*: 2=*rpe*, 3=*ftsZ*, 4=*recA*, 5=*ropB*, 6=*ropC*, 7=*adk*, 8=*gmk*, 9=*icdA*, 10=*sucA*, 11=*sdhC1*, 12=*sdhC2*, 13=*fumA*, 14=*mdh*, 15=pozo sin muestra. La electroforesis se corrió a 70 V en buffer TBE 0.5X durante 1 hora y 20 min.

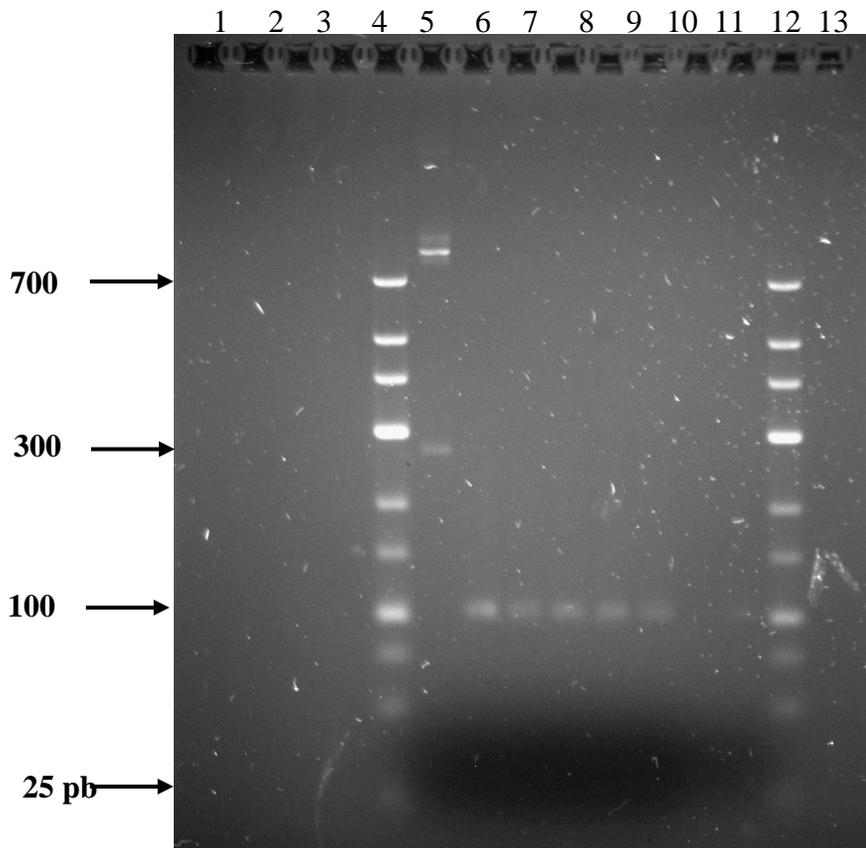
Los primers para amplificar los genes *rpe*, *ftsZ*, *recA*, *ropB*, *ropC*, *adk*, *gmk*, *icdA*, *sucA*, *sdhC1*, *sdhC2*, *fumA* y *mdh* de *A. schindleri* (Figura 11) sirven para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa y además dan productos únicos de amplificación. El tamaño de los amplicones es de aproximadamente 100 pb, los primers fueron diseñados para obtener amplicones de 101 pb.



**Figura 12.-** Electroforesis en gel de agarosa al 3% y buffer TBE al 0.5X. 1=Marcador de peso molecular GeneRuler Low Range DNA Ladder, del carril 2 al 5 amplicones de 101 pb de los genes presentes en *A. schindleri*, del carril 6 al 15 amplicones de 101 pb de genes presentes en *Escherichia coli* JM101. 2=*maeB*, 3=*sfcA*, 4=*fbp*, 5=*pgi*, 6=*gyrB*, 7=*gyrA*, 8=*secA*, 9=*dnaG*, 10=*adk*, 11=*gmk*, 12=*ftsZ*, 13=*recA*, 14=*rpoB*, 15=*ropC*. La electroforesis se corrió a 70 V en buffer TBE 0.5X durante 1 hora y 20 min.

El gel de electroforesis en gel de agarosa (Figura 12) fue cargado con productos de PCR de la cepa *A. schindleri* (Carriles del 2 al 5) y *Escherichia coli* JM101 (Carriles del 6 al 15).

De igual manera los primers son específicos, en el gel de electroforesis no se ven productos de PCR inespecíficos, solo se distingue una banda de tamaño de 100 pb aproximadamente.



**Figura 13.-** Electroforesis en gel de agarosa al 3% y buffer TBE al 0.5X. 1, 2, 3, 4,15=Carriles sin muestra, 5=Marcador de peso molecular GeneRuler Low Range DNA Ladder, 6=*actP*, 7=*acsA*, 8=*ackA*, 9=*pta*, 10=*poxB*, 11=*gltA*, 12=*adh2As*, 13=*aceAAs*, 14= Marcador de peso molecular. La electroforesis se corrió a 70 V en buffer TBE 0.5X durante 1 hora y 20 min.

Se repitió la amplificación de los genes *adh2* y *aceA* de *A. schindleri* y nuevamente no amplificó el gen *adh2* (Carril 12), el gen *aceA* si amplificó (Carril 13) Ver imagen 7.

El gen *actP* de *Escherichia coli* no amplificó, sin embargo, se distinguen dos productos de PCR, uno menor a 300 pb y el otro mayor a 700 pb (Figura 13).

Lo que se hizo fue rediseñar los primers para la amplificación de *actP*, con los mismos parametros con los que se diseñaron los oligonucleotidos de ACE. Se llevó a cabo la PCR tomando como templado DNA genómico de JM101 y se obtuvo una banda de aproximadamente 101 pb (Figura no reportada).