



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Facultad de Biología

Centro de Investigación en Biotecnología

Doctorado en Ciencias Naturales

Estrategias para producir ácido succínico en

Saccharomyces cerevisiae

Tesis que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Naturales

Presenta:

M.C. Prisciluis Caheri Salas Navarrete

Diciembre de 2022

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado en el Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y en el Laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas y Biología Sintética de Microorganismos, Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, con la Dirección del Dr. Luis Caspeta Guadarrama

La presente tesis fue financiada por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyectos TA200119 y TA200622, y la beca de doctorado CONACyT 473065.

Se agradece la participación del comité tutorial conformado por:

Dra. María del Refugio Trejo Hernández

Dra. Alicia González Manjarrez

Dr. Ramón Suárez Rodríguez

Dr. Alfredo Martínez Jiménez

RESUMEN

El ácido succínico (AcSuc) es el precursor principal en la síntesis de una gran variedad de compuestos orgánicos y de la producción de productos terminados como el caucho. Actualmente, algunas empresas lo producen mediante la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual debe ser modificada por ingeniería metabólica. Las estrategias de ingeniería metabólica se basan en dos objetivos principales: (i) generar cepas de levadura que alcancen títulos de producción mayores a 50 g/L y rendimientos cercanos al máximo teórico ($1.7 \text{ mol}_{\text{AcSuc}}/\text{mol}_{\text{GLC}}$), y (ii) desarrollar cepas de levadura capaces de crecer y sintetizar AcSuc en fermentaciones con pH ácido, por debajo del pKa del AcSuc, el cual es 4.2.

En este trabajo se implementaron diferentes estrategias para incrementar la disponibilidad de poder reductor intracelular, con el objetivo de aumentar la producción de AcSuc. Para esto se clonó un plásmido con una ruta de producción de AcSuc que no es nativa de la levadura. Con esta estrategia se logró incrementar la síntesis de AcSuc de 0 a 1.7 g/L en medio rico, y de 0 a 0.65 g/L en medio mínimo, ambos medios con 50 g/L de glucosa (GLC) como fuente de carbono. Estos títulos representan rendimientos de 61 y 48 $\text{mmol}_{\text{AcSuc}}/\text{mol}_{\text{GLC}}$ para cada uno de los medios de cultivo. Estos experimentos demuestran que aumentar la disponibilidad del poder reductor intracelular sirve para aumentar la producción de AcSuc en *S. cerevisiae*.

Para aumentar la tolerancia de la levadura a $\text{pH} < 4.2$ se secuenciaron los genomas de 2 cepas que generaron tolerancia a $\text{pH} = 4.0$ y 12 g/L de ácido acético (AcAce) en un ensayo de evolución adaptativa en laboratorio que se realizó previamente en nuestro grupo de investigación. Con la secuenciación de estas cepas y mediante ingeniería inversa determinamos que la inserción de una timina en el terminador de la transcripción del gen *RAS2* es la responsable de la tolerancia al pH bajo y a la elevada concentración de AcAce en las cepas evolucionadas. Esto permitirá transferir esta mutación a cepas productoras de AcSuc para que generen tolerancia a un pH menor al pKa y la acumulación del ácido en el medio de cultivo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	6
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. ANTECEDENTES	10
2.1. Ácido succínico: importancia, aplicaciones y síntesis	10
2.2. Rutas bioquímicas para la síntesis del AcSuc	11
2.3. Regulación del estado redox en <i>S. cerevisiae</i> y su implicación en la síntesis de AcSuc	12
2.4. Estrategias de ingeniería de reacciones para incrementar la síntesis y acumulación de AcSuc en <i>S. cerevisiae</i>	13
2.5. El rendimiento máximo teórico de AcSuc depende de la ruta metabólica.....	17
2.6. Modelamiento del metabolismo mediante biología de sistemas	18
2.7. Tolerancia de <i>S. cerevisiae</i> a pH ácido y altas concentraciones de ácidos débiles	20
2.8. Obtención de cepas de <i>S. cerevisiae</i> resistentes a pH ácido y altas concentraciones de AcSuc: la ingeniería evolutiva y los análisis a escala genómica.	22
3. JUSTIFICACIÓN.....	24
4. HIPÓTESIS	25
5. OBJETIVOS	25
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	25
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
6.1. Métodos para la ingeniería genética de <i>S. cerevisiae</i> : oligonucleótidos, plásmidos y cepas	26

6.2.	Medios nutritivos definidos para de cultivo de <i>S. cerevisiae</i>	29
6.3.	Estrategias para la construcción de cepas de <i>S. cerevisiae</i> productoras de AcSuc mediante la incorporación de una ruta heteróloga reductiva: cepas W3031A/pSAL4, SCW06/pSAL4 y SCW06/SCRED	31
6.5.	Simulaciones del metabolismo de la cepa productora de AcSuc	32
6.6.	Secuenciación de los genomas de las cepas evolucionas e ingeniería reversa para transferir mutaciones que ayuden a la cepa silvestre a tolerar pH bajo y altas concentraciones de AcAce.....	32
7.	RESULTADOS	34
7.1.	Construcción de una ruta reductiva para producir AcSuc en <i>S. cerevisiae</i>	34
7.2.	Construcción de una doble mutante de <i>S. cerevisiae</i> para generar una cepa productora de AcSuc	35
7.3.	Construcción de una cepa de <i>S. cerevisiae</i> productora de AcSuc	35
	Figura 6. Esquema de la reconstrucción de los flujos metabólicos de la cepa SCW06/pSCRED para incrementar la síntesis de AcSuc por la vía reductiva.	36
7.4.	Cultivos de producción de AcSuc con la cepa SCW06/pSCRED	36
7.5.	Modelado de escala genómica para diseñar nuevas estrategias para aumentar la producción de AS	38
7.5.1.	Modificaciones iniciales del GEM Yeast8 para simular auxotrofías propias de la cepa W3031A.....	38
7.5.2.	Análisis del balance de flujos metabólicos con el modelo Yeast8_SCWRED_CSN	38
7.5.3.	Análisis del modelo Yeast8_SCWRED_CSN con la herramienta flux-phase plane	40
7.5.4.	Análisis del modelo Yeast8_SCWRED_CSN con la herramienta FSEOF.....	41
7.5.5.	Aplicación de las estrategias obtenidas a partir del modelado con los GEMs que generamos	42

7.6.	Disminución de la actividad de PDC5 en la cepa SCW06/pSCRED.....	44
7.7.	Balance redox.....	46
7.8.	Tolerancia al pH ácido	47
7.8.1.	Análisis genómico de cepas tolerantes a ambientes termo-ácidos.....	47
8.	CONCLUSIONES.....	52
9.	PERSPECTIVAS.....	53
10.	PRODUCTOS GENERADOS EN ESTE TRABAJO DE TESIS	54
	BIBLIOGRAFÍA.....	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales compañías que producen ácido succínico en procesos demostrativos y a gran escala	10
Tabla 2. Estrategias de ingeniería metabólica utilizadas para aumentar la producción de ácido succínico en <i>S. cerevisiae</i>	15
Tabla 3. Rendimientos de producción de ácido succínico.	18
Tabla 4. Oligonucleótidos empleados en este estudio.	26
Tabla 5. Plásmidos que se emplearon para el desarrollo de este trabajo.	28
Tabla 6. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> empleadas en esta tesis.	29
Tabla 7. Componentes del medio definido DELFT.	30
Tabla 8. Resultados del análisis de flujos metabólicos generados con los GEMs Yeast8_W3031A_CSN, Yeast8_SCW06_CSN y Yeast8_SCWRED_CSN. Las unidades de los flujos son mmol/g _{psc} /h.....	39
Tabla 9. Genes candidatos para pasar las mutaciones de la cepa TAT12 a la cepa silvestre. Se muestran las características principales de cada uno.....	48
Tabla 10. Biomasa alcanzado en 48 horas por las poblaciones transformadas con los genes amplificados a partir de la cepa TAT12.	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pasos principales en el metabolismo de glucosa (glc) y las tres rutas principales de producción de AcSuc que parten del piruvato (pir). ver texto principal para los detalles de las abreviaturas.....	13
Figura 2. Ejemplo de dos rutas reductivas con las que se han alcanzado los títulos de producción.	15
Figura 3. Representación esquemática de los calculos con el software COBRA	19
Figura 4. Obtención del plásmido pSCRED. Este plásmido contiene los genes de la vía reductiva de síntesis de AcSuc.	34
Figura 5. Estrategia general para la construcción de la ruta reductiva de producción de AcSuc.....	35
Figura 6. Esquema de la reconstrucción de los flujos metabólicos de la cepa SCW06/pSCRED para incrementar la síntesis de AcSuc por la vía reductiva.....	36
Figura 7. Parámetros cinéticos de la cepa productora de AcSuc mediante una ruta reductiva. El cultivo se hizo en medio mínimo con 20 g/L de GLC.	37
Figura 8. Análisis de plano fase del cambio de la velocidad de producción de AcSuc respecto al cambio en las velocidades de producción de etanol y 1,3-BP-glicerato.....	40
Figura 9. Resultados principales del análisis de flujos metabólicos con la herramienta de optimización FSEOF.	41
Figura 10. Parámetros cinéticos de la cepa productora de AcSuc mediante una ruta reductiva..	43

Figura 11. Diseño de dos estrategias para truncar el promotor del gen <i>PDC5</i>	44
Figura 12. Proceso de evolución adaptativa para recuperar el fenotipo GLC+ en la cepa SCW02PDC5V2::KANMX.	45
Figura 13. Comportamiento cinético de la producción de AcSc, ácidos orgánicos totales y etanol en la cepa SCW02PDC5V2::KANMX.....	45
Figura 14. Balance redox de los metabolitos secretados por cada una de las cepas que se probaron para la producción de AsSc.	46
Figura 15. Adaptación de la biomasa de las cepas candidatas a la condición de estrés.....	49
Figura 16. Velocidad específica de crecimiento de las cepas candidatas y las cepas control.....	50
Figura 17. Alineamiento de la secuencia de la candidata C2 contra la secuencia del gen silvestre.....	50
Figura 18. Velocidad específica de crecimiento de las cepas candidatas en medio DELFT con 20 g/L de glucosa pH 6 y 39 °C.	51

1. INTRODUCCIÓN

Por más de cien años, la humanidad ha usado fuentes de carbono no renovables como el petróleo, el carbón y el gas natural como materias primas para producir combustibles y compuestos químicos que son la base para generar los servicios de transporte y los productos terminados que sustentan el estilo de vida de la mayor parte de la población. Sin embargo, el agotamiento de éstas y la contaminación generada por los procesos de producción asociados plantean retos importantes para las sociedades modernas. En este sentido, los azúcares contenidos en la materia lignocelulósica pueden utilizarse como fuente de carbono por diferentes microorganismos para producir un juego de químicos básicos y energéticos muy similar al que se puede obtener a partir de las fuentes no renovables. Además, el CO₂ producido en los procesos industriales y de combustión entraría al ciclo de carbono, lo cual presupone una disminución de la cantidad neta de CO₂ y otros gases de efecto invernadero acumulados en la atmósfera.

Entre los químicos básicos que se pueden sintetizar a partir de la glucosa contenida en la biomasa vegetal destaca el ácido succínico (AcSuc). Este ácido orgánico de cadena media es el precursor principal en la síntesis de distintos químicos básicos como el 1,3-butadieno y el 1,4-butanodiol, así como de productos terminados como el caucho. Actualmente, el AcSuc es producido por empresas que lo generan mediante procesos basados en microorganismos. Uno de los microorganismos es la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Biddy et al., 2016; Debabov, 2015). Para la producción industrial de AcSuc utilizando esta levadura se debe enfrentar dos retos: (i) incrementar los títulos (g/L) por encima de 50 g/L, y rendimientos (mol/mol) a niveles cercanos al máximo teórico obtenido con glucosa (GLC) como fuente de carbono ($1.7 \text{ mol}_{\text{AcSuc}}/\text{mol}_{\text{GLC}}$); y (ii) desarrollar cepas de levadura que sean capaces de crecer y sintetizar AcSuc en condiciones ácidas de pH (< 4.2).

Un ejemplo de estas estrategias es la reportada por **Yan y sus colaboradores en 2014**. Ellos reportaron un título de 12 g/L de AcSuc y un rendimiento de $0.36 \text{ mol}_{\text{AcSuc}}/\text{mol}_{\text{GLC}}$ en fermentaciones con medio mínimo con 50 g/L de GLC el cual se mantuvo a un pH 6 durante toda la fermentación. Este título es uno de los más altos que se han reportado hasta hoy, sin embargo, el rendimiento fue de 0.2 veces el máximo teórico. Esto representa un amplio margen para intentar aumentar la concentración y el rendimiento de AcSuc en un medio de cultivo con un pH menor a 6 y al del pKa de este ácido (4.2).

En este proyecto de doctorado, se utilizaron herramientas de ingeniería genética, evolutiva e inversa, así como de biología de sistemas para desarrollar estrategias de ingeniería metabólica para aumentar los títulos y rendimientos de AcSuc en *S. cerevisiae*, así como su tolerancia a elevadas concentraciones de ácido a pH < 4.2.

2. ANTECEDENTES

2.1. Ácido succínico: importancia, aplicaciones y síntesis

El ácido succínico, o ácido-1,4-butanodioico es un ácido dicarboxílico de 4 carbonos, el cual tiene dos valores de pKa, 4.2 y 5.6. Éste es considerado como una molécula base para la síntesis de otros compuestos químicos orgánicos como el 1,3-butadieno y sus derivados, los cuales son importantes en la industria petroquímica (**Biddy et al., 2016; Debabov, 2015; McKinlay, et al., 2007; Pinazo, et al., 2015**). Por lo que la aplicación principal del AcSuc es la síntesis del caucho para producir llantas y empaques para automóviles. Además, también se utiliza como surfactante, quelante de iones y aditivo en la agricultura y en algunos alimentos. Dado lo anterior, la producción anual de AcSuc se incrementó de 30,000 a 50,000 toneladas métricas (Tm) entre los años 2015 y 2017, y su valor en el mercado superó los 30 billones de dólares anuales. Además, las proyecciones de mercado del Departamento de Energía de EUA (DOE) muestran que la producción de esta molécula tendrá un crecimiento promedio anual de alrededor del 18 %, por lo que se proyectó que su producción excedería las 500,000 Tm a partir del año 2020 (**Biddy et al., 2016**).

En la actualidad, la mayor producción de AcSuc proviene de la conversión de ácido maleico, un residuo de las refinerías de petróleo. Sin embargo, la contaminación generada por los procesos asociados de síntesis química, así como la necesidad de prescindir de fuentes de carbono no renovables, ha impulsado la búsqueda de alternativas tecnológicas como la fermentación de azúcares. Es por esto que, desde hace más de 10 años, diferentes compañías tienen procesos industriales en etapas de demostración para la producción de ácido succínico por fermentación, y se proyecta que en los próximos años, estas empresas abran plantas de producción industrial. En conjunto, se cree que la capacidad de producción con la instalación de nuevas plantas aumente la capacidad de producción de AcSuc en unas 400,000 toneladas tm anuales a partir de glucosa (**Tabla 1. Principales compañías que producen ácido succínico en procesos demostrativos y a gran escala (Cavani, & Basile, 2016).**).

Tabla 1. Principales compañías que producen ácido succínico en procesos demostrativos y a gran escala (**Cavani, & Basile, 2016**).

Compañía	Ubicación de la planta	Capacidad instalada (Tm)	Inicio de operación
BioAmber	Pomacle, Francia	3,000	2010
	Sarnia, Canadá	30,000	2015
	América del Norte	200,000	2018
Reverdia	Cassano Spinola, Italia	10,000	2012
Myrian	Lago Providence, USA	13,600	2013
Succinity	Montmeló, España	10,000	2014

Uno de los microorganismos que han sido empleados por las empresas para la producción de AcSuc es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Esto se debe a que esta levadura es uno de los microorganismos mejor caracterizados y más utilizados a nivel industrial (Strope et al., 2015; Verduyn, 1991); fue el primer organismo eucariota del cual se secuenció el genoma (Goffeau et al., 1997); existen técnicas microbiológicas para su propagación y utilización exhaustivas en fermentaciones (Herskowitz, 1988); así como herramientas de biología molecular bien establecidas que permiten hacer modificaciones genéticas estables, sobreexpresar genes en vectores de replicación autónoma y en el cromosoma de este microorganismo (Siewers, Nielsen, & Mortensen, 2012). Lo anterior ha permitido implementar estrategias de Ingeniería Metabólica que han aumentado la producción de diferentes compuestos, incluyendo el AcSuc (Yan et al., 2014). Asimismo, se han secuenciado los genomas de cientos de diferentes cepas de este microorganismo, por lo que hay una gran cantidad de información genómica disponible (Strope et al., 2015). Esto ha permitido hacer un catálogo molecular de los componentes celulares, y más importante aún, esta información se ha utilizado para generar modelos de escala genómica (GEMs) (Heavner & Price, 2015; Sánchez & Nielsen, 2015). Con los GEMs se han realizado simulaciones *in-silico* para identificar estrategias que permitan aumentar la producción de compuestos como el AcSuc (Agren, Otero, & Nielsen, 2013; Heavner & Price, 2015; Otero et al., 2013; Sánchez & Nielsen, 2015).

2.2. Rutas bioquímicas para la síntesis del AcSuc

En las cepas silvestres de *S. cerevisiae* el AcSuc se produce en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y en la ruta del glioxilato. El AcSuc se disocia a pH intracelular de 7 y entonces se acumula en su forma ionizada o succinato. Esta forma ionizada también es la forma común que se acumula en el medio de cultivo, el cual se mantiene entre 5 y 6 para favorecer el crecimiento de *S. cerevisiae*.

En *S. cerevisiae*, el TCA y la ruta del glioxilato son menos favorecidas por su metabolismo que la glicólisis y la fermentación. Por lo que el AcSuc no se acumula de manera natural en los cultivos controlados de laboratorio. Sin embargo, se ha reportado que se puede acumular en concentraciones tan bajas como 0.1-0.3 g/L en vinos y cervezas producidos con esta levadura. En el TCA, el succinato se produce mediante la succinyl-CoA sintasa a partir de succinil-CoA. En el mismo ciclo, el succinato se oxida a fumarato reduciendo al flavín-adenín-dinucleótido (FAD) a FADH₂ mediante la enzima succinato deshidrogenasa. En la ruta del glioxilato se sintetiza succinato y glioxilato a partir de isocitrato en la reacción catalizada por la isocitrato liasa. Posteriormente, el succinato se incorpora al TCA y puede ser utilizado como sustrato por la succinato deshidrogenasa. Una limitante para la síntesis de AcSuc vía TCA es que este ciclo sólo está completo en la mitocondria. Además, el TCA es un proceso metabólico para la síntesis de intermediarios cuya salida del ciclo impone restricciones para la síntesis y acumulación de AcSuc. Por otro lado, la vía del glioxilato está negativamente regulada por la presencia de glucosa y su utilización implica la desregulación del fenómeno de represión catabólica, el cual es altamente regulado en microorganismos de tipo Crabtree positivos como *S. cerevisiae*.

Existen microorganismos silvestres que sintetizan AcSuc de forma eficiente como las bacterias anaerobias *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Mannheimia succiniciproducens* y *Basfia*

succiniciproducens. Estos microorganismos poseen un ruta reductiva que es altamente eficiente para la síntesis tanto de succinato como fumarato a partir de fosfoenolpiruvato o piruvato. Sin embargo son deficientes en la síntesis de oxaloacetato que es el precursor de la síntesis de glutamato. Por lo que estos microorganismos son auxótrofos a este y otros aminoácidos derivados de precursores sintetizados en el TCA, y su cultivo sólo se puede realizar en presencia de medios de cultivo complejos preparados con las auxotrofias. Además, estos microorganismos son anaerobios estrictos o facultativos, esto quiere decir que no utilizan de forma eficiente la rama oxidativa del TCA, incluso, algunos como *A. succinogenes* no poseen los genes que codifican para las enzimas de ésta rama del TCA. Esta característica provoca que en los productores naturales el NADH que se genera en la glucólisis tenga que ser reoxidado por la rama reductiva del TCA, cuyo producto final es el succinato. Esta ruta tiene la ventaja de consumir CO₂, NADH y ATP, lo que le permite a esta ruta alcanzar un rendimiento teórico más alto comparado con las rutas oxidativas y del glioxilato.

Los productores naturales de succinato normalmente no resisten las condiciones de cultivo prevalentes en biorreactores de escala industrial, lo que reduce el título máximo de producción que se obtiene a escala de laboratorio. Es decir, su escalamiento a nivel de producción se dificulta. Además, son bacterias que requieren que el pH del medio de cultivo se mantenga cercano al neutro durante toda la fermentación, lo que hace necesario que se agregue continuamente una base débil al cultivo. Dado que la forma útil a nivel industrial del compuesto es la forma no disociada, es decir el AcSuc y no el succinato, al final de la fermentación con estas bacterias es necesario acidificar el cultivo con un ácido débil para su posterior purificación. Estos pasos adicionales aumentan el costo de producción, por lo que las empresas productoras de AcSuc han optado por no usar productores naturales y en su lugar han explorado la expresión de rutas reductivas en *S. cerevisiae*. Sin embargo, para lograr altos títulos de producción de AcSuc a través de rutas reductivas en ésta levadura es necesario modificar su metabolismo oxidativo-reductor (redox) de forma eficiente.

2.3. Regulación del estado redox en *S. cerevisiae* y su implicación en la síntesis de AcSuc

En química se le llama redox al equilibrio químico entre los componentes de una reacción de reducción-oxidación. En esta clase de reacciones, el compuesto que se oxida le cede un electrón al compuesto que se reduce. El metabolismo de cualquier célula contiene cientos de estas reacciones. En las células, los principales receptores de los electrones de las fuentes de carbono son el NAD⁺ y el NADP⁺, estos compuestos se reducen a NADH y NADPH respectivamente. Estos compuestos reducidos forman parte del poder reductor de la célula y tienen un papel central en la generación de energía química y en la síntesis de las macromoléculas celulares.

Cuando *S. cerevisiae* consume glucosa como fuente carbono, regula el balance redox manteniendo un cociente [NADH]/[NAD⁺] con un valor cercano a uno (Villadsen et al. 2011). Esto se logra principalmente mediante dos reacciones: una catalizada por la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (G3P-deshidrogenasa) y la segunda catalizada por la alcohol deshidrogenasa (ALDH) (¡Error! La autoreferencia al marcador no es válida.). La G3P-deshidrogenasa produce un mol de NADH y oxida un mol de gliceraldehído-3-fosfato (G3P) a un mol de 1,3-difosfoglicerato (1,3-DPG), mientras que la aldehído deshidrogenasa (ALDH) reoxida éste mol de NADH a un mol de NAD⁺

por cada mol de etanol que produce. Es decir, cuando las levaduras están consumiendo glucosa como fuente de carbono, la reacción que produce la mayor parte del NADH de la célula es la G3P-deshidrogenasa y la enzima que lo reoxida a una velocidad similar es la ALDH. Mantener el cociente $[NADH]/[NAD^+]$ en un valor cercano a uno es esencial para la levadura, ya que si el NADH no se reoxida a NAD^+ durante la producción de etanol, el G3P no puede convertirse en 1,3-BPG. Además, la glucólisis no puede continuar y por lo tanto no pueden crecer en medios mínimos con glucosa como única fuente de carbono. Este es el caso de las cepas *PDC⁻* en cuyos fondos genéticos se eliminaron los genes que codifican para las 3 isoenzimas de la piruvato decarboxilasa (*PDC*). Estas enzimas catalizan la conversión de piruvato a acetaldehído, éste último es el sustrato de la ALDH. Estas cepas no consumen glucosa, sin embargo, puede restablecerse esta función biológica mediante ingeniería evolutiva (van Maris, et al., 2004). Estas cepas que tienen un fenotipo *PDC⁻/GLC⁺*, pueden consumir glucosa sin producir etanol y se ha demostrado que tienen una mayor disponibilidad intracelular de NADH, por lo que se han utilizado en la producción de compuestos cuya síntesis requiere de poder reductor como lo es el caso del AcSuc (Van Maris et al., 2004; Jansen & Verwaal, 2010).

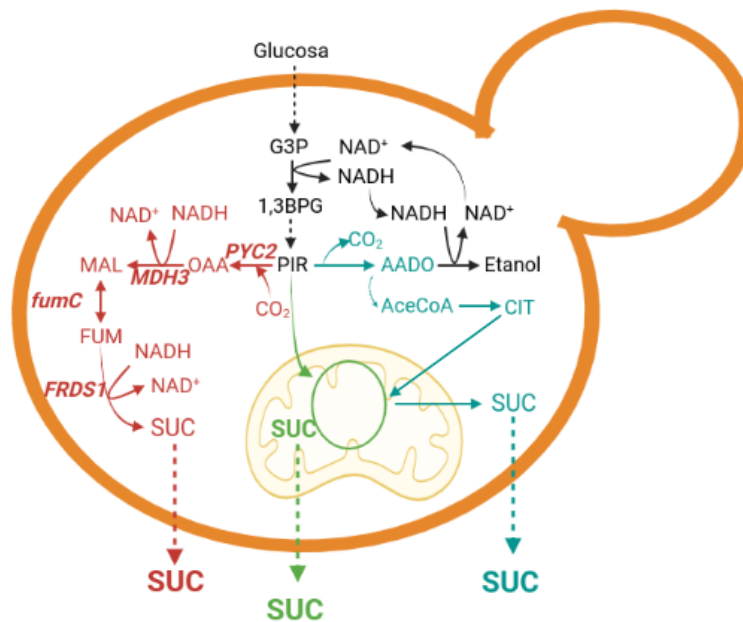


Figura 1. Pasos principales en el metabolismo de glucosa (glc) y las tres rutas principales de producción de AcSuc que parten del piruvato (pir). ver texto principal para los detalles de las abreviaturas

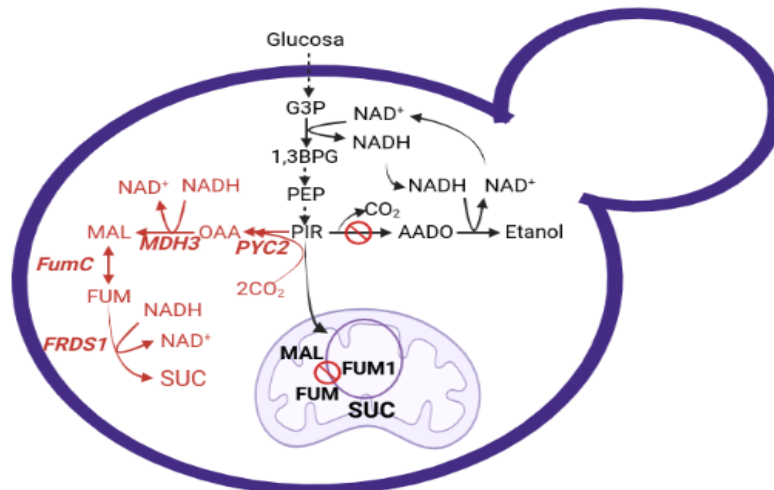
2.4. Estrategias de ingeniería de reacciones para incrementar la síntesis y acumulación de AcSuc en *S. cerevisiae*

Una cepa con fenotipo *PDC⁻/GLC⁺* fue usada junto con una ruta reductiva de producción de ácido succínico por **Yan y sus colaboradores en el 2014** (Figura 2. Ejemplo de dos rutas reductivas con las que se han alcanzado los títulos de producción. **Figura 2**). Usaron un primer plásmido para clonar los genes de *S. cerevisiae* que codifican para la piruvato

carboxilasa (PYC2) que cataliza la conversión de piruvato (PYR) a oxalacetato (OAA), y la malato deshidrogenasa (MDH3) que cataliza la conversión de malato (MAL) a OAA. En un segundo plásmido clonaron la fumarato reductasa (FRDS1) nativa de *S. cerevisiae* que transforma fumarato (FUM) a succinato y la fumarasa de *Escherichia coli* (FUMC) que convierte malato (MAL) a fumarato (FUM). Estos plásmidos fueron transformados en una cepa PDC⁻/GLC⁺ y se realizaron cultivos en matraces con medio mínimo suplementado con 50 g/L de GLC y dos pulsos de CaCO₃ como fuente de carbono orgánico e inorgánico respectivamente. El primer pulso de CaCO₃ lo hicieron al inicio del cultivo y fue de 5 g/L, el segundo pulso lo hicieron en la fase exponencial del crecimiento y fue de 30 g/L. Con esta estrategia lograron un título de producción de 8 g/L. Escalaron la producción a bioreactores de 3 L con un volumen de trabajo de 1L, en estas condiciones donde controlaron el pH, la tensión de oxígeno disuelto, entre otros parámetros, lograron elevar el título hasta 12.9 g/L, con un rendimiento de 0.32 mol_{AcSuc}/mol_{GLC} (**Figura 2**). Es importante destacar que en todos sus ensayos mantuvieron el pH del medio en un valor de 6 a lo largo de todo el cultivo, es decir, no sometieron a las células productoras de AcSuc a un estrés ácido.

Por su parte, **Jansen y Verwaal (2010)** construyeron un brazo reductor del TCA en dos plásmidos (**Figura 2**). En el primer plásmido clonaron el gen que codifica para la fosfoenolpiruvato carboxinasa (PCK) de *Actinobacillus succinogenes* que convierte el fosfoenolpiruvato (PEP) en OAA y el gen que codifica para la fumarato reductasa (FRDg) de *Trypanosoma brucei* que convierte el fumarato a succinato. En un segundo plásmido clonaron el gen que codifica para la malato deshidrogenasa nativa de la levadura (MDH3) y un gen sintetizado químicamente que codifica para la fumarasa de *Rhizopus oryzae*. Además de los plásmidos con la ruta reductiva, construyeron un plásmido donde clonaron el transportador mitocondrial de malato MAE de *Schizosaccharomyces pombe*. Estos tres plásmidos fueron transformados en la cepa RBW064 (MATA ura3-52 leu2-112 trp1-289 adh1::lox adh2::lox gpd1::KanMX). La cepa que obtuvieron se denominó SUC-200 y con esta realizaron ensayos en medio mínimo en cultivos tipo lote alimentado. La alimentación de GLC se mantuvo por debajo de 1 g/L y el cultivo se mantuvo con limitación de oxígeno. Asimismo, la alimentación de gas tuvo un flujo de 0.33 vvm de aire suplementado con 10 % de CO₂. El CO₂ es necesario para la síntesis de OAA a partir del PEP. Este cultivo se llevó a cabo por 90 horas y se reportó un título máximo de producción de 16 g/L.

A



B

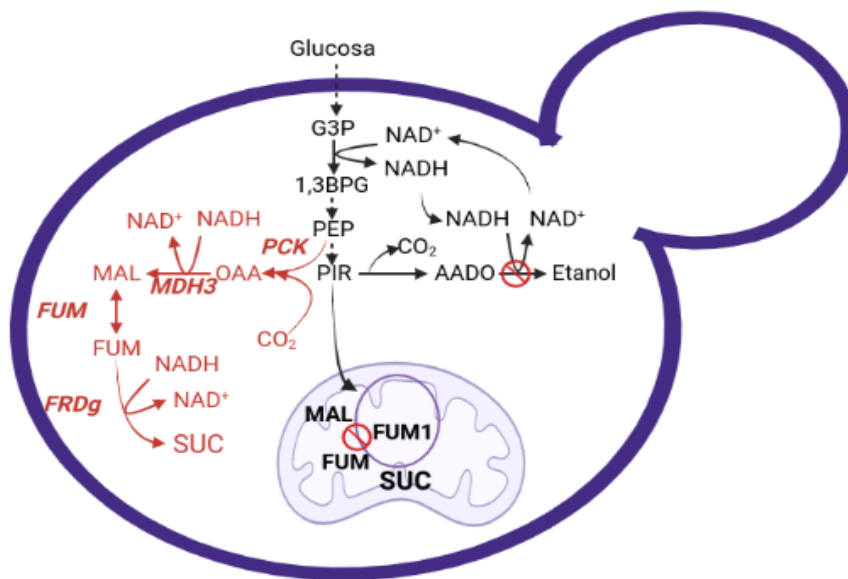


Figura 2. Ejemplo de dos rutas reductoras con las que se han alcanzado los títulos de producción.

n y los rendimientos de conversión de glucosa a AcSuc más altos. Estas dos vías difieren en la forma en que se limita la formación de etanol y la síntesis de ácido oxalacético (OAA). A) En esta estrategia la síntesis de etanol se evita eliminando la actividad de PDC y se genera OAA mediante piruvato carboxilasa (PYC2). B) En la segunda estrategia se elimina actividad de ADH y se sintetiza OAA mediante la fosfoenolpiruvato carboxinasa (PCK).

En la **Tabla 2** se presenta un resumen de las estrategias que se han usado previamente para aumentar la producción de AcSuc mediante la ruta oxidativa (Raab et al., 2010; Agren et al., 2013), el ciclo del glioxilato (Otero et al., 2013) y dos rutas reductoras distintas (Jansen & Verwaal, 2010; Yan et al., 2014).

Tabla 2. Estrategias de ingeniería metabólica utilizadas para aumentar la producción de ácido succínico en *S. cerevisiae*.

Ruta de síntesis	Estrategia	Título (g/L)	Rendimiento (mo-AcSuc/molGLC)	Referencia
TCA oxidativo	Eliminaron los genes <i>SDH1</i> , <i>SDH2</i> , <i>IDH1</i> Y <i>IDP1</i>	3.6	0.11	(Raab et al., 2010)
Ciclo del glioxilato	GEM-iFF708.	0.9	0.076	(Otero et al., 2013)

	Evolución adaptativa. Eliminación de los genes <i>SDH3</i> y <i>SER3/SER33</i>			
TCA oxidativo	GEM-iFF708. Eliminación del gen <i>DIC1</i>	0.23	0.030	(Agren et al., 2013)
TCA reductivo	Expresaron la PEP carboxinasa de <i>A. succinogenes</i> , <i>fumC</i> de <i>E. coli</i> , <i>MDH</i> y <i>FRDS</i> de <i>S. cerevisiae</i> .	16	0.44*	(Jansen & Verwaal, 2010)
TCA reductivo	Expresaron los genes <i>fumC</i> de <i>E. coli</i> , <i>PYC2</i> , <i>MDH</i> y <i>FRDS</i> de <i>S. cerevisiae</i> .	12.9	0.32**	(Yan et al., 2014)

*Este rendimiento fue calculado por nosotros a partir de los datos del cultivo continuo que reportaron Jansen & Verwaal, 2010; ** Este rendimiento fue convertido por nosotros a moles a partir del rendimiento reportado en gramos por los autores.

Para lograr que *S. cerevisiae* acumulara mayores concentraciones de AcSuc **Raab y sus colaboradores (2010)** eliminaron los genes *SDH1*, *SDH2*, *IDH1* Y *IDP1*, que codifican para la succinato deshidrogenasa y para una isoenzima mitocondrial de la isocitrato deshidrogenasa respectivamente. Con esta estrategia se alcanzó un título de 3.6 g/L y un rendimiento de 0.11 mol_{Suc}/mol_{GLC}.

Otras modificaciones genéticas que mejorarían la síntesis de AcSuc fueron identificadas con base en simulaciones *in silico* del metabolismo, utilizando el modelo metabólico a escala genómica (GEM) iFF708 y el algoritmo OptGene. Este método se utiliza para la búsqueda de genes cuyas enzimas favorezcan el flujo de carbono hacia la formación del producto deseado (**Patil et al., 2005**). **Otero et al. (2013)** se basaron en los resultados de **Patil et al. (2005)** para generar una cepa a la que se le eliminaron los genes *Sdh3* que codifica para el citocromo b del complejo succinato deshidrogenasa y *Ser3p/Ser33* que codifica para las isoenzimas de 3-fosfoglicerato deshidrogenasa. Con esto se acopló la producción de AcSuc al crecimiento celular a través del ciclo del glioxilato. Con esta primera aproximación se obtuvo un rendimiento de 0.14 g_{AcSc}/g_{biomasa}. Posteriormente realizaron un ensayo de evolución adaptativa, con lo que se generó una cepa que acumuló 0.69 g_{AcSc}/g_{biomasa}. En esta última cepa se realizó un análisis transcriptómico y se identificó que la isocitrato liasa (ICI1) se modificó en el ensayo de evolución, lo que le permitió a la cepa evolucionada aumentar la producción de AcSuc.

En otro estudio se utilizó el GEM iFF708 y un análisis del balance de flujos metabólicos FBA para establecer estrategias de ingeniería metabólica para aumentar la producción de ácido succínico (**Agren et al., 2013**). De acuerdo con los resultados de las simulaciones, **Agren y sus colaboradores (2013)** construyeron mutantes individuales de los genes *Mdh1*, *Oac1* y *Dic1* que codifican la malato deshidrogenasa mitocondrial, un transportador de la membrana

interna mitocondrial y un transportador de dicarboxilato mitocondrial, respectivamente. Las simulaciones también identificaron que la producción de succinato es sensible a la velocidad de consumo de oxígeno. El análisis transcripcional de la mutante *DICI* sugiere que la cadena de transporte de electrones, la síntesis de ATP, el transporte de esteroides y los procesos metabólicos para la formación de energía se asocian con la formación de succinato (**Agren, et al., 2013**). Por otra parte, la limitación del potencial redox restringe los rendimientos que pueden alcanzarse en un proceso de fermentación anaeróbica (el cual es deseable); por lo que, controlar las concentraciones de cofactores redox para manipular los flujos metabólicos parece un enfoque útil para aumentar los rendimientos en las levaduras.

2.5. El rendimiento máximo teórico de AcSuc depende de la ruta metabólica

Los parámetros estequiométricos más importantes que se deben considerar en el diseño de microorganismos para la producción de compuestos de interés comercial son los rendimientos. En especial el rendimiento de producción en función de la cantidad de sustrato consumido, el cual es la cantidad de producto (gramo o mol) que se obtiene por cantidad de sustrato consumido, y se abrevia Y_{SP} . Sin embargo, aumentar el Y_{SP} de un metabolito que deriva de una vía metabólica que conecta con la red intrincada de reacciones propia de los microorganismos tiene diferentes restricciones, entre las que destacan: (i) la ruta metabólica que conecta el sustrato con el producto; (ii) el contenido energético del sustrato y el producto; (iii) la eficiencia energética de la ruta; (iv) el consumo o producción de NADH por la ruta metabólica; y, (v) la dificultad para expresar la ruta heteróloga de síntesis en un organismo huésped. Por estos motivos, **Dugar y Stephanopoulos (2011)** presentaron una forma simple para calcular el rendimiento máximo teórico (Y_T) de un producto a partir de un sustrato específico. Este se calcula usando el contenido energético del sustrato y del producto con la ecuación $Y_T = \lambda_S / \lambda_P$. Donde λ_S representa los moles de electrones por mol del sustrato y λ_P los moles de electrones por mol del producto. El Y_T de AcSuc a partir de glucosa es $24 \text{ mol}_e^- / \text{mol}_{GLC} / 14 \text{ mol}_e^- / \text{mol}_{AcSuc} = 1.7 \text{ mol}_{AcSuc} / \text{mol}_{GLC}$. Por otra parte, la eficiencia de las rutas para la síntesis de AcSuc a partir de GLC puede calcularse únicamente mediante la estequiometría de las rutas (**Dugar y Stephanopoulos, 2011**). En la **Tabla 3** se muestra el rendimiento que puede alcanzarse usando la ruta oxidativa es $1 \text{ mol}_{AcSuc} / \text{mol}_{GLC}$, mientras que con la ruta reductiva es posible alcanzar un rendimiento de $1.7 \text{ mol}_{AcSuc} / \text{mol}_{GLC}$.

La metodología propuesta por **Dugar y Stephanopoulos (2010)** es una guía inicial para elegir la ruta de producción con la que se pueda alcanzar un rendimiento más alto respecto a otra que lleve al mismo producto. Sin embargo, esta metodología es un modelo de caja negra con el que podemos saber qué es lo que entra y lo que sale de la célula en estado estacionario. Esto representa una limitación desde el punto de vista del diseño del microorganismo, ya que no se puede manipular los componentes internos del sistema. Una alternativa es el uso de modelos del metabolismo a escala genómica.

2.6. Modelamiento del metabolismo mediante biología de sistemas

A la colección completa de los genes y la versión específica de éstos contenidos en el genoma de un organismo en particular se le conoce como genotipo. Asimismo, la forma y la función del organismo se conoce como fenotipo. Comprender la relación que existe entre el genotipo y el fenotipo a escala genómica es un problema fundamental en la biología actual (Palsson, 2006). En este sentido, las técnicas de secuenciación masiva en conjunto con el amplio acervo de conocimiento sobre las transformaciones bioquímicas en un organismo dado pueden convertirse a un formato matemático del que emanan las relaciones mecánicas entre los genotipos y los fenotipos metabólicos de las células (Palsson, 2006). Este formato matemático que subyace al conjunto de conocimientos bioquímico, genético y genómico (BiGG) ha facilitado la construcción de lo que se ha llamado Modelos de Escala Genómica (GEMs). Estos modelos son una reconciliación de las propiedades bioquímicas de las enzimas y los genes que las codifican en un organismo determinado (Palsson, 2006). Los GEMs pueden construirse y analizarse usando la metodología *CO*nstraint-*B*ased *R*econstruction and *A*nalysis (COBRA). Los métodos COBRA permiten el análisis de sistemas biológicos a escala genómica (como es el caso de los GEMs) - Biología de Sistemas del Metabolismo - sin la necesidad de contar con grandes cantidades de datos de entrada, como valores de las constantes cinéticas de las enzimas, datos fluxómicos, metabolómicos, etc. Estos métodos se basan en datos fisicoquímicos (capturados en la matriz estequiométrica) para calcular los estados fenotípicos posibles para un GEM particular bajo una condición dada (Figura 3).

Tabla 3. Rendimientos de producción de ácido succínico.

Balance general de las rutas de producción de AsSc en <i>S. cerevisiae</i>	
Máximo teórico	$Y_T = \lambda_s / \lambda_p = (24 \text{ mol-e/mol-GLC}) / (14 \text{ mol-e/mol-AcSc}) = 1.7 \text{ mol-AcSc/mol-GLC}$
Ruta oxidativa	$C_6H_{12}O_6 + H_2O + 4 ADP + 4 Pi \rightarrow C_4H_6O_4 + 5 NADH + 2CO_2 + 4 ATP$ $Y_O = 1 \text{ mol-AcSc}/1 \text{ mol-GLC} = 1 \text{ mol-AcSc/mol-GLC}$
Ruta reductiva	$1.16 C_6H_{12}O_6 + 4 NADH + CO_2 \rightarrow 2 C_4H_6O_4 + 4 NAD^+ + 3 H_2O$

$$Y_R = 2 \text{ mol-AcSc}/1.16 \text{ mol-GLC} = 1.7 \text{ mol-AcSc/mol-GLC}$$

Uno de los métodos COBRA más utilizados es el *flux balance analysis* (FBA). El FBA convierte el conocimiento BiGG contenido en los GEMs en un formato matemático conocido como matriz estequiométrica (S). S puede resolverse para dar un espacio de soluciones en el que se optimizan los flujos (bordes del cono en la **Figura 3**) que llevan a optimizar una función objetivo. Actualmente los GEMs traen precargada la velocidad específica de crecimiento (μ) como función objetivo. Para obtener un espacio de solución que describa fielmente los flujos metabólicos del sistema es necesario restringir el espacio de solución con datos experimentales como la velocidad específica de crecimiento (μ), la velocidad específica de consumo de la o las fuentes de carbono (r_s) y las velocidades específicas de producción de metabolitos ($r_{p1}, r_{p2} \dots r_{pn}$).

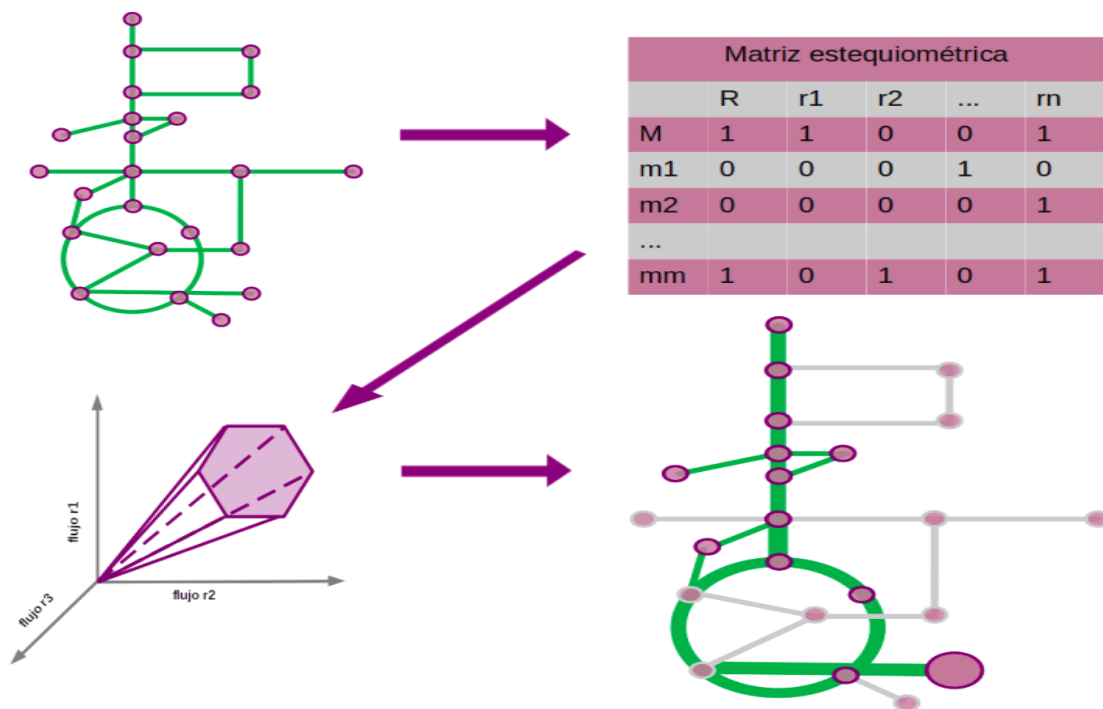


Figura 3. Representación esquemática resumida de la forma en que el metabolismo de un organismo puede ser representado en un matriz de coeficientes estequiométricos de las reacciones bioquímicas, las cuales se modelan mediante flujos metabólicos basados en límites de operación termodinámicos calculados con el software COBRA. Para su interpretación, la matriz estequiométrica se puede interpretar mediante gráficas que representan la relación entre los flujos metabólicos de un organismo y sus límites de operación que dan origen a un fenotipo. Esta interpretación se puede realizar mediante métodos matemáticos contenidos en COBRA, el cual realiza estos cálculos a partir de la reconstrucción completa del metabolismo (GEM).

S. cerevisiae fue el primer organismo eucariota para el cuál se desarrolló un GEM (Forster et al., 2003) y es uno de los organismos que cuenta con mayor número de GEMs publicados (Lopes & Rocha, 2017). El GEM más reciente, más curado y completo que se ha publicado para *S. cerevisiae* es el Yeast8 (Lu et al., 2019). Este GEM tiene versiones para COBRA Toolbox (MATLAB) y COBRAPy (Python). Elegimos la versión para COBRAPy, ya que Python es un lenguaje de programación libre y gratuito. Con este modelo y los métodos COBRA se evaluaron perfiles metabólicos, los cuales se presentarán más adelante en este manuscrito.

2.7. Tolerancia de *S. cerevisiae* a pH ácido y altas concentraciones de ácidos débiles

Para la síntesis del caucho y de otros compuestos químicos es necesario que el AcSuc esté en su forma oxidada. Por lo que la producción de AcSuc se enfoca en presentar éste en forma de solución en estado no ionizado. Dado lo anterior, es recomendable que la fermentación de glucosa a AcSuc se realice en un valor de pH por debajo del pKa del AcSuc (4.72) para disminuir los esfuerzos en la purificación y formulación del producto final envasado. Sin embargo, este valor está por debajo del pH óptimo para el crecimiento de *S. cerevisiae* (5.0-6.0).

A un pH menor al valor de pKa del AcSuc, éste se encuentra principalmente en su forma protonada y no cargada. Esta forma puede atravesar la membrana plasmática a una velocidad que se controla por la permeabilidad de la propia membrana. Una vez en el citosol, donde el pH es cercano al neutro en *S. cerevisiae*, el AcSuc se disocia generando así dos protones y el anión correspondiente. Estas moléculas cargadas no pueden simplemente difundir a través de la membrana hacia el medio extracelular. Esto puede causar la acidificación del citoplasma causando efectos deletéreos en la célula. Sin embargo, para aliviar esta condición de estrés, la levadura utiliza la bomba de protones citosólica y vacuolar, PMA1 y VMA1, respectivamente. Estas proteínas consumen ATP para lograr bombear los protones al medio extracelular (PMA1) y al interior de la vacuola (VMA1). Este consumo de ATP limita el crecimiento así como los recursos celulares para la síntesis de productos metabólicos.

Sin ácido en el medio de cultivo, pocas levaduras industriales crecen en pH menor o igual a 2.5 (Tahezadeh et al. 1997; Della-Bianca et al. 2013). Un pH por debajo de 4.5 es vital para que *S. cerevisiae* prospere a una concentración de ácido débil de 10 g/L, mientras que a un pH 3 la concentración de ácido no debe ser mayor a 3 g/L (Tahezadeh et al. 1997). Esto es que, conforme la concentración de ácido débil se incrementa, el nivel del pH debe aumentar para que *S. cerevisiae* pueda prosperar. Lo anterior porque, si el nivel de ácido no disociado se incrementa en el medio de cultivo, este difunde al interior de la célula acidificando el citosol. Por ejemplo, el pH citosólico disminuye a 5.7 o 5.1 si las células se exponen a 4.8 o 9.6 g/L de ácido acético cuando el pH del medio es de 4.5 (Fernández-Niño et al. 2015; Giannattasio et al. 2013). Se ha demostrado que si el pH citosólico disminuye por debajo de 5.2 las células mueren (Tahezadeh et al. 1997). Entonces, 9.6 g/L de ácido con un pH 4.5 es letal para *S. cerevisiae*.

En un medio sin ácido y pH 5, las levaduras no crecen a una temperatura superior a 40 °C (Van Uden 1985; Walsh and Martin 1977). En presencia de 1 o 3 g/L de ácido acético y pH 3.3, las temperaturas máximas de crecimiento son

37 °C y 35 °C, respectivamente (**Pinto et al. 1989**). Lo anterior demuestra que la presencia de un ácido débil en el medio de cultivo a un pH ácido hace que temperaturas subóptimas no letales se vuelvan letales en presencia del ácido.

Se ha observado que la actividad de PMA1 incrementa con el incremento de la temperatura de cultivo y con la adición de un ácido débil (**Coote et al., 1994; Ullah et al., 2012**). Por lo tanto, el consumo de ATP también se incrementa sustancialmente (**Lahtvee et al., 2016; Verduyn et al., 1992; Watson, 1970**). Para evitar el consumo excesivo de ATP, las células moderan la actividad de PMA1 sobre expresando la proteína de choque térmico HSP30 (**Meena et al., 2011; Piper et al., 1994**), por lo que el pH citosólico disminuye ligera- y transitoriamente con el choque térmico. Un uso excesivo de ATP también puede incrementar el consumo de glucosa y de oxígeno para la oxidación completa de la glucosa y producción máxima de ATP por mol de azúcar. Lo que se acompaña de un incremento en el volumen de la mitocondria (**Lahtvee et al., 2016; Verduyn et al., 1992**). El incremento en la actividad de la mitocondria puede causar un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las actividades de la superóxido dismutasa y catalasa (**Giannattasio et al., 2005**). Si la eliminación de ROS no es eficiente, esto causa la respuesta retrógrada y la muerte celular programada.

Un pH intracelular ácido puede disminuir la actividad de las enzimas glicolíticas. Se ha observado que la actividad de varias de las enzimas de la glicólisis disminuye a un pH menor a 6.8 (**Kumar et al., 2004; Pampulha and Loureiro-Dias, 1990**). Sorprendentemente, la transcripción de algunos genes que codifican enzimas de la glucólisis aumenta con el estrés oxidativo, el choque térmico y el ácido. Entre estos, los genes que codifican para la hexocinasa (HXK2) y la fosfofructocinasa (PFK1) (**Almeida et al., 2009; Gasch et al., 2000; Mira et al., 2010; Schüller et al., 2004**). La expresión de estos genes tiene una influencia importante en la represión catabólica causada por la glucosa (**Broach, 2012; Gancedo, 1998**). Dicha represión parece ser importante para la resistencia a ácido ya que mutaciones en *GPR1*, *GPA2*, *RGT2* y *SNF3*, los cuales codifican para enzimas reguladoras de las vías de señalización de glucosa (RAS/cAMP/PKA y SNF1/SNF3), promueven la resistencia en cepas aisladas en ambientes ácidos (**Isom et al., 2018; Orij et al., 2011**). Esto es que, si disminuye la actividad de la vía de señalización por glucosa disminuye la activación de las respuestas al estrés. Aunque por otro lado, la disminución también disminuye la actividad fermentativa y la activación de PMA1. Por ejemplo, mutaciones en SNF1, TPK2 y RAS2 los cuales son elementos río abajo del sistema de regulación causan la acidifican el citosol (**Som et al., 2018**), aunque disminuyen la formación de ROS (**Lastauskienė and Čitavičius, 2008; Leadsham and Gourlay, 2010; Salas-Navarrete et al., 2022**).

Las vías de señalización de de glucosa, en combinación con las de nitrógeno también regulan la acidificación de la vacuola, que, entre otras cosas previenen la acidificación del citosol y la respuesta retrógrada causada por el mal funcionamiento de la mitocondria (**Bishop and Guarente, 2007; Broach, 2012; Hughes and Gottschling, 2012**). Por lo tanto, estas vías controlan la expresión de la ATPasa vacuolar y se ha observado que mutantes en *VMA1*, *VMA2* y *VMA3*, así como la proteína ensambladora *VPH2* causan la acidificación del citosol y la imposibilidad de la levadura para alcanzar la homeostasis del pH citosólico (**Martínez-Muñoz and Kane, 2008; Preston et al., 1992**). La señalización entre la vacuola y el citosol es importante para el metabolismo de Fe y Cu que juegan un papel importante en la tolerancia a ácido acético (**Hu et al., 2019; Li and Kaplan, 2004**). Se ha observado que los genes involucrados

en el transporte de Fe (FET3), reducción del Fe (FRE1 y FRE3) y facilitadores del transporte de Fe (FIT2 y FIT3) juegan un papel importante en la resistencia (Fletcher et al., 2016; Hu et al., 2019; Mira et al., 2010).

La difusión de un ácido débil hacia el citosol requiere que éste interaccione con la membrana citoplasmática de las células. Por lo que se ha sugerido que la composición de esta está relacionada con la resistencia al estrés ácido. De tal forma que las células que se someten a evolución adaptativa muestran cambios en la secuencia de genes que codifican para enzimas relacionadas con la reestructuración de la membrana, por ejemplo *ERG3*, *ERG4*, *ERG13*, *ERG24* *YDC1* y *SUR2* (Fletcher et al., 2016; Mira et al., 2010). Además de la reestructuración de la membrana, *S. cerevisiae* también altera la secuencia de genes que codifican para transportadores de ácidos y bases débiles como *AQR1*, *TPO2*, *JEN1* y *PDR12* (Casal et al., 1999; Mira et al., 2010).

Cuando las células se someten a un estrés ácido o térmico activan la expresión de varios cientos de genes (Caspeta et al., 2016a; Gasch et al., 2000; Lee et al., 2015; Mira et al., 2010). Esto hace pensar que, además de los genes cuyas funciones se relacionan individualmente con el fenotipo tolerante, existen otro grupo de genes que si bien no participan “directamente” con alguna función individual si se encargan de regular la transcripción de otros genes que complementan la respuesta, como los factores transcripcionales (FTs). En este sentido, el análisis de secuencias promotoras de la transcripción ha sido útil para identificar FTs que participan en la respuesta a estrés general como *MSN2/MSN4*, o en respuesta a estrés por choque térmico como *HSF1* (Gasch et al., 2000). Además, también se han identificado factores transcripcionales que regulan las respuestas particulares a estrés oxidativo como *YAP1*, estrés ácido como *WAR1*, y complementan la regulación de la respuesta a choque térmico como *SKN7* (Mira et al., 2010; Schüller et al., 2004).

Como se puede detectar de este pequeño resumen, es posible identificar genes cuyas funciones aportan a un fenotipo termo-ácido tolerante en *S. cerevisiae*. Estos genes se pueden usar para el diseño de cepas resistentes mediante los conceptos y técnicas de la ingeniería inversa, la cual se centra en la generación de fenotipos tolerantes transfiriendo las funciones genéticas que determinan la resistencia en otras cepas. para generar estas cepas se usan procesos de evolución adaptativa, los cuales, cabe mencionar que operan también en los procesos industriales de producción. Aunque estos procesos se pueden operar en el laboratorio.

2.8. Obtención de cepas de *S. cerevisiae* resistentes a pH ácido y altas concentraciones de AcSuc: la ingeniería evolutiva y los análisis a escala genómica.

Cepas de *S. cerevisiae* tolerantes a ácido, pH ácido y temperaturas supraóptimas se han aislado en la industria y en experimentos de evolución adaptativa en laboratorio (EAL) (Mira et al., 2010; Schüller et al., 2004). Además, el uso de herramientas de análisis de funciones en el genoma completo ha permitido la identificación de genes cuyas funciones aportan al fenotipo tolerante observado en experimentos típicos de fisiología microbiana. Estas funciones han sido evaluadas mediante ingeniería inversa para develar los aspectos básicos de los mecanismos celulares responsables de la tolerancia en las cepas aisladas (Mans et al. 2018). Por ejemplo, el análisis fisiológico molecular de cepas industriales tolerantes a concentraciones elevadas de ácido acético y pH ácido mostró cambios estructurales

en genes relacionados a la vía de señalización de glucosa RAS/cAMP/PKA y a la regulación de la disponibilidad de nitrógeno como: *IRA2*, *SNF4*, *CUP2*, *GRT1*, *MET4*, *HAA1*, *SAM3*, *SAM4*, y *TRT2* (Della- Bianca et al. 2013; Meijnen et al. 2016; Stojiljkovic et al. 2020). En particular, resulta interesante que mutaciones en los genes de la vía RAS/cAMP/PKA, como *IRA1*, *IRA2*, *CYR1* y *BCY1*, también se detectaron en cepas termotolerantes aisladas en la industria (Parts et al. 2011).

En experimentos de EAL también se han aislado cepas tolerantes a ambientes ácidos, por ejemplo en presencia de 15 g/L de ácido acético y pH 4.5 (Fletcher et al. 2016; González-Ramos et al. 2016; Wright et al. 2011). Las mutaciones encontradas en estas cepas se detectaron en genes relacionados con el estrés oxidativo, el balance de óxido-reducción como *FRE1*, *ADH3*; El metabolismo de lípidos y esteroides (*ASG1* y *ERG5*) y la respuesta a la disponibilidad de glucosa como *SKS1* (Fletcher et al. 2016; González-Ramos et al. 2016). En otros experimentos de EAL bajo ambientes con elevada temperatura se aislaron cepas resistentes a 38-42 °C (Caspeta et al. 2014; Hyun-Soo Kim et al. 2011; Satomura et al. 2016). En estas cepas se identificaron mutaciones en genes relacionados con el metabolismo de lípidos (*ERG3* y *LCB3*), con la respiración y la generación de energía en forma de ATP (*ATP3*, *ATP2*, *MTM1*, *CCM1* y *MDL2*), la vía RAS/cAMP/PKA (*IRA2* y *CDC25*), la replicación del DNA (*RAD9*, *RAD24*, *PAN2*, *CSM3* y *CMK2*) y las respuestas múltiples al estrés (*SSK2* y *MSN2*) (Caspeta et al. 2014; Hyun-Soo Kim et al. 2011; Satomura et al. 2016).

En experimentos de EAL recientemente se aislaron cepas tolerantes a valores de pH menores a 4.2, altas concentraciones de ácido acético y elevada temperatura (Caspeta et al. 2019). Para tales experimentos se partió de la cepa silvestre S288C y de la cepa termotolerante denominada TT23. Este antecedente es relevante para nuestro trabajo ya que estas cepas lograron crecer en medio mínimo con 20 g/L de GLC y 12 g/L de ácido acético, con pH 4 a 30 °C y 250 RPM.

3. JUSTIFICACIÓN

En *S. cerevisiae* se ha caracterizado ampliamente la producción de AcSuc mediante rutas metabólicas oxidativas. Sin embargo, los títulos de producción más altos de este compuesto se han alcanzado a través de rutas metabólicas reductivas. Las cuales se analizaron en este proyecto de tesis.

Los cambios que ocurren en el metabolismo central de *S. cerevisiae* cuando produce AcSuc mediante una ruta reductiva no están bien caracterizados debido al alcance que esto tiene en el metabolismo global. Esto justifica aplicar estrategias de Biología de Sistemas que permitan comprender los cambios que ocurren en el metabolismo de *S. cerevisiae* cuando produce AcSuc mediante una ruta reductiva. A partir de este conocimiento será posible diseñar estrategias de Ingeniería de Vías Metabólicas a nivel de sistemas que permitan aumentar los títulos y los rendimientos de producción de este metabolito.

La obtención de fenotipos ácido tolerantes es importante para generar cepas productoras de AcSuc que puedan acumular este ácido débil en cultivos con pH ácido menor al pKa del AcSuc. Esto permitiría la recuperación del ácido en su forma no disociada que es la forma más habitual en que se formulan las presentaciones de este ácido para la comercialización como reactivo. Por lo que esto presupone un ahorro en los procesos de separación y purificación del AcSuc del medio de cultivo.

La obtención de cepas tolerantes a ambientes ácidos representa un reto ya que no es atractivo generar diseños experimentales para evaluar todas las posibles mutaciones que podrían dar origen al fenotipo tolerante. Para solucionar este problema se han utilizado estrategias de EAL para generar cepas tolerantes. Mediante análisis a escala genómica es posible generar conocimiento sobre los cambios genotípicos que generan la tolerancia.

4. HIPÓTESIS

El incremento en la síntesis de ácido succínico y la resistencia a la acidez en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se conseguirán mediante la ingeniería del metabolismo redox, e inversa de fenotipos tolerantes generados por ingeniería evolutiva.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Aumentar la producción de ácido succínico y la resistencia a ambientes ácidos en *S. cerevisiae* modificando el metabolismo redox mediante ingeniería de vías metabólicas a nivel de sistemas y la estructura del genoma mediante ingenierías evolutiva e inversa.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir una cepa de *S. cerevisiae* productora de AcSuc mediante una ruta reductiva.
- Determinar una estrategia que aumente el flujo de carbono hacia la producción de AcSuc mediante simulaciones *in-silico*.
- Secuenciar los genomas de las cepas de *S. cerevisiae* evolucionadas para tolerar un pH < 4.2.
- Transferir mutaciones clave a la cepa parental S288C para determinar su efecto sobre la tolerancia al pH.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Métodos para la ingeniería genética de *S. cerevisiae*: oligonucleótidos, plásmidos y cepas

Los oligonucleótidos que se enlistan en la **Tabla 4** fueron utilizados para generar los productos de PCR para la construcción de los plásmidos y las mutaciones cromosomales que se reportan en esta tesis doctoral. Los oligonucleótidos de 70 pares de bases (pb) se utilizaron para hacer mutaciones cromosomales. En su extremo 3' tienen 20 pb de homología con el casete KANMX del plásmido pUG6, mientras que en el 5' tienen homología con el gen respectivo que se eliminará. Los oligonucleótidos de 50 y de 20 pb se utilizaron para clonar los marcos de lectura de la ruta reductiva en el plásmido pSAL4 de forma individual y posteriormente armar un plásmido con las 4 unidades transcripcionales de la ruta completa. Los oligonucleótidos de 50 pb son oligos que amplifican en el sentido 3' tienen 20 pares de bases (pb) de homología con el templado del cual se amplifica el marco de lectura o la región reguladora que se va a ensamblar. El 5' de estos oligonucleótidos tiene homología con el 3' del fragmento que se ensamblará al 5' del producto de PCR que amplifica. Los oligonucleótidos de 20 pb son oligos que amplifican en antisentido, por lo que sólo tienen homología con el fragmento que se usará como templado.

En la **Tabla 5** se describen brevemente los plásmidos que se construyeron en este trabajo, así como los plásmidos de los que se partió para construir cada uno. El plásmido pSAL4 reportado por **Mascorro-Gallardo, et al. 1996**, es al que nos referiremos como plásmido vacío. Éste es un plásmido de 6140 pb con un origen de replicación autónoma para *S. cerevisiae* con aproximadamente 40 copias por célula; tiene la versión silvestre del gen *URA3*, que complementa la auxotrofia a uracilo en cepas con el alelo mutante *ura3-1*. Para su replicación en *E. coli* tiene un origen de replicación derivado del plásmido *pBlueScript*. En esta bacteria se encuentran 200 copias por célula aproximadamente y tiene el gen que codifica para la beta lactamasa que confiere resistencia a ampicilina en las células transformadas. Dado que el resto de los plásmidos para la ruta reductiva son derivados de éste, tienen estos mismos elementos de replicación y marcadores de selección para *E. coli* y para *S. cerevisiae*. Todos los marcos de lectura que se clonaron se encuentran bajo el control del promotor del factor de elongación de la transcripción I (*TEF1*) de la cepa S288C de *S. cerevisiae*. Este promotor es constitutivo, fuerte y no se ha reportado que se reprima por ninguna fuente de carbono. El terminador que se clonó para controlar el término de la transcripción de los genes clonados es el terminador del citocromo C1 (*CYC1*) de la cepa S288C de *S. cerevisiae*. Este es un terminador fuerte que evita que se formen fusiones transcripcionales que pueden dar origen a proteínas no funcionales.

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados en este estudio.

Oligonucleótido	Secuencia (Todos están de 5 a 3')	año (pb)	referencia
pSal4-R	GGC TCG AGA ATT CGT TAC AG	20	Este estudio
CYC1-SAL4F	GTT TTG GGA CGC TCG AAG GCT TTA ATT TGC CAC GTC GTG GAA TGC CTT CG	50	Este estudio

SAL4-TEF1F	GAA AAA CAA ACT GTA ACG AAT TCT CGA GCC CAT AGC TTC AAA ATG TTT CT	50	
TEF1-R	CTT AGA TTA GAT TGC TAT GC	20	Este estudio
TEF1-PYC2F	TAG AAA GAA AGC ATA GCA ATC TAA TCT AAG ATG AGC AGT AGC AAG AAA TT	50	Este estudio
PYC2-R	TTA CTT TTT TTG GGA TGG GG	20	Este estudio
PYC2-CYC1F	GAA ACC CTA CCC CCA TCC CAA AAA AAG TAA TCA TGT AAT TAG TTA TGT CA	50	Este estudio
CYC1-R	GCA AAT TAA AGC CTT CGA GC	20	Este estudio
TEF1-MDH3F	TAG AAA GAA AGC ATA GCA ATC TAA TCT AAG ATG GTC AAA GTC GCA ATT CT	50	Este estudio
MDH3-R	GGA AGA GTC TAG GAT GAA AC	50	Este estudio
MDH3-CYC1F	AAA GGC AAG AGT TTC ATC CTA GAC TCT TCC TCA TGT AAT TAG TTA TGT CA	50	Este estudio
TEF1-FR1F	TAG AAA GAA AGC ATA GCA ATC TAA TCT AAG ATG TCT CTC TCT CCC GTT GT	50	Este estudio
FR1-R	TTA CTT GCG GTC ATT GGC AA	20	Este estudio
FR1-CYC1F	GCT GAA TCT ATT GCC AAT GAC CGC AAG TAA TCA TGT AAT TAG TTA TGT CA	50	Este estudio
TEF1-FumCF	TAG AAA GAA AGC ATA GCA ATC TAA TCT AAG ATG AAT ACA GTA CGC AGC GA	50	Este estudio
FumC-R	TTA ACG CCC GGC TTT CAT AC	20	Este estudio
FumC-CYC1F	ATG GTC GGC AGT ATG AAA GCC GGG CGT TAA TCA TGT AAT TAG TTA TGT CA	50	Este estudio
FUM1-TEF1F	ATG TTG AGA TTT ACC AAT TGT AGT TGC AAG ACT TTC GTA AAA TCG TCA TAC ATA GCT TCA AAA TGT TTC T	70	Este estudio
CYC1-FUM1R	TTA TTT AGG ACC TAG CAT GTG TTC AGG AAC AAC CCA TTC ATC AAA TTC CTG CAA ATT AAA GCC TTC GAG C	70	Este estudio
PDC1-TEF1F	ATG TCT GAA ATT ACT TTG GGT AAA TAT TTG TTC GAA AGA TTA AAG CAA GTC ATA GCT TCA AAA TGT TTC T	70	Este estudio
PDC1-CYC1R	TTA TTG CTT AGC GTT GGT AGC AGC AGT CAA CTT AGC TTG TTC AAC CAA GTG CAA ATT AAA GCC TTC GAG C	70	Este estudio

Tabla 5. Plásmidos que se emplearon para el desarrollo de este trabajo.

Plásmido	Características principales	Fuente
pSAL4	Orígenes de replicación y marcadores de selección para <i>S. cerevisiae</i> y <i>E. coli</i> .	Mascorro et al. 1996. Proveído amablemente por el Dr. Ramón Suarez
pSCMDH3	Derivado del pSAL4 tiene clonado el gen <i>MDH3</i> de <i>S. cereveisiae</i> .	Este trabajo
pSCFRDS1	Derivado del pSAL4 tiene clonado el gen <i>FRDS1</i> de <i>S. cereveisiae</i> .	Este trabajo
pSCPYC2	Derivado del pSAL4 tiene clonado el gen <i>PYC2</i> de <i>S. cereveisiae</i> .	Este trabajo
pSCFUMC	Derivado del pSAL4 tiene clonado el gen <i>fumC</i> de <i>E. coli</i> .	Este trabajo
pSCRED01	Derivado del plásmido pSCPYC2. Adicionalmente se le clonó la unidad transcripcional que contiene el marco de lectura del gen <i>MDH3</i> de <i>S. cerevisiae</i> .	Este trabajo
pSCRED02	Derivado del plásmido pSCFUMC. Adicionalmente se le clonó la unidad transcripcional que contiene el marco de lectura del gen <i>FRDS1</i> de <i>S. cerevisiae</i> .	Este trabajo
pSCRED06	Derivado del plásmido pSCRED01. Adicionalmente tiene clonados los genes <i>fumC</i> y <i>FRDS1</i> como unidades transcripcionales independientes.	Este trabajo
pUG6	Este plásmido tiene clonado el cassette KANMX bordeado por sitios loxP. Para eliminar genes del cromosoma de <i>S. cerevisiae</i> se amplifica esta región del plásmido con la que se transformaron células competentes de la levadura.	De Antoni and Gallwitz, 2000. Proveído amablemente por el Dr. Paul Rosas Santiago
pSH47	Este plásmido tiene clonada una región que codifica para la recombinasa CRE. Esta enzima reconoce los sitios loxP y los recombina, en este proceso se elimina el cassette KANMX y la cepa puede utilizarse para eliminar otro gen.	De Antoni and Gallwitz, 2000. Proveído amablemente por el Dr. Paul Rosas Santiago

La cepa de *S. cerevisiae* W30301A se utilizó como cepa parental para generar la cepa productora de AcSUc (Tabla 6). Por otra parte, la cepa S288C se utilizó como control para los ensayos relacionados con la resistencia al pH ácido y ácido acético. A esta última se le extrajo ADN cromosomal que se usó como templado para los PCRs necesarios para construir el plásmido con la ruta reductiva.

Tabla 6. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* empleadas en esta tesis.

Cepa	Genotipo relevante	Descripción	Fuente
W3031-A	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15.</i>	Cepa de laboratorio. Tiene la mutación <i>ybp1-1 (I7L, F328V, K343E, N571D)</i> que suprime la función Ybp1p, aumentando la sensibilidad al estrés oxidativo.	Donada por el Dr. Ramón Suarez Rodríguez
SCW06	W3031-A <i>FUM1::LoxP</i> <i>PDC1::LoxP</i>	Se le eliminó el gen que codifica para la fumarasa mitocondrial y citosólica. También se le eliminó el gen que codifica para la isoenzima de la PIR con mayor nivel de expresión con glucosa como fuente de carbono.	Este estudio
SCW07	W3031-A <i>PDC1::LoxP</i> <i>pPDC5::KANMX</i>	Se le eliminó el gen que codifica para la isoenzima de la PIR con mayor nivel de expresión con glucosa como fuente de carbono. También se le eliminó parte del 5' del promotor que codifica para la otra isoenzima de la PIR carboxilasa que es activa con glucosa como fuente de carbono.	Este estudio
S288C	<i>MATa SUC2 gal2 mal2 mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6.</i>	Cepa modelo para proyectos de secuenciación masiva de ADN.	Cepario del laboratorio
TT23	Derivada de la S288C	Obtenida por un proceso de evolución adaptativa en laboratorio para tolerar temperaturas superiores a 39 C.	Caspeta et al. 2020
AT22	Derivada de la S288C	Obtenida por un proceso de evolución adaptativa en laboratorio para tolerar pH < 4.2 y concentraciones de AcAce mayores a 12 g/L	Salas-Navarrete et al., 2022
TAT12	Derivada de la cepa TT23 <i>RAS2</i>	Obtenida por un proceso de evolución adaptativa en laboratorio para tolerar pH < 4.2 y concentraciones de AcAce mayores a 12 g/L	Salas-Navarrete et al., 2022

6.2. Medios nutritivos definidos para de cultivo de *S. cerevisiae*

El medio de cultivo que se usó en este trabajo para las cinéticas de producción de AcSuc y para los ensayos de tolerancia al pH ácido y altas concentraciones de ácido acético es el medio definido DELFT. Este medio está formulado a base de sales, metales traza, vitaminas y glucosa como fuente de carbono. La composición del medio y las cantidades para la preparación de un litro se muestran en la **Tabla 7**.

Las soluciones de glucosa 100X, sales 4X y elementos traza 1000X se esterilizan por separado en una autoclave a 121°C y 15 libras/pulgada cuadrada (PSI), por 15 minutos. La solución de vitaminas 1000X se esteriliza por filtración con filtros de 0.2 µm. Los elementos traza se almacenan en un frasco ámbar porque algunos de sus componentes son fotosensibles.

Para algunos ensayos se utilizó ácido acético en diferentes concentraciones como fuente de carbono adicional y se ajustó el pH de acuerdo a las necesidades del ensayo con HCl 5 M.

Tabla 7. Componentes del medio definido DELFT.

Fórmula	Descripción	Cantidad
Glucosa 100X		10 mL
C ₆ H ₁₂ O ₆	Glucosa	200 g/L
Sales 4X (pH 6)		250 mL
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amonio	20 g/L
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio	15 g/L
MgSO ₄ *7H ₂ O	Sulfato de magnesio	2 g/L
Elementos traza 1000X (pH 4)		1 mL
EDTA	etilendiaminotetraacético	15 g/L
ZnSO ₄ 7H ₂ O	Sulfato de zinc	4.5 g/L
MnCl ₂ . 2H ₂ O	Cloruro Manganeso	0.84 g/L
CoCl ₂ . 6H ₂ O	Cloruro de cobalto	0.3 g/L
CuSO ₄ . 5H ₂ O	Sulfato de cobre	0.3 g/L
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	Molibdato de sodio	0.4 g/L
CaCl ₂ . 2H ₂ O	Cloruro de Calcio	4.5 g/L
FeSO ₄ . 7H ₂ O	Sulfato de hierro	3 g/L
H ₃ BO ₃	Ácido bórico	1.0 g/L
KI	Ioduro de potasio	0.10 g/L
Vitaminas 1000X (pH 6.5)		1 mL
	Biotina	0.05 g/L
	Ácido p-amino benzoico	0.2 g/L
	Ácido nicotínico	1 g/L

	Ca-pantotenato	1 g/L
	piridoxina-HCl	1 g/L
	tiamina-HCl	1 g/L
	myo-inositol	25 g/L
Agua estéril		Aforar a 1 L

Para la replicación de las cepas de *S. cerevisiae* en los protocolos de biología molecular utilizamos el medio complejo “extracto de levadura-peptona-dextrosa” o YPD (por sus siglas en inglés). Este medio contiene 20 g/L de peptona, 10 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de dextrosa y 15 g/L de agar en el caso de que se requiriera en sólido.

6.3. Estrategias para la construcción de cepas de *S. cerevisiae* productoras de AcSuc mediante la incorporación de una ruta heteróloga reductiva: cepas W3031A/pSAL4, SCW06/pSAL4 y SCW06/SCRED

La construcción del plásmido con la ruta reductiva se realizó mediante el método de recombinación homóloga reportado por **van Leeuwen et al. (2015)**. Los genes que codifican para la PIR carboxilasa, malato deshidrogenasa y la fumarato reductasa se amplificaron a partir del DNA cromosomal de la cepa de *S. cerevisiae* S288C. La fumarasa se amplificó a partir del DNA cromosomal de la cepa de *E. coli* JM107. En la **Tabla 4** se resumen los oligonucleótidos diseñados para construir la ruta reductiva de producción de AcSuc.

Con el plásmido generado se transformaron las cepas W3031A y su derivada SCW06 mediante el método de alta eficiencia de acetato de litio reportado por **Gietz & Schiestl (2008)**.

6.4. Cultivos de las cepas de *S. cerevisiae* W3031ApSAL4, SCW06/pSAL4 y SCW06/SCRED productoras de AcSuc.

El tren de cultivo se inició estriando cada una de las cepas en una caja de petri con 20 mL de medio sólido DELFT con 20 g/L de GLC como fuente de carbono. En estas cajas se adicionaron soluciones con los factores de crecimiento necesarios para complementar las auxotrofias de cada cepa (**Tabla 6**). Estas cajas se incubaron sin agitación a 30 °C entre 2 y 6 días, dependiendo de la cepa. A partir de una colonia aislada de cada cepa se inoculó un tubo de vidrio de 16x150 mm que contenía 4 mL del mismo medio donde venían cada una de las cepas. Estos tubos se incubaron en una agitadora orbital a 30 C y 250 RPM entre 2 y 4 días dependiendo de la cepa. Con el cultivo de cada cepa se inoculó un matraz con deflectores de 250 mL, en estos matraces se alicuotaron 50 mL de medio DELFT y se inocularon a 0.3 densidades ópticas medidas a 600 nm (DO₆₀₀). Los cultivos de producción de AcSuc se realizaron en medio DELFT

con pH 6 y 20 g/L de GLC. Este paso se realizó para adaptar el metabolismo celular al medio de cultivo y a las condiciones de oxigenación dentro del matraz. Para el experimento principal se utilizaron matraces con deflectores de 250 mL, en estos matraces se alicuotaron 50 mL de medio DELFT y se inocularon a 0.3 DO₆₀₀. Los cultivos principales se monitorearon entre 24 y 76 horas. Se midió el aumento de la biomasa celular indirectamente a través de la DO₆₀₀ y se tomó 0.1 mL del cultivo que se congeló a -20 C para analizarse posteriormente por cromatografía líquida de alta definición (HPLC). Con los resultados del HPLC se realizaron los cálculos de los parámetros cinéticos tal como los reportaron **Viladsen y sus colaboradores en el 2011**.

6.5. Simulaciones del metabolismo de la cepa productora de AcSuc

Para realizar las simulaciones del flujo metabólico global de *S. cerevisiae* se utilizarán las plataformas COBRApy y cameo (**Ebrahim et al., 2013; Cardoso et al. 2014**). Estas plataformas contienen diferentes métodos computacionales para realizar simulaciones utilizando modelos metabólicos a escala genómica (GEMs), así como herramientas de análisis y visualización de los resultados. En el presente trabajo se usó el GEM Yeast8 (**Lu et al., 2019**) para las simulaciones. Este y todos los GEMs se restringieron con los parámetros cinéticos como: velocidad específica de crecimiento, velocidad específica de consumo de GLC y las velocidades específicas de producción de los metabolitos de fermentación como ácidos orgánicos, glicerol, etanol, etc. Como control negativo se utilizó la cepa de *S. cerevisiae* W3031A transformada con el plásmido vacío. Una vez hechas estas restricciones se realizó un análisis del balance de los flujos metabólicos (FBA) utilizando la velocidad específica de crecimiento (μ) como función objetivo para inspeccionar los flujos que calcula el modelo. Posteriormente utilizamos el algoritmo de escaneo de flujos con base en un flujo reforzado o *Flux Scanning* basado en *Enforced Objective Flux* (**Park, et al. 2012**) para optimizar la producción de AcSuc. A partir de las simulaciones se identificaron blancos genéticos que potencialmente permiten redirigir el flujo de carbono hacia la producción de AcSuc.

6.6. Secuenciación de los genomas de las cepas evolucionas e ingeniería reversa para transferir mutaciones que ayuden a la cepa silvestre a tolerar pH bajo y altas concentraciones de AcAce

Las cepas tolerantes a temperaturas elevadas (TT23), concentraciones elevadas de ácido acético y pH ácido (AT22), y ambas condiciones (TAT12) fueron generadas en trabajos previos en el grupo. A estas cepas y su cepa parental S288C se les extrajo el ADN total con la metodología reportada por **Sambrook y Rusell (2000)**. Brevemente, éste método de extracción se basa en la digestión enzimática de la pared celular utilizando liticasa. Posteriormente los esferoplastos formados se lisan químicamente con dodecil sulfato de sodio (SDS). A continuación, el ADN total se precipitó con acetato de amonio y etanol absoluto. Las sales contenidas en la precipitación del ADN se eliminaron con etanol al 70 % y el DNA se secó en una centrífuga con vacío. Finalmente, el ADN se suspendió en TE pH 8 y se verificó su integridad y concentración.

El ADN obtenido mediante el método descrito se envió a secuenciar a la unidad de secuenciación masiva y bioinformática del Instituto de biotecnología UNAM. La secuenciación se realizó con la tecnología Miseq illumina® de lecturas de extremos pareados 2x75 pb. Esto fue seguido por un análisis de control de calidad inicial de las lecturas con el software FastQC versión 0.11.9. Se utilizó el software TrimGalore versión 0.6.5 para eliminar las secuencias del adaptador con los parámetros predeterminados para los datos de secuenciación pareada. Posteriormente repetimos el análisis de calidad con FastQC. Las lecturas se mapearon contra el genoma de referencia S288C utilizando MosaikAligner (Lee et. Al, 2014). El llamado de variantes se realizó con *Freebayes* y los datos obtenidos se filtraron con un puntaje de calidad > 54 con el módulo *Pandas* de Python. Los datos obtenidos se cargaron en la plataforma YeastMine de la base de datos Yeastgenome para caracterizar las mutaciones en las regiones genómicas de las cepas evolucionadas.

Para la cepa TAT12, algunas de las inserciones y deleciones (INDELs) y las variaciones simples de nucleótidos (SNVs) fueron validados por secuenciación de Sanger. Para comprobar que las mutaciones observadas en la doble evolucionada están relacionadas con el fenotipo ácido tolerante seleccionamos algunas de ellas para transferirlas a la cepa silvestre. A partir del genoma de la cepa TAT12 se amplificaron los genes candidatos y con este producto de PCR se transformó la cepa silvestre S288C. A partir de esta transformación se seleccionarán colonias aisladas que sean capaces de crecer en medios de cultivo con estrés por ácido y se volvieron a secuenciar por metodología de Sanger para determinar que la mutación que transferimos es la misma que la contenida en la cepa TAT12.

7. RESULTADOS

7.1. Construcción de una ruta reductiva para producir AcSuc en *S. cerevisiae*.

Para cumplir con el primer objetivo específico de este trabajo de tesis se clonaron los marcos de lectura de los genes *PYC2*, *MDH3*, *FRDS1* y *FUMC* que codifican para la piruvato carboxilasa, la malato deshidrogenasa, la fumarasa y la fumarato reductasa respectivamente. Estos se clonaron bajo el control del promotor constitutivo fuerte *TEF1* y el terminador *CYC1* (Figura 4). Debido al tamaño del marco de lectura del gen *PYC2* (3544 pb), éste se tuvo que ensamblar con el terminador *CYC1* por la metodología de overlap extension reportada en (Heckman & Pease, 2007). Antes de realizar la técnica de recombinación homóloga. Con estas clonaciones obtuvimos cuatro plásmidos individuales, cada uno con una unidad transcripcional independiente (Figura 4).

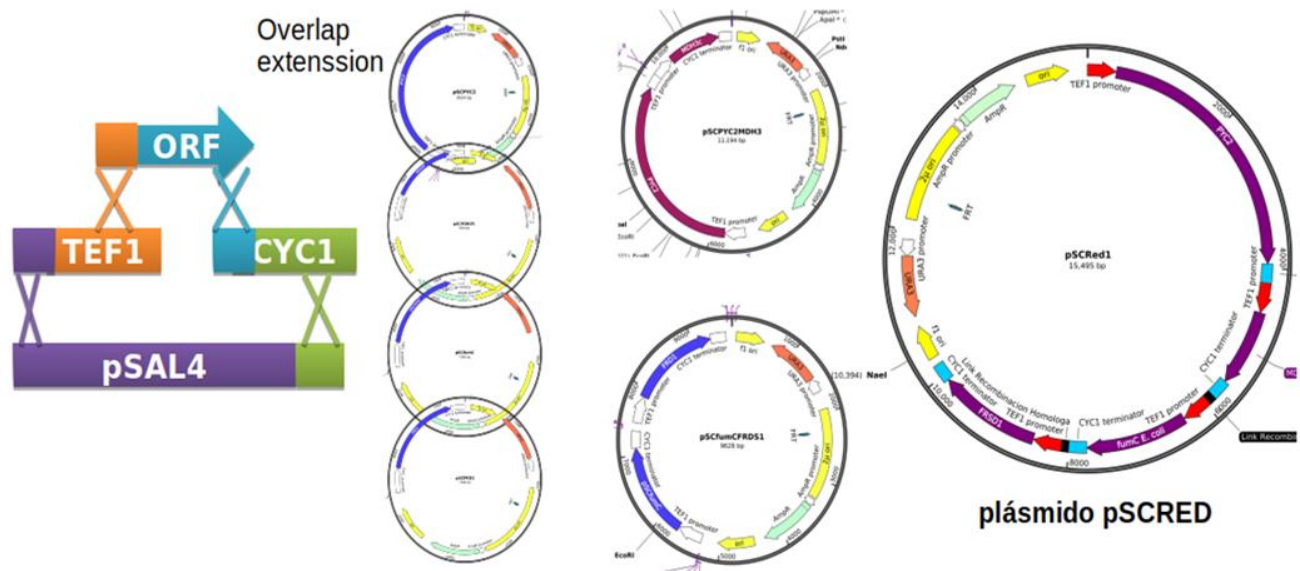


Figura 4. Obtención del plásmido pSCRED. Este plásmido contiene los genes de la vía reductiva de síntesis de AcSuc.

En un segundo paso de recombinación homóloga se unieron las unidades transcripcionales *TEF1-PYC2-CYC1/TEF1-MDH3-CYC1* y *TEF1-FUMC-CYC1/TEF1-FRDS1-CYC1* en plásmidos individuales. Finalmente, a partir de los plásmidos con dos unidades transcripcionales se construyó el plásmido con la ruta reductiva completa. A este plásmido se le denominó pSCRED (Figura 4).

7.2. Construcción de una doble mutante de *S. cerevisiae* para generar una cepa productora de AcSuc

La segunda parte del primer objetivo específico consistió en eliminar los genes *PDC1* y *FUM1* que codifican a la piruvato decarboxilasa y la fumarasa de la cepa W3031A mediante la metodología de CRE-loxP. Posteriormente se generó la cepa doble mutante W3031A *PDC1*::loxP, *FUM1*::loxP y la cual se denominó SCW06 (**Figura 5**).

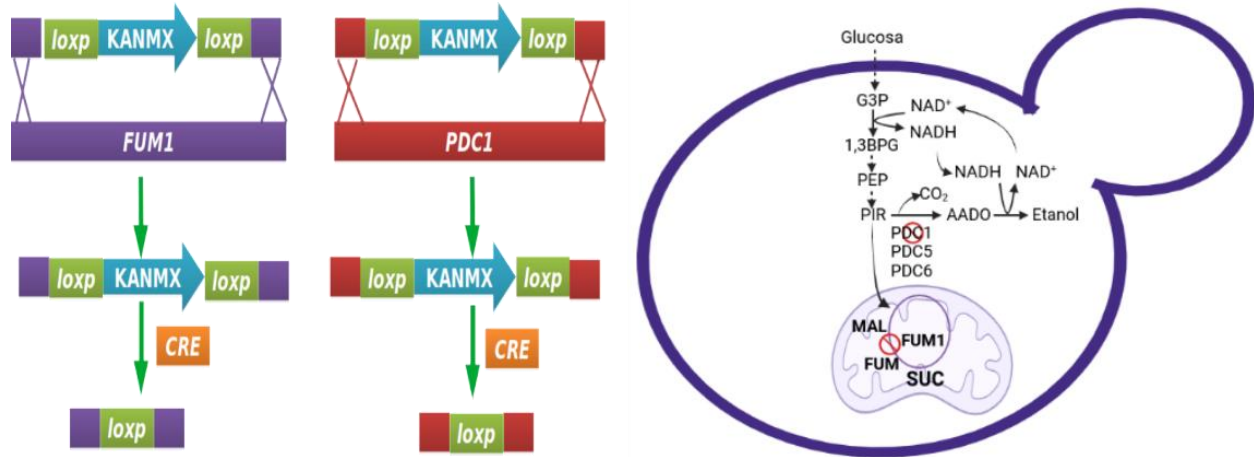


Figura 5. Estrategia general para la construcción de la ruta reductiva de producción de AcSuc.

7.3. Construcción de una cepa de *S. cerevisiae* productora de AcSuc

La cepa SCW06 se transformó con el plásmido pSCRED para generar la cepa SCW06/pSCRED (**Figura 6**). De esta cepa se esperaba atenuar la producción de etanol porque se eliminó el gen *PDC1*, el cual presenta la mayor actividad de piruvato carboxilasa de las tres enzimas que contiene *S. cerevisiae*. Además se esperaba que disminuyera la síntesis de malato a partir de fumarato, dada la eliminación de *FUM1*. Entonces, el fumarato se convertiría en succinato por la enzima *FRDS1*. Cabe destacar que la vía de síntesis se esperaba que operará en el citosol para evitar el transporte de succinato si este se sintetiza en algún organelo.

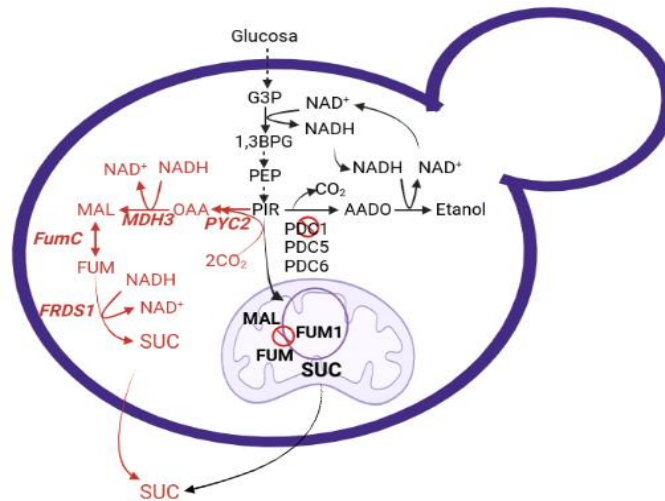
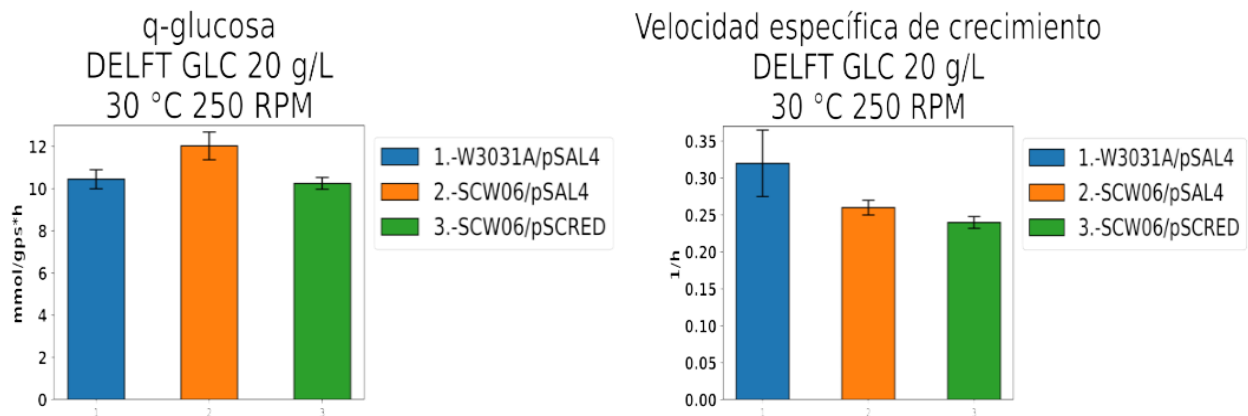


Figura 6. Esquema de la reconstrucción de los flujos metabólicos de la cepa SCW06/pSCRED para incrementar la síntesis de AcSUC por la vía reductiva.

7.4. Cultivos de producción de AcSUC con la cepa SCW06/pSCRED

La cepa SCW06/pSCRED se utilizó para la producción de AcSUC en cultivos tipo lote. Para esto se utilizó el medio mínimo DELFT con 20 g/L de GLC. Los cultivos se realizaron en matraces agitados a 30 °C y 250 RPM.

En la **Figura 7** se muestran las velocidades específicas de crecimiento (μ), consumo de glucosa (q_{GLC}) y producción de etanol (q_{ETOH}), glicerol (q_{GLY}), acetato (q_{ACE}) y succinato (q_{SUC}) de las cepas W3031A/pSAL4 (azul), SCW06/pSAL4 (naranja) y SCW06/pSCRED (verde).



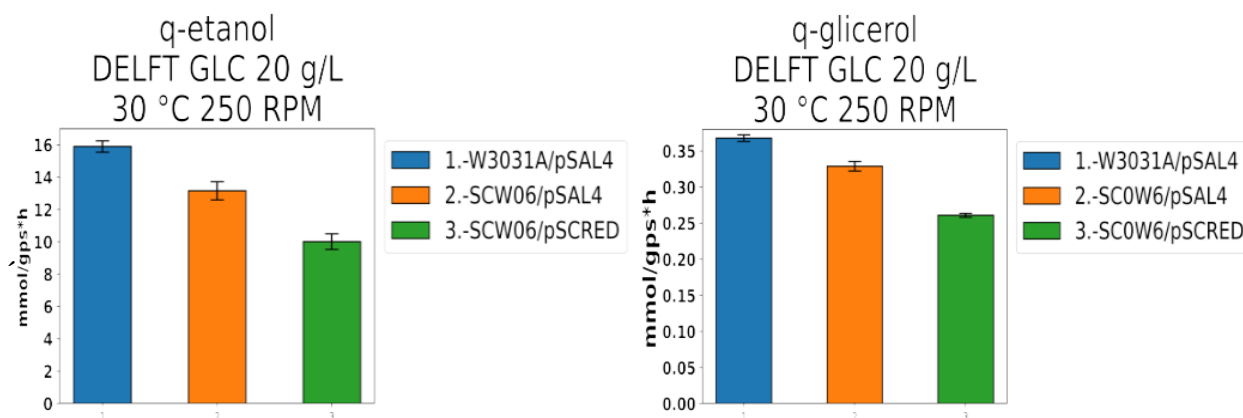


Figura 7. Parámetros cinéticos de la cepa productora de AcSuc mediante una ruta reductiva. El cultivo se hizo en medio mínimo con 20 g/L de GLC.

En esta figura se puede ver que la velocidad específica de producción de succinato pasó de cero, o imperceptible en la cepa de referencia transformada con el plásmido vacío (W3 031A/pSAL4) a 0.147 mmolSUC/gPSC/h en la cepa mutante en PDC1 y FUM1 transformada con el plásmido vacío (SCW06/pSAL4), y 0.266 mmolSUC/gPSC/h en la cepa mutante en PDC1 y FUM1 transformada con el plásmido que contiene la ruta reductiva de producción de AcSuc (SCW06/pSCRED).

En estos resultados también destaca que la velocidad específica de acumulación de etanol disminuyó en un 35.6 % en la cepa SCW06/pSCRED respecto a la cepa de referencia transformada con el plásmido vacío. Este resultado presuponía que la actividad de PDC1 mutada en el la cepa SCW06 estaba siendo reemplazada posiblemente por la actividad de PDC5.

La velocidad de acumulación de ácido acético aumentó alrededor de 10 veces en las cepas SCW06 con el plásmido vacío y el plásmido pSCRED. Siendo en este último 37% menor que en la cepa con el plásmido vacío. Este fue un resultado inesperado porque el ácido acético tiene un grado de óxido-reducción de 8, lo que significa que produce una molécula de NADH. La acumulación de este poder reductor junto con lo que se acumula en la glicólisis presupone una disminución en la velocidad de consumo de glucosa lo cual no ocurrió en las cepas SCW06/pSAL4 y SCW06/pSCRED. Parecía entonces que este poder reductor estaría siendo utilizado en la síntesis de AcSuc. Esto podría ocurrir por un incremento en las actividades de ALD4 y ALD5. Las isoenzimas ALD4 y ALD5 que catalizan la conversión de acetaldehído a acetato pueden utilizar NAD+ o NADP+ como cofactor y producir las respectivas versiones reducidas de estas moléculas. Este aumento en la producción de acetato podría ser una estrategia de la célula para generar poder reductor extra a los dos moles de NADH que se generan en la glucólisis.

En las cepas productoras de AcSuc también se observó la disminución en la velocidad específica de acumulación de glicerol. Ésta disminuyó un 12% en la cepa SCW06/pSAL4 y un 29 % en la cepa SCW06/pSCRED respecto a la cepa

control. Esto es interesante porque esta ruta consume la mayor parte del NADPH para balancear el menor estado de oxidorreducción de la biomasa, la cual disminuyó su velocidad de formación en estas dos cepas.

7.5. Modelado de escala genómica para diseñar nuevas estrategias para aumentar la producción de AS

7.5.1. Modificaciones iniciales del GEM Yeast8 para simular auxotrofias propias de la cepa W3031A

Los modelos del metabolismo a escala genómica funcionan con la premisa de que los organismos limitan sus flujos metabólicos de acuerdo a sus capacidades. Por lo que, para realizar las simulaciones para detectar posibles cambios en la cepa W3031A necesarios para aumentar la síntesis de AcSuc primero se adecuó el GEM Yeast8 a utilizarse con Cobrapy. Primero se establecieron las auxotrofias a triptófano (TRP), uracilo (URA), leucina (LEU), histidina (HIS) y adenina (ADE) en este GEM. El nuevo modelo con las auxotrofias se nombró Yeast8_W3031A_CSN. Sobre este modelo se simularon las eliminaciones cromosomales de los genes *PDC1* y *FUM1*, y esta segunda versión del modelo se le denominó Yeast8_SCW06_CSN. A continuación se simuló la sobreexpresión de las enzimas nativas PYC2, MDH3 y FRDS1. También se restringió la direccionalidad de los flujos a través de las reacciones catalizadas por éstas, para que el flujo de carbono a partir del piruvato forme un brazo reductor del TCA. Finalmente, le agregamos la reacción catalizada por la enzima FUMC de *E. coli* y restringimos el flujo de carbono hacia el sentido reductor. A esta última versión que se generó del modelo se nombró Yeast8_SCWRED_CSN.

7.5.2. Análisis del balance de flujos metabólicos con el modelo Yeast8_SCWRED_CSN

Para realizar los cálculos del balance de flujos metabólicos con los modelos Yeast8_W3031A_CSN, Yeast8_SCW06_CSN y Yeast8_SCWRED_CSN primero se restringieron los flujos de entrada de nutrientes para identificar que los cálculos se realizarán utilizando la formulación de un medio mínimo. Para simular la velocidad de consumo de los compuestos que complementan las auxotrofias utilizamos las reportadas previamente (**Agren et al., 2013**). Restringimos las simulaciones de las tres cepas con los datos cinéticos obtenidos de los cultivos en medio mínimo con 20 g/L de GLC como fuente de carbono (**Figura 7**). Una vez hechas estas restricciones se realizaron las simulaciones utilizando un FBA con la μ como función objetivo. Los resultados obtenidos de estas simulaciones se presentan en la **Tabla 8**.

Los resultados del FBA que se muestran en la **Tabla 8** indican que el modelo sólo es capaz de producir AcSuc con las dos mutaciones cromosomales y con la ruta reductiva, como se presenta en la cepa SCW06/pSCRED. La simulación con la doble mutante (SCW06/pSAL4) nos muestra que estas mutaciones no son suficientes para que el modelo asociado produzca AcSuc. Aunque el modelo predice la disminución en la velocidad de síntesis de etanol. Sin embargo, el modelo también predice que las cepas modificadas pueden acumular isobutanol y alcohol isopropílico en

lugar de succinato como sucede en la cepa SCW06/pSAL4. Esto sugiere un desbalance redox en el metabolismo simulado lo cual desemboca en la síntesis de estos alcoholes. No obstante, eso puede ocurrir en la cepa SCW06/pSAL4, esta parece derivar el poder redox hacia la síntesis de AcSuc (**Figura 7**). Esto es que, el modelo predice que es más eficiente el desvío de NADH hacia la síntesis de estos alcoholes que hacía AcSuc.

Tabla 8. Resultados del análisis de flujos metabólicos generados con los GEMs Yeast8_W3031A_CSN, Yeast8_SCW06_CSN y Yeast8_SCWRED_CSN. Las unidades de los flujos son mmol/gps/h.

Flujos de entrada		Flujos de salida		Función objetivo	
W3031A/pSAL4					
Identificador	Flujo (mmol/gps*h)	Identificador	Flujo (mmol/gps*h)	Identificador	Flujo (mmol/gps*h)
GLC_e	11.53	CO2_e	23.38	biomass	0.29
O2_e	4.51	EtOH_e	17.50	-	-
H_e	1.66	H2O_e	8.57	-	-
L_Leu_e	1.66	s_0235_e	1.56	-	-
-	-	GLY_e	0.27	-	-
SCW06/pSAL4					
Identificador	Flujo (mmol/gps*h)	Identificador	Flujo (mmol/gps*h)	Identificador	Flujo (mmol/gps*h)
GLC_e	11.53	CO2_e	20.95	biomass	0.32
O2_e	2.50	EtOH_e	12.98	-	-
H_e	1.68	H2O_e	7.48	-	-
L_Leu_e	1.66	IsoBut_e	2.10	-	-
-	-	formate_e	1.86	-	-
-	-	IsoOH_e	1.54	-	-
-	-	GLY_e	0.27	-	-
SCW06/pSCRED					
Identificador	Flujo (mmol/gps*h)	Identificador	Flujo (mmol/gps*h)	Identificador	Flujo (mmol/gps*h)

GLC_e	11.53	CO2_e	13.94	biomass	0.31
O2_e	2.50	EtOH_e	12.84	-	-
H_e	1.67	H2O_e	6.16	-	-
L_Leu_e	1.66	formate_e	3.61	-	-
-	-	SUCC_e		-	-
-	-	IsoOH_e	1.54	-	-
-	-	GLY_e	0.27	-	-
-	-	PYR_e	0.15	-	-

7.5.3. Análisis del modelo Yeast8_SCWRED_CSN con la herramienta flux-phase plane

Entonces, las actividades de deshidrogenasa asociadas a la síntesis de alcoholes parecía ser más eficiente en el uso de poder reductor para mantener el crecimiento como función objetivo. A continuación se realizó un análisis de superficie de respuesta en el que le pedimos a cada uno de los modelos que nos mostrará cómo cambia la velocidad de producción de AcSuc respecto al cambio en las velocidades de las reacciones catalizadas por la G3P-deshidrogenasa y la alcohol-deshidrogenasa (**Figura 8**).

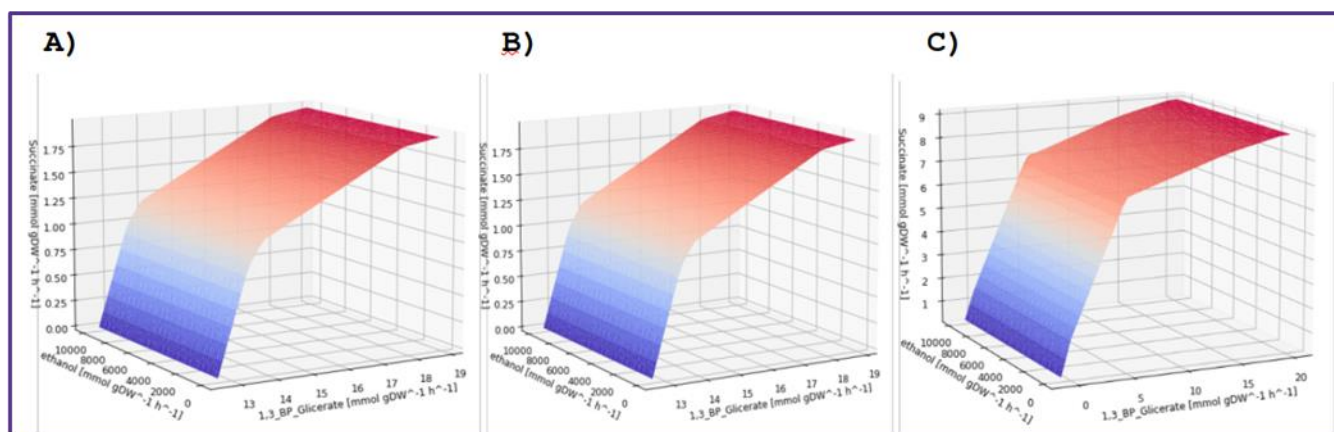


Figura 8. Análisis de plano fase del cambio de la velocidad de producción de AcSuc respecto al cambio en las velocidades de producción de etanol y 1,3-BP-glicerato. A) W3031A/pSAL4, B) SCW06/pSAL4 y C) SCW06/pSCRED.

Este resultado nos mostró que la velocidad de producción de AcSuc puede ser cuatro veces más alta con la cepa SCW06/pSCRED si se aumenta la velocidad de la 1,3-BP-glicerato hasta 19 mmol_{SUC}/g_{PSC}/h. También llamó la

atención el hecho de que el análisis de superficie de respuesta con las dos variables indicaba que la producción de AcSuc sólo se afectaba por la velocidad de la 1,4-BP-glicerato sintasa pero no se veía afectada por la velocidad de la alcohol-deshidrogenasa, ya que este resultado es contraintuitivo.

7.5.4. Análisis del modelo Yeast8_SCWRED_CSN con la herramienta FSEOF

Por otra parte, con los parámetros cinéticos del cultivo con 20 g/L de GLC se realizó un análisis “Flux Scanning based on Enforced Objective Flux” (FSEOF), el cual viene precargado en el módulo cameo que corre junto con cobrapy. La característica principal de este método de optimización es que puede definirse una función objetivo primaria y una función objetivo reforzadora. Esto permite optimizar la producción de un metabolito y evitar que el modelo asigne un valor de cero a la reacción que simula el crecimiento. En este caso usamos la reacción de biomasa como objetivo primario y la reacción de producción de AcSuc como objetivo reforzado. Esta herramienta de optimización nos dice que para aumentar la velocidad de producción de AcSuc debemos disminuir la velocidad de la alcohol-deshidrogenasa 62 % (Figura 9).

Este resultado es muy interesante, ya que nos dice que la μ de la cepa SCW06/pSCRED puede mantenerse en 0.31 y que la q_{SUC} puede pasar de 1 a 9 mmol_{SUC}/g_{PSC}/h si se disminuye el flujo de carbono hacia la producción de etanol en 62 %. Esto abre la posibilidad de modular la expresión de los genes que codifican para las enzimas de la ruta de etanol y aumentar la producción de AcSuc.

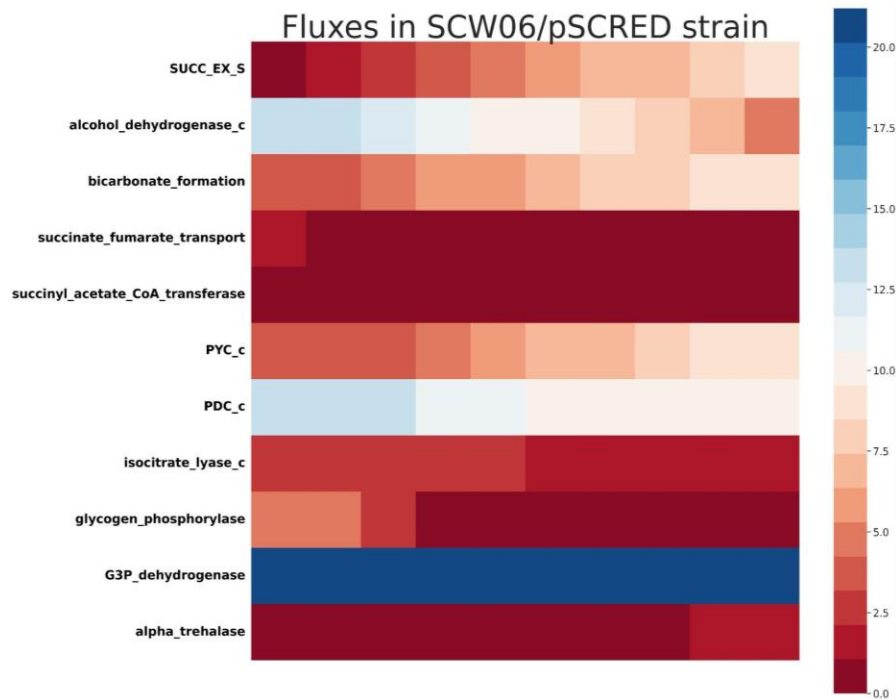


Figura 9. Resultados principales del análisis de flujos metabólicos con la herramienta de optimización FSEOF.

7.5.5. Aplicación de las estrategias obtenidas a partir del modelado con los GEMs que generamos

Una estrategia sencilla para aumentar la velocidad de la G3P-deshidrogenasa es aumentar la velocidad de la glucólisis. Esto se puede lograr aumentando la velocidad específica de consumo de GLC, por lo que la siguiente estrategia fue aumentar la concentración de GLC en el medio de cultivo para aumentar la q_{GLC} . Con esta estrategia se incrementó en un 59.8 % la velocidad específica de consumo de GLC de la cepa SCW06/pSCRED respecto al cultivo con 20 g/L de GLC (**Figura 10**). La cepa WSC06 con el plásmido pSAL4 también incrementó su velocidad de consumo de glucosa en un 40% respecto a la control con el plásmido vacío y en un 18% con respecto a su cultivo en 2% de glucosa (**Figura 7**). La cepa control, W3031A con el plásmido pSCRED, la SCW06 con el plásmido vacío y la cepa SCW06/pSCRED disminuyeron la velocidad específica de acumulación de etanol en un 40% respecto a la cepa control, cuando estas se cultivaron con 50 g/L de glucosa. Una disminución semejante también es observada con respecto a los cultivos con 2% de glucosa.

En los cultivos a 5% de glucosa también se observó un incremento en la acumulación de ácido acético en la cepa SCW06/pSCRED el cual fue de un 45% respecto a las otras cepas, las cuales mostraron velocidades de acumulación de etanol semejantes. Estas velocidades se asemejan a la velocidad de la cepa SCW06/pSCRED en 2% de glucosa.

La velocidad específica de acumulación de piruvato fue mayor en las cepas SCW06 con el plásmido pSCRED y vacío. Lo cual se esperaba ya que estas cepas tienen mutado el gen *PDC1* el cual codifica para la piruvato descarboxilasa. Llama la atención que la cepa con el plásmido pSCRED acumuló piruvato a una velocidad muy baja. Esto sugería que la actividad de la piruvato carboxilasa, codificada en el gen *PYR2*, contenida en el plásmido pSCRED era significativa para competir con *PDC1* de la cepa control. Esto se vio reflejado en una mayor velocidad de acumulación de oxaloacetato y malato que la cepa SCW06 sin el plásmido pSCRED.

La velocidad de formación de oxaloacetato se vio mayormente incrementada en la cepa SCW06/pSCRED. Esta alcanzó velocidades alrededor de tres veces mayores a las de las otras cepas. La velocidad de acumulación de ácido málico fue mayor en la cepa W3031A con el plásmido pSCRED. Esta cepa, al no contar con la mutación en el gen *FUM1*, el cual codifica para la enzima que convierte el fumarato en malato, acumula preferente este último metabolito.

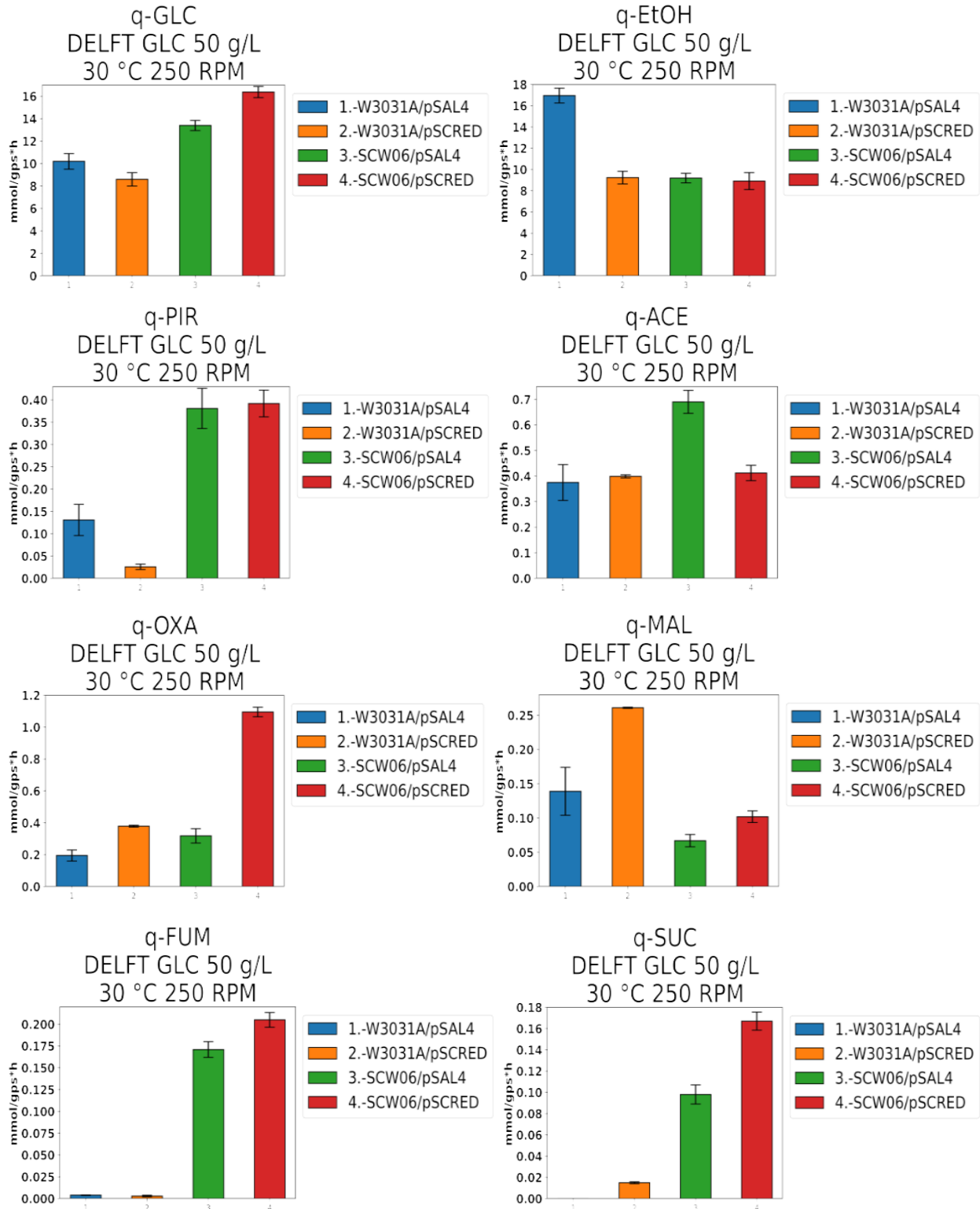


Figura 10. Parámetros cinéticos de la cepa productora de AcSuc mediante una ruta reductiva. El cultivo se hizo en medio mínimo con 50 g/L de GLC con las cepas W3031A/pSal4 (barra azul), W3031A/pSCRED (barra naranja), WSC06/pSAL4 (barra verde) y WSC06pSCRED (barra roja).

De hecho, la mutación en FUM1 parece ser la responsable de una mayor velocidad de acumulación de fumarato y succinato en las cepas SCW06 con el plásmido de la ruta reductiva (SCW06/pSCRED) y sin el (SCW06/pSAL4). Estas dos cepas fueron prácticamente las únicas que sintetizaron fumarato y succinato de forma significativa.

7.6. Disminución de la actividad de PDC5 en la cepa SCW06/pSCRED

Aunque con el incremento en la velocidad de consumo de glucosa se logró aumentar la rapidez de la acumulación de succinato en un 50% (de 0.25 a 0.38 mmol_{SUC}/g_{PSU}/h), esto aún representaba una concentración de alrededor de 1 g/L de AcSuc. Recordar que la formación de este ácido depende de la disponibilidad de NADH, el cual aún estaba siendo principalmente utilizado en la síntesis de etanol. Esto también se puede deducir de la disponibilidad de fumarato que se observaban en los cultivos con las cepas WSC06/pSAL4 y WSC06pSCRED.

Dado que la cepa WSC06 tenía mutado PDC1, la actividad debería provenir de la piruvato decarboxilasa, isoenzima 5 (PDC5). Por lo que, para disminuir la velocidad de producción de etanol decidimos truncar el promotor del gen PDC5. Con esto esperábamos modular la expresión de este gen para modular la actividad de la piruvato descarboxilasa y lograr un efecto análogo al que nos sugería el modelo. Para hacer esta mutación diseñamos dos versiones del oligonucleótido reverso (**Figura 11**) para tener dos versiones de la mutación con distinto nivel de severidad.

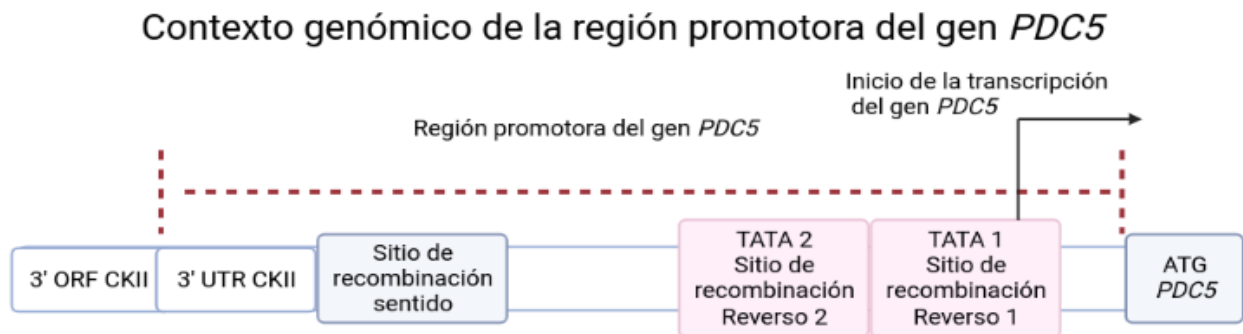


Figura 11. Diseño de dos estrategias para truncar el promotor del gen *PDC5*.

La mutación menos severa se realizó en la cepa que tenía eliminado el gen PDC1 solamente. Con esto generamos la cepa W3031A PDC1::FRT PDC5pV2::KANMX. Estas eliminaciones generan un fenotipo GLC-, es decir, esta cepa no es capaz de crecer con glucosa como única fuente de carbono (**Hohmann, 1991**). Con esta cepa se realizó un ensayo de evolución adaptativa (**Figura 12**) el cual inició en un medio con 40 g/L de peptona, 20 g/L de extracto de levadura y 20 g/L de glucosa. Durante los primeros cuatro pases se centrifugó toda la biomasa contenida en el tubo de cada pase, aproximadamente 0.5 DO. En el quinto pase la DO aumentó visiblemente (no se midió). El pase 6 se inoculó con una dilución 1:10 de la biomasa del pase 5, y esta dilución se continuó del pase 6 al 14. Asimismo, a partir

del pase 6 el medio de cultivo tuvo una composición de 20 g/L de peptona, 10 g/L de extracto de levadura y 20 g/L de glucosa.

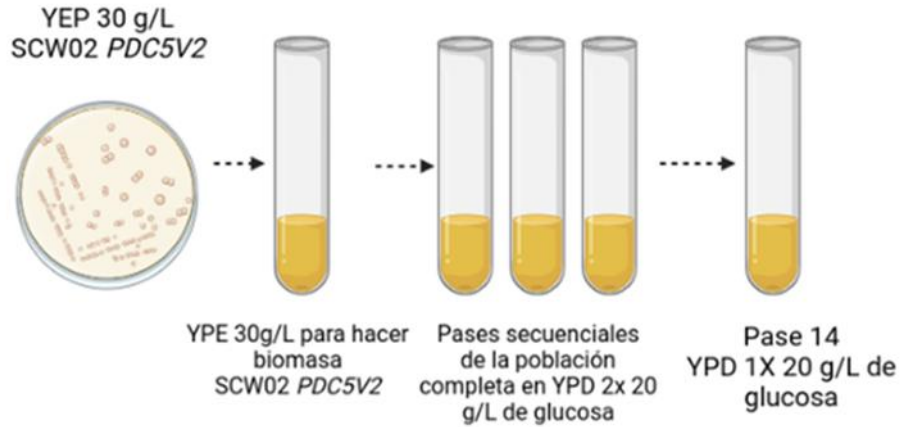


Figura 12. Proceso de evolución adaptativa para recuperar el fenotipo GLC+ en la cepa SCW02PDC5V2::KANMX.

Se hizo un glicerol de la población en algunos de los pases, incluyendo la población del pase 14. También se sembró la población en una caja con medio YPD 1X, se seleccionó la colonia más grande y se guardó en glicerol. Con esta cepa se inició un cultivo en medio YPD 1X y se monitoreó la biomasa, el consumo de glucosa y la producción de metabolitos (**Figura 13**).

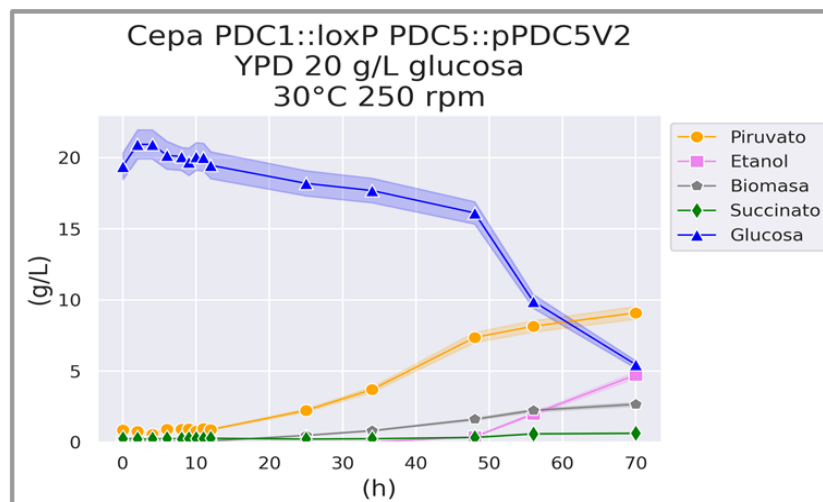


Figura 13. Comportamiento cinético de la producción de AcSc, ácidos orgánicos totales y etanol en la cepa SCW02PDC5V2::KANMX.

El título de ácido succínico que se obtiene a la hora 70 es de 0.60 g/L. Es importante destacar que este título es uno de los más elevados que hemos obtenido en el presente trabajo y con un número de intervenciones moleculares menor que en otras estrategias que hemos aplicado. En segundo lugar, debemos resaltar que en esta cepa el rendimiento de ácido orgánicos totales (ORGT) es de 0.88 g_{ORGT}/g_{GLC} y el de etanol es de 0.28 g_{EiOH}/g_{GLC}. Es de particular interés que el título de ácido pirúvico es de 8.65 g/L, y representa un rendimiento de 0.65 g_{PIR}/g_{GLC}.

Con esto hemos conseguido cambiar la proporción de los productos de la fermentación ácido mixta. Lo que implica que el metabolismo del poder reductor en esta levadura se ha modificado sustancialmente, y el acetaldehído ha dejado de ser el aceptor final de electrones del NADH generado en la glicólisis. Por otra parte, transferimos esta mutación a la cepa SCW06/pSCRED2, sin embargo no se logró que creciera en medio mínimo con glucosas como única fuente de carbono, esta cepa logra crecer sólo en medio YPD.

7.7. Balance redox

Para determinar si las estrategias de producción de AsSc que implementamos estaban redirigiendo el poder reductor hacia la formación de este compuesto realizamos un balance redox. Este balance se realiza calculando los rendimientos c-mol-compuesto/c-mol-glucosa y este rendimiento se multiplica por el estado de reducción del propio compuesto (Villadsen et. al., 2011).

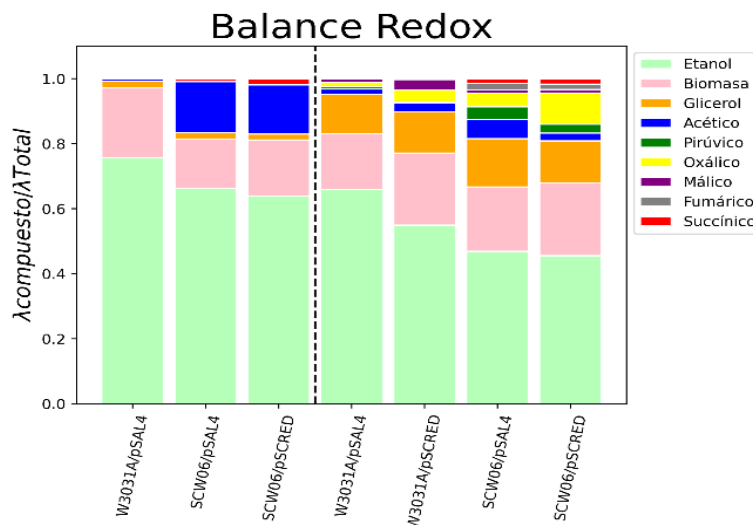


Figura 14. Balance redox de los metabolitos secretados por cada una de las cepas que se probaron para la producción de AsSc.

En la FIGURA 14 podemos observar que con cada estrategia de ingeniería metabólica que probamos se desviaba una parte del poder reductor hacia la síntesis de ácidos orgánicos. Esto nos demuestra que la hipótesis de nuestro trabajo es verdadera. Es decir, es posible redirigir el poder reductor que normalmente se consume en la ruta de etanol hacia la

síntesis de AcSc, aunque como también podemos observar en la **FIGURA 14**, parte del poder reductor se queda en algunos de los intermediarios de la ruta reductora de biosíntesis de AcSc.

7.8. Tolerancia al pH ácido

De forma paralela al desarrollo de las cepas productoras de AcSuc se realizó el análisis genómico de las cepas tolerantes a elevada temperatura (TTY23), pH ácido y ácido acético (AT22), y la combinación de ambas (TAT12). El objeto de éste fue detectar las modificaciones genéticas que daban origen a la tolerancia de estas cepas. Estas mutaciones fueron transferidas a la cepa parental S288C para generar tolerancia en esta cepa. A esta estrategia se le conoce como ingeniería inversa. El propósito final es generar cepas productoras de AcSuc que puedan acumular este ácido en cultivos con pH ácido menor al pKa del ácido (4.23).

Los resultados que se presentan en esta sección es un resumen de los resultados reportados en la publicación “*Evolutionary and reverse engineering to increase Saccharomyces cerevisiae tolerance to acetic acid, acidic pH, and high temperature*” publicados en la revista Applied Microbiology and Biotechnology (<https://doi.org/10.1007/s00253-021-11730-z>). En esta publicación se puede consultar la información completa y detallada sobre los análisis.

7.8.1. Análisis genómico de cepas tolerantes a ambientes termo-ácidos

Más del 90% de las lecturas de las cepas AT22 y TAT12 tuvieron un valor de calidad Q mayor a 34 y más del 90% de las lecturas de la cepa TT23 tuvieron un valor de calidad Q mayor a 30. Cada muestra proporcionó más de 3 millones de lecturas mapeables, lo que proporcionó una cobertura del genoma superior a 80x para todas las cepas. El criterio que se usó para la selección de las mutaciones es una visión de biología de sistemas en la que se hace una jerarquía de los procesos celulares. En esta jerarquía se propone que las rutas de señalización detectan el estrés ambiental, pasan la señal a las redes de transcripción-regulación para desencadenar una respuesta, y es el metabolismo que finalmente cambia para enfrentar la condición estresante. Basados en lo anterior, buscamos primero mutaciones en genes que codifican proteínas involucradas en señalización y en proteínas que se localizan en la membrana, ya que éstas también están en contacto físico con el ambiente. Posteriormente, nos concentramos en la **Tabla 9** factores de transcripción y en genes que codifican para enzimas relacionadas con el metabolismo vacuolar. La **Tabla 9** muestra un resumen de los genes, las mutaciones generadas, el cambio en los codones y el cambio en el nivel de transcripción respecto a la cepa silvestre.

Tabla 9. Genes candidatos para pasar las mutaciones de la cepa TAT12 a la cepa silvestre. Se muestran las características principales de cada uno.

Gen	Nucleótidos		Aminoácidos		Cambio en la expresión
	SC288C	TAT12	SC288C	TAT12	
Señalización					
<i>GPA2</i>	G	T	L(0.06)CUC	L(0.13)CUU	1.7
<i>RAS2</i>	GTTTTTTC	GTTTTTTC	3'UTR	3'UTR	-1.8
<i>GSP2</i>	T	A	Promotor	Promotor	0.4
<i>YPT52</i>	C	T	Promotor	Promotor	-1.6
Transcripción					
<i>SUM1</i>	T	A	S(0.16)AGU	C(0.63)UGU	-1.1
<i>HSF1</i>	T	A	3' UTR	3' UTR	1.3
<i>CAT8</i>	A	T	Promotor	Promotor	
Transporte					
<i>RTC2</i>	T	C	I(0.46)AUU	T(0.35)ACU	-2.4
<i>JEN1</i>	C	A	F(0.41)UUC	L(0.28)UUA	0.9
<i>AQY3</i>	TAA	TA	L TTA	* TAA	1.9
<i>ECM3</i>	C	A	S(0.16)UCC	S(0.21)UCA	-0.8
<i>HXT3</i>	C	A	S(0.21)UCA	N(0.59)AAU	-1.5
<i>PHO90</i>	A	G	N(0.41)AAC	D(0.35)GAC	0.7
<i>SLY41</i>	TAT	TT	-	-	1.2
<i>ATG27</i>	C	A	-	-	-0.6
Vacuola					
<i>VMA2</i>	A	G	A(0.38)GCU	A(0.22)GCC	1.7

De las mutaciones descritas en la **Tabla 9** se eligieron 4 genes para realizar la ingeniería inversa de la cepa S288C: *VMA2*, el cual codifica para la subunidad B del dominio membranal de la H⁺-ATPase vacuolar; *YPT52*, el cual es una GTPase requerida para la selección de proteínas transportadas a la vacuola; *RAS2* y *GPA2* involucradas en la señalización por glucosa. Estas últimas están implicadas en la regulación de la glicólisis y el metabolismo fermentativo, así como la activación de las respuestas al estrés.

Se sintetizaron oligos para los genes: *VMA2*, *YPT52*, *RAS2* y *GPA2*. Extrajimos DNA cromosomal de la TAT12 e hicimos los PCRs de estos genes. Posteriormente los transformamos en la cepa S288C y seleccionamos 10 candidatas que mostraron un fenotipo resistente a pH 3 y 2 g/L de ácido acético y 50 uL de HCl 1M (**Tabla 10**).

Tabla 10. Biomasa alcanzado en 48 horas por las poblaciones transformadas con los genes amplificados a partir de la cepa TAT12.

	S288C	Población 1	Población 2	Población 3
4 mL DELFT pH 3, GLC 20 g/L, AcAce 2 g/L, 50 μ L HCl 1M	2.84 DO ₆₀₀	1.92 DO ₆₀₀	2.61 DO ₆₀₀	1.88 DO ₆₀₀
4 mL DELFT pH 3, GLC 20 g/L, AcAce 2 g/L, 100 μ L HCl 1M	1.24 DO ₆₀₀	1.51 DO ₆₀₀	1.91 DO ₆₀₀	1.49 DO ₆₀₀
4 mL DELFT pH 3, GLC 20 g/L, AcAce 2 g/L, 200 μ L HCl 1M	0.01 DO ₆₀₀	0.02 DO ₆₀₀	0.01 DO ₆₀₀	0.01 DO ₆₀₀

A continuación caracterizamos estas cepas en cultivos con medio DELFT con 20 g/L de glucosa, 2 g/L de ácido acético y pH3. En la **Figura 15** se observan los pases que realizamos en la condición estresante para alcanzar un estado estacionario en la velocidad específica de crecimiento. Cabe destacar que la cepa silvestre no resiste esta condición de estrés. También podemos notar que las candidatas 2 y 6 son las que resisten mejor esta condición.

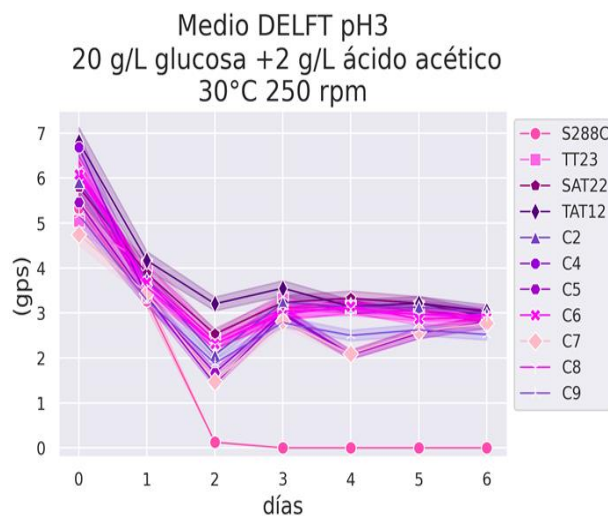


Figura 15. Adaptación de la biomasa de las cepas candidatas a la condición de estrés.

Una vez que estas cepas alcanzaron el estado estacionario realizamos cultivos en matraz para determinar la velocidad específica de crecimiento de cada una (**Figura 16**).

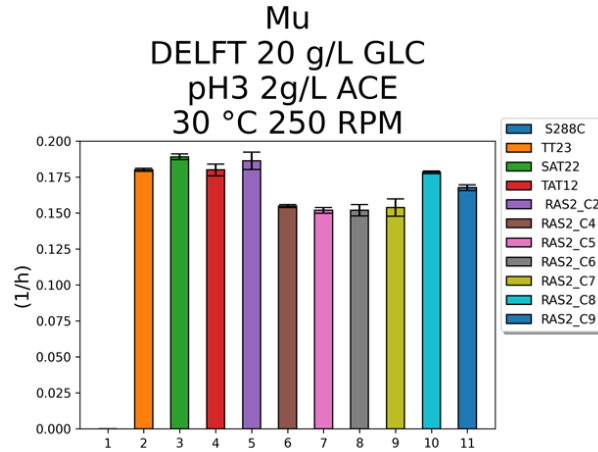


Figura 16. Velocidad específica de crecimiento de las cepas candidatas y las cepas control.

Ya que demostramos que estas candidatas resistían el pH 3 y 2 g/L de ácido acético secuenciamos los genes en las cepas candidatas. Los datos de secuenciación Sanger mostraron que la única mutación que se transfirió de la cepa TAT12 a las candidatas es la inserción en el 3'UTR del gen RAS2 (**Figura 17**).

```

Query  239  GTAAAGGaaaaaaCAAACAACATCGCTATAACATAAAAATTGGACATTGCAGAGAGTCAT 298
                |||
Sbjct  277  GTAAAGG-AAAAAACAAACAACATCGCTATAACATAAAAATTGGACATTGCAGAGAGTCAT 335
    
```

Figura 17. Alineamiento de la secuencia de la candidata C2 contra la secuencia del gen silvestre.

En este sentido, caracterizamos las candidatas 2 y 6 en medio DELFT con 20 g/L de glucosa a pH 6 y 39 °C. De la misma manera que la condición de estrés por ácido y pH hicimos pases hasta que la velocidad específica de crecimiento alcanzó un estado estacionario y realizamos cultivos en matraz. Los resultados de estos cultivos nos muestran que las cepas candidatas tienen la misma velocidad específica de crecimiento que la cepa silvestre (**Figura 18**).

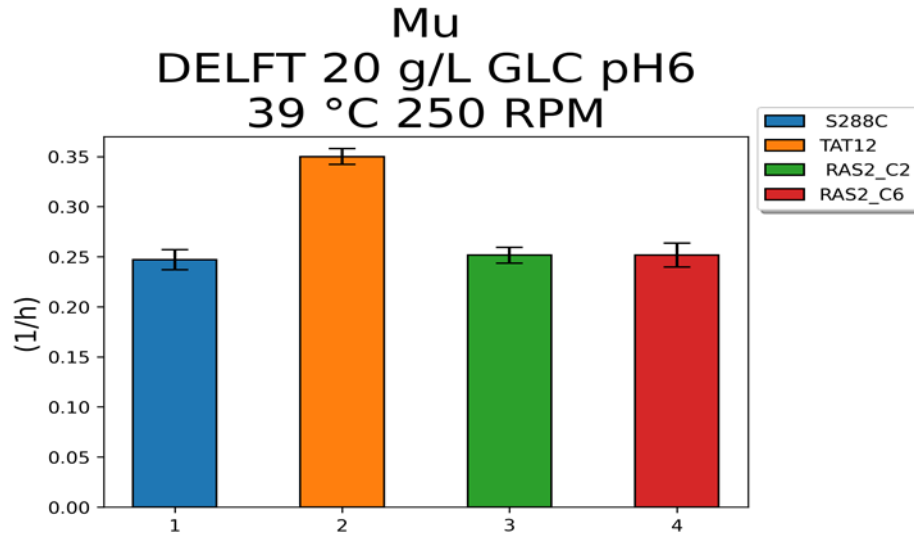


Figura 18. Velocidad específica de crecimiento de las cepas candidatas en medio DELFT con 20 g/L de glucosa pH 6 y 39 °C.

Con estos resultados podemos concluir que la mutación en el gen *RAS2* es específica para la tolerancia a pH bajo y altas concentraciones de ácido. Esta mutación puede transferirse a cualquier cepa productora de ácido succínico y caracterizarla en un medio con pH menor al del pKa del ácido succínico.

8. CONCLUSIONES

Las mutaciones en los genes *PDC1* y *FUM1* en la cepa SCW06 fueron suficientes para redistribuir parte del poder reductor, desde las reacciones para la síntesis del acetaldehído y etanol a las conversión de piruvato a metabolitos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Cabe destacar que el consumo de glucosa no disminuyó en SCW06 a pesar del decremento en la velocidad de síntesis de etanol.

El potencial incremento del flujo de poder reductor asociado con el aumento en el consumo de glucosa de las cepas con fondo genético SCW06 favoreció el incremento de la velocidad de síntesis de los metabolitos del TCA y formación de piruvato. La mayor rapidez con la que el oxalacetato se acumuló sugiere una limitación en la generación de poder reductor.

La eliminación de la región promotora del gen *PDC5*, si bien fue suficiente para abatir la síntesis de etanol e incrementar considerablemente la formación de piruvato y succinato, ocasionó una disminución drástica en el consumo de glucosa y el crecimiento de la cepa mutante SCW02PDC5V2::KANMX.

El cambio en la secuencia de la región no traducible del extremo 5' del gen *RAS2* fue suficiente para generar tolerancia a ambientes ácidos en la cepa control W3031A.

9. PERSPECTIVAS

Incrementar la disponibilidad de poder reductor mediante el consumo de formato y glucosa.

Incorporar el plásmido pSCRED en la cepa SCW02PDC5V2::KANMX. Esto posiblemente favorezca el consumo de poder reductor para la producción de succinato y restablezca la velocidad de consumo de glucosa.

Evolucionar la cepa SCW02PDC5V2::KANMX para incrementar su consumo de glucosa en medio mínimo.

10. PRODUCTOS GENERADOS EN ESTE TRABAJO DE TESIS

Artículos:

- 1) Salas-Navarrete PC, de Oca Miranda AIM, Martínez A, Caspeta L. 2022. Evolutionary and reverse engineering to increase *Saccharomyces cerevisiae* tolerance to acetic acid, acidic pH, and high temperature. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **106**:383–399. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-021-11730-z>.
- 2) Salas-Navarrete PC, Rosas-Santiago P, Martínez A, Caspeta L. 2022. Adaptive responses of evolved *Saccharomyces cerevisiae* strains tolerant to acidic pH, acetic acid, and supraoptimal temperature---. Enviado

Capítulos de libro:

- 1) Caspeta L, Salas-Navarrete PC. 2021. Reduction of the *Saccharomyces cerevisiae* Genome: Challenges and Perspectives. *Minimal Cells: Design, Construction, Biotechnological Applications*, 117-139

BIBLIOGRAFÍA

- Chundawat, S. P., Beckham, G. T., Himmel, M.E., & Dale, B.E. (2011). Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. *Annu Rev Chem Biomol Eng* 2, 121–45.
- McKendry P. (2002). Energy production from biomass (Part 1): Overview of biomass. *Bioresource technology*, 83(1), 37–46. [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(01\)00118-3](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(01)00118-3)
- Kim, S. R., Ha, S. J., Wei, N., Oh, E. J., & Jin, Y. S. (2012). Simultaneous co-fermentation of mixed sugars: a promising strategy for producing cellulosic ethanol. *Trends in biotechnology*, 30(5), 274–282. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.01.005>
- Kang, N. K., Lee, J.W., Ort, D. R., & Jin, Y.-S. (2021). L-malic acid production from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. J.*, e2000431. <https://doi.org/10.1002/biot.202000431>
- Kricka, W., Fitzpatrick, J., & Bond, U. (2015). Challenges for the production of bioethanol from biomass using recombinant yeasts. *Advances in applied microbiology*, 92, 89–125. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2015.02.003>
- Kwak, S., and Jin, Y. S. (2017). Production of fuels and chemicals from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: a review and perspective. *Microb. Cell Fact.* 16:82. doi: 10.1186/s12934-017-0694-9
- Bruinenberg, P. M., Debot, P. H. M., Vandijken, J. P., Scheffers, W. A. (1983). The role of redox balances in the anaerobic fermentation of xylose by yeasts. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18, 287–292.
- Lee, S. M., Jellison, T., & Alper, H. S. (2014). Systematic and evolutionary engineering of a xylose isomerase-based pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for efficient conversion yields. *Biotechnology for biofuels*, 7(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0122-x>
- Kuypers, M., Harhangi, H., Stave, A., Winkler, A., Jetten, M., Delaat, W., Denridder, J., Opdecamp, H., Vandijken, J., Pronk, J. (2003). High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*? *FEMS Yeast Res.* 4, 69–78.
- Ko, J. K., & Lee, S. M. (2018). Advances in cellulosic conversion to fuels: engineering yeasts for cellulosic bioethanol and biodiesel production. *Current opinion in biotechnology*, 50, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.11.007>
- Gancedo J. M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 62(2), 334–361. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.2.334-361.1998>
- Farwick, A., Bruder, S., Schadeweg, V., Oreb, M., & Boles, E. (2014). Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(14), 5159–5164. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323464111>

- Sedlak, M., Edenberg, H. J., & Ho, N. W. (2003). DNA microarray analysis of the expression of the genes encoding the major enzymes in ethanol production during glucose and xylose co-fermentation by metabolically engineered *Saccharomyces* yeast. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(1), 19-28.
- Tran Nguyen Hoang, P., Ko, J. K., Gong, G., Um, Y., & Lee, S. M. (2018). Genomic and phenotypic characterization of a refactored xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain for lignocellulosic biofuel production. *Biotechnology for biofuels*, 11, 268. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1269-7>
- Lee, S. M., Jellison, T., & Alper, H. S. (2014). Systematic and evolutionary engineering of a xylose isomerase-based pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for efficient conversion yields. *Biotechnology for biofuels*, 7(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0122-x>
- Zeikus, J., Jain, M. & Elankovan, P. (1999). Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl Microbiol Biotechnol* 51, 545–552. doi.org/10.1007/s002530051431
- Ahn, J. H., Jang, Y.-S., & Lee, S. Y. (2016). Production of succinic acid by metabolically engineered microorganisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* 42, 54–66. [doi: 10.1016/j.copbio.2016.02.034](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.02.034)
- Dusselier, M., Mascal, M., & Sels, B. F. (2014). “Top chemical opportunities from carbohydrate biomass: a chemist’s view of the biorefinery,” in *Selective Catalysis for Renewable Feedstocks and Chemicals. Topics in Current Chemistry*, ed. K. Nicholas (Cham: Springer), 353.
- Raab, A. M., and Lang, C. (2011). Oxidative versus reductive succinic acid production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioeng. Bugs* 2, 120–123. [doi: 10.4161/bbug.2.2.14549](https://doi.org/10.4161/bbug.2.2.14549)
- Raab, A.M., Gebhardt, G., Bolotina, N., Weuster-Botz, D., Lang, C., 2010. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the biotechnological production of succinic acid. *Metab. Eng.* 12, 518–525.
- Yan, D., Wang, C., Zhou, J., Liu, Y., Yang, M., and Xing, J. (2014). Construction of reductive pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for effective succinic acid fermentation at low pH value. *Bioresour. Technol.* 156, 232–239. [doi: 10.1016/j.biortech.2014.01.053](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.053)
- Almeida B, Ohlmeier S, Almeida AJ, Madeo F, Leão C, Rodrigues F, Ludovico P. 2009. Yeast protein expression profile during acetic acid-induced apoptosis indicates causal involvement of the TOR pathway. *Proteomics* 9:720–732. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19137548/>.
- Aufschnaiter A, Büttner S. 2019. The vacuolar shapes of ageing: From function to morphology. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1866:957–970.
- Bishop NA, Guarente L. 2007. Genetic links between diet and lifespan: shared mechanisms from yeast to humans. *Nat. Rev. Genet.* 2007 8(11) 8:835–844. <https://www.nature.com/articles/nrg2188>.
- De Boer CG, Hughes TR. 2012. YeTFaSCo: a database of evaluated yeast transcription factor sequence specificities. *Nucleic Acids Res.* 40:D169–D179. <https://academic.oup.com/nar/article/40/D1/D169/2903735>.

Broach JR. 2012. Nutritional control of growth and development in yeast. *Genetics*.

Carmelo V, Bogaerts P, Sá-Correia I. 1996. Activity of plasma membrane H⁺-ATPase and expression of PMA1 and PMA2 genes in *Saccharomyces cerevisiae* cells grown at optimal and low pH. *Arch. Microbiol.* 1996 1665 **166**:315–320. <https://link.springer.com/article/10.1007/s002030050389>.

Casal M, Paiva S, Andrade RP, Gancedo C, Leão C. 1999. The Lactate-Proton Symport of *Saccharomyces cerevisiae* Is Encoded by JEN1. *J. Bacteriol.* **181**:2620–2623. <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/JB.181.8.2620-2623.1999>.

Caspeta L, Chen Y, Nielsen J. 2016a. Thermotolerant yeasts selected by adaptive evolution express heat stress response at 30 °C. *Sci. Rep.* **6**.

Caspeta L, Nielsen J. 2015. Thermotolerant yeast strains adapted by laboratory evolution show trade-off at ancestral temperatures and preadaptation to other stresses. *MBio* **6**.

Caspeta L, Chen Y, Nielsen J. 2016b. Thermotolerant yeasts selected by adaptive evolution express heat stress response at 30 °C. *Sci. Rep.* **6**:27003. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4882594&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Caspeta L, Coronel J, Montes de Oca A, Abarca E, González L, Martínez A. 2019a. Engineering high-gravity fermentations for ethanol production at elevated temperature with *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **116**:2587–2597. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bit.27103>.

Caspeta L, Coronel J, Oca AM de, Abarca E, González L, Martínez A. 2019b. Engineering high-gravity fermentations for ethanol production at elevated temperature with *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **116**:2587–2597. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bit.27103>.

Chen H, Song R, Wang G, Ding Z, Yang C, Zhang J, Zeng Z, Rubio V, Wang L, Zu N, Weiskoff AM, Minze LJ, Jeyabal PVS, Mansour OC, Bai L, Merrick WC, Zheng S, Shi ZZ. 2015a. OLA1 regulates protein synthesis and integrated stress response by inhibiting eIF2 ternary complex formation. *Sci. Rep.* **5**:1–17. <https://www.nature.com/articles/srep13241>.

Chen H, Song R, Wang G, Ding Z, Yang C, Zhang J, Zeng Z, Rubio V, Wang L, Zu N, Weiskoff AM, Minze LJ, Jeyabal PVS, Mansour OC, Bai L, Merrick WC, Zheng S, Shi ZZ. 2015b. OLA1 regulates protein synthesis and integrated stress response by inhibiting eIF2 ternary complex formation. *Sci. Reports 2015 51* **5**:1–17. <https://www.nature.com/articles/srep13241>.

- Coote PJ, Cole MB, Jones M V. 1991. Induction of increased thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* may triggered by a mechanism involving intracellular pH. *J. Gen. Microbiol.* **137**:1701–1708. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1835495/>.
- Coote PJ, Jones M V., Seymour IJ, Rowe DL, Ferdinando DP, McArthur AJ, Cole MB. 1994. Activity of the plasma membrane H⁺-ATPase is a key physiological determinant of thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **140**:1881–1890. <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/13500872-140-8-1881>.
- Dannenmaier S, Altamirano CD, Schüler L, Zhang Y, Hummel J, Milanov M, Oeljeklaus S, Koch HG, Rospert S, Alberti S, Warscheid B. 2021. Quantitative proteomics identifies the universally conserved ATPase Ola1p as a positive regulator of heat shock response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **297**:101050.
- Della-Bianca BE, Gombert AK. 2013. Stress tolerance and growth physiology of yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry. *Antonie Van Leeuwenhoek* **104**:1083–1095. <http://link.springer.com/10.1007/s10482-013-0030-2>.
- Dettman JR, Rodrigue N, Melnyk AH, Wong A, Bailey SF, Kassen R. 2012. Evolutionary insight from whole-genome sequencing of experimentally evolved microbes. *Mol. Ecol.* **21**:2058–77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22332770>.
- Dimster-Denk D, Schafer WR, Rinett J. 1995. Control of RAS mRNA Level by the Mevalonate Pathway. *Mol. Biol. Cell* **6**:59–70.
- Dong Y, Hu J, Fan L, Chen Q. 2017. RNA-Seq-based transcriptomic and metabolomic analysis reveal stress responses and programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. Reports 2017* **7**:1–16. <https://www.nature.com/articles/srep42659>.
- Fernandes AR, Mira NP, Vargas RC, Canelhas I, Sá-Correia I. 2005. *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to weak acids involves the transcription factor Haa1p and Haa1p-regulated genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **337**:95–103.
- Fernández-Niño M, Marquina M, Swinnen S, Rodríguez-Porrata B, Nevoigt E, Ariño J. 2015. The cytosolic pH of individual *Saccharomyces cerevisiae* cells is a key factor in acetic acid tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**:7813–7821. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26341199/>.
- Ferreira T, Mason AB, Slayman CW. 2001. The Yeast Pma1 Proton Pump: a Model for Understanding the Biogenesis of Plasma Membrane Proteins *. *J. Biol. Chem.* **276**:29613–29616. <http://www.jbc.org/article/S0021925820896501/fulltext>.

- Fisher KJ, Buskirk SW, Vignogna RC, Marad DA, Lang GI. 2018. Adaptive genome duplication affects patterns of molecular evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* **14**:e1007396.
<https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1007396>.
- Fletcher E, Feizi A, Bisschops MMM, Hallström BM, Khoomrung S, Siewers V, Nielsen J. 2016. Evolutionary engineering reveals divergent paths when yeast is adapted to different acidic environments. *Metab. Eng.*
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096717616301756>.
- Gancedo JM. 1998. Yeast Carbon Catabolite Repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:334–361.
</pmc/articles/PMC98918/>.
- Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* **11**:4241–4257.
<http://www.molbiolcell.org/content/11/12/4241.long>.
- Giannattasio S, Guaragnella N, Corte-Real M, Passarella S, Marra E. 2005. Acid stress adaptation protects *Saccharomyces cerevisiae* from acetic acid-induced programmed cell death. *Gene* **354**:93–98.
- Giannattasio S, Guaragnella N, Ždravlečić M, Marra E. 2013. Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid. *Front. Microbiol.* Frontiers Research Foundation. www.frontiersin.org.
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG. 1996. Life with 6000 Genes. *Science (80-)*. **274**:546–567. <http://science.sciencemag.org/content/274/5287/546.abstract>.
- Guaragnella N, Bettiga M. 2021. Acetic acid stress in budding yeast: From molecular mechanisms to applications. *Yeast* **38**:391. </pmc/articles/PMC8361955/>.
- Ho B, Baryshnikova A, Brown GW. 2018. Unification of Protein Abundance Datasets Yields a Quantitative *Saccharomyces cerevisiae* Proteome. *Cell Syst.* **6**:192-205.e3.
<http://www.cell.com/article/S240547121730546X/fulltext>.
- Hu J, Dong Y, Wang W, Zhang W, Lou H, Chen Q. 2019. Deletion of *Atg22* gene contributes to reduce programmed cell death induced by acetic acid stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels* **12**:1–20.
<https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-019-1638-x>.
- Hughes AL, Gottschling DE. 2012. An early age increase in vacuolar pH limits mitochondrial function and lifespan in yeast. *Nature* **492**:261–265. <https://www.nature.com/articles/nature11654>.

- Isom DG, Page SC, Collins LB, Kapolka NJ, Taghon GJ, Dohlman HG. 2018. Coordinated regulation of intracellular pH by two glucose-sensing pathways in yeast. *J. Biol. Chem.* **293**:2318–2329. <http://www.jbc.org/article/S0021925820316963/fulltext>.
- Kumar DP, Tiwari A, Bhat R. 2004. Effect of pH on the Stability and Structure of Yeast Hexokinase A: ACIDIC AMINO ACID RESIDUES IN THE CLEFT REGION ARE CRITICAL FOR THE OPENING AND THE CLOSING OF THE STRUCTURE *. *J. Biol. Chem.* **279**:32093–32099. <http://www.jbc.org/article/S0021925820774958/fulltext>.
- Lahtvee P-J, Kumar R, Hallström BM, Nielsen J. 2016. Adaptation to different types of stress converge on mitochondrial metabolism. *Mol. Biol. Cell* **27**:2505–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27307591>.
- Lastauskienė E, Čitavičius D. 2008. Influence of RAS genes on yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell viability in acid environment. *Biologija* **54**:150–155. <http://www.uhmc.sunysb.edu/bioscience/default.htm>.
- Leadsham JE, Gourlay CW. 2010. cAMP/PKA signaling balances respiratory activity with mitochondria dependent apoptosis via transcriptional regulation. *BMC Cell Biol.* *2010* **11**:1–14. <https://bmcmolcellbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2121-11-92>.
- Lee Y, Nasution O, Choi E, Choi IG, Kim W, Choi W. 2015. Transcriptome analysis of acetic-acid-treated yeast cells identifies a large set of genes whose overexpression or deletion enhances acetic acid tolerance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**:6391–6403.
- Lee Y, Nasution O, Lee YM, Kim E, Choi W, Kim W. 2017. Overexpression of PMA1 enhances tolerance to various types of stress and constitutively activates the SAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**:229–239. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-016-7898-5>.
- Li BZ, Yuan YJ. 2010. Transcriptome shifts in response to furfural and acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**:1915–1924. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20309542/>.
- Li L, Kaplan J. 2004. A mitochondrial-vacuolar signaling pathway in yeast that affects iron and copper metabolism. *J. Biol. Chem.* **279**:33653–33661. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15161905/>.
- Martínez-Muñoz GA, Kane P. 2008. Vacuolar and Plasma Membrane Proton Pumps Collaborate to Achieve Cytosolic pH Homeostasis in Yeast. *J. Biol. Chem.* **283**:20309–20319.
- Meena RC, Thakur S, Chakrabarti A. 2011. Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* Plasma membrane H⁺-ATPase (Pma1) by Dextrose and Hsp30 during Exposure to Thermal Stress. *Indian J. Microbiol.* **51**:153. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3209896/>.

Mira NP, Palma M, Guerreiro JF, Sá-Correia I. 2010. Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for tolerance to acetic acid. *Microb. Cell Fact.* **9**. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20973990/>.

Mollapour M, Piper PW. 2006. Hog1p mitogen-activated protein kinase determines acetic acid resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **6**:1274–1280. <https://academic.oup.com/femsyr/article/6/8/1274/571186>.

Orij R, Brul S, Smits GJ. 2011. Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* Elsevier.

Orij R, Postmus J, Beek A Ter, Brul S, Smits GJ. 2009. In vivo measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth. *Microbiology* **155**:268–278. <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.022038-0>.

Ough SC, Amerine MA. 1966. Agricultural Sciences UNIVERSITY OF CALIFORNIA EFFECTS OF TEMPERATURE ON WINE MAKING EXPERIMENT STATION.

Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresour. Technol.* **74**:17–24.

Pampulha ME, Loureiro-Dias MC. 1989. Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1989 315 **31**:547–550. <https://link.springer-com.pbidi.unam.mx:2443/article/10.1007/BF00270792>.

Pampulha ME, Loureiro-Dias MC. 1990. Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1990 343 **34**:375–380. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00170063>.

Parts L, Cubillos FA, Warringer J, Jain K, Salinas F, Bumpstead SJ, Molin M, Zia A, Simpson JT, Quail MA, Moses A, Louis EJ, Durbin R, Liti G. 2011. Revealing the genetic structure of a trait by sequencing a population under selection. *Genome Res.* **21**:1131–1138. <https://genome.cshlp.org/content/21/7/1131.full>.

Pinto I, Cardoso H, Leão C, van Uden N. 1989. High enthalpy and low enthalpy death in *Saccharomyces cerevisiae* induced by acetic acid. *Biotechnol. Bioeng.* John Wiley & Sons, Ltd. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bit.260331019>.

Piper PW, Talreja K, Panaretou B, Moradas-Ferreira P, Byrne K, Praekelt UM, Meacock P, Recnacq M, Boucherie H. 1994. Induction of major heat-shock proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, including plasma membrane Hsp30,

by ethanol levels above a critical threshold. *Microbiology* **140** (Pt **11**):3031–3038.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7812443/>.

Preston RA, Reinagel PS, Jones EW. 1992. Genes required for vacuolar acidity in *Saccharomyces cerevisiae*.

Genetics **131**:551–558. <https://academic.oup.com/genetics/article/131/3/551/6007272>.

Raitt DC, Johnson AL, Erkin AM, Makino K, Morgan B, Gross DS, Johnston LH. 2000. The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Mol. Biol. Cell* **11**:2335–2347.

Salas-Navarrete PC, de Oca Miranda AIM, Martínez A, Caspeta L. 2022. Evolutionary and reverse engineering to increase *Saccharomyces cerevisiae* tolerance to acetic acid, acidic pH, and high temperature. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **106**:383–399. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-021-11730-z>.

Schüller C, Mamnun YM, Mollapour M, Krapf G, Schuster M, Bauer BE, Piper PW, Kuchler K. 2004. Global Phenotypic Analysis and Transcriptional Profiling Defines the Weak Acid Stress Response Regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **15**:706–720. <https://www.molbiolcell.org/doi/full/10.1091/mbc.e03-05-0322>.

Serrano R, Kielland-Brandt MC, Fink GR. 1986. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ + K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases. *Nature* **319**:689–693.

<http://www.nature.com/doi/10.1038/319689a0>.

Taherzadeh MJ, Niklasson C, Lidén G. 1997. Acetic acid-friend or foe in anaerobic batch conversion of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*? *Chem. Eng. Sci.* **52**:2653–2659.

Takaine M, Imamura H, Yoshida S. 2022. High and stable ATP levels prevent aberrant intracellular protein aggregation in yeast. *Elife* **11**.

Triandafillou CG, Katanski CD, Dinner AR, Allan Drummond D. 2020. Transient intracellular acidification regulates the core transcriptional heat shock response. *Elife* **9**:1–30.

Van Uden N. 1985. Temperature Profiles of Yeasts. *Adv. Microb. Physiol.* **25**:195–251.

Ullah A, Orij R, Brul S, Smits GJ. 2012. Quantitative analysis of the modes of growth inhibition by weak organic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**:8377–8387. <https://journals.asm.org/journal/aem>.

Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, Van Dijken JP. 1992. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: A continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast* **8**:501–517.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/yea.320080703>.

Watson TG. 1970. Effects of sodium chloride on steady-state growth and metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **64**:91–99. <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-64-1-91>.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

DES de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Naturales



Cuernavaca, Morelos, a 23 de noviembre del 2022.

VOTOS APROBATORIOS DE TESIS

Los integrantes de la Comisión Revisora de la tesis titulada: "**Estrategias para producir ácido succínico en *Saccharomyces cerevisiae***", que presenta el **C. Prisciluis Caheri Salas Navarrete**, del Programa de Posgrado Doctorado en Ciencias Naturales, bajo la dirección del DR. LUIS CASPETA GUADARRAMA, han determinado que el documento reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado, por lo que emiten su **VOTO APROBATORIO**.

Comisión Revisora de tesis (firma electrónica)

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (director de tesis, IBT UNAM)

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (CEIB UAEM)

Dra. Alicia González Manjarrez (IFC UNAM)

Dr. Alfredo Martínez Jiménez (IBT UNAM)

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (CEIB UAEM)

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (CEIB UAEM)

Dr. Edgar Dantán González (CEIB UAEM)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA ALICIA GONZALEZ MANJARREZ | Fecha:2022-11-24 10:38:16 | Firmante

b0GJD6GXA7ANdSzWHGWHO5wiAI/4hDwyrZPEmMrFli1nq9brzSgZg3dZe8AbXeEYDabYadAeJm2LQdEWR1w6Z8G4dOTXEaeX94YSpj1BbsepKLVdNLS2+izZlofVmq4VNTy9/EAlwTgZOyGsU5c7HcdluG5A9xQ35Iz0yO97PUI8BgMmkg6/L11/bMEt8WpNUvoZ8plxzRCPf+xW5NtE4XuUX6XRnAPpU8df/z+SQOFUprmd9Bl3/PjBfY+mg3FeymNYcZQ6+WxNjSq27b563W0r+mNCiJTYsvNSD1VITYGqpltpi4JIVWi1TiideljaXCmmjmduG4tFe5ehQ==

RAMON SUAREZ RODRIGUEZ | Fecha:2022-11-24 11:32:34 | Firmante

WL/KKsnDgp8jquDii/kN6Kdk6/DkqmJ9uDPW7MV2uTfDc73aUPx/F6iboQeMZV2HdTvTibhdXS3a7ChJRlg7gHuOaiPas2/vxJl8HhDaV9R4B3CDpxO/rNhgP1zLVAA9+zGZvpslf2y8XHAhi37FcXzdA8PsnfBO4tghkHvem3pDgqpxw8o484kIOyet5BCAZPwYIC9AhiFN6UQJdL6pDRtoX4FoCKlqt+ONRqE2Nm1/cR3MEH5f2t9PEy9OazjZwLSpjoEdeV4g34qOCdgEAgSboul6Eh9eJSvVntSatHCX3xwflPZLY44hi1JGpUQPAMyOFF6ykcZjifQxy7A==

MARIA DEL REFUGIO TREJO HERNANDEZ | Fecha:2022-11-25 16:01:55 | Firmante

L/rPohPUmn90LoFDt6Rwqd0ISfuzHL5anl0CIZ71za0MK8MYo5FvMz4dPE7CPAhhqfQ9MVPaZXrR7GWytVKcwp4L3RbsaHsJiyfvWqSKqWZAinkjis1j/DuVKrrXKjEv/CoHEZlyBw819SXoOqmWiQyVeyMme0LFAIt+6VfsYUwb9UcZMpiNhHA185YVukQbv7Z70vBKFEb3qRSuOTYMrkc4irto1dnlDitNjSL1fCpC1mPSPqKuM0ZQIUUM7/qE0NrraA7FibiQzxsYNFKPPTq4soW3fYrv59j654JyJKF+eWSQWAFZcsFHx2lyj8jWlyTvdqtnXh/Ag8HCWzCDA==

MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha:2022-11-29 16:13:06 | Firmante

BXT7xbZPb5RaJ2HsTRua1pgiDaES71qn+zWyzlh1B82+MKbHWIP4Ca2K+KNsh0W6+m4rT5mFZVcGWPucU8mdGKV503qR1Mm+S5PUhbl/h8pWPUKkZbmi8PWAzaCXwK C9LW+CfuXLfTmqrDldgUf8Qb95KGWFUvuG7GfE28WoUjk06WEO6FFU15H5WbQRmFA35A2tm1bkiHEuWp+qqG5DAdiyJIR9Y2olhN4al9F5awlxOtepoQ8pTNCWI84vQx+9S vvk88GDgSeX7SbnUFOBVTaotmsAuPkIs4byT7BsS/7x9xxL7pNxnHRYvHv7m0NkkaP0fRGSbWjXEDAKA==

EDGAR DANTAN GONZALEZ | Fecha:2022-11-30 09:04:25 | Firmante

hP1bJGfziRk6m/qDkYiPK94r87gqGuDRFf6p+hgKszNZwNB+xyGwDbcjWBFpW2rpl+VsJR5kvk/Ls7V4Rmg0Xt7GEzZ1DCbPgesb4Ce65/u5zSPfF5PGCuFgTV2o3rnzE8MpS nSqfA7OZ/qNcheAjL8UvTU0tCL59GOCRILTLcP+ZRSEwKY4Z/7eGdqh2tE2PjPu1+9wYfE8lQrcrVJymdwQ21yv1f8k/SjvcEYTVL6vucqL5dTLDbDiwiRlexXe39eWejnERoUycSSc F19DzncUKlPKiUeBzVi2q6kOJAHHfHmj0pBYxysPIBkrk65DE8Fy60JetKcdq8tvow==

LUIS CASPETA GUADARRAMA | Fecha:2022-12-05 19:26:48 | Firmante

sn3zW7uO5qJSExGpELzDFiVvk2fC0goNnxEJPD5wnhDQvc6aHRv7mg8FJFCxU23rBL2yCOaFi9lCocOAYalat9NQ8Py9Qi2LmPb/9lly8pKhTurSF5nCGzNxxKkddyMZJAsjcd/qM C2Xe3KLH8TW/nrKvumtCjboleGmYctWzHeyahQ+E9IMAYAdOuxyX6tRoFFh+6J7GfNi2yGHhIbdRWY8inj+h8fivBCFhkD4srloBxDuOiwNLA++MDO0hXkmCN4aLyQuOAgpv48 gJosCdjO107h7Y1Jv13+CU5FsatJ05QFxtZ/SdDWfuJTf35VZwCmJFfeu7u4f82GWe0GQ==

ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ | Fecha:2022-12-06 21:32:06 | Firmante

jHL0Xb4eVgVbfeTvwWDeHtOa2Tf/7HxIM3mjoF5/3seR+HYwSNZTtoocq+52qvbzshnpw+zr6Kao6/5eo6Obm/uv6xBDECLYKERczMj6FcxV8XE0F8kYnPDIVMvEdw2dUa4Abzm /0sr9bll1riVsaen8kqAnTv2VqQRoN/1Bzle6jTtz1QoAyEJSXQsOgmF1B33dCgAkKu51AB37wpLuCpQz6lVQvBSMg2EAX8G59j0K38Ljn/x4hz0bHrrZrf+h9btUzQwNAb0JMnXmK6 0o74dmZ6foQ2MjBuwcsGxU/rkVOKxqx8/wqpwmdgVjSdPVkEzrJL+HT3Nq74TmdQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



OBYEukndj

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/S2cZ7Qwb5d6MvmPC9QKUV/Ng8P8Yengu>

