|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| http://www.icesi.edu.co/imgs/contenido/png/logo_icesi.png | **INFORME DE ACTIVIDADES** | | | | | D:\Usuarios\1144065172.ICESI.000\Downloads\FIS (1).png | |
| **Nombre Programa:** | *BIOECONOMÍA – 85942* | | | | | | |
| **Nombre Proyecto:** | *Proyecto 1 - Gal Discovery / Proyecto 2 – Gal Biofactory / Proyecto 3 – Farma Sostenible* | | | | | | |
| **Línea de Inv. 1:** | Neurofarmacología | | | | | | |
| **Nombre Investigador:** | J. David Vega Páez | | | | | | |
| **Semana del año:** | 47 | **Fecha de Realización del Informe:** | | | | | 14-Nov-2022 |
| **Formato elaborado por:** | Steven Alexander David Jiménez | | **Firma:** | S. David | **Fecha:** | 13-Ene-2022 | |
| **Formato revisado por:** |  | | **Firma:** |  | **Fecha:** |  | |
| **Formato aprobado por:** |  | | **Firma:** |  | **Fecha:** |  | |

La síntesis de galantamina (GAL) es un problema abordado desde el planteamiento del diseño racional de biofábricas cuyos primeros obstáculos se encuentran en el hecho de que la ruta biosintética no está completamente descrita por ausencia de datos genómicos en conjunto con estudios transcriptómicos y metabolómicos suficientemente detallados en torno a la producción de alcaloides de plantas de la familia de las amarilidáceas.

A la fecha se conoce únicamente una ruta bioquímica basada en una única enzima que es capaz de producir GAL a partir de 4’O-metilnorbeladina (4OMET) pero en una proporción muy baja [1]. Sin embargo, para la producción de GAL en biofábricas se necesita primero visualizar el abanico de posibilidades de rutas metabólicas dentro de las reacciones *up-stream* de la 4OMET y evaluar la optimalidad de su integración en diferentes modelos de biofábricas (*Escherichia coli, Pseudomonas* sp o *Saccharomyces cerevisiae*).

El presente informe recoge las estrategias implementadas, basadas en datos, para tomar las decisiones pertinentes que lleven al desarrollo a escala laboratorio de biofábricas para la producción de 4OMET y por consiguiente, de GAL.

**Proyecto 1 – Gal Discovery:** Obtener moléculas a partir de un diseño racional in-silico de alcaloides y derivados de galantamina presente en plantas nativas de Colombia para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

**Proyecto 2 – Gal Biofactory:** Desarrollar una biofábrica para la obtención de galantamina a partir del diseño racional in silico usando datos - ÓMICOS, como estrategia de producción biotecnológica de alcaloides que asegure el aprovechamiento sostenible de la biodiversidad colombiana.

1. **Objetivos Específicos**

**Proyecto 1 – Gal Discovery**

* OE1: Proponer rutas de biosíntesis de galantamina a partir de datos -OMICOS (genómica / transcriptómica / metabolómica – *Crinum* sp / *Eucharis* sp.) de plantas nativas de la diversidad colombiana como la familia Amarillidaceae.
* OE3: Plantear estrategias de biosíntesis de derivados de galantamina.

**Proyecto 2 – Gal Biofactory**

* OE1: Reconstruir una ruta biosintética de galantamina empleando datos -ÓMICOS (genómica / transcriptómica / metabolómica) para su producción en *Saccharomyces cerevisiae*.

1. **Descripción de la Metodología**

Con el fin de elucidar las posibles rutas biosintéticas para producir GAL mediante biofábricas, se realizaron simulaciones de aproximaciones basadas en algoritmos que, junto a datos bibliómicos, llevarán a generar una matriz de decisión enfocada en establecer el o los chasis óptimo(s) para desarrollar la biofábrica basándose en las rutas biosintéticas óptimas ajustadas a los posibles modelos biológicos.

* 1. **Descubrimiento de rutas alternas para la síntesis de galantamina basado en herramientas computacionales.**

El descubrimiento de redes bioquímicas en torno a la producción de metabolitos secundarios es una problemática que ha sido abordada a lo largo de la historia desde diferentes perspectivas. Una perspectiva evolucionista considera el estudio de la generación de este tipo de redes desde el entendimiento de la conservación de *traits* evolutivos como ventajas adaptativas para el organismo en su entorno [2], los cuales no se pierden debido a la presión de selección que ejerce el ecosistema sobre dicha característica.

Otra perspectiva más funcionalista consiste en aprovechar las características únicas del metabolismo secundario de los organismos para explotarlas en función de obtener productos de valor agregado a gran escala. Tal es el caso del objetivo en torno al desarrollo de biofábricas tanto en plantas como microbianas [3]–[5]. Con este objetivo, en los últimos 15 años y con motivo de la generación masiva de datos basados en diferentes ómicas, la biología de sistemas se ha encargado de generar estrategias basadas en la integración de todos estos datos desde diferentes perspectivas para generar aproximaciones que lleven a la generación de mapas metabólicos que permitan el diseño de rutas hipotéticas basadas en enzimas características de diferentes tipos metabolismos, cuya evolución puede haber ocurrido en forma divergente en diferentes grupos de organismos.

Dos aproximaciones recientes para el descubrimiento de rutas metabólicas con perspectivas funcionales son las abordadas por el grupo del profesor Costas D. Maranas de la universidad de *Penn State* (Pensilvania, Estados Unidos) y por el grupo del *Laboratoire de biotechnologie computationnelle des systèmes* (LCSB) de la *École polytechnique fédérale de Lausanne* (EPFL, Lausanne, Suiza). El grupo de Maranas desarrolló y publicó un algoritmo conocido como OptStoic el cual es acoplado con los algoritmos MinFlux y MinRxn para identificar la estequiometría óptima de una reacción y las posibles reacciones que pueden llevar a la obtención del producto basándose en parámetros de energía libre de Gibbs, conservación atómica y conservación electrónica. El algoritmo trabaja con una base de datos propia construida con información de KEGG y MetaCyc la cual puede ser actualizada y puede abordarse mediante código de Python o mediante el software GAMS IDE [6].

Por su parte, en el grupo del LCSB se han explorado más alternativas para el descubrimiento de rutas, siendo una de las más recientes ATLASx, la cual consiste primero en la integración de la información de cerca de 15 bases de datos diferentes entre las que se encuentran KEGG, MetaCyc, BRENDA, RHEA, ModelSeed, entre otras. Dicho algoritmo tiene una interfaz que permite generar tanto rutas como mapas metabólicos alrededor de un compuesto y se explora online mediante una licencia que puede solicitarse gratuitamente. El algoritmo trabaja basándose en el cálculo de un coeficiente de conservación atómica (CAR) para cada paso potencial dentro de una ruta hipotética y la interfaz permite filtrar la información deseada para explorar resultados sobre enzimas reportadas para catalizar reacciones o sobre únicamente reacciones propuestas por retro síntesis [7].

De acuerdo con esto, se utilizaron ambos algoritmos para generar la información necesaria que llevara a construir los posibles mapas de rutas metabólicas que lleven a la obtención de 4OMET a partir de un precursor común de aminoácidos de plantas: L-arogenato (ARO). Si bien dicho precursor es un metabolito de producción restringida a plantas y pocas bacterias, es el precursor más inmediato del modelo natural para la producción de los aminoácidos fenilalanina y tirosina que conforman los pilares para la producción de 4OMET. Las reacciones posteriores a partir de 4OMET están parcialmente descritas debido a que dicho metabolito puede sufrir acoplamientos entre sus anillos fenólicos bajo diferentes orientaciones (*p-p, p-o, o-p*) que dan lugar a los diferentes tipos de alcaloides de amarilidáceas, sin embargo, solo se ha descrito una de las enzimas responsable selectivamente del tipo de reacción *p-p* (CYP96T1) [1], [8]–[10] y por lo tanto la CYP asociada selectivamente para la producción de GAL (*p-o*) aún necesita ser descrita y validada experimentalmente.

En la Figura 1 se observan ambas aproximaciones metodológicas.

Screening de base de datos (MetRxn).

Actualización de base de datos con reacciones conocidas reportadas en MetaCyc.

Planteamiento de ecuación de diseño de la biofábrica hasta 4OMET en GAMS IDE.

Identificación de reacciones que cumplen con el mínimo número de pasos para obtener 4OMET (MinRxn).

Creación de grafos sobre las potenciales rutas de síntesis de 4OMET (Gephi).

Generación de rutas metabólicas (ATLASx) limitadas a biotransformaciones conocidas (asociadas a enzimas descritas).

Creación de grafos sobre las potenciales rutas de síntesis de 4OMET (Gephi).

*Figura 1. Aproximaciones metodológicas para el trabajo con algoritmos para el descubrimiento de rutas metabólicas para la producción de 4OMET. Izq: OptStoic - MinRxn. Der: ATLASx*

* 1. **Planteamiento de estrategias óptimas para el desarrollo de biofábricas de galantamina, de acuerdo con el chasis.**

Con base en los resultados de las posibles rutas metabólicas encontrados mediante los algoritmos utilizados, se propone desarrollar una matriz de decisión para ayudar a decidir el chasis y la ruta óptimos con los cuales desarrollar la biofábrica. Es necesario resaltar que dicha matriz se basará únicamente hasta la producción de 4OMET debido a que es el metabolito central del cual se derivan todos los alcaloides exclusivos de amarilidáceas y posterior a su producción no se ha caracterizado ninguna enzima CYP-450 de acoplamiento específico fenol-fenol de tipo *p-o* que lleve a la producción de GAL predominantemente.

Se calculará una matriz por ruta propuesta (Tabla 1) y posteriormente el mejor chasis de cada ruta será evaluado en una segunda matriz de decisión bajo parámetros de información intrínsecos de las enzimas.

*Tabla 1. Propuesta de matriz de decisión por ruta a evaluar en diferentes chasis para la producción de 4OMET.*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Chasis (Ruta 1)** | **(0.33)** | **(0.33)** | **(0.33)** | **Score** |
| ***E. coli*** | 9.5457/9.5457=1 | 0.95729 |  |  |
| ***Pseudomonas*** | 2.7245/9.5457=0.28 | 0.96668 |  |  |
| ***S. cerevisiae*** | 9.4526/9.5457=0.99 | 0.96448 |  |  |

*Tabla 2. Propuesta de matriz de decisión de ruta de síntesis de 4OMET basada en los mejores Chasis de cada ruta.*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Chasis** | **Ruta** | **Kcat/Km mínimo (0.5)** | **Requerimientos adicionales en la ruta (0.5)** | **Score** |
| ***E. coli*** | ***R1*** |  |  |  |
|  | ***R2*** |  |  |  |
|  | ***R(n)*** |  |  |  |

Los parámetros de decisión son descritos a continuación:

* + 1. **FBA**

Se realizarán simulaciones usando CobraToolbox en Matlab para estimar en cada chasis el cambio en la función objetivo al introducir la producción de 4OMET mediante la modificación de los modelos a escala genómica que serán usados como input para la simulación. En cada modelo se introducirá la información de una de las rutas propuestas cada vez generando datos bajo la siguiente nomenclatura:

BN: Producción de biomasa bajo condiciones estándar

BM: Producción de biomasa bajo modificación del modelo con una de las rutas

4OM: Producción de 4OMET bajo modificación del modelo con una de las rutas.

El resultado de estas ecuaciones serán relaciones de proporciones que se categorizarán con un score deseable (=1) e indeseable = 0. Para la Ecuación 1, si la relación es superior a 0.5 (es decir que la función biomasa no se vea afectada al menos en un 50% del potencial crecimiento celular normal) se categorizará como deseable. En el caso de la Ecuación 2, será deseable si esta relación es superior a 0.001, (es decir que la eficiencia de producción de 4OMET sea como mínimo del 1% frente a su crecimiento celular). Estos parámetros se traducen como indicadores cualitativos de si la respectiva ruta introducida tiene o no un efecto positivo en el chasis simulado.

* + 1. **Funcionalidad de enzimas en el chasis**

Para este parámetro se tendrá en cuenta que cada enzima que catalice las reacciones de la ruta a simular tenga reportes registrados en literatura o que tengan secuencias homólogas reportadas en NCBI, en el respectivo chasis. Los parámetros serán 1 para presencia, 0 para ausencia. Se sumarán y se dividirán entre el total de reacciones de la ruta (Ecuación 3). Este es un indicador de qué tan conveniente sería la introducción de la ruta en el potencial chasis, teniendo en cuenta la información disponible.

* + 1. **Kcat/Km mínimo**

Esta relación es conocida como la eficiencia catalítica de las enzimas. Para poder calcular este parámetro, se requiere información de las enzimas en relación con el sustrato específico con el que interactúan pues esta relación también es indicativa de la afinidad de la enzima por el sustrato (Km). Este parámetro es cuantitativo y se parametrizará de acuerdo con todas las relaciones que existan en la ruta.

La relación Kcat/Km máxima en la ruta tendrá un valor de 1 y el resto de las relaciones se ubicarán en un vector entre 0 y 1. Se tomará la reacción con relación mínima como la determinante de la eficiencia catalítica de la ruta.

* + 1. **Requerimientos Adicionales de la ruta**

Sobre el número total de pasos a agregar en cada ruta, sumar el número de pasos que requieren cofactores.

1. **Resultados**

Los resultados de las simulaciones para las dos aproximaciones evaluadas se describen brevemente a continuación mediante la construcción de grafos usando el software Gephi. Los resultados correspondientes a los FBA y la construcción de la matriz de decisión del chasis/ruta están en desarrollo a la fecha del presente informe.

* 1. **Generación de grafos sobre rutas alternas para la producción de 4OMET**

La visualización de los resultados obtenidos mediante las dos aproximaciones evaluadas para el descubrimiento de rutas alternas para la producción de 4OMET se desarrolló mediante el Software Gephi y la anotación y curación manual de los resultados obtenidos de los algoritmos evaluados.

* + 1. **Aproximación por algoritmos OptStoic – MinRxn**

El algoritmo OptStoic desarrollado por [6] se evaluó para la producción de 4OMET teniendo en cuenta que la base de datos que usa el algoritmo debió ser revisada y actualizada con las reacciones conocidas por literatura y reportadas en MetaCyc. Las actualizaciones realizadas se indican en la Tabla 3.

*Tabla 3. Modificaciones a archivos .txt de la base de datos MetRxn del algoritmo OptStoic.*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Tipo de dato** | **Total** | **# de modificaciones** | |  |
| **Adición** | **Corrección** | **Tipo de corrección** |
| ***Metabolitos*** | 5767 | 15 | 40 | Parámetros errados en ∆Gf.  Problemas en anotación de especies  (# átomos de H+ y cargas de las moléculas) |
| ***Reacciones*** | 6894 | 23 | 4 | Reacciones con anotaciones incorrectas en sus especies químicas (reactivos y productos), especialmente en reacciones que involucran metabolitos transportadores de electrones. |

Para determinar la estequiometría óptima del sistema, fue necesario establecer las condiciones de simulación contemplando inicialmente todos los metabolitos que hacen parte de las entradas y salidas generales de la ruta a evaluar. Esto significa que es necesario un conocimiento preliminar de la ruta al menos bajo estudios de retrosíntesis. Una vez identificados los compuestos que pueden intervenir en la estequiometría general de la reacción, se obtuvieron ecuaciones estequiométricas bajo diferentes escenarios (Tabla 4)

*Tabla 4. Ecuaciones óptimas de diseño de ruta encontradas mediante OptStoic.*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Condición** | ***Ecuación OptStoic*** | **F.O.** | ∆Grxn (kCal/mol) |
| ***Estándar***  *(Todas las especies pueden participar)* | 13O2 + 3H+ + SAM + NADPH + **3Arogenato** + FlavRed  →  10H2O + 13CO2 + SAH + NADP+ + Acetato + **OMetNorb** + Amonio + FlavOx | 0.33 | -461.18 |
| ***Sin cofactores***  *(NADPH-NADP+)* | O2 + 12H+ + SAM + **9Arogenato** + FlavRed  →  12H2O + 9CO2 + SAH + Acetato + **5OMetNorb** + Amonio + FlavOx | 0.56 | -3.7 |
| ***Sin cofactores ni moléculas carrier de electrones*** | 12O2 + 3H+ + SAM + **3Arogenato**  →  8H2O + 13CO2 + SAH + Acetato + **OMetNorb** + Amonio | 0.33 | -427.83 |

Las especies corresponden a:

O2: Oxígeno

H+: Protones

SAM: S-adenosilmetionina

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducida)

FlavRed: Flavina genérica (reducida)

H2O: Agua

CO2: Dióxido de carbono

SAH: S-adenosilhomocisteína

NADP+: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (oxidada)

OMetNorb: 4OMET

FlaxOx: Flavina genérica (oxidada)

Con base en las ecuaciones de OptStoic obtenidas, se procedió a implementar el algoritmo MinRxn para encontrar el set mínimo de reacciones que permite la producción de 4OMET a partir de ARO. Este sistema dio lugar a la producción de 4OMET en un mínimo de 10 reacciones y se simuló nuevamente bajo el bloqueo de una de las reacciones encontradas de la cual se conoce que está patentada para la producción de Vanilina [11] (4-Hidroxibenzaldehído → 3,4-Dihidroxibenzaldehído) obteniendo un sistema de mínimo 14 reacciones para la producción de 4OMET.

Es importante resaltar que bajo este algoritmo se obtuvieron reacciones desconectadas del sistema que no pudieron ser bloqueadas. Los resultados de ambos sistemas se ilustran mediante el siguiente grafo de nodos (Figura 2).

Gráfico

Descripción generada automáticamente

*Figura 2. Grafo de rutas posibles calculadas por el algoritmo OptStoic/MinRxn para la obtención de 4OMET a partir de ARO. Aristas resaltadas en verde, anaranjado y morado corresponden al menor número de reacciones posible (10) para generar la molécula. En amarillo se encuentran las reacciones correspondientes a una ruta alterna encontrada en 14 pasos.*

* + 1. **Aproximación por algoritmo ATLASx**

El trabajo realizado mediante el algoritmo ATLASx en línea permitió realizar la búsqueda de rutas metabólicas bajo condiciones específicas: 1) que las reacciones obedecieran a biotransformaciones conocidas bajo una búsqueda exponencial y 2) que el algoritmo realizara la búsqueda en un máximo de 10 pasos. Esto permitió generar un archivo .csv que fue procesado obteniendo 50 especies metabólicas interactuando en 99 reacciones. Es importante tener en cuenta que el algoritmo toma cada paso en forma lineal por lo que el sistema debió analizarse con los datos obtenidos para la síntesis de norcraugsodina por el lado de la síntesis de tiramina y por el lado de la síntesis de 3,4-Dihydroxybenzaldehído.

Gráfico

Descripción generada automáticamente

*Figura 3. Grafo de rutas posibles calculadas por el algoritmo ATLASx para la obtención de 4OMET a partir de ARO. Aristas resaltadas en colores corresponden a las rutas con biotransformaciones conocidas (catalizadas enzimáticamente) que permiten el menor número de pasos (13) para generar la molécula. En rojo genes/enzimas de catálisis conocida para la reacción en la arista.*

Es importante resaltar también que en el grafo generado se adicionó manualmente 1 nodo correspondiente a la molécula 3-dehidroshikimato ya que es una molécula de interés en la parte alta de la ruta de producción de aminoácidos aromáticos la cual tiene una biotransformación ampliamente conocida y patentada para la producción de 3,4-dihidroxibenzaldehído [12] con el uso de genes CAR (ácido carboxílico reductasa) [13], [14].

También se adicionaron 7 aristas: Una correspondiente a la biotransformación de 3-dehidroshikimato a 3,4-dihidroxibenzoato mediante el gen quiC reportado del género *Acinetobacter* sp. el cual también tiene proteínas funcionalmente homólogas en especies como *Pseudomonas* *putida* [12] y 6 aristas correspondientes a la reversibilidad de otras reacciones (Ej: Prefenato a L-Arogenato).

La ruta relacionada con las proteínas dehidroshikimato dehidratasa (quiC) y los genes CAR, será evaluada como una reacción adicional en el sistema dentro de las matrices de decisión.

* + 1. **Rutas para evaluar en matrices de decisión**

Como resultado de la aplicación de ambos algoritmos, en la Tabla 5 se detallan las rutas metabólicas que serán evaluadas en los diferentes chasís.

*Tabla 5. Rutas para evaluar en la matriz de decisión.*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **I.D.** | **Ruta** | **# Pasos** | **Algoritmo fuente** |
| RO1 | Arogenato – Tirosina – Tiramina  Arogenato – Fenilalaniina – Cinamato – p-Cumarato  – 4-hidroxibenzaldehído – 3,4-dihidroxibenzaldehído  Tiramina+3,4-dihidroxibenzaldehído – Norcraugsodina  – Norbeladina – 4OMET | 10 | OptStoic - MinRxn |
| RO2 | Arogenato – Tirosina – Tiramina  Arogenato – Fenilalaniina – Cinamato – CinamoylCoA  – p-CumaroylCoA – p-CumaroylShikimato – 5-O-CafeoylShikimato  – CafeoylCoA – 3-(3,4-dihidroxifenil)3-hidroxypropanoato  – 3,4-dihidroxibenzaldehído  Tiramina+3,4-dihidroxibenzaldehído – Norcraugsodina  – Norbeladina – 4OMET | 14 | OptStoic - MinRxn |
| RA1 | Arogenato – Tirosina – Tiramina  Arogenato – Fenilalaniina – Cinamato – p-Cumarato – p-CumaroylCoA  – CafeoylCoA – 3-(3,4-dihidroxifenil)3-hidroxypropanoato  – 3,4-dihidroxibenzaldehído  Tiramina+3,4-dihidroxibenzaldehído – Norcraugsodina  – Norbeladina – 4OMET | 13 | ATLASx |
| RA2 | Arogenato – Tirosina – Tiramina  Arogenato – Fenilalaniina – Cinamato – p-Cumarato – Cafeato  – CafeoylCoA – 3-(3,4-dihidroxifenil)3-hidroxypropanoato  – 3,4-dihidroxibenzaldehído  Tiramina+3,4-dihidroxibenzaldehído – Norcraugsodina  – Norbeladina – 4OMET | 13 | ATLASx |
| RA3 | Arogenato – Tirosina – Tiramina  Arogenato – Fenilalaniina – Cinamato – CinamoylCoA  – p-CumaroylCoA – CafeoylCoA – 3-(3,4-dihidroxifenil)3-hidroxypropanoato – 3,4-dihidroxibenzaldehído  Tiramina+3,4-dihidroxibenzaldehído – Norcraugsodina  – Norbeladina – 4OMET | 13 | ATLASx |
| RAlt | Arogenato – Tirosina – Tiramina  3-dehidroShikimato – 3,4-dihidrobenzoato – 3,4-dihidroxibenzaldehído  Tiramina+3,4-dihidroxibenzaldehído – Norcraugsodina  – Norbeladina – 4OMET | 7 | Literatura |

1. **Discusión**

Los resultados obtenidos indican que la información que proporciona el algoritmo de ATLASx es mucho más rico en posibilidades de rutas metabólicas, especialmente si se tiene en cuenta que el sistema se obtuvo con base únicamente en biotransformaciones conocidas. Por su parte, el algoritmo de OptStoic/MinRxn permitió encontrar un sistema de reacciones de 10 pasos por los cuáles es posible obtener la molécula 4OMET.

Comparando ambos grafos generados, es importante notar que la reacción patentada para la producción de Vanilina no está registrada como una biotransformación completamente descrita en la base de datos de ATLASx. Esto puede deberse a que los parámetros de eficiencia y especificidad no han sido bien elucidados, aun cuando en la patente hay información registrada frente a la actividad enzimática en extractos crudos no purificados.

Es importante resaltar que para la construcción final de la(s) biofábrica(s) para producir GAL, se terminará optando por sistemas basados en la producción de tiramina y 3,4-DHBA como resultado de la ruta y chasis que se definan con las matrices de decisión. Sin embargo 5 de las 6 rutas propuestas a ser evaluadas se basan en reacciones subsecuentes de los 2 aminoácidos (tirosina y fenilalanina), sin embargo, de acuerdo con los grafos y su conectividad, sería posible pensar en rutas más cortas basadas únicamente en la tirosina mediante la construcción de cepas optimizadas para la producción de metabolitos específicos derivados de este aminoácido usando estrategias específicas enfocadas al knockout génico. Para ello es posible abordar el problema mediante algoritmos como OptKnock [15] que posteriormente podrían ser comprobados *in-vitro*. Esta estrategia podría a futuro reducir costos de producción aunque implicaría la construcción de otro tipo de rutas diferentes a las que se abordarán dentro del presente proyecto.

1. **Conclusiones**

Se definió un listado de rutas biosintéticas de 4OMET para ser evaluadas en 3 chasis microbianos y de esta forma definir el chasis de la biofábrica a construir y la ruta óptima. Por otro lado, se postularon los parámetros de decisión y la estrategia de estudio para identificar el chasis microbiano para la subsecuente inserción de los genes involucrados en la biosíntesis de 4OMET y se planteó la optimización metabólica como uno de los aspectos a evaluar dentro del desarrollo de las biofábricas para la posterior producción de GAL.

1. **Recomendaciones**

Los resultados de este trabajo deben ser evaluados en perspectiva con la postulación de enzimas correspondiente al del proyecto 1: Gal-Discovery, OE2. Esto con el fin de establecer la ruta completa hacia la síntesis de GAL posterior al cuello de botella correspondiente al metabolito 4OMET.

El resultado de la matriz de decisión deberá ser comprobado experimentalmente, sin embargo, los pesos de la matriz deberán ser optimizados con el fin de establecer la mejor ruta y chasis a ser evaluada. Este resultado corresponde a un planteamiento sistemático para resolver el problema con base en algoritmos computacionales. Sin embargo, no será determinante frente a los posibles resultados que se obtengan con base en la experimentación, la cual determinará si es necesario optar por otras rutas u optimizar la que sea seleccionada.

1. **Perspectivas Futuras**

Los resultados obtenidos hasta el momento permiten establecer de forma óptima las posibilidades de construcción de biofábricas de 4OMET con perspectiva a la obtención futura de GAL. Las estrategias aquí planteadas permitirán iniciar la experimentación con una base sólida que conlleva a evitar gastos innecesarios probando rutas poco efectivas así como ahorro en tiempos de experimentación. Si los costos de producción de biofábricas de GAL se mantienen al mínimo desde etapas tempranas del planteamiento experimental, será posible obtener una producción de galantamina escalable y viable que permita el aprovechamiento de esta molécula desde la industria farmacéutica.

1. **Bibliografía**

[1] M. Kilgore, “The Identification of Alkaloid Pathway Genes from Non-Model Plant Species in the Amaryllidaceae”, Washington University, 2015. [En línea]. Disponible en: https://openscholarship.wustl.edu/art\_sci\_etds/657

[2] R. Fani, “The Origin and Evolution of Metabolic Pathways: Why and How did Primordial Cells Construct Metabolic Routes?”, *Evol. Educ. Outreach*, vol. 5, núm. 3, Art. núm. 3, sep. 2012, doi: 10.1007/s12052-012-0439-5.

[3] D. Medina-Cleghorn y D. K. Nomura, “Exploring Metabolic Pathways and Regulation through Functional Chemoproteomic and Metabolomic Platforms”, *Chem. Biol.*, vol. 21, núm. 9, pp. 1171–1184, sep. 2014, doi: 10.1016/j.chembiol.2014.07.007.

[4] S. Zhao *et al.*, “Discovery of new enzymes and metabolic pathways by using structure and genome context”, *Nature*, vol. 502, núm. 7473, Art. núm. 7473, oct. 2013, doi: 10.1038/nature12576.

[5] H. Huang *et al.*, “A General Strategy for the Discovery of Metabolic Pathways: d-Threitol, l-Threitol, and Erythritol Utilization in Mycobacterium smegmatis”, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 137, núm. 46, pp. 14570–14573, nov. 2015, doi: 10.1021/jacs.5b08968.

[6] A. Chowdhury y C. D. Maranas, “Designing overall stoichiometric conversions and intervening metabolic reactions”, *Sci. Rep.*, vol. 5, núm. 1, p. 16009, dic. 2015, doi: 10.1038/srep16009.

[7] H. Mohammadi Peyhani, J. Hafner, A. Sveshnikova, V. Viterbo, y V. Hatzimanikatis, “Expanding biochemical knowledge and illuminating metabolic dark matter with ATLASx”, *Nat. Commun.*, vol. 13, núm. 1, Art. núm. 1, mar. 2022, doi: 10.1038/s41467-022-29238-z.

[8] I. Desgagné-Penix, “Biosynthesis of alkaloids in Amaryllidaceae plants: a review”, *Phytochem. Rev.*, vol. 20, núm. 2, pp. 409–431, abr. 2021, doi: 10.1007/s11101-020-09678-5.

[9] M. B. Kilgore, C. K. Holland, J. M. Jez, y T. M. Kutchan, “Identification of a Noroxomaritidine Reductase with Amaryllidaceae Alkaloid Biosynthesis Related Activities\*”, *J. Biol. Chem.*, vol. 291, núm. 32, pp. 16740–16752, ago. 2016, doi: 10.1074/jbc.M116.717827.

[10] M. B. Kilgore, M. M. Augustin, G. D. May, J. A. Crow, y T. M. Kutchan, “CYP96T1 of Narcissus sp. aff. pseudonarcissus Catalyzes Formation of the Para-Para’ C-C Phenol Couple in the Amaryllidaceae Alkaloids”, *Front. Plant Sci.*, vol. 7, p. 225, feb. 2016, doi: 10.3389/fpls.2016.00225.

[11] D. Havkin-frenkel, A. Podstolski, y R. A. Dixon, “Vanillin biosynthetic pathway enzyme from Vanilla planifolia”, 20030070188, el 10 de abril de 2003 Consultado: el 14 de noviembre de 2022. [En línea]. Disponible en: https://www.freepatentsonline.com/y2003/0070188.html

[12] J. Peek, J. Roman, G. R. Moran, y D. Christendat, “Structurally diverse dehydroshikimate dehydratase variants participate in microbial quinate catabolism”, *Mol. Microbiol.*, vol. 103, núm. 1, pp. 39–54, 2017, doi: 10.1111/mmi.13542.

[13] D. Gahloth, G. A. Aleku, y D. Leys, “Carboxylic acid reductase: Structure and mechanism”, *J. Biotechnol.*, vol. 307, pp. 107–113, ene. 2020, doi: 10.1016/j.jbiotec.2019.10.010.

[14] A. N. Khusnutdinova *et al.*, “Exploring bacterial carboxylate reductases for the reduction of bifunctional carboxylic acids”, *Biotechnol. J.*, vol. 12, núm. 11, p. 10.1002/biot.201600751, nov. 2017, doi: 10.1002/biot.201600751.

[15] A. P. Burgard, P. Pharkya, y C. D. Maranas, “Optknock: A bilevel programming framework for identifying gene knockout strategies for microbial strain optimization”, *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 84, núm. 6, pp. 647–657, 2003, doi: 10.1002/bit.10803.