

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PRODUCCIÓN OPTIMIZADA DE VITAMINA B12 EN PSEUDOMONAS
PUTIDA KT2440 CON HERRAMIENTAS DE BIOLOGÍA SINTÉTICA

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en
Biología para optar al grado y título de Maestría Académica en Biología

THOMAZ SATUYE PRIETO DE LIMA

2024

Agradecimientos

Mi profundo agradecimiento a mi comité de tesis, a PhD. Keilor Rojas Jiménez por su acompañamiento, escucha, confianza y amistad. También a PhD. Christopher Vaglio Cedeño por sus invaluable aportes y guía en el proceso de análisis, su instrucción en el aprendizaje del uso de nuevas herramientas. Y agradezco a PhD Alejandro Hernandez Soto, por la disposición a apoyarme en este proceso de la maestría.

Agradezco profundamente al Sistema de Estudios de Posgrado que me abrió las puertas a este proceso y esta etapa tan importante de mi vida. Todas las formas de apoyo brindadas por parte del SEP han sido vitales a lo largo de esta travesía y me ha dado la oportunidad de crecer como persona y científico. Quiero reconocer también al Laboratorio de Ecología y Genética de Microorganismos (LEGMI) de la Universidad de Costa Rica por permitirme disponer del espacio del laboratorio donde aprendí tanto. También al Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) por su ayuda con los análisis químicos de las muestras. A Jessica Morera, por acompañarme en el aprendizaje y enseñarme diversos procedimientos del laboratorio. Al grupo de estudiantes que formaron o forman parte de Laboratorio y que me dieron palabras de ánimo, su ayuda y consejos en diversos momentos del proceso.

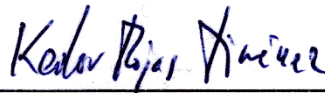
Quiero agradecer a mi familia, mi mamá y papá por todo el apoyo brindado, las conversaciones, celebraciones, palabras de aliento, su compromiso y lealtad. Sin su acompañamiento este proceso no hubiera sido posible. Así como a Sofía Mendoza, Pablo Zagt y Daniel Escamilla, de mis amistades más cercanas que siempre dieron su escucha activa y motivación en momentos de dudas e incertezas.

No puedo dejar de agradecer a la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica, a todo el cuerpo docente que acompañaron mi camino en la ciencia y que en tantas ocasiones me inspiraron a seguir y llegar hasta acá. Igualmente quiero reconocer al personal técnico y administrativo de la Escuela y de la Universidad de Costa Rica que en colectivo hacen posible este gran proyecto de educación superior pública de calidad.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Biología.”



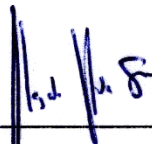
PhD. Max Chavarria Vargas
Representante de la Decana
Sistema de Estudios de Posgrado



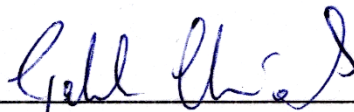
[PhD. Keilor Rojas Jimenez]
Director de Tesis



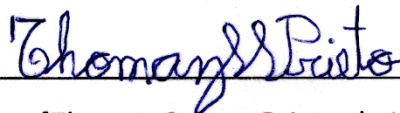
[PhD. Christopher Vaglio Cedeño]
Asesor



[PhD. Alejandro Hernández Soto]
Asesor



[PhD. Gabriela Chavarría Soley]
Directora del Programa de Posgrado en Biología



[Thomaz Satuye Prieto de Lima]
Candidato

Tabla de contenidos

Resumen.....	v
Lista de tablas	vi
Lista de figuras.....	vi
Introducción	1
Metodología.....	8
Objetivo General:.....	15
Objetivos Específicos:	15
Artículo: Strategy for Optimizing Vitamin B12 Production in Pseudomonas putida KT2440 Using Metabolic Modeling.....	16
Resultados y discusión del objetivo 2.....	41
Perspectivas finales.....	44
Referencias bibliográficas.....	46

Resumen

La vitamina B₁₂, o cobalamina, es un cofactor en actividades enzimáticas y desempeña diversos roles en la fisiología humana. B₁₂ es una vitamina compleja de alto valor para la industria farmacéutica, alimentaria y de producción de aditivos. El sistema de producción actual utiliza bacterias como *Pseudomonas denitrificans* de crecimiento lento y difícil mejora genética. El presente proyecto propone el uso de *Pseudomonas putida* KT2440 como un modelo alternativo para la producción de vitamina B₁₂ debido a que posee un chasis robusto para modificaciones genéticas, contiene genes de la ruta biosintética de la vitamina y además existe un gran interés en producir este compuesto utilizando medios biotecnológicos. El proyecto permitió curar y se modificar un modelo metabólico a escala genómica de *Pseudomonas putida* KT2440 y se evaluaron diferentes estrategias para optimizar la producción de cobalamina utilizando los algoritmos Knockin y OptGene del COBRA Toolbox. También se examinó la presencia de riboswitches como elementos cis-reguladores y se calcularon los rendimientos teóricos de crecimiento de biomasa y producción de vitamina B₁₂ utilizando un análisis de equilibrio de flujos. Según el análisis de equilibrio de flujos (FBA) de *P. putida* KT2440 en condiciones de cultivo, los valores de producción de biomasa podrían alcanzar 1.802 gDW⁻¹·hr⁻¹·L⁻¹, y la producción de vitamina B₁₂ podría llegar a 0.359 μmol·gDW⁻¹·hr⁻¹·L⁻¹. El proyecto logró identificar dos reacciones adicionales para *P. putida* KT2440 que resultarían en un incremento de 14 veces mayor de tasa teórica de síntesis de vitamina B₁₂ calculada en comparación con el control *Pseudomonas denitrificans*. Específicamente, se propone la adición de genes de enlace de aminopropanol y la modificación de riboswitches permitirían que *P. putida* KT2440 sea un chasis adecuado para la producción industrial de vitamina B₁₂.

Lista de cuadros

Tabla 1. Tasas de consumo de compuestos del medio de fermentación para para la síntesis de la Vitamina B ₁₂	10
Tabla II: Lista de reacciones utilizadas para la prueba OptGene.	13

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema metodológico general del proyecto para las etapas de análisis <i>in silico</i> y la etapa experimental.	8
Resumen Gráfico del artículo (Graphical abstract):	16
Figura 2: Producción promedio de vitamina B ₁₂ por <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 en medio de cultivo Luria Bertani.....	41
Figura 3: Biomasa celular estimada para <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 en medio de cultivo Luria-Bertani a partir de valores de OD ₆₀₀	42

Introducción

La producción de la vitamina B₁₂ por medio de la optimización de rutas metabólicas de la bacteria *Pseudomonas putida* KT2440, puede constituir una alternativa de gran potencial para la producción industrial de este compuesto en relación con el uso de cepas tradicionales. Dado el alto valor comercial de este compuesto, resulta de interés buscar formas más eficientes de producir la vitamina, ya que las cepas utilizadas actualmente están limitadas por la ausencia de herramientas de ingeniería genética, tienen crecimiento lento en medios de cultivo complejos (Martens et al., 2002). En este aspecto, por medio de modelos computacionales, se pueden hacer estimaciones de rendimientos teóricos de crecimiento bacteriano y producción del metabolito de interés que permitan reorientar y las rutas metabólicas para la optimización de la producción de vitamina B₁₂. A continuación, se presentan una serie de antecedentes y una contextualización teórica que permitirán este abordaje.

La vitamina B₁₂, también conocida como cobalamina, es un cofactor de enzimas que es utilizado en el metabolismo de varios eucariotas como animales y protistas, estos últimos la requieren pero no la producen. En el caso de los hongos y las plantas, estos grupos del todo no utilizan esta vitamina como cofactor enzimático (Moravcová et al., 2024). Este compuesto es producido únicamente por procariontes (Biedendieck et al., 2010), específicamente, por bacterias y arqueas (Fang et al., 2018). La vitamina B₁₂ es la vitamina más grande y compleja de todas las vitaminas (Watanabe, 2007) y se encuentra en su forma natural como adenosilcobalamina o metilcobalamina (Kang et al., 2012). Otra forma no natural es la cianocobalamina que es comúnmente utilizada en suplementos vitamínicos (Allen et al., 2018). Diversas formas de la vitamina se utilizan en la producción de medicinas de calidad, suplementos alimenticios y alimentos enriquecidos (Temova Rakuša et al., 2023).

La vitamina B₁₂, es un nutriente clave para diversos procesos bioquímicos, fisiológicos, el metabolismo celular y con ello es vital para la prevención de enfermedades. Ya que funciona como un cofactor esencial para actividades enzimáticas humanas (Biedendieck et al., 2010), es esencial para la síntesis de ADN, eritrocitos y el mantenimiento de la mielina (Melina et al., 2016). También tiene un papel importante en el metabolismo de la mitocondria y es

importante para la prevención de anemia megaloblástica (Green et al., 2017). A nivel social, se ha visto una alta prevalencia de déficit de cobalamina (23-35%) en individuos sobre los 80 años (Johnson et al., 2010). Por eso, algunos estudios recomiendan el consumo de suplementos de la vitamina B₁₂ en adultos mayores y otras poblaciones, ya que disminuye ese riesgo (Stabler, 2013). Además, los alimentos de origen vegetal naturalmente (con pocas excepciones) no suelen contener cantidades significativas de la vitamina por lo que para las poblaciones con alimentaciones basadas en plantas se recomienda su suplementación o el consumo de alimentos enriquecidos (Temova Rakuša et al., 2023).

En cuanto a la producción y comercialización global de las vitaminas del complejo B, se ha reportado un crecimiento del mercado en más de 4% anualmente (Nielsen & Keasling, 2016). En el 2017 la vitamina B₁₂ fue valorada en aproximadamente \$2700 por kg de alta pureza. La vitamina B₁₂ es ampliamente utilizada en la industria de la alimentación, así como para uso clínico y existe un gran interés comercial en su producción (Czajka et al., 2017).

Ruta de biosíntesis y producción microbiana de Vitamina B₁₂

Existen diferentes variaciones orgánicas de la vitamina B₁₂ que pertenecen a la familia de las cobalaminas. Todas están compuestas de un anillo corrinoide y un ligando superior. El ligando superior puede ser adenosina, metil, hidroxil o un grupo ciano, y es la razón de que exista en distintas formas (Fang et al., 2017).

En la naturaleza la vitamina B₁₂ se produce por medio de una vía de síntesis de compuestos tetrapirroles, esto requiere cerca de 30 pasos mediados por enzimas (Biedendieck et al., 2010; Kang et al., 2012). Hay dos grandes rutas biosintéticas de la vitamina B₁₂, la ruta dependiente de oxígeno y la ruta independiente de oxígeno (Biedendieck et al., 2010). Estas difieren principalmente en el tiempo de inserción de cobalto y los requerimientos de oxígeno (Fang et al., 2018). En la síntesis de la vitamina B₁₂, la aeróbica está presente en organismos como *Pseudomonas denitrificans*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhodobacter sphaeroides* y *Pseudomonas aeruginosa*. Por otro lado, la vía anaeróbica se encuentra en organismos como *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Propionibacterium shermanii*, *Bacillus megaterium*, *Citrobacter amalonaticus* y *Lactobacillus reuteri* (Fang et al., 2017).

La vía de síntesis de la vitamina B₁₂ se puede dividir en cuatro secciones, comienza con la síntesis de δ- aminolevulinato (ALA) y finaliza con la síntesis de la cobalamina como tal (Raux et al., 2000; Scott & Roessner, 2002). Otros compuestos tetrapirroles, también se originan del ALA (Yin & Bauer, 2013). El ALA se puede sintetizar por vías C4 y C5. En la vía C4, se cataliza la formación de ALA a partir de glicina y succinil-coA por medio de la enzima ALA sintasa. En la vía C5 el ALA puede ser sintetizado a partir de glutamato por tres reacciones enzimáticas (Avissar et al., 1989). El proceso general de síntesis de la vitamina B₁₂ requiere cerca de 30 genes y al eliminar cualquiera de ellos no se daría la producción de la vitamina (Cai et al., 2018).

La producción de vitaminas por medio de la fermentación microbiana más viable y mayor que la síntesis química, que requiere una gran cantidad de pasos (Mani, 2020). Se dice que la síntesis química requeriría más de 60 pasos (Biedendieck et al., 2010). De esta forma, para la producción industrial de vitamina B₁₂, se ha recurrido a cepas como *Pseudomonas denitrificans*, *Propionibacterium shermanii*, o *Sinorhizobium meliloti* (Fang et al., 2017). Pero se ha visto que estas cepas cuentan con limitaciones como períodos de fermentación largos, medios de crecimiento complejos y falta de sistemas genéticos que puedan ser modificados por métodos ingenieriles (Martens et al., 2002).

En la revisión de Balanova et al, publicada en abril del 2021 se exponen una serie de cepas utilizadas para el proceso de fermentación de producción de vitamina B₁₂ (Balabanova et al., 2021). En esta publicación el mayor rendimiento reportado para las diversas cepas productoras de cobalamina fue el de la bacteria *Pseudomonas denitrificans* SC510 (Li et al., 2008). La bacteria *Pseudomonas denitrificans* es actualmente una de las cepas utilizadas para la producción industrializada de cobalamina (Biedendieck et al., 2010). Esta bacteria contiene todos los genes para la síntesis de vitamina B₁₂ y están divididos principalmente en dos clusters (Nguyen-Vo et al., 2018). Las investigaciones en *P. denitrificans* se han limitado principalmente a estrategias más tradicionales como la mutagénesis aleatoria y optimización en procesos de optimización de fermentación (Fang et al., 2017). No obstante, esta cepa al

igual que otras cuenta varias limitaciones como crecimiento lento y dificultades para ser alterado por herramientas de edición genética (Fang et al., 2018).

Las secuencias de ARN, conocidas como riboswitches son un punto importante de regulación que debe ser considerado para la producción de la vitamina B₁₂. Estos son elementos de control de sensibilidad a ARN en la región cis-reguladora que modula la expresión genética de secuencias en muchos microorganismos productores de cobalamina. Funcionan como elementos de control que responden a la presencia de ligandos (Nahvi et al., 2004). Estos Riboswitches- B₁₂ pueden estar presentes en regiones 5' no transcritas del ARNm y llegan a formar una estructura secundaria que sensa la cobalamina al unirse a ella. Este mecanismo de control es de las formas predominantes de metabólica de concentración de vitamina B₁₂ en microorganismos (Mandal & Breaker, 2004).

Los cambios en la regulación y expresión de los genes de la vía metabólica de la vitamina B₁₂ en *P. denitrificans* resultaron en un aumento en la producción de este compuesto (Nguyen-Vo et al., 2018). En este sistema biológico, los operones de genes de la vía estaban siendo controlados por riboswitches a nivel de transcripción y traducción. Se vio que para cluster I, la remoción de los riboswitches y el remplazo de los promotores mejoró la producción de B₁₂ al doble. Pero sorprendentemente, la modificación del cluster II perjudicó la producción del compuesto (Nguyen-Vo et al., 2018). La presencia de mecanismos regulatorios en la producción de la vitamina B₁₂ debe ser contemplada a la hora de proponer estrategias de modificación genética eficientes para la optimización de los rendimientos de producción del metabolito de interés.

Biología sintética

Recientemente la biología sintética ha ido emergiendo como un campo propio en la ingeniería que ha adoptado cada vez principios ingenieriles para transformar células en maquinas vivientes diseñadas. Este acercamiento procura programar sistemas biológicos para que realicen una función determinada por el usuario. En esta área se parten principios de la ingeniería como el diseño modular, la estandarización de partes e inclusive simulaciones

computacionales (Tang et al., 2021). Estos principios permiten por medio de la investigación, modular las funciones celulares (Bashor & Collins, 2018). Así la biología sintética se constituye como un campo multidisciplinario que procura desarrollar nuevos componentes biológicos, sistemas, dispositivos así como el rediseño de sistemas naturales (Zhao & Ning, 2023). Gracias a estas tecnologías, es posible crear nuevos componentes genéticos y módulos que direccionen los flujos metabólicos hacia un bioproducto específico (Czajka et al., 2017). Entre sus diferentes aplicaciones, la biología sintética se puede utilizar para la producción de compuestos diseñados o naturales de alto valor como lo son las vitaminas (Shi et al., 2022).

Se han visto grandes ventajas en el uso de bacterias modificadas para la producción de varios compuestos naturales, estas bacterias frecuentemente cuentan con facilidades en el manejo de laboratorio (Loeschcke & Thies, 2015). La producción eficiente de ciertas moléculas puede ser alcanzada con la introducción o modificación de vías biosintéticas al emplear distintas estrategias de ingeniería genética. Para la síntesis de un compuesto en específicos, se puede buscar la optimización de la actividad enzimática y alterar los niveles de expresión genética, así como el uso de sistemas sintéticos de control, rediseño del metabolismo central y la eliminación de rutas competidoras (Xiao et al., 2016).

En este aspecto, el uso de modelos metabólicos ha facilitado la mejora en el rendimiento de producción de compuestos de interés (Curran et al., 2012). Para estos estudios se han desarrollado Modelos metabólicos a escala genómica (GSM) y Análisis basados en restricciones siendo el Balance de Flujo (FBA) uno de los más populares para hacer simulaciones metabólicas (Simeonidis & Price, 2015). Las reconstrucciones metabólicas a escala genómica brindan una plataforma para profundizar en el conocimiento genómico, genético y bioquímico del organismo, esto puede ser transformado en un modelo metabólico matemático (Schellenberger et al., 2010).

Pseudomonas putida

La bacteria *Pseudomonas putida* pertenece al grupo de las *Pseudomonas* fluorescentes y es un organismo sumamente ubicuo que coloniza ambientes de la rizosfera y hasta muy adaptado para ese medio. Las bacterias del género *Pseudomonas sp.* se han

caracterizado por tener una gran capacidad de resistencia al estrés endógeno y exógeno, así como su potencial para producir muchos compuestos bioactivos (Gurney R & Thomas C.M, 2011). En el caso de *P. putida* KT2440, su genoma ya fue secuenciado y está disponible en bases de datos, además la información genómica ha sido revisada en numerosas ocasiones (Nelson et al., 2002).

Para la cepa *Pseudomonas putida* KT2440, desde el 2008 existe una reconstrucción de modelo metabólico con información genómica, bioquímica y fisiológica (Nogales et al., 2008). Esta bacteria del suelo Gram negativa ha sido “domesticada” para fines biotecnológicos, particularmente dentro de la biología sintética y tiene un gran potencial en la biotecnología (P. Nickel et al., 2014). La cepa *P. putida* KT2440 ha sido reconocida como una cepa no dañina y certificada como “generalmente reconocida como segura” (GRAS), lo que facilita estudios en laboratorio, así como apta para producción industrial (Loeschke & Thies, 2015). Tanto *Pseudomonas putida* como *Pseudomonas denitrificans* han sido reconocidas como microorganismos con genes de biosíntesis de la ruta de la Vitamina B₁₂ (Balabanova et al., 2021).

Por estas razones, se considera que *P. putida* KT2440 tiene muy buenas características como chasis (P. I. Nickel et al., 2016). Aun así, en las revisiones bibliográficas realizadas no se encontraron reportes del uso de esta cepa para la producción optimizada de la cobalamina ni tampoco se encontraron trabajos de ingeniería genética sobre *P. putida* con el mismo objetivo de síntesis de la vitamina.

El objetivo de esta investigación es curar y modificar un modelo metabólico de la bacteria *Pseudomonas putida* KT2440 con el fin de valorar estrategias de ingeniería genética que permitieran la producción optimizada de cobalamina. Se espera que por medio de los algoritmos presentes en la herramienta COBRA ToolBox se pueda curar y modificar un modelo metabólico de *P. putida* KT2440 y que a través de estrategias de análisis tipo Knock-in y Opt-gene, se pueda analizar propuestas de modificación genética que favorezcan a una producción optimizada de la vitamina B₁₂. Esto tomando como referencia la producción biosintética de *P. denitrificans* como punto de comparación. También se busca cuantificar el rendimiento real de producción de vitamina B₁₂ de la cepa silvestre de *P. putida* KT2440 para tener como punto de referencia de las capacidades metabólicas de la bacteria para este

fin. Se espera que con los Análisis de Balance de Flujo se puedan calcular rendimientos teóricos de crecimiento en biomasa y tasas de producción de la vitamina B₁₂ para evaluar las posibles estrategias de optimización de síntesis de vitamina B₁₂ y con ello poder crear un circuito genético para la intervención biotecnológica.

Materiales y métodos

El esquema metodológico general se muestra a continuación en la Figura 1. Aquí se resumen las principales etapas del procedimiento, tanto la parte *in silico* de simulaciones bioinformáticas como la parte experimental de laboratorio.

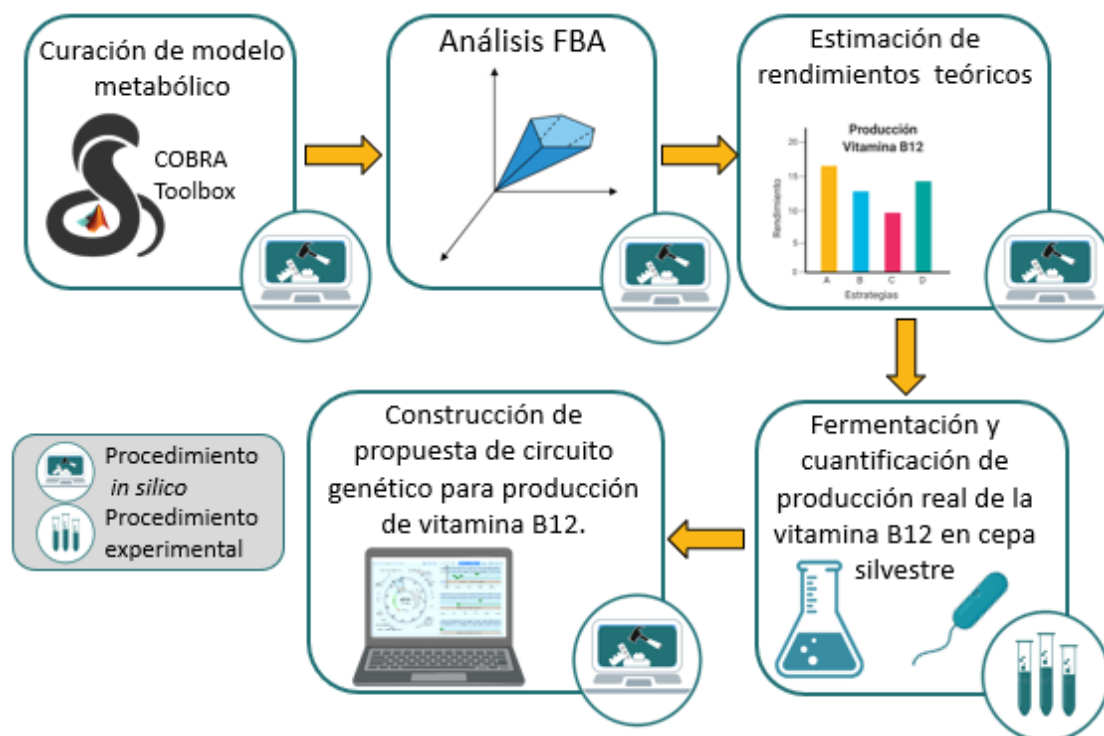


Figura 1: Esquema metodológico general del proyecto para las etapas de análisis *in silico* y la etapa experimental.

Organismo modelo

La bacteria *Pseudomonas putida* KT2440, es un organismo modelo de gran potencial en el área biotecnológica (P. Nikel et al., 2014). Es un organismo estrictamente aeróbico (Kampers et al., 2019). Existe un modelo metabólico para la cepa KT2440 que fue publicado en el 2008, para esta publicación, los análisis de reconstrucción basados en restricciones (COBRA) fueron exitosos para construir y analizar *in silico* las reconstrucciones metabólicas a escala genómica (Nogales et al., 2008). Las bacterias de este género tienen un gran potencial

biotecnológico al poder producir diversos compuestos y además cuentan con una gran capacidad de resistencia al estrés (Gurney R & Thomas C.M, 2011).

Modelo bioinformático

Se utilizó un modelo metabólico a escala genómica (GEM) para *P. putida* KT2440 de la base de datos de Modelos BIGG que está registrado bajo el ID BIGG: iJN1463; el modelo tiene 2,153 metabolitos, 2,927 reacciones y 1,462 genes (Schellenberger et al., 2010). Se descargó en formato SBML para su posterior uso en la herramienta COBRA Toolbox versión 2.13.3 (Schellenberger et al., 2011) en Matlab 2021b para los análisis posteriores. Se realizó un análisis de reconstrucción basados en restricciones (COBRA) que permite predecir fenotipos celulares y analizar las propiedades de redes y sistemas de ingeniería metabólica (Lewis et al., 2012).

Se confirmó que el modelo de la cepa contenía los genes que codifican para la ruta metabólica de producción de vitamina B₁₂. Además, se verificaron las rutas bioquímicas reportadas para *Pseudomonas putida* KT2440 en la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG) (Kanehisa & Goto, 2000). Se compararon las reacciones de la vía de la cobamida reportadas para *P. putida* con las reportadas para *P. denitrificans*, que es un estándar en la industria, por lo que se consideró como un punto de referencia y comparación para ambas bacterias. Las reacciones que no estaban anotadas en el modelo BIGG pero sí presentes en el genoma se agregaron al modelo con la descripción estequiométrica correspondiente con una función de COBRA Toolbox (la función “addReaction”). Las reacciones agregadas fueron cobirinato a,c-diamida sintetasa (EC:6.3.5.9), 5,6-dimetil benzimidazol sintetasa aeróbica (EC: 1.13.11.79) y precorrina-3B sintetasa (EC:1.14.13.83). El modelo curado está disponible en los materiales suplementarios (Archivo suplementario S1). Cuando fue necesario, se realizó un BLASTN en UNIPROT para confirmar que las secuencias codificantes de las enzimas en la vía de KEGG efectivamente estaban presentes en el genoma de *P. putida* KT2440.

Las características de cada reacción agregada (sustratos, productos, direccionalidad y estequiometría) se establecieron con información de la base de datos KEGG (Kanehisa & Goto, 2000). La direccionalidad de las reacciones del modelo fue verificada utilizando

información de la base de datos BIGG para cada enzima (Schellenberger et al., 2010) y una función de COBRA Toolbox (la función “printRxnFormula”); el modelo resultante, con las reacciones faltantes añadidas, fue anotado en un formato de “systems biology markup language” (SBML). En el proceso, se utilizaron funciones de COBRA Toolbox para los pasos de curación de la red metabólica (Schellenberger et al., 2011). COBRA Toolbox admite formatos y modelos tipo SBML (Keating et al., 2006).

Condiciones del medio de cultivo de la simulación

Para el cálculo del FBA de la producción de la tasa de crecimiento en biomasa de la bacteria y del rendimiento de vitamina B₁₂, se establecieron condiciones que simulaban un medio de cultivo descritas por Fang *et al.*, que proponen un medio para la síntesis de vitamina B₁₂ en *Escherichia coli* (Fang et al., 2018). Para definir las tasas de consumo de glucosa y succinato se consideraron los valores experimentales reportados (P. Nickel et al., 2015) y para el consumo de oxígeno se tomó el valor de utilizado en otro artículo de ingeniería *in silico* en *P. putida*, igualmente (Kampers et al., 2019). Se utilizó la función “ChangeRxnBounds” de COBRA ToolBox para modificar los límites inferiores de tasas de consumo de los compuestos que estarían presentes en el medio de cultivo de fermentación para la producción de la vitamina B₁₂. Los valores de las tasas de consumo para cada compuesto utilizado en el FBA se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Tasas de consumo de compuestos del medio de fermentación para para la síntesis de la Vitamina B₁₂.

Compuesto	Tasa de consumo (mmol/ gdw * h)
Oxígeno	18.5
Glucosa	6.14
L-Treonina	4.64
Succinato	4.35
Glicina	3.0
Dimetilbencimidazol (DMB)	0.0681
Cobalto ²⁺	0.0375

Análisis de balance de flujo (FBA) y knockin

El análisis de balance de flujo (FBA) se utiliza ampliamente para predecir rendimientos teóricos de modelos metabólicos a escala genómica. El FBA calcula el flujo de metabolitos

a través de la red metabólica, prediciendo así la tasa de crecimiento del organismo y las tasas de producción de metabolitos importantes para la biotecnología (Orth et al., 2010). El FBA optimiza los flujos de la red para una función dada, que puede ser la biomasa de una reacción o la predicción de valores de crecimiento *in silico*. Esta optimización de los valores de flujo metabólico maximiza una función objetivo seleccionada, como las reacciones de interés (Oberhardt et al., 2009). Luego, se utiliza una matriz de coeficientes estequiométricos para cada reacción con el fin de estimar su flujo de acuerdo con una serie de restricciones del sistema (Anand et al., 2020).

Las restricciones del sistema están dadas por las condiciones de las reacciones del modelo, tales como los cambios en los niveles de disponibilidad de oxígeno, fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y otros. Otras restricciones también se pueden agregar como la disponibilidad de oxígeno, de fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno e inclusive algunas otras moléculas como aminoácidos. Así, el FBA se puede utilizar para predecir rendimientos teóricos de tasa de producción de metabolitos bajo diferentes condiciones (Orth et al., 2010)

En este estudio, se utilizó el FBA para hacer estimaciones cuantitativas de las tasas de crecimiento de biomasa bacteriana y los rendimientos de producción de vitamina B₁₂. Los rendimientos obtenidos de las pruebas de FBA se compararon con los valores de rendimiento de la producción de vitamina en *P. denitrificans* (Li et al., 2008). Para ambas simulaciones, basadas en knockin y en OptGene, se analizaron la vía biosintética del metabolismo de la porfirina en *P. putida* KT2440 en la base de datos KEGG bajo el nombre "Porphyrin metabolism". Este esquema presenta las reacciones de la vía metabólica de la vitamina B₁₂ y las vías circundantes que producen otros compuestos.

Para las simulaciones knockin, se agregaron al modelo curado varias reacciones que podrían mejorar los rendimientos generales de producción de vitamina B₁₂ en la vía de la bacteria. Específicamente, se añadieron reacciones que podrían mejorar la producción de precursores de la vía. Las nuevas reacciones se añadieron al modelo con la función "Add reaction" de la herramienta COBRA Toolbox. Para cada simulación knockin, se estimó el crecimiento de biomasa bacteriana y los rendimientos de producción de vitamina B₁₂, como se muestra en el

código correspondiente (Archivo suplementario S2). En todas las simulaciones knockin, el modelo con el mejor desempeño se utilizó para los análisis de OptGene.

Simulaciones basadas en OptGene

El análisis de OptGene es una técnica dentro de los métodos de modelado in silico basados en restricciones, como el FBA (Goldstein & Bockmayr, 2015; Rocha et al., 2008). Es un procedimiento computacional que consiste en una simulación de deleciones génicas que podrían aumentar la tasa de producción de la reacción objetivo al eliminar algunas reacciones potencialmente dispensables del modelo. En este caso, la producción de vitamina B₁₂ puede aumentar al reducir el número de precursores y energía invertidos en la síntesis de compuestos bioquímicos y procesos secundarios o no vitales (Rocha et al., 2008).

En la vía biosintética del metabolismo de la porfirina en *P. putida* KT2440 en la base de datos KEGG, se identificaron reacciones cercanas a la vía metabólica de interés, específicamente algunas que podrían consumir parte de los precursores necesarios para la síntesis de vitamina B₁₂. Se definió una lista de reacciones candidatas para las simulaciones de deleción, como se muestra en la Tabla II. Todas las reacciones anotadas se incluyeron como candidatas para un hipotético knockout que eventualmente podría aumentar la reacción objetivo, en este caso, la producción de vitamina B₁₂ (EC: 2.7.8.26). Se programó un algoritmo basado en OptGene que utilizó todas las combinaciones teóricas posibles de deleciones de reacciones, que iban de una a un máximo de cinco deleciones simultáneas de la lista de reacciones (Tabla II), y se realizó un FBA tanto de la biomasa como de las funciones de vitamina B₁₂ en cada simulación. En el ensayo basado en OptGene se usaron las condiciones del medio teórico descritas en la Tabla I y el modelo curado con las dos reacciones sugeridas por los resultados de las simulaciones knockin (reacciones de enlace de aminopropanol). El código correspondiente utilizado para las simulaciones basadas en OptGene se puede encontrar en los materiales suplementarios (Archivo suplementario S3).

Tabla II: Lista de reacciones utilizadas para la prueba OptGene.		
	Nombre de reacción	Número EC
1	Coproporfirinógeno oxidasa	1.3.3.3
2	Protoporfirinógeno oxidasa (aeróbica)	1.3.3.4
3	Coproporfirinógeno III deshidrogenasa independiente del oxígeno	1.3.98.3 - 1.3.99.22
4	Uroporfirinógeno descarboxilasa (uroporfirinógeno III)	4.1.1.37
5	Sirohidroclorina ferroquelatasa	4.99.1.4
6	Ferroquelatasa	4.99.1.1
7	Sistema de escisión de la glicina	1.4.4.2
8	Tetrahidrofolato aminometiltransferasa	2.1.2.10
9	Aminometiltransferasa	2.1.2.10
10	2-Oxogluterato deshidrogenasa	1.8.1.4 - 1.2.4.2
11	L-allo-treonina deshidrogenasa	1.1.1.381
12	Sirohidroclorina deshidrogenasa (NAD)	1.3.1.76

Proceso de fermentación

El experimento se realiza por triplicado para cada tratamiento (Biedendieck et al., 2010). El inóculo de la fermentación se preparó a partir de una colonia pura de la cepa de *P. putida* KT2440 en crecimiento por 16 horas en 15 mL de medio Luria-Bertani (overnight). La fermentación se realizó en un Erlenmeyer con 150 mL de medio Luria-Bertani de manera similar a lo reportado por otros autores (Pastor et al., 2016). La fermentación se llevó a cabo por 9 horas a 25°C y con una agitación de 170 rpm (Avendaño et al., 2016). Se tomaron alícuotas de 10.5 mL cada hora para cuantificar la producción de la vitamina B₁₂ y para la medición de la absorbancia del OD₆₀₀ por medio de un biofotómetro. Para estimar la biomasa de la bacteria a partir del valor de OD₆₀₀, se usó un factor de correlación de 0.57 g de peso seco celular por litro por cada unidad de OD según fue utilizado en otro experimento con *P. putida* (Vogeleer et al., 2024).

Cuantificación y análisis del rendimiento de producción de vitamina B₁₂

Para cada una de las 3 réplica de cada tratamiento se extrajo una alícuota de 10.5 mL. La alícuota del cultivo fue tratada con buffer de lisis SDS por 4 minutos y con la ayuda de una jeringa de 25 mL se pasó por un filtro de 0,22 µm de tamaño de poro para filtrar el contenido (Fang et al., 2018). El filtrado se almacenó a -10 °C para su análisis posterior.

Reactivos para la cuantificación Vitamina B₁₂.

Se utilizaron patrones analíticos con concentración conocida para la vitamina B₁₂ (número de catálogo V2876, ≥98,0%), metanol (MeOH, grado gradiente, ≥99,9%, 34860), ácido acético (número de catálogo 45754), 1-heptanesulfonato de sodio monohidratado (número de catálogo 51832, adecuado para cromatografía de par iónico, LiChropur™, ≥99,0%). Estos reactivos fueron todos de Millipore Sigma (Burlington, MA, EE.UU.). El agua ultrapura (tipo I, 0,055 μS cm⁻¹ a 25 °C, 5 μg L⁻¹ TOC) se obtuvo utilizando un sistema A10 Milli-Q® Advantage y un sistema Elix® Advantage 10 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

Cuantificación de la Vitamina B₁₂.

Los analitos fueron analizados siguiendo el método de (Kim, 2016), con algunas modificaciones, utilizando un sistema Shimadzu (Shimadzu, Kioto, Japón) equipado con un detector de arreglo de fotodiodos (SPD-M20AV), un compartimento para columna (CTO-20A), un autosampler (SIL-20A HT) y una bomba cuaternaria (LC-20AT). Se utilizó una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (250 mm × 4.6 mm, con un tamaño de partícula de 5 μm; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.) para realizar la separación. Al tomar en cuenta el promedio de la cantidad de cobalamina previamente reportada para algunas bacterias (Balabanova et al., 2021), las muestras se transfirieron directamente a un vial HPLC listo para inyectar, tras ser filtradas con un tamiz de 0.20 μm (poliamida, hidrofílico, catálogo 17845, Sartorius, Göttingen, Alemania) y se inyectaron 25 μL de la mezcla en el sistema. Se utilizó un método de gradiente con H₂O (solvente A) y MeOH (solvente B), ambos con 2.27 mmol L⁻¹ de sal de heptanosulfonato a 0.5 mL min⁻¹. El sistema de fase móvil se configuró de la siguiente manera: comenzando con 10% B en 0 min, 10% B en 2 min, 70% B en 22 min, 70% B en 27 min, 10% B en 28 min y 10% B en 35 min. La temperatura de la columna se mantuvo a 40 °C. La detección se realizó a una longitud de onda de 270 nm. Para evaluar la concentración de ambos analitos, se prepararon curvas de calibración lineales de ocho puntos diluyendo el estándar concentrado a volúmenes adecuados, con concentraciones de trabajo que oscilaron entre 2 y 10 μg mL⁻¹. Bajo estas condiciones, el tiempo de retención de la vitamina B₁₂ de 6.727 ± 0.150 min.

Objetivo General:

Establecer una estrategia de modificación genética para la producción optimizada de vitamina B₁₂ en una cepa de *Pseudomonas putida* KT2440 con herramientas de la biología sintética.

Objetivos Específicos:

1. Construir modelos metabólicos in silico en *Pseudomonas putida* KT2440 con la herramienta COBRA Toolbox para poder estimar la producción de vitamina B₁₂ de la cepa silvestre.
2. Cuantificar la producción real de la vitamina B₁₂ de la cepa de *Pseudomonas Putida* KT2440 silvestre (con HPLC) para evaluar la precisión de los resultados del modelo in silico.
3. Construir y evaluar modelos metabólicos modificados in silico, con COBRA Toolbox, de *Pseudomonas putida* KT2440 para valorar estrategias que optimicen la producción de la vitamina B₁₂ la bacteria.
4. Desarrollar una propuesta de modificación genética por medio de la elaboración de un constructo genético in silico para la producción optimizada de la vitamina B₁₂ para *Pseudomonas Putida* KT2440.

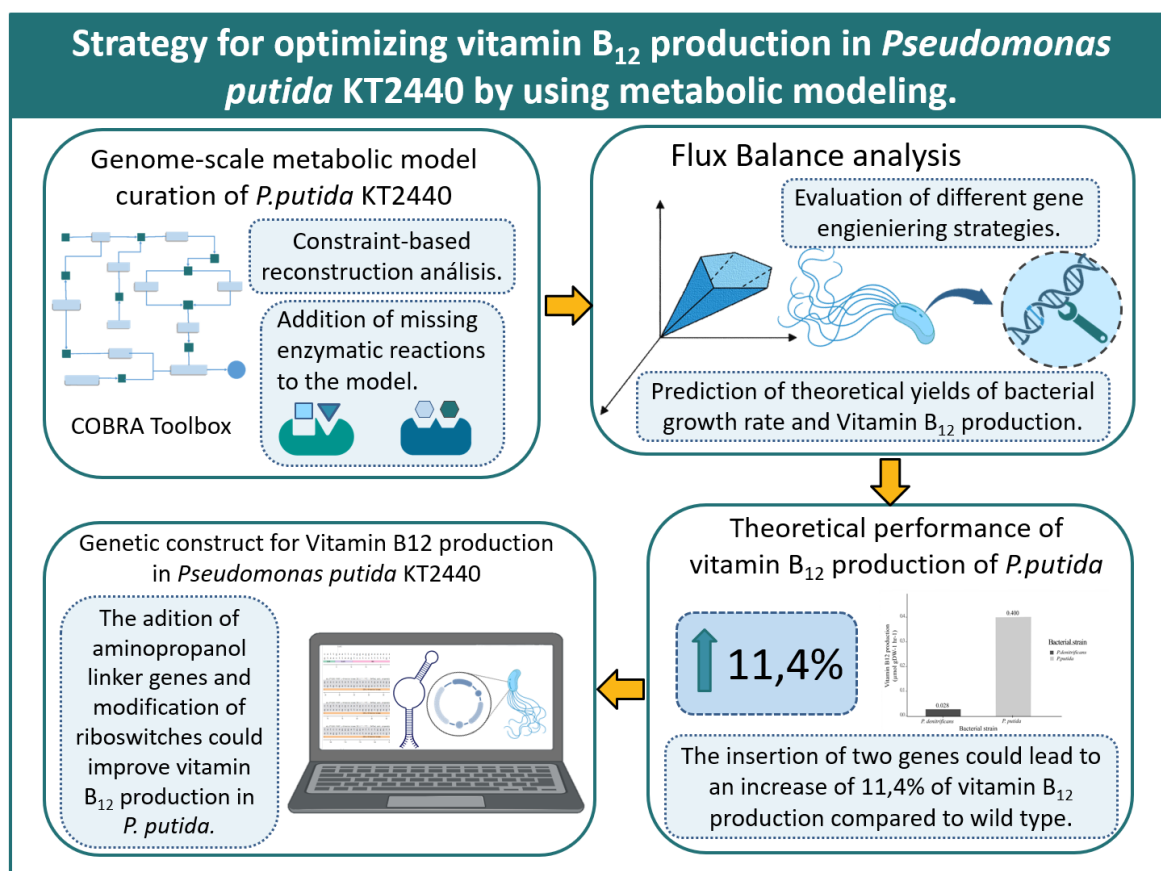
Artículo

El trabajo de esta tesis se elaboró y se publicó como artículo científico en la siguiente cita:

Prieto-de Lima, T.S.; Rojas-Jimenez, K.; Vaglio, C. Strategy for Optimizing Vitamin B₁₂ Production in *Pseudomonas putida* KT2440 Using Metabolic Modeling. *Metabolites* **2024**, *14*, (accepted).

A continuación, se muestra el manuscrito del artículo en el formato que corresponde a la revista *Metabolites* de MDPI (Impact factor 3.4).

Resumen Gráfico:



Strategy for Optimizing Vitamin B12 Production in *Pseudomonas putida* KT2440 Using Metabolic Modeling

Thomaz Satuye Prieto-de Lima ^{1,*}, Keilor Rojas-Jimenez ^{2,*} and Christopher Vaglio ³

¹ Postgraduate Program in Biology, University of Costa Rica, San José 11501, Costa Rica

² School of Biology, University of Costa Rica, San José 11501, Costa Rica

³ Health Research Institute, University of Costa Rica, San José 11501, Costa Rica; christopher.vagliocedeno@ucr.ac.cr

* Correspondence: thomaz.prieto@ucr.ac.cr (T.S.P.-d.L.); keilor.rojas@ucr.ac.cr (K.R.-J.);

Tel.: +506-2511-4145 (T.S.P.-d.L.); +506-2511-4145 (K.R.-J.)

Citation: Prieto-de Lima, T.S.; Rojas-Jimenez, K.; Vaglio, C. Strategy for Optimizing Vitamin B12 Production in *Pseudomonas putida* KT2440 Using Metabolic Modeling. *Metabolites* **2024**, *14*, x.
<https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor(s):
Name

Received: 19 August 2024

Revised: 24 September 2024

Accepted: 4 October 2024

Published: date



Copyright: © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the

terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract:

Background/Objectives: Vitamin B₁₂ is essential for human health, as it is a cofactor for enzymatic activities and plays various roles in human physiology. It is highly valued in the pharmaceutical, food, and additive production industries. Some of the bacteria currently used for vitamin production are difficult to modify with gene-editing tools and may grow slowly. We propose the use of the bacteria *Pseudomonas putida* KT2440 for the production of vitamin B₁₂ because it has a robust chassis for genetic modifications. The present work evaluates *P. putida* KT2440 as a host for vitamin B₁₂ production and explores potential gene-editing optimization strategies. **Methods:** We curated and modified a genome-scale metabolic model of *Pseudomonas putida* KT2440. We evaluated different strategies to optimize vitamin B₁₂ production using the knockin and OptGene algorithms from the COBRA Toolbox. Furthermore, we examined the presence of riboswitches as cis-regulatory elements and calculated theoretical biomass growth yields and vitamin B₁₂ production using a flux balance analysis (FBA). **Results:** According to the flux balance analysis of *P. putida* KT2440 under culture conditions, the biomass production values could reach 1.802 gDW⁻¹·h¹·L⁻¹, and vitamin B₁₂ production could reach 0.359 μmol·gDW⁻¹·hr⁻¹·L⁻¹. The theoretical vitamin B₁₂ synthesis rate calculated using *P. putida* KT2040 with two additional reactions was 14 times higher than that calculated using the control, *Pseudomonas denitrificans*, which has been used for the industrial production of this vitamin. **Conclusions:** We propose that, with the addition of aminopropanol linker genes and the modification of riboswitches, *P. putida* KT2440 may become a suitable host for the industrial production of vitamin B₁₂.

Keywords: microbial biotechnology; metabolic engineering; genome-scale metabolic model; cobalamin; vitamin B₁₂; flux balance analysis; *Pseudomonas putida* KT2440; systems biology

1. Introduction

Among all vitamins, vitamin B₁₂, also called cobalamin, is the largest and one of the most complex [1]; it is also an important nutrient and an essential cofactor for human enzymatic activities [2]. Vitamin B₁₂ is used for DNA synthesis, erythrocyte production, and myelin maintenance. It also plays a vital role in mitochondrial metabolism and prevents megaloblastic anemia

[3]. Vitamin B₁₂ production is currently of great interest to the pharmaceutical, food, and additive production industries [4]. In 2017, vitamin B₁₂ was valued at approximately USD 2700 per kg of high purity [5]. Manufacturing this compound via chemical synthesis is extremely complex, as it involves a series of reactions of more than 60 steps, whereas, at the biological level, the vitamin is synthesized via the tetrapyrrole compound pathway, requiring about 30 enzyme-mediated steps [2,6].

Modified bacteria have significant advantages for producing natural compounds, as bacteria are easy to handle under laboratory conditions [7]. In addition, the efficient production of certain compounds can be optimized by introducing or modifying biosynthetic pathways with different genetic engineering strategies. In this regard, using metabolic models has improved the production yield of compounds of interest [8]. For these purposes, genome-scale metabolic models (GSMs) and constraint-based analyses have been developed, with flux balance analysis (FBA) being one of the most popular for metabolic simulations [9]. The FBA predicts theoretical metabolite production rate yields under different conditions, such as oxygen levels, carbon sources, nitrogen sources, and amino acids [10,11]. Metabolic reconstructions at the genomic scale provide a platform to deepen an organism's genomic, genetic, and biochemical knowledge, which can be transformed into a mathematical metabolic model [12]. Along with the FBA, methods such as OptGene are used to identify knockout gene targets that may enhance a biochemical process of interest and biomass growth [13].

For the bacterium *Pseudomonas putida* KT2440, a metabolic model constructed with genomic, biochemical, and physiological information has been available since 2008 [14]. This Gram-negative soil bacterium has been “domesticated” for biotechnological purposes, and it has excellent potential in synthetic biology in particular [15]. The strain *P. putida* KT2440 has been recognized as a nonharmful strain and certified as “generally recognized as safe” (GRAS), facilitating laboratory studies as well as being suitable for industrial production [7]. Both *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas denitrificans* have been recognized as microorganisms with vitamin B₁₂ biosynthesis pathway genes [11].

In the case of *P. denitrificans*, the presence of B₁₂-responsive riboswitches in mRNA is vital for the vitamin B₁₂ regulation process, as they work as mRNA control elements of metabolites sensing [16]. Riboswitches contain ligand-binding sensor domains that enable the alteration of gene expression at both the transcriptional and translational levels, as they can bind to metabolites such as vitamin derivatives [17]. A study by Nguyen-Vo et al. suggests that vitamin B₁₂ biosynthesis can be considerably improved by modifying the promoter sequences

regulated by riboswitches [16]. In this regard, the Rfam database can provide valuable information on noncoding RNA families that have these types of regulatory functions [18]. Currently, *P. denitrificans* is one of the species used for industrialized vitamin B₁₂ production [2]. However, it has several limitations; for example, it has slow growth and is difficult to modify with gene-editing tools [4]. Conversely, *P. putida* KT2440 has optimal characteristics as a chassis [19].

This research aims to curate and modify a genome-scale metabolic model of *Pseudomonas putida* KT2440 to evaluate genetic engineering strategies for optimizing vitamin B₁₂ production. Using the algorithms present in the COBRA Toolbox, such as the gene knockin and OptGene algorithms, the metabolic model of *P. putida* KT2440 is modified, and different genetic modification strategies are evaluated to optimize vitamin B₁₂ production. This analysis uses the biosynthetic production of *P. denitrificans* as a point of comparison. The presence of riboswitch sequences in the *P. putida* KT2440 genome, which may work as cis-regulatory elements of the metabolic pathway of vitamin B₁₂, is also examined. The flux balance analysis is used to calculate theoretical biomass growth yields and vitamin B₁₂ production yields in order to evaluate possible optimization strategies for vitamin B₁₂ synthesis and thus propose a genetic circuit for biotechnological interventions.

1.1. Microbial Production of Vitamin B₁₂

The overall process of vitamin B₁₂ synthesis requires about 30 genes, and deleting any of them would result in the vitamin not being produced [20]. The cobalamin group is a part of the biosynthetic pathways in several microbial species. There are two major biological pathways for biosynthesis, namely, oxygen-dependent and oxygen-independent biological pathways [2], differing mainly in cobalt insertion time and oxygen requirements [4]. The aerobic route is present in *Pseudomonas denitrificans*, *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti*, *Rhodobacter sphaeroides*, and *Pseudomonas aeruginosa*. However, the anaerobic pathway is found in *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter amalonaticus*, *Bacillus megaterium*, *Propionibacterium shermanii*, and *Lactobacillus reuteri* [21].

Figure 1 shows the de novo production pathways, which comprise three major steps: (1) the production of uroporphyrinogen III (Uro III); (2) the transformation of Uro III into cobinamide (Cbi); and (3) the assembly of the nucleotide loop, which requires the synthesis of the lower axial ligand, usually 5,6-dimethylbenzimidazole [11]. Previously, the synthesis of 5-amino-levulinate (ALA) was also required, which can be produced by two pathways—the C4 and C5 pathways. In the C4 pathway, ALA is synthesized from glycine and succinyl-CoA with the enzyme ALA synthase (EC: 2.3.1.27). Conversely,

the C5 pathway uses L-glutamate as a precursor, and three enzymatic reactions occur: Gltx (EC: 6.1.1.17), HemA (EC: 1.2.1.70), and HemL (EC: 5.4.3.8) [22]. *P. putida* KT2440 has the genes encoding the C5 pathway but lacks the ALA synthase corresponding to the C4 pathway [23].

In the first stage, from glycine to the synthesis of Uro III, 4 enzymes are involved; then, in the second stage, from Uro III to the synthesis of adenosyl cobinamide phosphate, 14 enzymes are involved, being the longest stage. Finally, in the last stage, vitamin B₁₂ is produced from dimethylbenzimidazole (DMB) and the previously synthesized adenosyl cobinamide phosphate, for which four enzymes are involved: two are involved in the transformation of DMB; one is engaged in the synthesis of adenosine GDP cobinamide from adenosyl cobinamide phosphate; and the last enzyme, cobalamin synthase, combines these precursors to generate the vitamin of interest [23]. The metabolic pathway for vitamin B₁₂ production in *Pseudomonas putida* KT2440 requires three major precursor compounds (highlighted in Figure 1): 5-Aminolevulinate, produced from the amino acid glycine; (R) 1-Aminopropan-2-ol, resulting from the glycine and threonine metabolism pathway; and, finally, DMB, which comes from riboflavin metabolism [11].

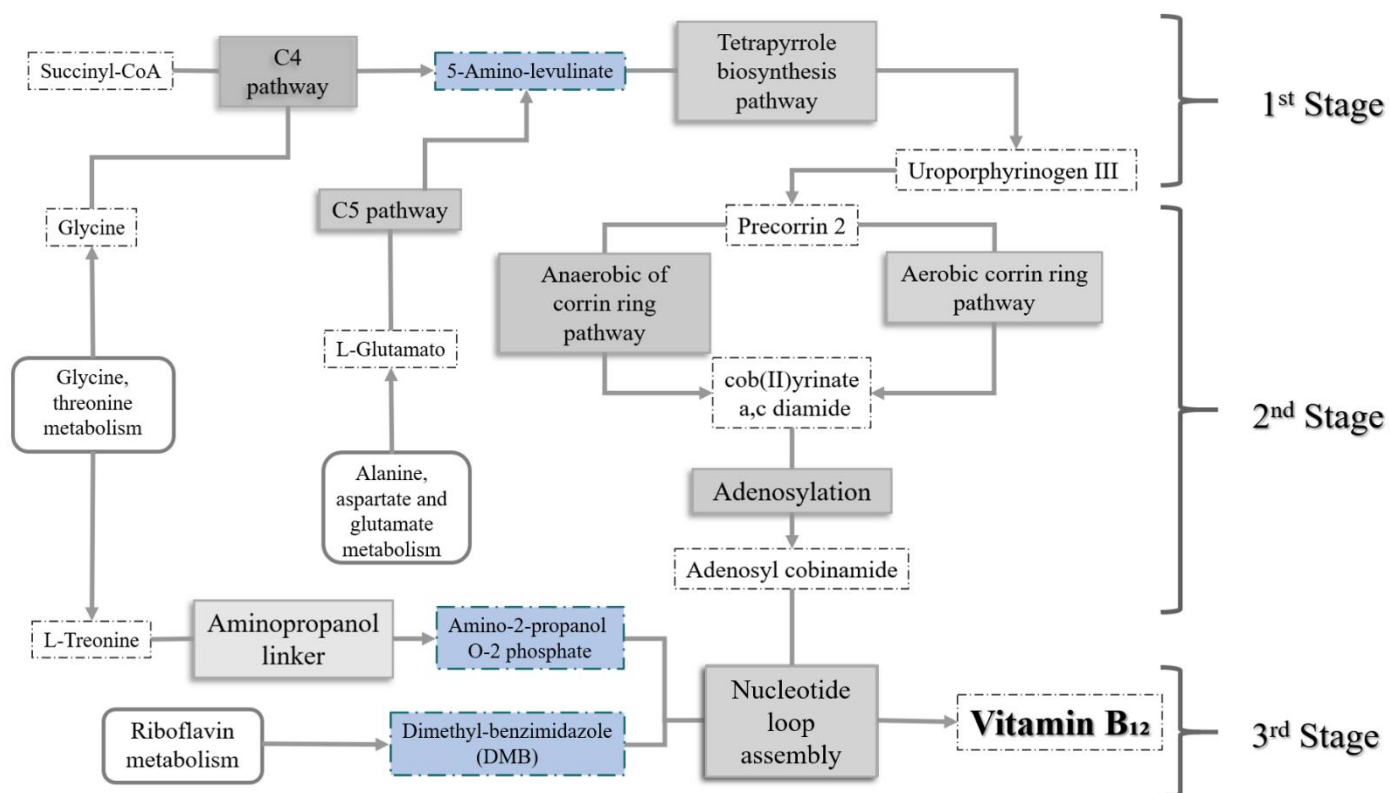


Figure 1. Main steps and stages in the metabolic synthesis pathway of vitamin B₁₂. The major precursor compounds are highlighted. Adapted from [23].

1.2. Industrial Production of Vitamin B₁₂

The bacterium *P. denitrificans* contains all genes required for vitamin B₁₂ synthesis, and they are mainly divided into two clusters [16]. The research on *P. denitrificans* has been mostly limited to more traditional strategies, such as random mutagenesis and optimization in fermentation processes [21]. In this work, *P. denitrificans*, as a standard in the vitamin industry, was used as a benchmark and as a starting point to quantitatively evaluate and compare the theoretical yields obtained against those of *P. putida* KT2440.

2. Materials and Methods

2.1. Organism Model

In this study, we used *Pseudomonas putida* KT2440 as a model organism. The first genome-scale metabolic model for *P. putida* KT2440 used constraint-based reconstruction analyses (COBRAs) to conduct in silico analyses [14]. In addition, the genus *Pseudomonas* is characterized by a high capacity for resistance to endogenous and exogenous stresses and the potential to produce many bioactive compounds [24].

2.2. Bioinformatic Model

We used a genome-scale metabolic model (GEM) for *P. putida* KT2440 obtained from the BIGG Models database and registered under BIGG ID: iJN1463; the model has 2153 metabolites, 2927 reactions, and 1462 genes [12]. The model was downloaded in SBML format for further use in the COBRA Toolbox tool 2.13.3 [25] in Matlab 2021b to perform downstream analyses. We applied constraint-based reconstruction analysis (COBRA) methods to predict cellular phenotypes and analyze the properties of metabolic engineering networks and systems [26].

We confirmed that the model of our strain contained the genes encoding for the metabolic pathway for vitamin B₁₂ production. Furthermore, we verified the biochemical pathways reported for the strain in the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [23]. We compared the cobamide pathway reactions reported for *P. putida* with those reported for *P. denitrificans*, which is a standard in the industry, so it was considered a benchmark and reference for both bacteria.

The reactions that were not annotated in the BIGG model but were indeed in the genome were added to the model with the corresponding stoichiometric description using a COBRA Toolbox function (the “addReaction” function). The added reactions were cobyrinate a,c-diamide synthase (EC:6.3.5.9), aerobic 5,6-dimethyl benzimidazole synthase (EC: 1.13.11.79), and precorrin-3B synthase (EC:1.14.13.83). The curated model is available in the Supplementary Materials (Supplementary File S1). When required, we performed BLASTN in UNIPROT to confirm that the

coding sequences for the enzyme in the KEGG pathway were present in the genome of *P. putida* KT2440. The characteristics of each aggregated reaction (substrates, products, directionality, and stoichiometry) were established with information from the KEGG database [23]. The reaction directionality of the model was verified using information from the BIGG database for each enzyme [12] and a COBRA Toolbox function (the “printRxnFormula” function); the resulting model, with the missing reactions added, was annotated in a systems biology markup language (SBML) format. In the process, COBRA Toolbox functions were used for the metabolic network curation steps [25]. The COBRA Toolbox supports SBML-like formats and models [27].

2.3. *In Silico Culture Medium Conditions*

For the FBA, bacterial biomass growth rates, and vitamin B₁₂ yield, we used some of the compounds present in a culture medium previously described for *Escherichia coli* [4]. To define the glucose, succinate, glycine, and threonine consumption rates for the model, we considered the experimental values reported by Molina et al. [28]; for oxygen consumption, we used the values obtained in an in silico engineering analysis of *P. putida* [29]. We applied the COBRA Toolbox function “ChangeRxnBounds” to modify the lower limits of the consumption rates of the compounds present in the fermentation culture medium for vitamin B₁₂ production. The values of the consumption rates of each compound used in the FBA are listed in Table 1.

Table 1. Consumption rates of compounds from the fermentation medium for vitamin B₁₂ synthesis.

Compound	Consumption Rates (mmol/gdw·h)
Oxygen	18.5
Glucose	11.7
L-Threonine	0.48
Succinate	0.95
Glycine	0.1
Cobalt ²⁺	0.0375

2.4. *Flux Balance Analysis (FBA) and Knockin*

The flux balance analysis (FBA) is widely used to predict theoretical yields of genome-scale metabolic models. The FBA calculates the flux of metabolites through the metabolic network, thereby predicting the growth rate of the organism and the production rates of biotechnologically important metabolites [10]. The FBA optimizes the network for a given function, which can be the biomass of a reaction or the prediction of in silico values of growth. This optimization of metabolic flux values maximizes a selected objective function, such as target reactions [30]. Then, a matrix of stoichiometric coefficients is used for each

reaction to estimate its flux according to a series of system restrictions [31].

In this study, the FBA was used to make quantitative estimates of bacterial biomass growth rates and vitamin B₁₂ production yields. The yields obtained from the FBA tests were compared with the yield values of vitamin production in *P. denitrificans* [32]. For both knockin- and OptGene-based simulations, we analyzed the biosynthetic pathway of porphyrin metabolism in *P. putida* KT2440 in the KEGG database under the name “Porphyrin metabolism”. This scheme presents the reactions of the vitamin B₁₂ metabolic pathway and the surrounding pathways that produce other compounds.

For the knockin simulations, we added to the curated model several reactions that might improve the overall production yields of vitamin B₁₂ in the bacteria’s pathway. We specifically added reactions that could enhance the pathway’s precursor production, as shown in Figure 2. New reactions were added to the model with the “Add reaction” function of the COBRA Toolbox. For each knockin simulation, we estimated bacterial biomass growth and vitamin B₁₂ production yields, as shown in the corresponding code (Supplementary File S2).

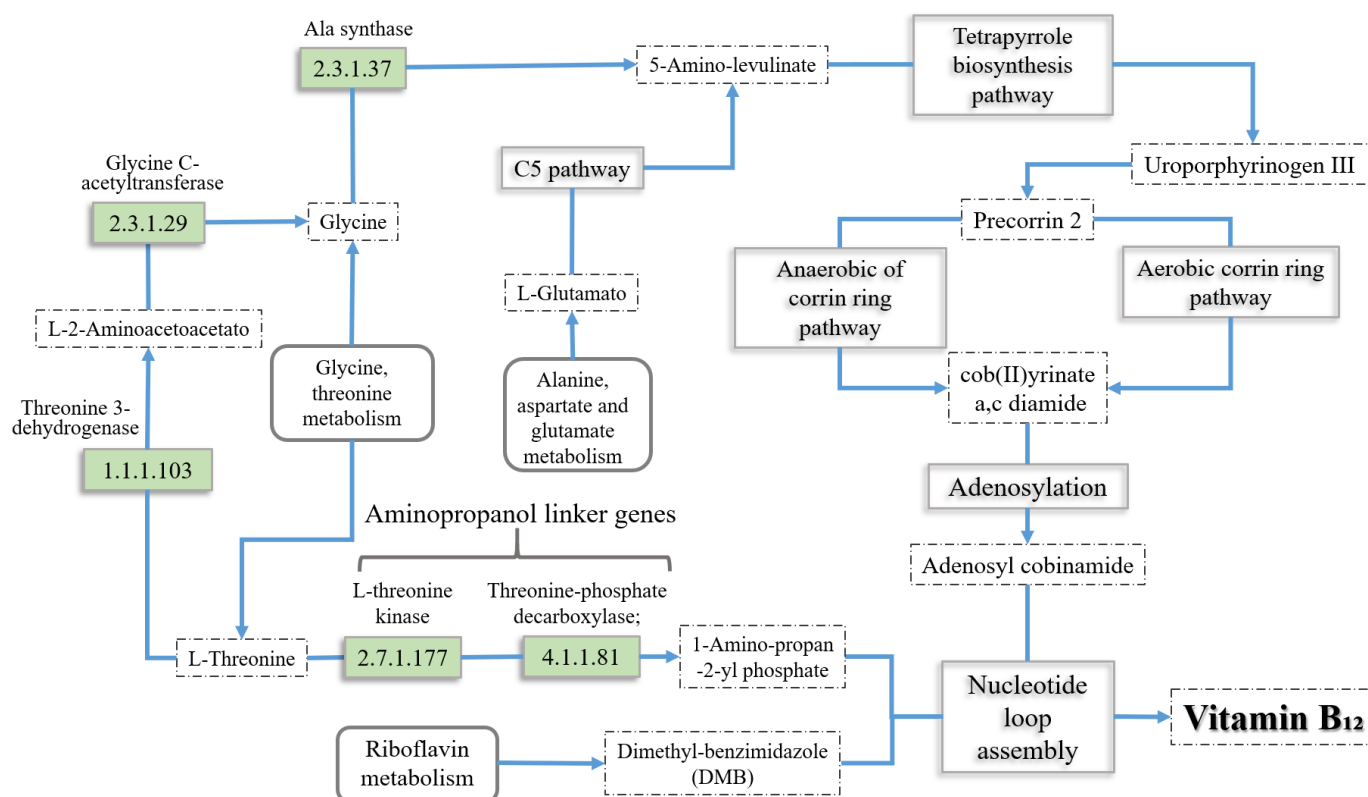


Figure 2. Candidate knockin-tested reactions (highlighted) added to the genome-scale metabolic model of *Pseudomonas putida* KT2440 to increase vitamin B₁₂ production. Adapted from [23].

2.5. OptGene-Based Simulations

The OptGene analysis is a technique within constraint-based in silico modeling methods such as the FBA [33,34]. It is a computational procedure consisting of a simulation of gene deletions that could increase the production rate of the objective reaction by eliminating some potentially dispensable reactions from the model. In this case, vitamin B₁₂ production may be increased by reducing the number of precursors and energy invested in the synthesis of secondary or nonvital biochemical compounds and processes [34].

In the biosynthetic pathway of porphyrin metabolism in *P. putida* KT2440 in the KEGG database, we identified reactions close to the metabolic pathway of interest, specifically some that could consume part of the precursors necessary for the synthesis of vitamin B₁₂. We defined a list of candidate reactions for deletion simulations, as shown in Table 2. All of the annotated reactions were included as candidates for a hypothetical knockout that could eventually increase the objective reaction, in this case, vitamin B₁₂ production (EC: 2.7.8.26). We established an OptGene-based algorithm that used all possible theoretical combinations of reaction deletions, ranging from one to a maximum of five simultaneous deletions from the reaction list (Table 2), and we conducted an FBA of both the biomass and vitamin B₁₂ functions in each simulation. The OptGene-based assay was performed by using the theoretical medium conditions described in Table 1 and the curated model with the two reactions suggested by the results of the knockin simulations (aminopropanol linker reactions). From 2 all the knockin simulations, this model with the aminopropanol linker reactions, had the best performance (see Table 3), so it was used for OptGene analyses. The corresponding code used for the OptGene-based simulations can be found in the Supplementary Materials (Supplementary File S3).

Table 2. List of reactions used for the OptGene test.

	Reaction Name	EC Number
1	Coproporphyrinogen oxidase	1.3.3.3
2	Protoporphyrinogen oxidase (aerobic)	1.3.3.4
3	Oxygen-independent coproporphyrinogen III dehydrogenase	1.3.98.3–1.3.99.22
4	Uroporphyrinogen decarboxylase (uroporphyrinogen III)	4.1.1.37
5	Sirohydrochlorin ferrochelatase	4.99.1.4
6	Ferrochelatase	4.99.1.1
7	Glycine cleavage system	1.4.4.2
8	Tetrahydrofolate aminomethyltransferase	2.1.2.10
9	Aminomethyltransferase	2.1.2.10
10	2-Oxoglutarate dehydrogenase	1.8.1.4–1.2.4.2
11	L-allo-threonine dehydrogenase	1.1.1.381
12	Sirohydrochlorin dehydrogenase (NAD)	1.3.1.76

2.6. Identification of Riboswitches in Vitamin B₁₂ Pathway

We used the [Rfam database](#) as a source of information to verify the presence of vitamin B₁₂-related riboswitch sequences in the genome of *P. putida* KT2440. As the Rfam database has noncoding RNA families represented by multiple alignments, it contains useful information on secondary structures, as well as other information that can be used for computational models [18]. We searched for riboswitch sequences reported for *P. putida* KT2440 related to the vitamin B₁₂ pathway.

3. Results

3.1. The Reference Value of *Pseudomonas denitrificans*

In a recent review, several strains were used for vitamin B₁₂ production via fermentation [11]; among them, the highest yield was reported for *Pseudomonas denitrificans* SC510 [32]. In some experiments on the synthesis of vitamin B₁₂, several conditions of the fermentation medium of *Pseudomonas denitrificans* were modified, and, by maintaining a pH between 7.15 and 7.30, seven days (168 h) of fermentation resulted in a vitamin B₁₂ concentration of 214 mg/L and a maximum dry cell mass (DWC) of 33.23 g/L. This was carried out in a medium containing sucrose, betaine, and DMB [32]. A dimensional analysis showed that this yield was equivalent to $2.83 \times 10^{-2} \mu\text{mol} \cdot \text{gDW}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ (micromoles per gram of dry mass per hour). This value constitutes a benchmark for comparing the theoretical yields of the metabolic model of *P. putida* KT2440 (Figure 2).

3.2. Metabolic Model Curation and FBA of *Pseudomonas putida* KT2440

Genome-scale metabolic model curation was carried out for the porphyrin metabolism pathway. It has previously been confirmed that, at the molecular level, *P. putida* has the metabolic

pathway genes for vitamin B₁₂ synthesis [35]. All enzymatic reactions of the pathway of interest reported in the KEGG database were in the SBML model of *P. putida* KT2440, except for some enzymatic reactions (EC: 2.5.1.17, EC: 6.3.5.9, EC:1.13.11.79, and EC:1.14.13.83) described in the Discussion; thus, they were added to the curated model.

For the first FBA test using the curated model (the BIGG model with the missing reactions added) with the consumption rates described in Table 1 in the Materials and Methods Section 2, we obtained a value of 1.802 gDW⁻¹·hr⁻¹·L⁻¹ for the cell biomass target function. Furthermore, by setting the last reaction (adenosylcobinamide-GDP ribazoltransferase (EC: 2.7.8.26)) of the pathway as the target function, the FBA resulted in a synthesis of 0.359 μmol gDW⁻¹ hr⁻¹ L⁻¹. This value corresponds to the theoretical production of vitamin B₁₂ by *P. putida* KT2440 in the culture medium specified.

3.3. Gene Knockin Analysis

We performed an *in-silico* test to evaluate the effect of the insertion of external genes, which could increase the yield of vitamin B₁₂, into the *P. putida* genome. The candidate reactions tested in the metabolic model are represented in Figure 2. By considering the metabolic pathway described in Figure 1 and the list of annotated genes in Table 3, the insertion of ALA synthase (EC: 2.3.1.37) from the C4 pathway for 5-amino-levulinate synthesis was assessed. We also considered two reactions from glycine, serine, and threonine metabolism as candidates for insertion because of their potential to increase the production of the precursor aminopropan-2-ol. Specifically, we considered the threonine 3-dehydrogenase (EC: 1.1.1.103) and the glycine C-acetyltransferase (EC: 2.3.1.29) for this purpose. The two reactions responsible for the aminopropanol linking part, threonine kinase (EC: 2.7.1.177) and threonine phosphate decarboxylase (EC: 4.1.1.81), were also established as candidates. The results of the FBA performed with different reaction candidates are shown in Table 3.

Table 3. Results of flux balance analysis rates of biomass and vitamin B₁₂ production for the *Pseudomonas putida* KT2440 genome-scale metabolic models with the candidate knockin reaction(s) added. All values were obtained with the culture and substrate consumption conditions described in Table 1.

Name of the Reaction(s) Added to the Model	EC Numbers of Reaction(s) Added	Vitamin B ₁₂ Production (μmol gDW ⁻¹ hr ⁻¹ L ⁻¹)
None (curated model)	-	0.359
Aminopropanol linker	2.7.1.177, 4.1.1.81	0.400
Ala synthase reaction	2.3.1.37	0.394
Ala synthase reaction	2.3.1.37 and 2.3.1.29	0.394

and Glycine C-acetyltransferase		
Aminopropanol linker and Ala synthase	2.7.1.177, 4.1.1.81 and 2.3.1.37	0.215
Threonine 3-dehydrogenase	1.1.1.103	0.230
Glycine C-acetyltransferase	2.3.1.29	0.180
Threonine 3-dehydrogenase and glycine C-acetyltransferase	1.1.1.103, 2.3.1.29	0.391

The biomass yields stayed the same for all the models ($1.802 \text{ gDW}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$), which suggests that the insertion of any of these candidate reactions is not detrimental to bacterial growth.

3.4. OptGene Analysis

The OptGene-based algorithm was used to evaluate all the combinations of reaction deletions possible for our 12 reaction candidates (Table 2), ranging from one to a maximum of five different reaction deletions, resulting in a total of 1585 simulations. We conducted 12 simulations for single reaction deletions (one for each reaction), 66 simulations for sets of two reaction deletions, 220 simulations for sets of three reaction deletions, 495 simulations for sets of four reaction deletions, and 792 simulations for sets of five reaction deletions. The vast majority of the simulations resulted in biomass growth or vitamin B₁₂ production values of zero or very close to zero. The highest values for both biomass growth and vitamin B₁₂ were, at best, the same or very similar to those obtained when using the curated model with the aminopropanol linker reactions added. The highest value obtained for vitamin B₁₂ yield was only 0.3% higher than that obtained with our model with the aminopropanol linker reactions, with the biomass growth performance being the same; this simulation case required the deletion of four different reactions (EC: 1.3.98.3; EC: 1.4.4.2; EC: 1.8.1.4/1.2.4.2; and EC: 1.1.1.381). The specific values of each simulation can be found in the Supplementary Materials (Supplementary File S4). Therefore, our algorithm suggests that our candidate reactions do not necessarily work as competitors for precursors or energy in the biosynthetic pathway of vitamin B₁₂ synthesis. This evidence suggests that none of the candidate gene deletions should be carried out to optimize vitamin B₁₂ production in *P. putida* KT2440.

3.5. Theoretical Performance of *Pseudomonas putida* KT2440 versus Experimental Results of *Pseudomonas denitrificans*

We used *P. denitrificans* SC510 as a point of comparison to validate the feasibility of *P. putida* KT2440 as a vector for vitamin B₁₂ production. For this purpose, we used the results of the metabolic model with the aminopropanol linker genes under the medium conditions described in Table 1 in the Materials and

Methods Section 2 in support of previous studies [4,29,36]. Figure 3 shows that the theoretical vitamin B₁₂ production yield obtained for the modified *P. putida* KT2440 ($0.400 \mu\text{mol gDW}^{-1} \text{hr}^{-1} \text{L}^{-1}$) is higher than the experimental yield obtained for *P. denitrificans* SC510 [32].

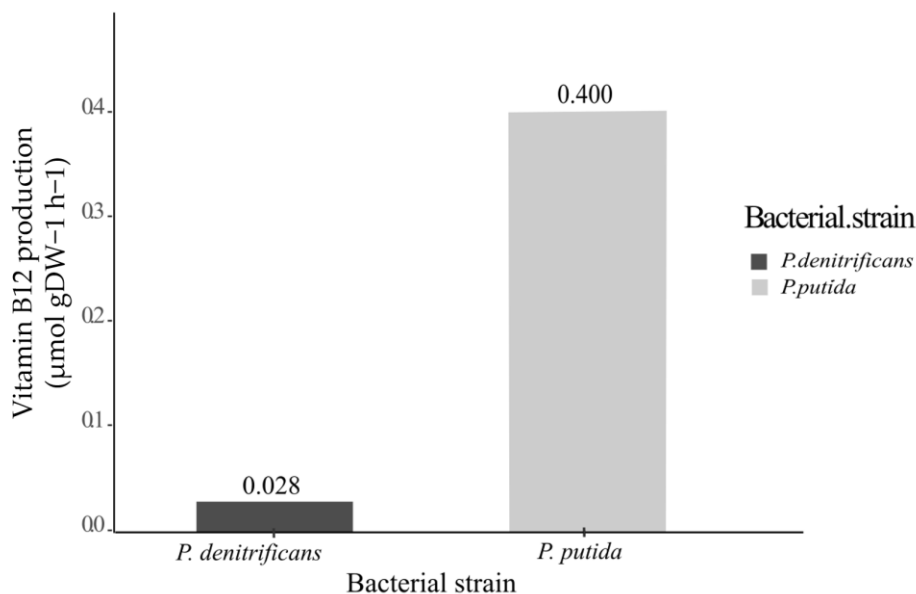


Figure 3. Experimental production of vitamin B₁₂ in *Pseudomonas denitrificans* SC510 [32] and theoretical production of vitamin B₁₂ in modified *Pseudomonas putida* KT2440 according to the metabolic FBA of a BIGG model (BIGG ID: iJN1463), subsequently curated with the insertion of the aminopropanol linker reaction and under the culture and substrate consumption conditions described in Table 1.

3.6. Riboswitches Identified in the Vitamin B₁₂ Pathway

In *Pseudomonas putida* KT2440, we detected five putative vitamin B₁₂ riboswitches according to Rfam, as described in Table 4. All the sequences have the same Rfam accession (RF00174). The NCBI also confirmed all the sequences as part of *P. putida* KT2440.

Table 4. Information of vitamin B₁₂ regulatory riboswitches in *Pseudomonas putida* KT2440.

Riboswitch	Length	Position	Rfam Accession
1	207	2,768,769–2,768,976	RF00174
2	222	3,857,546–3,857,768	RF00174
3	197	2,765,029–2,765,226	RF00174
4	205	398,802–3,982,007	RF00174
5	220	1,866,938–1,867,158	RF00174

4. Discussion

4.1. Biosynthetic Pathway of Vitamin B₁₂ in *Pseudomonas denitrificans* and *Pseudomonas putida*

Oxygen-dependent vitamin B₁₂ synthesis is the predominant biochemical pathway in Proteobacteria that synthesizes the molecule. In the case of *P. putida*, the presence of genes encoding for the vitamin B₁₂ synthesis pathway has been verified. The set of reactions reported in *P. putida* is similar to that reported in *P. denitrificans*, as shown in Table 5 [35]. *P. putida*, as a strictly aerobic organism [29], is also expected to use the aerobic route of corrin ring synthesis (Figure 1). The similarity of the vitamin B₁₂ synthesis reactions in the two *Pseudomonas* species assessed is shown in Table 5. Of the 38 reactions named, *P. denitrificans* has 31, and *P. putida* has 32; in the vitamin B₁₂ pathway, they differ only in the enzyme precorrin-6A synthase, also called CobF (EC:2.1.1.1.152), which is absent in *P. denitrificans* [35]. However, both strains lack the two aminopropanol binding reactions, which are responsible for transforming L-threonine into 1-aminopropan-2-ol. Phosphate is incorporated in one of the last steps of vitamin B₁₂ synthesis [23].

Table 5. Cobamide biosynthetic pathway gene annotation in *Pseudomonas denitrificans* and *Pseudomonas putida*. Adapted from [35].

<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	EC Number	Number of Reported Reactions	Stage of Biosynthesis
--------------------	---------------------------	-----------	------------------------------	-----------------------

<i>denitrificans</i>				
1	X	X	ALA synthesis (HemA o HemL)	
2	X	X	EC:4.2.1.24 (HemB)	Tetrapyrrole
3	X	X	EC:2.5.1.61 (HemC)	Precursor
4	X	X	EC:4.2.1.75 (HemD)	Biosynthesis
5	X	X	EC:2.1.1.107/4.99.1.4 (CysG/CobA)	
6	X	X	EC:1.3.1.76/4.99.1.4/2.1.1.107 (CysG)	
7	-	-	EC:4.99.1.3 (CbiK/CbiX)	
8	X	X	EC:2.1.1.151 (CbiL)	
9	X	X	EC:2.1.1.131 (CbiH/CobJ)	
10	X	X	EC:2.1.1.271/2.1.1.133 (CbiF/CobM)	
11	X	X	EC:3.7.1.12/2.1.1.131 (CbiG/CobJ)	
12	X	X	EC:2.1.1.195 (CbiD)	Anaerobic
13	X	X	EC:1.3.1.106/1.3.1.54 (CbiJ/CobK)	Corrin Ring
14	-	-	EC:2.1.1.196/2.1.1.289/2.1.1.132(CbiT/ CobL)	Biosynthesis
15	-	-	EC:2.1.1.289/2.1.1.132 (CbiE/CobL)	
16	X	X	EC:5.4.99.60/5.4.99.61 (CbiC/CobH)	
17	X	X	EC:6.3.5.11/6.3.5.9 (CbiA/CobB)	
18	X	X	EC:2.1.1.130 (CobI)	
19	X	X	EC:1.14.13.83 (CobG)	
20	X	X	EC:2.1.1.131 (CobJ)	
21	X	X	EC:2.1.1.133 (CobM)	
22	-	X	EC:2.1.1.152 (CobF)	Aerobic
23	X	X	EC:1.3.1.54 (CobK)	Corrin Ring
24	X	X	EC:2.1.1.132 (CobL)	Biosynthesis
25	X	X	EC:5.4.99.61 (CobH)	
26	X	X	EC:6.3.5.9 (CobB)	
27	X	X	EC:6.6.1.2 (CobNST)	
28	-	-	EC:1.16.8.1/2.5.1.17 (CobR/pduO)	
29	X	X	EC:2.5.1.17 (CobA/BtuR/CobO/PduO)	Adenosylation
30	-	-	EC:2.7.1.177 (PduX)	Aminopropanol
31	-	-	EC:4.1.1.81 (CobD)	Linker
32	X	X	EC:6.3.5.10 (CbiP/CobQ)	
33	X	X	EC:6.3.1.10 (CbiB/CobC/CobD)	
34	X	X	EC:2.7.1.156/2.7.7.62 (CobU/CobP)	Nucleotide Loop
35	X	X	EC: 2.7.7.62 (CobU/CobP/CobY)	Assembly
36	X	X	EC:2.4.2.21 (CobT/CobU/ArsAB)	
37	X	X	EC:3.1.3.73 Cbl Fosfatasa (CobS/CobV)	
38	X	X	EC:2.7.8.26 (CobC/CobZ)	

4.2. Genome-Scale Metabolic Models of *Pseudomonas putida* KT2440

Genome-scale metabolic models (GEMs) describe gene–protein reaction processes for all the sequences that participate in metabolic reactions. GEMs can help to predict metabolic fluxes

for a given pathway using optimization techniques such as the flux balance analysis (FBA) [37]. GEMs of different organisms have been used in industrial, medical, and scientific applications. These models have been used for the prediction of effective gene engineering strategies to enhance the microbial production of certain compounds and materials [37].

According to the biosynthetic pathway gene annotation shown in Table 5 it is important to highlight that although the biochemical vitamin B₁₂ pathway in *Pseudomonas* has been described to be oxygen-dependent, genes for the reactions of the anaerobic pathway are reported in both strains [35]. When verifying the reactions in Table 2 in the BIGG Database metabolic model of *P. putida* KT2440, we observed that genes reported as being part of the anaerobic pathway were not annotated as such in the iJN1463 model obtained from BIGG. Regarding the anaerobic reactions reported in Table 5, their aerobic equivalents were in the model, as the KEGG database showed both EC codes (anaerobic and aerobic) for the same reaction [23]. It is possible that the anaerobic pathway's annotation was assigned by homology or by the annotation algorithm. This hypothesis makes sense, as a strictly aerobic bacterium such as *P. putida* [29] should not require genes or reactions in the anaerobic pathway of corrin ring synthesis.

Another important aspect is that, in Table 5, the last reaction in the aerobic pathway of corrin ring synthesis (EC: 1.16.8.1), which is not reported for *Pseudomonas*, actually corresponds to the enzyme EC: 2.5.1.17, which belongs to the next step, adenosylation. This reaction was confirmed in the KEGG database, where the EC code for the reaction was updated [23]. Furthermore, the EC: 6.3.5.9 and EC:1.13.11.79 reactions were indeed in the genome of *P. putida* KT2440 (confirmed by BLAST) but were not annotated in the BIGG model, so we added them with the “Add reaction” function of the COBRA Toolbox. We noted that the precorrin-3B synthase reaction (EC:1.14.13.83) was in the model but not properly named, so it was also added by using the same function. The aminopropanol dehydrogenase reaction (EC 1.1.1.75) was not reported in the KEGG map but was in the BIGG model. The anaerobic reaction EC:2.1.1.195 is present in the genome of *P. putida* KT2440 but was not annotated in the model obtained.

4.3. Gene Knockin Analysis

The biomass yields were the same for all the models (1.802 gDW⁻¹·hr⁻¹·L⁻¹), which implies that the insertion of any of these candidate reactions is not detrimental to bacterial growth. These results suggest that the introduced reactions mainly affect the metabolic pathway of vitamin synthesis and not necessarily the core metabolism of *P. putida* KT2440. Individually, both aminopropanol linker reactions and Ala synthase (alone or with

Glycine C-acetyltransferase) resulted in higher vitamin B₁₂ production yields, with 0.400 and 0.394 $\mu\text{mol gDW}^{-1}\cdot\text{hr}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ of vitamin B₁₂, respectively. None of the other models surpassed the vitamin B₁₂ production of the first model (the curated model), even presenting a significant decrease in the predicted production rate. After adding both the ALA synthase reaction and the aminopropanol linker reactions, the FBA values for the biomass function stayed the same, but vitamin B₁₂ synthesis decreased significantly. Interestingly, the combination of these reactions in the same model led to a decrease in vitamin B₁₂ production.

The ALA synthase reaction (EC: 2.3.1.37) is a central part of the first stage of synthesis, specifically in the C₄ pathway, in which it produces 5-amino-levulinate from glycine and succinyl-CoA. Conversely, the aminopropanol linker reactions use L-threonine for the production of (R) 1-Amino-propan-2-yl phosphate. Both ALA synthase and the aminopropanol linker pathways obtain their substrates from glycine and threonine metabolism [11]. This may explain why having both pathways working at the same time reduces the overall production of vitamin B₁₂, as they may compete with each other for precursor compounds. A genetic modification strategy that involves the insertion of any of these two options should include one but not both of them at the same time.

According to this result, we suggest introducing aminopropanol linker genes into the organism as part of a genetic construct to optimize vitamin B₁₂ production in *P. putida* KT2440. The insertion of these genes could increase vitamin B₁₂ production by approximately 11.4% compared with the bacterial model without genetic modifications. If so, it may be necessary to complement this genetic strategy with other methods, such as gene overexpression and an adequate culture medium.

According to our results, the theoretical vitamin B₁₂ synthesis rate calculated using *P. putida* KT2040 with the addition of aminopropanol linker genes was about 14 times higher than that of *P. denitrificans*, and the cell biomass growth rate reached a value of 1.802 $\text{gDW}^{-1}\cdot\text{hr}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$. Although more factors can be considered to make more accurate predictions, this in silico analysis result indicates that *P. putida* KT2440 is favorable as a production system.

As stated in previous studies on *P. denitrificans* for vitamin B₁₂ production, it is important to consider the presence of riboswitches in the bacterial genome [38]. B₁₂ riboswitches may be present in the 5' nontranscribed regions of mRNA and may form a secondary structure that senses vitamin B₁₂ upon binding. It is one of the control mechanisms most predominant in the metabolism of vitamin B₁₂ [39]. B₁₂ riboswitches are RNA-sensitive control elements in the cis-regulatory region and modulate gene expression in many vitamins B₁₂-producing microorganisms. They function as ligand-responsive control

elements [38]. Considering the five putative B₁₂ riboswitches detected according to Rfam, we propose that modifying this regulatory mechanism can increase the yield of vitamin B₁₂ synthesis in *P. putida* KT2440. This modification may be achieved by using genetic editing tools such as CRISPR-Cas9. When vitamin B₁₂ increases, its high concentrations may favor the sequestration of ribosome binding sites and, thus, block the translation initiation of pathway enzymes [40]. Although B₁₂ riboswitches can present considerable challenges, it was recently demonstrated that all riboswitches in Cbl Cluster I in *Pseudomonas* ATCC 13867 could be removed entirely. Furthermore, the promoters regulated by those riboswitches were replaced by constitutive solid promoters that doubled B₁₂ biosynthesis in the strain [16]. Therefore, we consider that these riboswitches detected in the KT2440 strain are possible targets for genetic engineering, such as CRISPR/Cas9-mediated genome editing, to improve gene expression in vitamin B₁₂ synthesis.

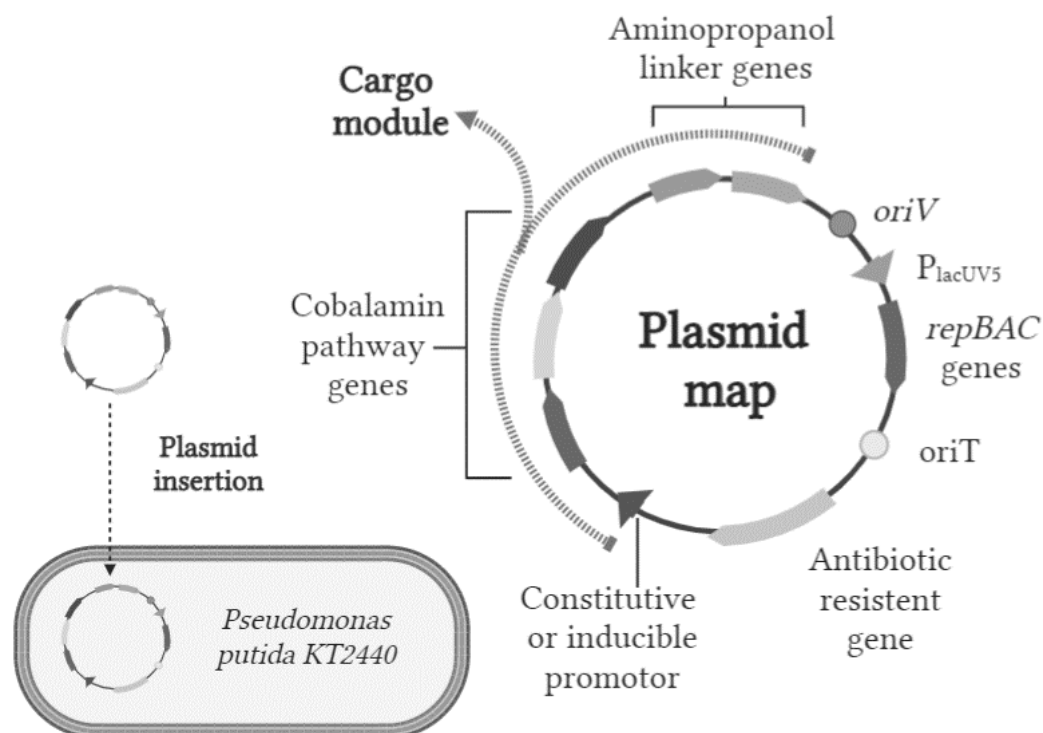
4.4. Design of Possible Genetic Construct for Vitamin B₁₂ Optimization in *Pseudomonas putida* KT2440

According to the results obtained in silico, we propose a genetic modification strategy for increasing vitamin B₁₂ production in *P. putida* KT2440. The genetic modification strategy consists of adding aminopropanol linker genes and modifying riboswitches related to vitamin B₁₂ enzyme sequences. Figure 4 shows the general structure of the plasmid that could be inserted into *P. putida* KT2440; the general design and some sequences belong to the Standard European Vector Architecture (SEVA) Database [41]. Besides the “Cargo module” (where sequences of interest are inserted), which contains the promoters and genes of the vitamin B₁₂ pathway and the genes of the aminopropanol linker that code for enzymes, as expected, the plasmid should include housekeeping components such as the origins of replication and antibiotic resistance. We believe that changing the riboswitches of the vitamin B₁₂ pathway genes is crucial for optimizing our bacterial strain for vitamin B₁₂ production, as suggested by studies on *P. denitrificans* [16].

The housekeeping components of the plasmid contain the *oriV*, *P_{lacUV5}*, and *repBAC* genes and *oriT* components. The *oriV* segment is a minimum sequence for replication initiation and may encode replication proteins. The *repBAC* genes constitute replication proteins that often follow *oriV* and are preceded by the *P_{lacUV5}* promoter. These replication origin sequences come from the RSF1010 replicon of the IncQ plasmid. The host range of IncQ plasmids includes pseudomonads and other proteobacteria relatives, and it has been widely used to create a large number of plasmid vectors. The *oriT* element allows for the conjugative mobilization of the plasmid to the organism, especially in organisms lacking alternative transformation methods [41]. In the

antibiotic resistance gene, the sequence may vary between the most standardized markers for selection in Gram-negative bacteria, and there are several options, such as ampicillin, kanamycin, chloramphenicol, streptomycin, tetracycline, and gentamicin [41]. We expect this plasmid insertion strategy to increase the yields of vitamin production in *P. putida* KT2440. The specific identity of some components can be defined and modified in the process according to technical criteria.

Figure 4. Possible genetic modification strategy for the optimization of *Pseudomonas putida* KT2440 vitamin B₁₂. One potential strategy for vitamin B₁₂ optimization is including both aminopropanol linker genes and changing the riboswitches of the vitamin B₁₂ pathway to constitutive promoter sequences. Data from [40].



5. Conclusions

The strain *Pseudomonas putida* KT2440 has significant potential for synthesizing valuable organic compounds in general terms, specifically for vitamin B₁₂. It has all the qualities necessary to serve as an appropriate production system for biotechnological purposes, and, as it has reactions for the synthesis of vitamin B₁₂, it is an optimal candidate for the industrial production of this compound. The theoretical yields obtained using flow balance analysis (FBA) tests suggest that this proteobacterium, with the addition of aminopropanol linker genes

and an optimized culture medium, could be a great producer of vitamin B₁₂. Furthermore, the results of OptGene-based simulations suggest that all native reactions should be maintained in the model. Due to the presence of riboswitches in the vitamin B₁₂ pathway, some genetic modifications of regulatory sequences may improve gene expression and, subsequently, vitamin B₁₂ production. However, incorporating constitutive promoters into vitamin B₁₂ gene clusters will be more convenient than modifying riboswitch sequences.

It is important to highlight that the in-silico analyses performed did not consider molecular regulation, such as the negative feedback that can occur in the transcription or translation of the sequences of the biochemical pathway. In this regard, it is necessary to thoroughly verify the presence of regulatory sequences, such as riboswitches, that could limit vitamin B₁₂ synthesis. Further bioinformatics analyses and laboratory experiments could provide even more information on other genetic engineering strategies that could be implemented.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at www.mdpi.com/xxx/s1, Supplementary File S1: Curated model of *Pseudomonas putida* KT2440, Supplementary File S2: Flux Balance Analysis and Knockin simulations, Supplementary File S3: OptGene-based simulations, Supplementary File S4: Optgene-based simulations' results .

Author Contributions: T.S.P.-d.L. performed the analyses, investigation, and data curation and wrote the original draft. K.R.-J. and C.V.-C. supervised the study, the conceptualization, and the methodology. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Vicerrectoria de Investigación and Sistema de Estudios de Posgrado provided the support for open access publishing

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Watanabe, F. Vitamin B12 Sources and Bioavailability. *Exp. Biol. Med.* **2007**, *232*, 1266–1274. <https://doi.org/10.3181/0703-MR-67>.
2. Biedendieck, R.; Malten, M.; Barg, H.; Bunk, B.; Martens, J.H.; Deery, E.; Leech, H.; Warren, M.J.; Jahn, D. Metabolic Engineering of Cobalamin (Vitamin B12) Production in *Bacillus Megaterium*. *Microb. Biotechnol.* **2010**, *3*, 24–37. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00125.x>.
3. Green, R.; Allen, L.H.; Bjørke-Monsen, A.L.; Brito, A.; Guéant, J.L.; Miller, J.W.; Molloy, A.M.; Nexø, E.; Stabler, S.; Toh, B.H.; et al. Vitamin B12 Deficiency. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2017**, *3*, 17040. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.40>.
4. Fang, H.; Li, D.; Kang, J.; Jiang, P.; Sun, J.; Zhang, D. Metabolic Engineering of *Escherichia Coli* for de Novo Biosynthesis of Vitamin B12. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4917. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07412-6>.
5. Czajka, J.; Wang, Q.; Wang, Y.; Tang, Y.J. Synthetic Biology for Manufacturing Chemicals: Constraints Drive the Use of Non-Conventional Microbial Platforms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 7427–7434. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8489-9>.
6. Kang, Z.; Zhang, J.; Zhou, J.; Qi, Q.; Du, G.; Chen, J. Recent Advances in Microbial Production of δ -Aminolevulinic Acid and Vitamin B12. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 1533–1542. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.04.003>.
7. Loeschke, A.; Thies, S. *Pseudomonas Putida*—A Versatile Host for the Production of Natural Products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 6197–6214. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6745-4>.
8. Curran, K.A.; Crook, N.C.; Alper, H.S. Using Flux Balance Analysis to Guide Microbial Metabolic Engineering. *Methods Mol. Biol.* **2012**, *834*, 197–216. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-483-4_13.
9. Simeonidis, E.; Price, N.D. Genome-Scale Modeling for Metabolic Engineering. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *42*, 327–338. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1576-3>.
10. Orth, J.D.; Thiele, I.; Palsson, B.O. What Is Flux Balance Analysis? *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 245–248. <https://doi.org/10.1038/nbt.1614>.
11. Balabanova, L.; Averianova, L.; Marchenok, M.; Son, O.; Tekutyeva, L. Microbial and Genetic Resources for Cobalamin (Vitamin B12) Biosynthesis: From Ecosystems to Industrial Biotechnology. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4522, 1–39. <https://doi.org/10.3390/ijms22094522>.
12. Schellenberger, J.; Park, J.O.; Conrad, T.M.; Palsson, B.T. BiGG: A Biochemical Genetic and Genomic Knowledgebase of Large Scale Metabolic Reconstructions. *BMC Bioinform.* **2010**, *11*, 213. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-213>.
13. Patil, K.R.; Rocha, I.; Förster, J.; Nielsen, J. Evolutionary Programming as a Platform for in Silico Metabolic Engineering. *BMC Bioinform.* **2005**, *6*, 308. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-6-308>.
14. Nogales, J.; Palsson, B.; Thiele, I. A Genome-Scale Metabolic Reconstruction of *Pseudomonas Putida* KT2440: IJN746 as a Cell Factory. *BMC Syst. Biol.* **2008**, *2*, 79. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-2-79>.
15. Nikel, P.; Martínez-García, E.; Reviews, V.D.L.-N.; 2014. Biotechnological Domestication of *Pseudomonads* Using Synthetic Biology. *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12*, 368–379. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nrmicro3253>.
16. Nguyen-Vo, T.P.; Ainala, S.K.; Kim, J.R.; Park, S. Analysis and Characterization of Coenzyme B12 Biosynthetic Gene Clusters and Improvement of B12 Biosynthesis in *Pseudomonas Denitrificans* ATCC 13867. *FEMS Microbiol. Lett.* **2018**, *365*, fny211. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny211>.

17. Serganov, A.; Nudler, E. A Decade of Riboswitches. *Cell* **2013**, *152*, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.024>.
18. Kalvari, I.; Nawrocki, E.P.; Argasinska, J.; Quinones-Olvera, N.; Finn, R.D.; Bateman, A.; Petrov, A.I. Non-Coding RNA Analysis Using the Rfam Database. *Curr. Protoc. Bioinform.* **2018**, *62*, 1–44. <https://doi.org/10.1002/cpbi.51>.
19. Nikel, P.I.; Chavarría, M.; Danchin, A.; de Lorenzo, V. From Dirt to Industrial Applications: *Pseudomonas Putida* as a Synthetic Biology Chassis for Hosting Harsh Biochemical Reactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2016**, *34*, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.05.011>.
20. Cai, Y.; Xia, M.; Dong, H.; Qian, Y.; Zhang, T.; Zhu, B.; Wu, J.; Zhang, D. Engineering a Vitamin B₁₂ High-Throughput Screening System by Riboswitch Sensor in *Sinorhizobium Meliloti*. *BMC Biotechnol.* **2018**, *18*, 27. <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0441-2>.
21. Fang, H.; Kang, J.; Zhang, D. Microbial Production of Vitamin B₁₂: A Review and Future Perspectives. *Microb. Cell Fact.* **2017**, *16*, 15. <https://doi.org/10.1186/S12934-017-0631-Y>.
22. Scott, A.I.; Roessner, C.A. Biosynthesis of Cobalamin (Vitamin B₁₂). *Biochem. Soc. Trans.* **2002**, *30*, 613–620. <https://doi.org/10.1042/BST0300613>.
23. Kanehisa, M.; Goto, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>.
24. Gurney, R.; Thomas, C.M. Mupirocin: Biosynthesis, Special Features and Applications of an Antibiotic from a Gram-Negative Bacterium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *90*, 11–21. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00253-011-3128-3>.
25. Schellenberger, J.; Que, R.; Fleming, R.M.T.; Thiele, I.; Orth, J.D.; Feist, A.M.; Zielinski, D.C.; Bordbar, A.; Lewis, N.E.; Rahmanian, S.; et al. Quantitative Prediction of Cellular Metabolism with Constraint-Based Models: The COBRA Toolbox v2.0. *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 1290–1307. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.308>.
26. Lewis, N.E.; Nagarajan, H.; Palsson, B.O. Constraining the Metabolic Genotype-Phenotype Relationship Using a Phylogeny of in Silico Methods. *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, *10*, 291–305. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2737>.
27. Keating, S.M.; Bornstein, B.J.; Finney, A.; Hucka, M. SBMLToolbox: An SBML Toolbox for MATLAB Users. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 1275–1277. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl111>.
28. Molina, L.; Rosa, R.L.; Nogales, J.; Rojo, F. *Pseudomonas Putida* KT2440 Metabolism Undergoes Sequential Modifications during Exponential Growth in a Complete Medium as Compounds Are Gradually Consumed. *Environ. Microbiol.* **2019**, *21*, 2375–2390. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14622>.
29. Kampers, L.F.C.; Van Heck, R.G.A.; Donati, S.; Saccenti, E.; Volkers, R.J.M.; Schaap, P.J.; Suarez-Diez, M.; Nikel, P.I.; Martins Dos Santos, V.A.P. In Silico-Guided Engineering of *Pseudomonas Putida* towards Growth under Micro-Oxic Conditions. *Microb. Cell Fact.* **2019**, *18*, 179. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1227-5>.
30. Oberhardt, M.A.; Palsson, B.; Papin, J.A. Applications of Genome-Scale Metabolic Reconstructions. *Mol. Syst. Biol.* **2009**, *5*, 320. <https://doi.org/10.1038/msb.2009.77>.
31. Anand, S.; Mukherjee, K.; Padmanabhan, P. An Insight to Flux-Balance Analysis for Biochemical Networks. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **2020**, *36*, 32–55. <https://doi.org/10.1080/02648725.2020.1847440>.
32. Li, K.T.; Liu, D.H.; Chu, J.; Wang, Y.H.; Zhuang, Y.P.; Zhang, S.L. An Effective and Simplified PH-Stat Control Strategy for the Industrial Fermentation of Vitamin B₁₂ by

- Pseudomonas Denitrificans*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2008**, *31*, 605–610. <https://doi.org/10.1007/s00449-008-0209-5>.
33. Goldstein, Y.A.B.; Bockmayr, A. Double and Multiple Knockout Simulations for Genome-Scale Metabolic Network Reconstructions. *Algorithms Mol. Biol.* **2015**, *10*, 1. <https://doi.org/10.1186/s13015-014-0028-y>.
 34. Rocha, I.; Maia, P.; Rocha, M.; Ferreira, E.C. OptGene-a Framework for in Silico Metabolic Engineering. In Proceedings of the 10th International Conference on Chemical and Biological Engineering, Braga, Portugal, 4–6 September 2008; pp. 218–219.
 35. Shelton, A.N.; Seth, E.C.; Mok, K.C.; Han, A.W.; Jackson, S.N.; Haft, D.R.; Taga, M.E. Uneven Distribution of Cobamide Biosynthesis and Dependence in Bacteria Predicted by Comparative Genomics. *ISME J.* **2019**, *13*, 789–804. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0304-9>.
 36. Nikel, P.; Chavarría, M.; Fuhrer, T.; Sauer, U.; De Lorenzo, V. *Pseudomonas Putida* KT2440 Strain Metabolizes Glucose through a Cycle Formed by Enzymes of the Entner-Doudoroff, Embden-Meyerhof-Parnas, and Pentose Phosphate Pathways. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 25920–25932. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.687749>.
 37. Gu, C.; Kim, G.B.; Kim, W.J.; Kim, H.U.; Lee, S.Y. Current Status and Applications of Genome-Scale Metabolic Models. *Genome Biol.* **2019**, *20*, 121. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1730-3>.
 38. Nahvi, A.; Barrick, J.E.; Breaker, R.R. Coenzyme B12 Riboswitches Are Widespread Genetic Control Elements in Prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 143–150. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh167>.
 39. Mandal, M.; Breaker, R.R. Gene Regulation by Riboswitches. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 451–463. <https://doi.org/10.1038/nrm1403>.
 40. Moore, S.J.; Mayer, M.J.; Biedendieck, R.; Deery, E.; Warren, M.J. Towards a Cell Factory for Vitamin B12 Production in *Bacillus Megaterium*: Bypassing of the Cobalamin Riboswitch Control Elements. *New Biotechnol.* **2014**, *31*, 553–561. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.03.003>.
 41. Silva-Rocha, R.; Martínez-García, E.; Calles, B.; Chavarría, M.; Arce-Rodríguez, A.; De Las Heras, A.; Páez-Espino, A.D.; Durante-Rodríguez, G.; Kim, J.; Nikel, P.I.; et al. The Standard European Vector Architecture (SEVA): A Coherent Platform for the Analysis and Deployment of Complex Prokaryotic Phenotypes. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 666–675. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS1119>.

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Resultados y discusión del objetivo 2.

En cuanto a la cuantificación de la producción real de la vitamina B₁₂ de *Pseudomonas Putida* KT2440, los resultados de las pruebas de HPLC dieron los resultados descritos en la figura 2. Como se puede observar, la cepa silvestre de *P. putida* KT2440 tiene una producción base de la vitamina B₁₂, en este experimento, alcanzó su tasa máxima al final de las 9 horas de cultivo celular. En la última hora del cultivo celular se cuantificó la mayor tasa de producción de vitamina B₁₂ con un valor de 1.08 $\mu\text{mol}\cdot\text{gDW}^{-1}\cdot\text{hr}^{-1}$. Esta cantidad supera a las proyecciones teóricas de los modelos de Análisis de Balance de Flujo, dentro de los cuáles se esperaba un rendimiento de 0.359 $\mu\text{mol}\cdot\text{gDW}^{-1}\cdot\text{hr}^{-1}$. El resultado contrasta con las expectativas, ya que por lo general se espera que los valores teóricos superen a los valores reales, debido al tipo de modelo utilizado, que no toma en cuenta los posibles efectos de los mecanismos bacterianos de retroalimentación negativa y regulación de producción de metabolitos secundarios.

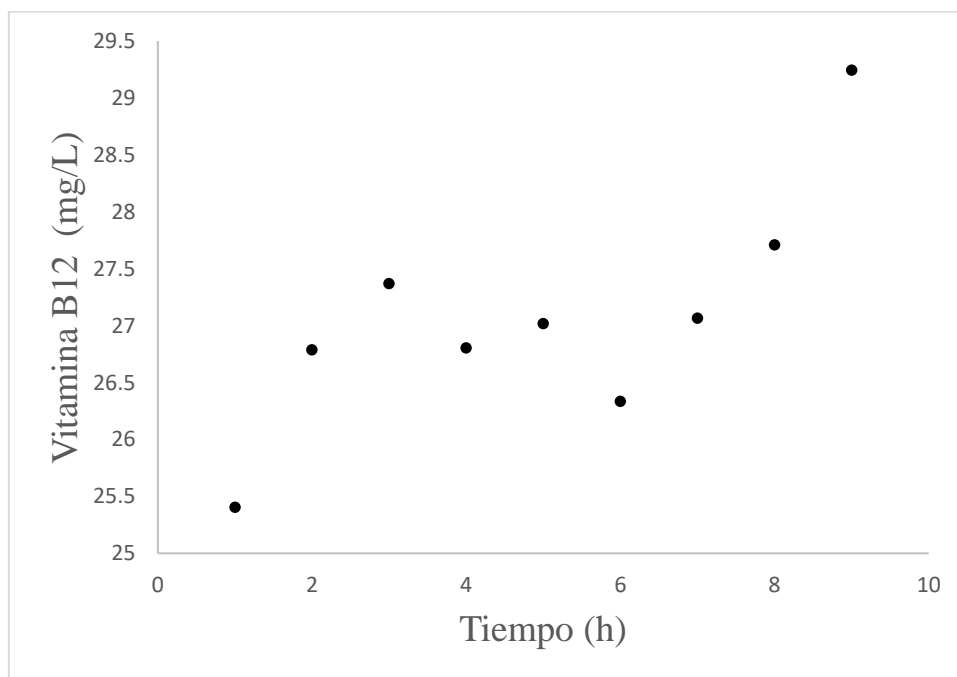


Figura 2: Producción promedio de vitamina B₁₂ por *Pseudomonas putida* KT2440 en medio de cultivo Luria Bertani.

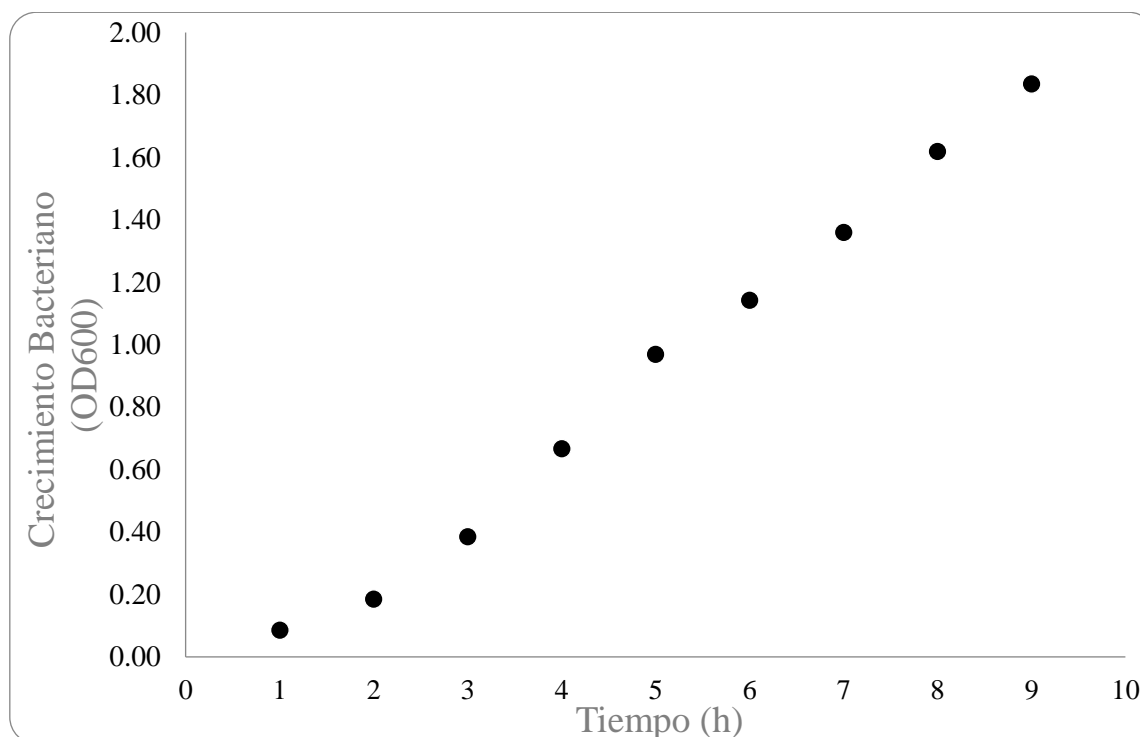


Figura 3: Biomasa celular estimada para *Pseudomonas putida* KT2440 en medio de cultivo Luria-Bertani a partir de valores de OD₆₀₀.

Un punto importante es que el medio de cultivo utilizado Luria Berthani, es un medio que al contener extracto de levadura, cuenta con diversos compuestos orgánicos que sirven como fuente de carbono y nitrógeno (Tao et al., 2023), probablemente el medio simulado en las pruebas (Tabla 1), necesitaría incluir nuevos parámetros de otros compuestos que están en el medio LB para poder ser comparado directamente con los resultados experimentales. En este punto se podría valorar la realización de ensayos de medio muy definido para poder validar de forma más directa las simulaciones computacionales realizadas. En relación con este mismo punto, se sabe que este medio al contener extractos de levadura también puede contener algunas vitaminas del complejo B como la vitamina B₁₂ (Tao et al., 2023), que, aunque esté en cantidades trazas, puede interferir con los resultados. Aunque estos resultados son importantes para hacer valoraciones iniciales y hacer comparaciones con los modelos simulados, se puede extender mucho más el tiempo de fermentación para tener parámetros que se asemejen más a un proceso industrial. En otros experimentos de producción de la vitamina con *Pseudomonas denitrificans*, se realizan cultivos de hasta 7 días (Li et al., 2008).

En la Figura 3 se puede observar que el crecimiento de la bacteria en gramos de biomasa fue aumentando progresivamente, pero no llegó a estabilizarse, lo que sugiere que el tiempo de fermentación empleado podría extenderse más para tener un panorama más amplio de la dinámica de producción del compuesto en el tiempo. También, para futuros experimentos se puede probar utilizar una mayor cantidad inicial de inóculo de la bacteria para propiciar que se alcance más rápido a la fase exponencial y posteriormente a la estacionaria, esto, además de la mayor cantidad de tiempo.

Perspectivas finales

La cepa *Pseudomonas putida* KT2440 cuenta con un potencial importante para la síntesis de compuestos orgánicos de valor en términos generales y específicamente para esta vitamina B₁₂. Cuenta con todas las cualidades necesarias para ser un vector apropiado para fines biotecnológicos y al contar con reacciones para la síntesis de vitamina B₁₂ es un gran candidato para la producción industrial de este compuesto. Los rendimientos teóricos obtenidos por medio de las pruebas de Análisis de balance de flujo (FBA) sugieren que esta proteobacteria con algunas modificaciones genéticas y con un medio de cultivo optimizado podría ser un buen productor de la vitamina. Además, los resultados para las simulaciones de Knockout (basadas en Optgene) sugieren que las reacciones candidatas analizadas deben mantenerse en el modelo y de momento no sería recomendable eliminar o neutralizar la expresión de alguno de esos genes. Este resultado puede ser conveniente ya que permite de una vez descartar las estrategias de delección genética y así enfocar la atención en otros acercamientos biotecnológicos como la inserción de genes.

Es importante resaltar que los análisis *in silico* realizados no contemplan ciertas dinámicas de regulación molecular como la retroalimentación negativa que se puede dar en la transcripción o traducción de las secuencias de la ruta bioquímica. En este aspecto, como se mencionó, será importante verificar minuciosamente la presencia de secuencias reguladoras como los Riboswitches que podrían limitar la síntesis de la cobalamina. De igual forma, los resultados del crecimiento experimental de la bacteria en medio LB y los valores las tasas de producción de Vitamina B₁₂ obtenidas demuestran que la bacteria efectivamente puede producir el compuesto aún como cepa silvestre. Sería conveniente realizar ensayos en los que se extienda el tiempo de la fermentación y es conveniente realizar más pruebas con diferentes medios de cultivo definidos que a su vez hayan sido previamente modelados y simulados por las pruebas de FBA. Parte de las formas de lograr mayores tasas de producción de vitamina B₁₂ puede implicar suministrar en el medio de cultivo precursores como glicina, L-threonina y dimetilbencimidazol. También se debe garantizar que la cantidad de cobalto suministrada sea óptima para los requerimientos de la vía biosintética pero no alcancen concentraciones tóxicas para la bacteria. Es posible que recurrir a más análisis bioinformáticos puedan brindar predicciones aún más precisas y al mismo tiempo dar más información en cuanto a otras estrategias de ingeniería genética que se podrían implementar. Conforme cada vez exista más

información del metabolismo de la bacteria, así como sus dinámicas celulares y moleculares como su caracterización transcriptómica, se podrán plantear modelos más precisos y robustos que facilitarán mejores predicciones y estimaciones. Sería recomendable realizar pruebas de laboratorio del rendimiento de producción de vitamina de la bacteria con la modificación genética respectiva que permita evaluar el efecto de la inserción de los genes sugeridos por los resultados.

Referencias

- Allen, L. H., Miller, J. W., De Groot, L., Rosenberg, I. H., Smith, A. D., Refsum, H., & Raiten, D. J. (2018). Biomarkers of Nutrition for Development (BOND): Vitamin B-12 Review. En *Journal of Nutrition*. 148, 1995S-2027S. <https://doi.org/10.1093/jn/nxy201>
- Allen, L. H., Miller, J. W., De Groot, L., Rosenberg, I. H., Smith, A. D., Refsum, H., & Raiten, D. J. (2018). Biomarkers of Nutrition for Development (BOND): Vitamin B-12 Review. *Journal of Nutrition*, 148, 1995S-2027S. <https://doi.org/10.1093/jn/nxy201>
- Anand, S., Mukherjee, K., & Padmanabhan, P. (2020). An insight to flux-balance analysis for biochemical networks. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 36(1), 32–55. <https://doi.org/10.1080/02648725.2020.1847440>
- Avendaño, R., Chaves, N., Fuentes, P., Sánchez, E., Jiménez, J. I., & Chavarría, M. (2016). Production of selenium nanoparticles in *Pseudomonas putida* KT2440. *Scientific Reports*, 6, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep37155>
- Avissar, Y. J., Ormerod, J. G., & Beale, S. I. (1989). Distribution of δ -aminolevulinic acid biosynthetic pathways among phototrophic bacterial groups. *Archives of Microbiology*, 151(6), 513–519. <https://doi.org/10.1007/BF00454867>
- Balabanova, L., Averianova, L., Marchenok, M., Son, O., & Tekutyeva, L. (2021). Microbial and genetic resources for cobalamin (Vitamin b12) biosynthesis: From ecosystems to industrial biotechnology. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 1–39. <https://doi.org/10.3390/ijms22094522>
- Bashor, C. J., & Collins, J. J. (2018). Understanding Biological Regulation Through Synthetic Biology. *Annual Review of Biophysics*, 47(1), 399–423. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-070816-033903>
- Biedendieck, R., Malten, M., Barg, H., Bunk, B., Martens, J. H., Deery, E., Leech, H., Warren, M. J., & Jahn, D. (2010). Metabolic engineering of cobalamin (vitamin B12) production in *Bacillus megaterium*. En *Microbial Biotechnology* (Vol. 2, Número 1, pp. 24–37). <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00125.x>
- Cai, Y., Xia, M., Dong, H., Qian, Y., Zhang, T., Zhu, B., Wu, J., & Zhang, D. (2018). Engineering a vitamin B 12 high-throughput screening system by riboswitch sensor in *Sinorhizobium meliloti*. *BMC Biotechnology*, 18(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0441-2>
- Curran, K. A., Crook, N. C., & Alper, H. S. (2012). Using flux balance analysis to guide microbial metabolic engineering. *Methods in Molecular Biology*, 834, 197–216. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-483-4_13
- Czajka, J., Wang, Q., Wang, Y., & Tang, Y. J. (2017). Synthetic biology for manufacturing chemicals: constraints drive the use of non-conventional microbial platforms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 7427–7434. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8489-9>
- Fang, H., Kang, J., & Zhang, D. (2017). Microbial production of vitamin B12: A review and future perspectives. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S12934-017-0631-Y>

- Fang, H., Li, D., Kang, J., Jiang, P., Sun, J., & Zhang, D. (2018). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for de novo biosynthesis of vitamin B12. *Nature Communications*, *9*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07412-6>
- Goldstein, Y. A. B., & Bockmayr, A. (2015). Double and multiple knockout simulations for genome-scale metabolic network reconstructions. *Algorithms for Molecular Biology*, *10*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13015-014-0028-y>
- Green, R., Allen, L. H., Bjørke-Monsen, A. L., Brito, A., Guéant, J. L., Miller, J. W., Molloy, A. M., Nexo, E., Stabler, S., Toh, B. H., Ueland, P. M., & Yajnik, C. (2017). Vitamin B12 deficiency. *Nature Reviews Disease Primers*, *3*, 1–20. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.40>
- Gurney R., & Thomas C.M. (2011). Mupirocin: biosynthesis, special features and applications of an antibiotic from a Gram-negative bacterium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *90*, 11–21. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00253-011-3128-3>
- Johnson, M. A., Hausman, D. B., Davey, A., Poon, L. W., Allen, R. H., & Stabler, S. P. (2010). Vitamin B12 deficiency in African American and white octogenarians and centenarians in Georgia. *Journal of Nutrition, Health and Aging*, *14*, 339–345. <https://doi.org/10.1007/s12603-010-0077-y>
- Kampers, L. F. C., Van Heck, R. G. A., Donati, S., Saccenti, E., Volkers, R. J. M., Schaap, P. J., Suarez-Diez, M., Nikel, P. I., & Martins Dos Santos, V. A. P. (2019). In silico-guided engineering of *Pseudomonas putida* towards growth under micro-oxic conditions. *Microbial Cell Factories*, *18*(179), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1227-5>
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. En *Nucleic Acids Research* (Vol. 28, Número 1). <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Kang, Z., Zhang, J., Zhou, J., Qi, Q., Du, G., & Chen, J. (2012). Recent advances in microbial production of δ -aminolevulinic acid and vitamin B12. *Biotechnology Advances*, *30*(6), 1533–1542. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.04.003>
- Keating, S. M., Bornstein, B. J., Finney, A., & Hucka, M. (2006). SBMLToolbox: An SBML toolbox for MATLAB users. *Bioinformatics*, *22*(10), 1275–1277. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl111>
- Kim, H. J. (2016). Development of an Ion-Pairing Reagent and HPLC-UV Method for the Detection and Quantification of Six Water-Soluble Vitamins in Animal Feed. *International Journal of Analytical Chemistry*, *1*, 1. <https://doi.org/10.1155/2016/8357358>
- Lewis, N. E., Nagarajan, H., & Palsson, B. O. (2012). Constraining the metabolic genotype-phenotype relationship using a phylogeny of in silico methods. *Nature Reviews Microbiology*, *10*, 291–305. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2737>
- Li, K. T., Liu, D. H., Chu, J., Wang, Y. H., Zhuang, Y. P., & Zhang, S. L. (2008). An effective and simplified pH-stat control strategy for the industrial fermentation of vitamin B12 by *Pseudomonas denitrificans*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *31*(6), 605–610. <https://doi.org/10.1007/s00449-008-0209-5>
- Loeschcke, A., & Thies, S. (2015). *Pseudomonas putida*—a versatile host for the production of natural products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*, 6197–6214. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6745-4>

- Mandal, M., & Breaker, R. R. (2004). Gene regulation by riboswitches. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5, 451–463. <https://doi.org/10.1038/nrm1403>
- Mani, I. (2020). Microbial Production of Vitamins. In *Engineering of Microbial Biosynthetic Pathways* (pp. 143–152). https://doi.org/10.1007/978-981-15-2604-6_9
- Martens, J. H., Barg, H., Warren, M., & Jahn, D. (2002). Microbial production of vitamin B12. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(3), 275–285. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0902-7>
- Melina, V., Craig, W., & Levin, S. (2016). Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Vegetarian Diets. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 116(12), 1970–1980. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2016.09.025>
- Moravcová, M., Siatka, T., Krčmová, L. K., Matoušová, K., & Mladěnka, P. (2024). Biological properties of vitamin B₁₂. *Nutrition Research Reviews*, 1–33. <https://doi.org/10.1017/S0954422424000210>
- Nahvi, A., Barrick, J. E., & Breaker, R. R. (2004). Coenzyme B12 riboswitches are widespread genetic control elements in prokaryotes. *Nucleic Acids Research*, 32(1), 143–150. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh167>
- Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. A. P., Fouts, D. E., Gill, S. R., Pop, M., Holmes, M., Brinkac, L., Beanan, M., DeBoy, R. T., Daugherty, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., White, O., Peterson, J., ... Fraser, C. M. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, 4(12), 799–808. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00366.x>
- Nguyen-Vo, T. P., Ainala, S. K., Kim, J. R., & Park, S. (2018). Analysis and characterization of coenzyme B12 biosynthetic gene clusters and improvement of B12 biosynthesis in *Pseudomonas denitrificans* ATCC 13867. *FEMS Microbiology Letters*, 365(21), 1–7. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny211>
- Nielsen, J., & Keasling, J. D. (2016). Engineering Cellular Metabolism. *Cell*, 164(6), 1185–1197. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.004>
- Nikel, P., Chavarría, M., Fuhrer, T., Sauer, U., & De Lorenzo, V. (2015). *Pseudomonas putida* KT2440 strain metabolizes glucose through a cycle formed by enzymes of the Entner-Doudoroff, embden-meyerhof-parnas, and pentose phosphate pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 290(43), 25920–25932. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.687749>
- Nikel, P. I., Chavarría, M., Danchin, A., & de Lorenzo, V. (2016). From dirt to industrial applications: *Pseudomonas putida* as a Synthetic Biology chassis for hosting harsh biochemical reactions. *Current Opinion in Chemical Biology*, 34, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.05.011>
- Nikel, P., Martínez-García, E., Reviews, V. D. L.-N., & 2014. (2014). Biotechnological domestication of pseudomonads using synthetic biology. *Nat Rev Microbiol*, 12, 368–379. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nrmicro3253>
- Nogales, J., Palsson, B., & Thiele, I. (2008). A genome-scale metabolic reconstruction of *Pseudomonas putida* KT2440: iJN746 as a cell factory. *BMC Systems Biology*, 2, 1–20. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-2-79>

- Oberhardt, M. A., Palsson, B., & Papin, J. A. (2009). Applications of genome-scale metabolic reconstructions. *Molecular Systems Biology*, 5(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/msb.2009.77>
- Orth, J. D., Thiele, I., & Palsson, B. O. (2010). What is flux balance analysis? *Nature Biotechnology*, 28(3), 245–248. <https://doi.org/10.1038/nbt.1614>
- Pastor, N., Masciarelli, O., Fischer, S., Luna, V., & Rovera, M. (2016). Potential of *Pseudomonas putida* PCI2 for the Protection of Tomato Plants Against Fungal Pathogens. *Current Microbiology*, 73(3), 346–353. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1068-y>
- Raux, E., Schubert, H. L., & Warren, M. J. (2000). Biosynthesis of cobalamin (vitamin B12): A bacterial conundrum. En *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 57, pp. 1880–1893). <https://doi.org/10.1007/PL00000670>
- Rocha, I., Maia, P., Rocha, M., & Ferreira, E. C. (2008). OptGene—a framework for in silico metabolic engineering. *10th International Conference on Chemical and Biological Engineering, January 2022*, 218–219. https://www.researchgate.net/profile/Eugenio-Ferreira/publication/277216985_OptGene_a_framework_for_in_silico_metabolic_engineering/links/61f7f024007fb50447292943/OptGene-a-framework-for-in-silico-metabolic-engineering.pdf
- Schellenberger, J., Park, J. O., Conrad, T. M., & Palsson, B. T. (2010). BiGG: A Biochemical Genetic and Genomic knowledgebase of large scale metabolic reconstructions. *BMC Bioinformatics*, 11, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-213>
- Schellenberger, J., Que, R., Fleming, R. M. T., Thiele, I., Orth, J. D., Feist, A. M., Zielinski, D. C., Bordbar, A., Lewis, N. E., Rahmanian, S., Kang, J., Hyduke, D. R., & Palsson, B. (2011). Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: The COBRA Toolbox v2.0. *Nature Protocols*, 6(9), 1290–1307. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.308>
- Scott, A. I., & Roessner, C. A. (2002). Biosynthesis of cobalamin (vitamin B12). *Biochemical Society Transactions*, 30(4), 613–620. <https://doi.org/10.1042/BST0300613>
- Shi, S., Wang, Z., Shen, L., & Xiao, H. (2022). Synthetic biology: a new frontier in food production. *Trends in Biotechnology*, 40(7), 781–803. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.01.002>
- Simeonidis, E., & Price, N. D. (2015). Genome-scale modeling for metabolic engineering. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42(3), 327–338. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1576-3>
- Stabler, S. P. (2013). Vitamin B12 Deficiency. *New England Journal of Medicine*, 368(2), 149–160. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1113996>
- Tang, T. C., An, B., Huang, Y., Vasikaran, S., Wang, Y., Jiang, X., Lu, T. K., & Zhong, C. (2021). Materials design by synthetic biology. *Nature Reviews Materials*, 6(4), 332–350. <https://doi.org/10.1038/s41578-020-00265-w>
- Tao, Z., Yuan, H., Liu, M., Liu, Q., Zhang, S., Liu, H., Jiang, Y., Huang, D., & Wang, T. (2023). Yeast Extract: Characteristics, Production, Applications and Future Perspectives. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(1). <https://doi.org/10.4014/jmb.2207.07057>

- Temova Rakuša, Ž., Rožkar, R., Hickey, N., & Geremia, S. (2023). Vitamin B12 in Foods, Food Supplements, and Medicines—A Review of Its Role and Properties with a Focus on Its Stability. *Molecules*, *28*(1), 240. <https://doi.org/10.3390/molecules28010240>
- Vogeleer, P., Millard, P., Arbulú, A. S. O., Pflüger-Grau, K., Kremling, A., & Létisse, F. (2024). Metabolic impact of heterologous protein production in *Pseudomonas putida*: Insights into carbon and energy flux control. *Metabolic Engineering*, *81*, 26–37. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2023.10.005>
- Watanabe, F. (2007). Vitamin B12 sources and bioavailability. *Experimental Biology and Medicine*, *232*(10), 1266–1274. <https://doi.org/10.3181/0703-MR-67>
- Xiao, Y., Bowen, C. H., Liu, D., & Zhang, F. (2016). Exploiting nongenetic cell-to-cell variation for enhanced biosynthesis. *Nature Chemical Biology*, *12*(5), 339–344. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2046>
- Yin, L., & Bauer, C. E. (2013). Controlling the delicate balance of tetrapyrrole biosynthesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *368*(1622), 1–9. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0262>
- Zhao, D., & Ning, K. (2023). Introduction to synthetic biology. En *Synthetic Biology and iGEM: Techniques, Development and Safety Concerns: An Omics Big-data Mining Perspective* (pp. 1–22). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-981-99-2460-8_1