

03072 15
2eje.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE
POSGRADO DEL CCH
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

Producción en *Escherichia coli* de las oxigenasas
naftaleno dioxigenasa y xileno monooxigenasa.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA
PRESENTA
FERNANDO MARTINEZ MORALES

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio del Dr. Francisco Bolívar Zapata, del departamento de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología/UNAM, Cuernavaca, Morelos.

TUTORES:

Tutor:

Dr. Fernando Valle Baheza

Co-Tutores:

Dr. Agustín López-Munguía Canales

Dra. Gloria Soberón Chávez

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Biotecnología de la U.N.A.M. por el apoyo brindado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante mis estudios de Maestría.

Al jurado asignado para la calificación de esta Tesis por la dedicación prestada durante su realización:

Dr. Baltazar Becerril Luján	Presidente
Dra. Amelia Farrés G. Sarabia	Vocal
Dr. Fernando Valle Baheza	Secretario
Dr. Agustín López Munguía	Suplente
Dr. Joel Osuna Quintero	Suplente

Abreviaturas empleadas en este trabajo

Ap	Ampicilina
DMSO	Dimetil Sulfoxido
I.F.	Intensidad de la Fluorescencia
Km	Kanamicina
LB	Luria Bertrani
NDO	Naftaleno dioxigenasa
nm	nanómetros
rpm	revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio
U.K.	Unidades Klett
XO	Xileno Monooxigenasa

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1 Síntesis de polifenileno y pinitol por bioconversión.
- Fig. 2 Producción de índigo por bioconversión.
- Fig. 3 y 4 Flujo de electrones en NDO y XO.
- Fig. 5 Mapa del plásmido pNDO.
- Fig. 6 Mapa del plásmido pTANDO.
- Fig. 7 Mapa del plásmido pUI301.
- Fig. 8 Subclonación del fragmento XO.
- Fig. 9 Mapa del plásmido pTX.
- Fig. 10 Cadena respiratoria de *Escherichia coli*.
- Fig. 11 Efecto de la rotenona en la cadena respiratoria de *E. coli*
- Fig. 12 Espectro de absorción de pigmentos disueltos en DMSO.
- Fig. 13 Estructura de distintas moléculas con afinidad por hierro.

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1 Cepas y plásmidos empleados en este trabajo.
- Tabla 2 Producción de índigo por NDO y XO bajo distintos promotores.
- Tabla 3 Medición del NADH celular por fluorescencia en presencia de rotenona.

CONTENIDO

RESUMEN

- I.- INTRODUCCION Y ANTECEDENTES
- II.- OBJETIVOS
- III.- MATERIAL Y METODOS
- IV.- RESULTADOS Y DISCUSION
- V.- CONCLUSIONES
- VI.- PERSPECTIVAS
- VII.- BIBLIOGRAFIA

RESUMEN

En este trabajo se presentan los resultados de la producción de dos oxigenasas, la naftaleno dioxigenasa (NDO) y la xileno monooxigenasa (XO), en *Escherichia coli*. Debido a que las oxigenasas juegan un papel importante en la degradación de compuestos carbonados complejos y actualmente algunas de éstas han sido propuestas en procesos de bioconversión nos propusimos estudiar algunos aspectos de su funcionamiento.

En nuestro laboratorio hemos trabajado con la expresión de los genes estructurales de las enzimas NDO y XO. Estos genes han sido clonados en plásmidos bajo distintos promotores. Para estudiar la actividad de estas enzimas aprovechamos la capacidad de *E. coli* para producir índigo, un colorante azul, cuando estas enzimas están presentes.

Se determinó que el promotor izquierdo del fago lambda permite una mejor producción de índigo cuando se tienen los genes estructurales de NDO bajo este promotor mientras que la enzima XO presenta una mejor producción de índigo cuando esta bajo el promotor de lactosa.

Basados en el empleo de un bloqueador de cadena respiratoria y de una cepas mutantes en el citocromo *d*, establecimos que la actividad de ambas oxigenasas pudiera estar limitada por el NADH intracelular.

I.- INTRODUCCION

Pseudomonas es capaz de emplear como fuente de carbono y energía a compuestos aromáticos y alifáticos complejos, debido a la presencia de vías catabólicas específicas para estos compuestos. Las enzimas de estas vías están codificadas muchas veces en plásmidos (3). En general, la degradación de compuestos aromáticos y alifáticos involucra la hidroxilación, la formación de compuestos intermediarios como catecol y protocatecuato, y finalmente intermediarios del ciclo de Krebs. En la etapa de hidroxilación *Pseudomonas* emplea las oxigenasas para iniciar la degradación.

Entre los ejemplos de la aplicación de las oxigenasas en procesos industriales para la producción de compuestos de interés comercial, están el empleo de la tolueno dioxigenasa que se emplea en la bioconversión del benceno a *cis*-benceno dihidrodiol. La acetilación del dihidrodiol, seguida por una polimerización por radicales libres, produce un polímero soluble de alto peso molecular, el cual se convierte por calor a polifenileno (figura 1). Este último es un polímero de interés comercial con propiedades que pueden encontrar aplicación en el campo de los semiconductores. El *cis*-benceno dihidrodiol ha sido también empleado como precursor en la síntesis de (\pm)-pinitol. La enzima tolueno dioxigenasa oxida el tolueno a sólo una forma enantiomérica, el *cis*-tolueno dihidrodiol. Hudlicky et al. (8), han demostrado que el dihidrodiol puede servir como un intermediario quiral muy versátil en la producción de sintones de prostaglandina, terpeno, y óxido de ciclohexeno.

PRODUCCION DE INDIGO POR BIOCONVERSION.

Otra de las aplicaciones de las oxigenasas es en la producción de índigo, un colorante normalmente producido por vía química o a partir de plantas del género *Indigofera*, y que se emplea para teñir la mezclilla. La producción de índigo se ha reportado para células de *E. coli* y *Rhodococcus* cuando éstas tienen los genes de algunas oxigenasas. El proceso ha sido patentado por compañías norteamericanas y emplea a la naftaleno dioxigenasa (5, 19).

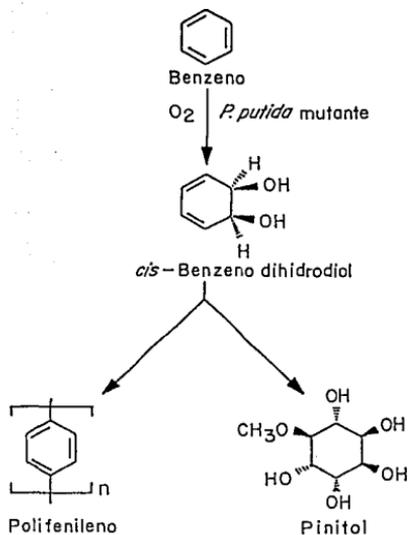


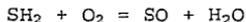
FIGURA 1.- *cis*-BENZENO DIHIDRODIOL COMO PRECURSOR EN LA SINTESIS DE POLIFENILENO Y (\pm)-PINITOL.

Para la producción del índigo por bioconversión, se emplean células de *E. coli* recombinantes con los genes de oxigenasas. El proceso de producción del índigo se puede llevar a cabo por la naftaleno dioxigenasa (NDO) o por la xileno monooxigenasa (XO).

La ruta propuesta para la formación de índigo en células de *E. coli* con los genes de NDO o XO a partir de indol o triptofano se muestra en la figura 2 (1, 6, 14, 20, 22). El indol y/o el triptofano se transportan al interior de la célula por transportadores específicos. El triptofano que se produce intracelularmente también puede ser incorporado a la reacción que catalizan las oxigenasas, una vez que el triptofano ha sido convertido a indol y piruvato por la triptofanasa que posee *E. coli* (22, 24). La reacción catalizada por las oxigenasas es posible que se lleve a cabo en la membrana interna de la célula debido a las características de composición de aminoácidos de las proteínas de las oxigenasas. Así el indol sería convertido teóricamente a *cis*-dihidrodiol o 3-indoxil por NDO o XO respectivamente, para producir finalmente índigo.

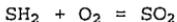
ANTECEDENTES

PROPIEDADES GENERALES DE LAS OXIGENASAS. Las oxigenasas que catalizan la incorporación de solo un átomo de oxígeno al sustrato son denominadas monooxigenasas, a las cuales también se les refiere como oxigenasas de función mixta. El segundo átomo de oxígeno es reducido a H₂O ya sea por los mismos sustratos o por un cosustrato reductor. La reacción general de las monooxigenasas es:



Donde S es el sustrato de la oxigenasa.

Las oxigenasas que catalizan la incorporación de los dos átomos de oxígeno en sus sustratos se conocen como dioxigenasas. La reacción general es:



En cuanto al mecanismo de reacción, de manera general, todas las oxigenasas requieren de cofactores como NAD(P)H como donadores de

electrones, y O_2 como aceptor de electrones (18). La estequiometría para la reacción de las oxigenasas requiere de un NAD(P)H por cada hidroxilo generado(3, 18).

Existen oxigenasas que tienen una especificidad relajada por el sustrato lo que explica, en parte, la diversidad metabólica de *Pseudomonas*. El conocimiento de los mecanismos de reacción y su organización estructural y genética es cada vez mas completo. Se conocen actualmente familias de oxigenasas clasificadas con diferentes criterios, por ejemplo, de acuerdo al número de componentes estructurales. Así, en el caso de oxigenasas de tres componentes se encuentran NDO, TOL, CAM, aquellas de dos componentes como xileno monooxigenasa y de un solo componente como una oxigenasa de *Rhodococcus*. También existe la clasificación de estas enzimas con base al producto de su actividad en monooxigenasas o dioxigenasas. Las primeras introducen un grupo hidroxilo en su sustrato. Las segundas generan como producto un dihidrodiol. Las dioxigenasas son proteínas hierro-azufre que requieren de hierro exógeno para una actividad óptima. En este último caso la producción de un *cis*-dihidrodiol es característico de la mayoría de las dioxigenas. En las figuras 3 y 4 se esquematizan los componentes de la NDO y la XO, así como el posible flujo de electrones propuesto para ambas.

La secuencia primaria de muchas oxigenasas ha sido determinada, y de acuerdo con sus similitudes en secuencia, las oxigenasas pueden ser agrupadas en varias familias. También se pueden observar semejanzas entre diferentes familias en las regiones involucradas con la unión de cofactores (12, 14, 16, 21).

MECANISMO DE REACCION.

En la estructura de las oxigenasas intervienen diversos elementos involucrados en el transporte de electrones: una región con actividad de NAD(P)H reductasa en donde se localiza un sitio de pegado del NAD(P)H definido por una huella dada de aminoácidos; una flavoproteína, una ferredoxina y un componente hidroxilante. El transporte de los electrones se realiza desde el NAD(P)H hasta la hidroxilasa con la flavoproteína y la ferredoxina como intermediarios en ese orden. Todos los componentes anteriores pueden estar

organizados en un sólo componente o estar separados en subunidades.

Todas las oxigenasas hasta ahora estudiadas, requieren de un cofactor, un metal de transición, flavina o pteridina, que interacciona con el oxígeno. Para las oxigenasas que requieren de NAD(P)H como cofactor, la reacción enzimática está separada en dos pasos: la oxidación del NAD(P)H para generar dos equivalentes reductores, y la hidroxilación de los sustratos. Las hidroxilasas flavoproteicas que catalizan la monohidroxilación del anillo aromático llevan a cabo estas dos reacciones en una cadena polipeptídica única.

En otras oxigenasas, la oxidación del NAD(P)H y la reacción de hidroxilación son catalizadas por dos polipéptidos distintos que interaccionan como una cadena corta transportadora de electrones. Los dos equivalentes reductores generados por la oxidación del NAD(P)H son transferidos a través de los componentes transportadores de electrones hasta el cofactor en el componente de la hidroxilasa que estos reducen. El oxígeno se acopla con el cofactor reducido y subsecuentemente hidroxila el sustrato. Las cadenas transportadoras de electrones asociadas con las oxigenasas contienen al menos dos centros redox. El primer centro redox es usualmente una flavina, mientras que el segundo es un complejo hierro-azufre. El transporte de electrones se inicia por la transferencia de un par de electrones desde el NAD(P)H a la flavina, seguido por la transferencia de dos electrones por separado desde la flavina a un centro hierro-azufre (10, 11, 18).

En esta tesis se trabajó con dos oxigenasas de *Pseudomonas*: los genes *ndo ABC* naftaleno dioxigenasa (NDO) y los genes estructurales de *xylMA* de xileno monooxigenasa (XO) los cuales se introdujeron en *E. coli* para ser expresados y producir dichas enzimas.

NAFTALENO DIOXIGENASA.

La reacción inicial en la degradación del naftaleno por *Pseudomonas* presentes en el suelo implica la incorporación enzimática de una molécula de oxígeno en el núcleo aromático para formar *cis*-(1R,

2S)-dihidroxi-1,2-dihidronaftaleno. Esta reacción se lleva a cabo por un sistema enzimático denominado naftaleno dioxigenasa.

ORGANIZACION DE NDO. Esta enzima consiste de tres componentes: A, B, y C, los cuales son esenciales para la actividad enzimática. En este sentido, la naftaleno dioxigenasa es similar a otros sistemas enzimáticos que forman *cis*-dihidrodiolés a partir de compuestos aromáticos.

Parece que este sistema multienzimático oxida el naftalenó con el consumo de un mol de NADH y oxígeno por mol de producto formado. La actividad de la oxigenasa NDO es estimulada *in vitro* por NADH y en menor grado por NADPH. La adición de hierro exógeno estimula la actividad de NDO. El transporte de los electrones se realiza en el sentido ABC. El componente A, denominado naftaleno reductasa contiene un sitio de pegado a NADH. Este sitio ha sido definido por la similitud a la secuencia. El componente B es una ferredoxina del tipo de cloroplasto que tiene un grupo 2Fe-2S tipo Rieske que esta involucrado en el transporte de los electrones desde el componente A hasta C donde se localiza el componente hidroxilante. El componente C está constituido por dos componentes denominados α y β que están en una proporción 2 α , 2 β (3, 10, 16).

Actualmente se conoce la secuencia de los genes que codifican para los distintos componentes de NDO, además que se han aislado y purificado y caracterizado estos componentes (10, 11, 12, 16).

XILENO MONOOXIGENASA.

Cuando *Pseudomonas putida* contiene el plásmido TOL pWWO es capaz de emplear hidrocarburos aromáticos tales como xilenos y toluenos como fuentes únicas de carbono y energía. El plásmido TOL codifica para una ruta metabólica inducible que permite la degradación de los hidrocarburos hasta intermediarios del ciclo de Krebs. Los genes que operan en esta ruta están organizados en dos operones, el primero codifica para tres enzimas que catalizan la oxidación sucesiva de la cadena lateral de los substratos aromáticos a un grupo carboxilato. Dos de estas enzimas, han sido purificadas y caracterizadas, la benzil alcohol deshidrogenasa y la benzaldehído deshidrogenasa del

plásmido TOL pWVO o sus plásmidos relacionados. La primera enzima en la ruta, denominada xileno monooxigenasa (XO), cataliza la introducción de un grupo hidroxilo sobre el grupo metilo de la cadena lateral del tolueno o xilenos para producir (metil) benzil alcohol.

ORGANIZACION DE XYL. Los análisis genéticos han indicado que esta enzima está compuesta de los los productos genéticos de *xyLM* y *xyLA*. El análisis de la secuencia de aminoácidos de *XylA*, deducida a partir de la secuencia de *xyLA* revela una hélice transmembranal entre los residuos (179-195) en su región N-terminal semeja la de las ferredoxinas del tipo de cloroplasto. Las ferredoxinas de tipo cloroplasto contienen agrupaciones [2Fe-2S] tipo Rieske asociadas con tres residuos de cisteína conservados en la siguiente estructura: Cys-XXXX-Cys-XX-Cys, donde X es cualquier aminoácido y que están involucrados en el transporte de electrones. Esta región de *XylA* se localiza entre los residuos 51 y 61 de la región N-terminal. Además, presenta una probable hélice transmembranal, mientras que su región C-terminal posee una similitud significativa con las NAD(P)H-ferredoxina reductasas. Con base a lo anterior, se supone que la proteína *XylA* sea la responsable del transporte de electrones del donador de electrones NADH al componente final de la hidroxilasa, *XyLM*.

La región C-terminal de *XylA* podría ser responsable de la oxidación de NADH, ya que, según la secuencia deducida, presenta un sitio de unión del NADH. Esta secuencia obedece a las reglas de Wierenga et al. (28,29,31): Met-Val-Cys-Val-*Aia-Gly-Gly*-Thr-*Gly*-Leu-Ala-Pro-Ile-Lys-Cys-Val -Leu-Gln-Ser-Met-Thr-Gln-Ala-Gln-Arg-Glu-Arg-*Asp* donde los residuos en cursivas estarían implicados en el pegado del NADH; esto se ha confirmado al determinar *in vitro* la afinidad al componente protéico *XylA* ($K_m = 22 \mu M$), (29). El análisis de la secuencia proteica deducida del producto de *xyLM* podría ser el de un componente "hidroxilante" debido a su similitud con el producto de *alkB*, el cual es un polipéptido que cataliza la hidroxilación del carbono terminal de los alcanos y la hidroxilación de los ácidos grasos. El análisis mediante el programa PCgene por el método de Rao y Argos para detectar hélices transmembranales indica la presencia de

tres porciones que pueden estar asociadas a membrana. Las posiciones de éstas, se encuentran entre los siguientes residuos: (25-41), (138-171), y (238-257). La presencia de éstas regiones hidrofóbicas indican que la proteína de xylM pudiese estar asociada a membrana.

II.- OBJETIVOS DEL TRABAJO:

En el presente trabajo de tesis se establecieron los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

Producción en *Escherichia coli* de dos oxigenasas de *Pseudomonas*, la naftaleno dioxigenasa (NDO) y la xileno monooxigenasa (XO).

OBJETIVOS PARTICULARES

a) Para el caso de NDO se estudiará su expresión con una copia adicional de Fd, por ser este un componente inestable.

b) Se evaluará el efecto del hierro en la expresión de NDO por que como se mencionó en la introducción, la adición de hierro exógeno puede promover una mejor actividad de las oxigenasas.

c) Para el caso de XO, se estudiará su expresión en *E. coli* empleando distintos promotores. El promotor de lactosa, el promotor izquierdo de lambda, y el promotor de triptofano.

d) En esta tesis se plantea la hipótesis de que la actividad de las oxigenasas pudiera estar limitada por la disponibilidad del NADH intracelular debido a una competencia por este cofactor entre la maquinaria enzimática de la célula y las oxigenasas que se están expresando.

III.- MATERIAL Y METODOS

Las cepas y plásmidos empleados se indican la tabla 1.

TABLA 1.- CEPAS Y PLASMIDOS EMPLEADOS EN ESTE TRABAJO

CEPA	CARACTERISTICAS	FUENTE O REFERENCIA
E. coli JM101	supE, thi, D- (lac-proAB), F' traD36, proAB, lacIqZ M15-r+m-	Este laboratorio
E. coli JM101 d- GO102	citocromo oxidasa d inactiva F-, cyo123, rpsL, relA, thi, gal, Dcyd1	Este trabajo Dr. R.B. Gennis (9)
GRO1N	gal-, recA, thi, rpsL, cyd1	Dr. R.B.Gennis (9)
PLASMIDOS		
pNDO	Apr	
pFd	Apr	
pTANDO	Apr	
pUI301	Kmr	
pXO	Apr	Este trabajo
pTX	Apr	Este trabajo

MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE NDO Y XO.

Con la finalidad de medir la expresión en *E. coli* de los genes de las oxigenasas se determinó la cantidad de índigo producido en presencia de indol. Para realizar los ensayos de producción de índigo se estableció la siguiente metodología:

a) En principio se estableció la concentración de indol a la cual *E. coli* podía crecer adecuadamente, para lo cual se probaron concentraciones de indol de 0 a 800 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en medio LB líquido. La cinética de crecimiento de *E. coli*, cepa JM101, se siguió empleando un fotocolorímetro Klett-Summerson.

b) Transformación de la cepa de *E. coli* JM101 con el vector que lleva

los genes para NDO o XO.

c) Selección de las clonas que producen índigo en medio sólido por la coloración azul de las colonias y su resistencia a antibiótico conferida por el vector.

d) Inoculación del medio de crecimiento LB con un cultivo de toda la noche de la cepa productora.

e) Fermentación en matrás de 125 ml con 30 ml de medio durante 12 h. Previamente se determinó que el mejor volumen para la producción de índigo en matrás de 125 ml es de 30 ml.

f) Toma de muestra para cuantificación de índigo. Se toma 0.5 ml de la fermentación y se disolvieron en 4.5 ml de DMSO, se centrifuga 1 ml de la mezcla para eliminar restos celulares, se lee la solución a 620 nm. Se cuantifica el índigo producido de acuerdo a la siguiente relación: 0.145 de O.D. equivalen a $1.65 \mu\text{gml}^{-1}$ de índigo.

IDENTIFICACION DEL PIGMENTO.

El pigmento se extrajo con dimetilsulfóxido (DMSO). Se efectuó una cromatografía en capa fina del pigmento que produce *E.coli*. Se emplearon cromatoplasmas de sílica gel, Whatmann 60F254. Se aplicaron repetidamente las muestras del pigmento extraído con DMSO en la cromatoplasma. Se aplicó un volumen final de 50 μl por cada muestra. Después de cada aplicación, la muestra se secó completamente antes de la próxima aplicación. Los cromatogramas se resolvieron colocando las placas en un tanque de cromatografía, conteniendo una atmósfera saturada de cloroformo y un pequeño volumen de cloroformo de tal manera que el solvente estuviera en contacto con la sílica de la fase estacionaria. El extracto del pigmento crudo se separó en dos bandas pigmentadas una azul y la otra rosa, en un tiempo de 40 minutos. Junto con el extracto crudo se corrió un estándar de índigo comercial (SIGMA) a una concentración de 0.025 mg ml^{-1} .

ESPECTRO DE ABSORCION DE LOS PIGMENTOS.

Se determinó el espectro de absorción, mediante un barrido en la región visible (400-700 nm). Para lo anterior se empleó un espectrofotómetro Beckman DU-40.

Para la determinación de los componentes proteicos de NDO y XO se empleó la técnica de SDS-PAGE. Se tomaron muestras de cultivo de la cepa *E. coli* silvestre y de la transformada con NDO y XO y se procesaron de acuerdo a lo indicado.

CINETICA DE LA PRODUCCION DE INDIGO.

Para determinar la cinética de producción de índigo en la cepa JM101 se realizaron fermentaciones en un volumen de 1 l de medio LB. Se empleó una concentración de indol en el medio de 100 µg ml⁻¹. Se tomaron lecturas de densidad óptica a 540 nm y la cuantificación de índigo se realizó empleando una cantidad conocida de índigo comercial disuelto en DMSO y leyendo a 620 nm.

EFECTO DE LA ADICION DE HIERRO EN LA PRODUCCION DE INDIGO.

Debido a que se tiene reportado que algunas oxigenasas requieren de hierro exógeno (Fe²⁺) para su actividad, se hicieron experimentos del efecto de distintas concentraciones de hierro en la producción de índigo por células de *E. coli* JM101 con los plásmidos pNDO y pUI301. Para esto se probaron concentraciones de FeSO₄ de 0-1.8g l⁻¹.

EXPRESION DE LAS OXIGENASAS BAJO DISTINTOS PROMOTORES.

El aislamiento del DNA plasmídico, la transformación de células competentes así como las reacciones con enzimas de restricción y de ligación fueron realizadas siguiendo protocolos estándares en el laboratorio de biología molecular (26).

Se ensayaron distintos plásmidos que contenían a NDO o XO bajo distintos promotores. Los promotores que se estudiaron fueron el promotor izquierdo de lambda, el promotor de triptofano en los plásmidos pNDO y pTANDO respectivamente (figuras 5 y 6). En el caso del gene XO se trabajó con el plásmido pUI301 el cual tiene los genes *xylMA* bajo el promotor de lactosa (figura 7). Para expresar XO bajo

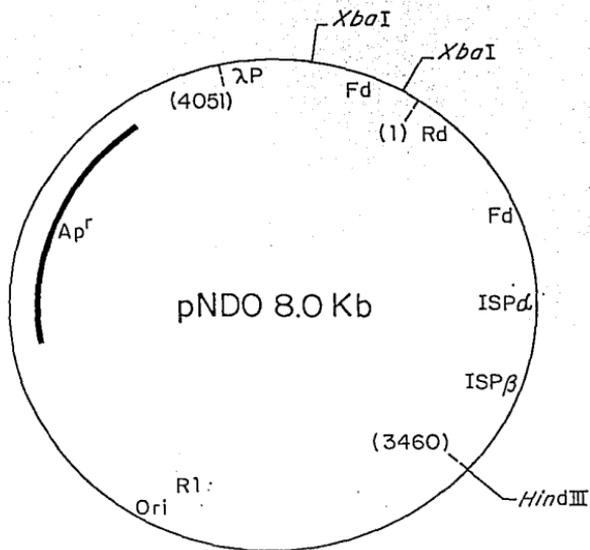


FIGURA 5.-EL PLASMIDO pNDO SE DERIVA DE LA INSERCIÓN EN EL VECTOR pAC1 DE LOS COMPONENTES DEL OPERÓN nahA, EN UN FRAGMENTO DE 350 PARES DE BASES, ADEMÁS SE INSERTO UN FRAGMENTO DE 350 PARES DE BASES CORRESPONDIENTES A Fd. SE INDICAN LOS SITIOS DE RESTRICCIÓN QUE FLANQUEAN AL FRAGMENTO.

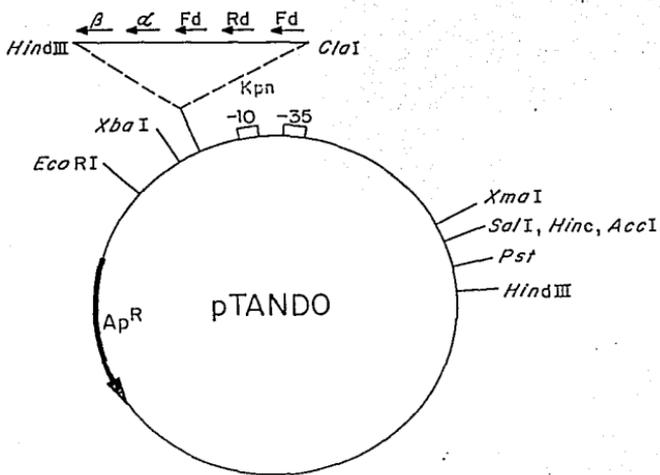


FIG 6 Mapa del plásmido pTANDO

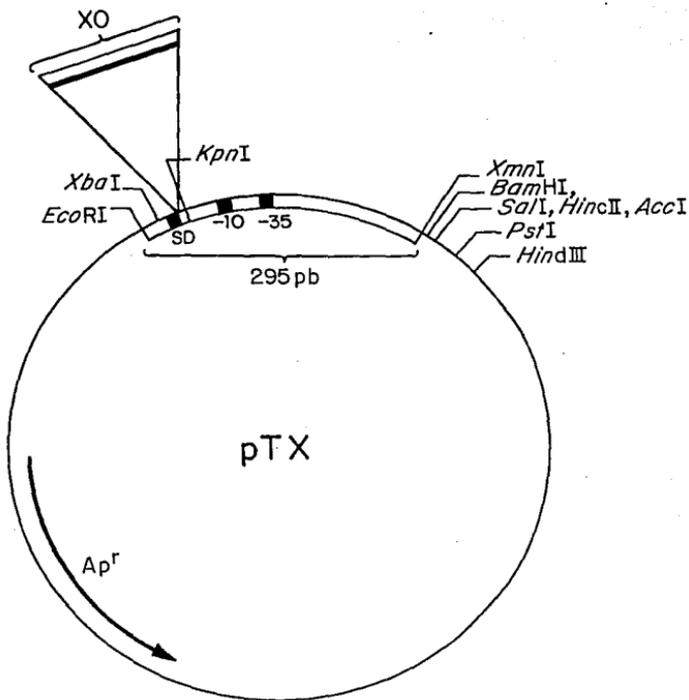


FIGURA 7.- EL PLASMIDO pTX SE CONSTRUYO MEDIANTE LA INSERCIÓN DEL FRAGMENTO DE XO EN EL VECTOR pUC19 JUNTO CON EL PROMOTOR DE TRIPTOFANO.

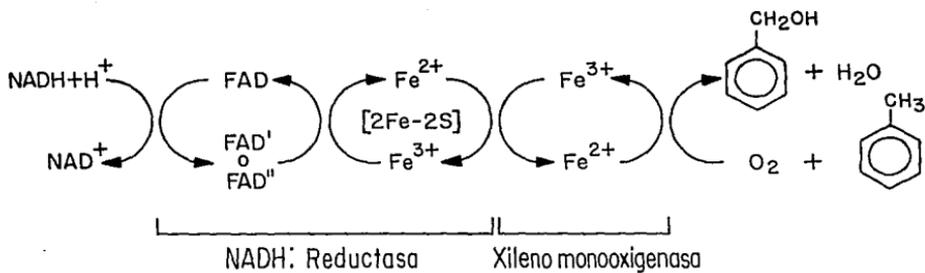


FIGURA 3.-FLUJO DE ELECTRONES PROPUESTO DE LA XILENO MONOOXIGENASA.

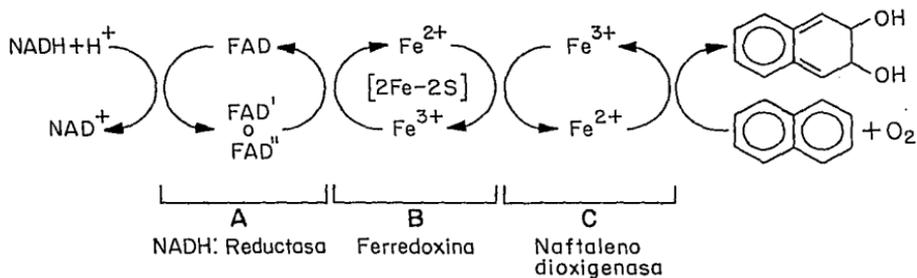


FIGURA 4.-FLUJO DE ELECTRONES PROPUESTO DE LA NAFTALENO DIOXIGENASA.

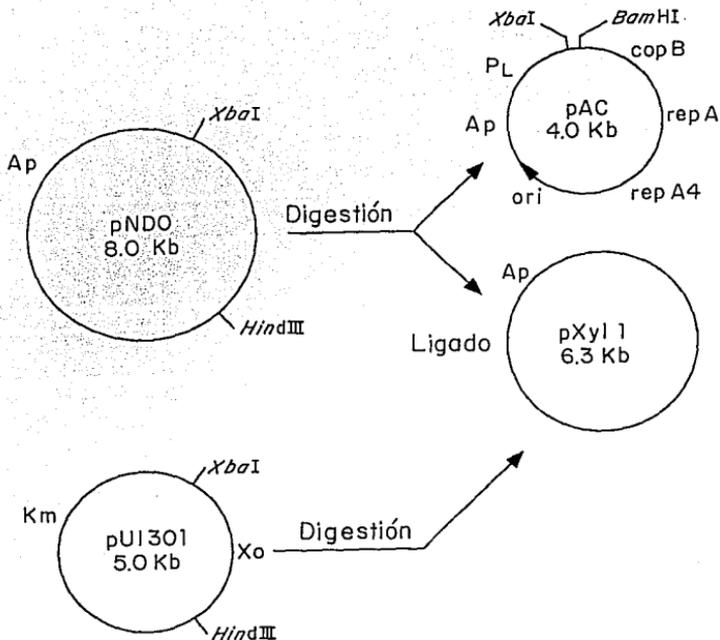


FIGURA 8.- EL PLASMIDO pXyl1 SE CONSTRUYO A PARTIR DEL PLASMIDO pNDO Y UN FRAGMENTO DEL PLASMIDO pUI301 QUE CONTIENE EL GENE DE LA XILENO MONOOXIGENASA.

los promotores de lambda y de triptofano se subclonó el fragmento de XO en los mismos vectores donde está clonado el gene de NDO como se indica en las figuras 8 y 9.

La expresión de los genes *ndoABC* y *xyIMA* bajo los distintos promotores se midió por la producción de índigo como se indicó previamente.

EFFECTO DEL NADH SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS OXIGENASAS NDO Y XO.

En el desarrollo del trabajo experimental con ambas oxigenasas se estableció como hipótesis que la producción de índigo por las células podría mejorar si hubiera un mayor aporte del cofactor NADH en el momento en que lo requiere la enzima. En *E. coli* crecida en condiciones aeróbicas, el punto principal de empleo del NADH producido en las distintas vías metabólicas es a través de la NADH reductasa ($K_m = 12 \mu M$) que forma parte de la cadena respiratoria, como se propone en la figura 10 (2, 15, 17).

De esta manera se propuso emplear un bloqueador de la cadena respiratoria de *E. coli*. Así, si se bloquease la oxidación del NADH por parte de la NADH-reductasa de *E. coli* la oxidación del NADH se vería disminuída y en teoría este NADH podría ser utilizado por NDO o XO. De esta forma en una cepa a la que le fuera bloqueada su cadena respiratoria, tendría un aumento de la forma reducida del cofactor donde la presencia del NADH podría determinarse de dos maneras; la primera consistió en comparar la intensidad de la fluorescencia de células tratadas con o sin bloqueador ya que se sabe que se puede hacer una correlación entre la concentración intracelular de NADH y la intensidad de la fluorescencia de un cultivo celular (13, 28, 30).

La segunda alternativa para demostrar el efecto del bloqueo de la oxidación de NADH por la NADH-reductasa fué observar la producción de índigo por parte de las oxigenasas. Así, la adición del bloqueador podría redundar en un efecto sobre la producción de índigo, (ver figura 11). El bloqueador que se escogió para ensayar fue la rotenona (MERCK), este es un bloqueador específico para la NADH-reductasa (34 y 35).

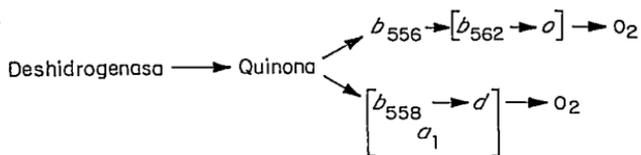


FIGURA 10.- ESQUEMA PROPUESTO DE LA CADENA RESPIRATORIA DE *E. coli* EN CONDICIONES AEROBICAS.

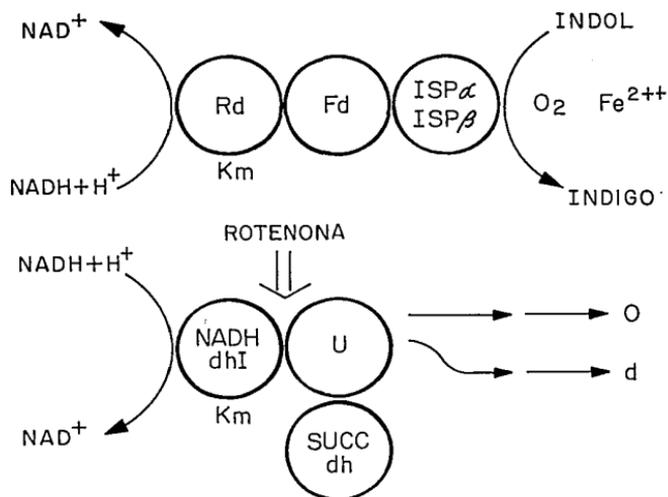


FIGURA 11.- ESQUEMA PROPUESTO PARA EXPLICAR EL POSIBLE EFECTO DE LA ROTENONA EN LA CADENA RESPIRATORIA DE *E.coli* TRANSFORMADA CON pINDO. LA ROTENONA INHIBE LA ACTIVIDAD DE LA NADH-DESHIDROGENASA dhI EVITANDO LA OXIDACION DEL NADH. LA REDUCTASA Rd EMPLEA EL NADH DISPONIBLE PARA PRODUCIR INDIGO.

El tiempo de adición de la rotenona se eligió con base al momento en que se observa la producción de índigo en el matraz. La concentración de bloqueador a utilizar se determinó con base a datos previos que indican que concentraciones mayores a 25 μM no tienen un efecto inhibitorio mayor sobre la NADH-reductasa (34). Debido a esto en este experimento se empleó una concentración de 25 μM . Experimentos posteriores con una mayor concentración de rotenona demostraron que efectivamente concentraciones superiores al indicado no tienen mayor efecto en la inhibición de la NADH-reductasa de *E. coli*.

DETERMINACION DEL NADH INTRACELULAR POR FLUORESCENCIA.

Se determinó el espectro de fluorescencia a una solución estándar de NADH empleando un espectrofluorómetro Perkin-Elmer modelo LS-50. Se empleó una longitud de onda de excitación de 370 nm y se estableció un intervalo de emisión de 450-470 nm, propias del NADH. Por otra parte se determinó el espectro de fluorescencia de células completas de *E. coli* JM101 incubadas a una concentración final de rotenona de 25 μM por 1, 2.5, 5, y 10 minutos. Además se determinó la fluorescencia de células durante el mismo período en ausencia de la rotenona. Para lo anterior se inocularon 30 ml de medio LB con *E. coli* JM101. Se incubó el cultivo hasta 70 U.K., se tomaron 10 ml del cultivo y se centrifugó en una centrifuga clínica por 10 minutos a 5000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 10 ml de buffer TE y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Esta operación se realizó dos veces. De la suspensión celular final se tomó una muestra para determinar su espectro de fluorescencia. Este procedimiento se realizó para todas las muestras mantenidas a 4° C.

OBTENCION DE UNA CEPA DE *E.coli* DEFICIENTE EN EL CITOCROMO d.

E. coli cuando crece en condiciones de aerobiosis posee dos oxidasas terminales en su cadena respiratoria (2, 15) (ver figura 10), la citocromo oxidasa o y la citocromo oxidasa d. La primera se expresa principalmente en condiciones de alta tensión de oxígeno y la segunda en tensiones bajas de oxígeno. Así una mutante en citocromo d podría crecer bien en la fase logarítmica temprana en donde hay tensiones altas de oxígeno. Al bajar la tensión de oxígeno en el medio, la

bacteria se haría deficiente en citocromo *d* por estar mutado y la oxidación del NADH se vería también disminuída (9). Se trabajó con cepas de *E. coli* deficientes en el citocromo *d* proporcionadas por los Dres. Mario Soberón y R.B. Gennis, y se realizó una transducción empleando el fago P1 a la cepa de *E. coli* JM101 seleccionando por resistencia a Km. Se escogió esta cepa por que con ella se hicieron los ensayos de expresión de las oxigenasas. Una vez obtenidas las tansductantes a las cuales se les denominó JM101 *d*⁻. Se prepararon células competentes para transformarlas con los plásmidos pNDO y pXO, y se determinó como era la producción de índigo en estas células.

IV.- RESULTADOS Y DISCUSION.

Dado que la mayor parte de este trabajo se centra en la determinación de la producción de índigo por células de *E. coli* transformadas con los genes de las oxigenasas bajo el control de distintos promotores, se determinaron las concentraciones de indol adecuadas para el crecimiento de las células y la producción de índigo.

Se creció un inóculo de toda la noche de las cepas JM101 en matraces de 125 ml con 10 ml de medio LB mas indol a distintas concentraciones (0, 50, 100, 250, 500, 800 $\mu\text{g ml}^{-1}$). *E. coli* JM101 puede crecer a concentraciones hasta de 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ como se puede observar en la grafica 1. A concentraciones mayores de 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de indol el crecimiento de la cepa declina rápidamente siendo nulo a 500 μgml^{-1} .

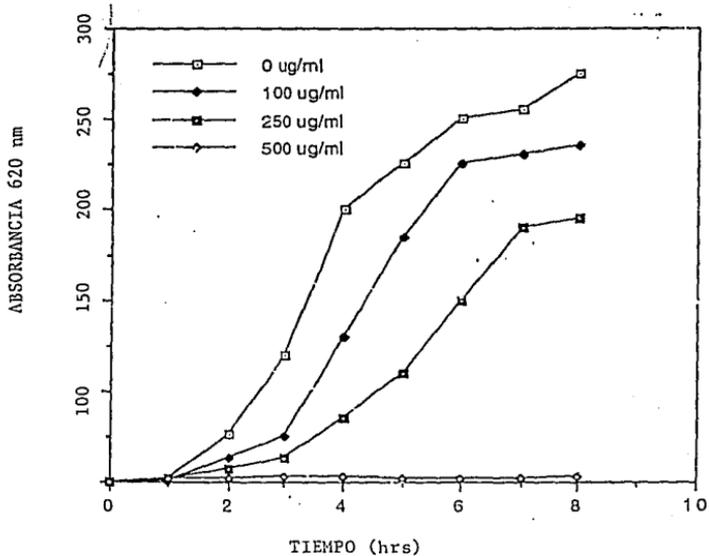
IDENTIFICACION DEL PIGMENTO PRODUCIDO.

Para determinar la naturaleza del pigmento que produce *E. coli* JM101 cuando tiene los genes de NDO y XO se comparó con índigo comercial empleando cromatografía en capa fina y el espectro de absorción de los pigmentos.

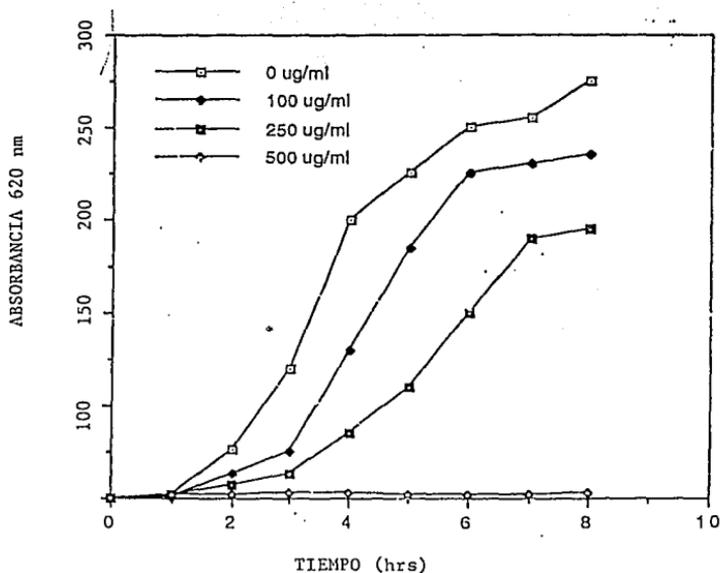
CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DEL PIGMENTO

Se analizaron por cromatografía en capa fina las muestras de pigmento producidos por las bacterias y fueron comparados con una muestra de índigo comercial, ambos disueltos en DMSO. El pigmento bacteriano se separó en un componente azul de mayor R_f y otro componente rosa de menor R_f .

La muestra de índigo comercial contenía un componente azul de manera predominante con la misma movilidad que el componente azul del pigmento bacteriano y un componente rosa muy tenue con la misma movilidad que el pigmento bacteriano rosa. Se observó que los extractos frescos del pigmento bacteriano el componente azul era predominante, pero en extractos mas viejos la fracción rosa se incrementaba en concentración en relación a la fracción azul, hasta volverse predominante después de 48 horas a temperatura ambiente. Esto sugiere que la forma rosa es un producto de descomposición del



GRAFICA 1.- COMPORTAMIENTO DE *E.coli* JM101 EN DISTINTAS CONCENTRACIONES DE INDOL EN MEDIO LB.



GRAFICA 1.- COMPORTAMIENTO DE *E.coli* JM101 EN DISTINTAS CONCENTRACIONES DE INDOL EN MEDIO LB.

componente azul, (ver mas adelante).

ESPECTRO DE ABSORCION DE LOS PIGMENTOS.

Se determinó el espectro de absorción de los pigmentos disueltos en DMSO. El espectro de absorción del índigo producido por bioconversión fue similar al del índigo comercial. El pico máximo de absorción de ambos pigmentos es de 620 nm (Figura 12A y 12B). También, se observó que el extracto azul se tornó gradualmente a rosa después de dejarlo a temperatura ambiente por 48 horas. El espectro de absorción de esta solución tiene un pico máximo de absorción a 575 nm con un hombro a 620 nm (Figura 12C). Esta observación sugiere que el índigo se fue convirtiendo gradualmente en el pigmento rosa en el extracto crudo (Figura 12D). El pigmento rosa podría ser un isómero del índigo, la indirrubina, que es de color rojo. Es importante mencionar que la solución del índigo comercial conserva su color azul aún después de 48 hrs en solución de DMSO a temperatura ambiente. La inestabilidad del índigo bacteriano en solución podría estudiarse para establecer si son condiciones como pH o iones que se producen cuando se rompen las células para disolver el índigo producido. Después de hacer la extracción de las células con el DMSO solo se centrifuga la muestra a 14 Krpm para separar células que no se hayan roto y no interfieran con las lecturas de absorción. Estas condiciones promoverían la formación del compuesto rosa. Sin embargo, no se intentó ver el efecto de extractos bacterianos sobre el índigo comercial.

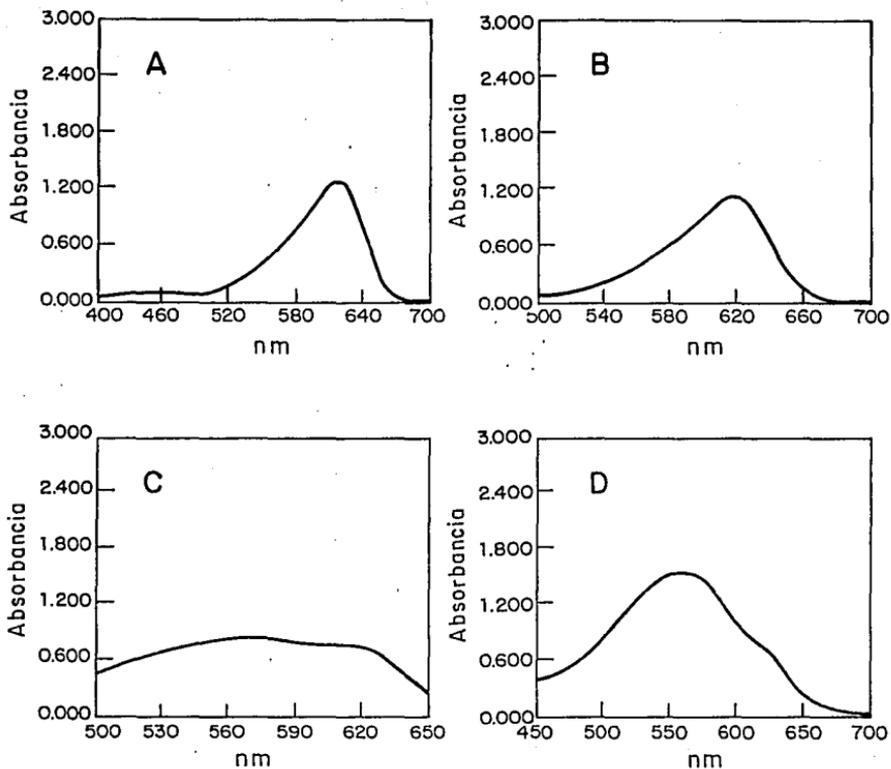


FIGURA 12.- ESPECTRO DE ABSORCION DE PIGMENTOS DISUELTOS EN DMSO. A INDIGO COMERCIAL, B INDIGO OBTENIDO POR BIOCONVERSION, C MEZCLA DE PIGMENTOS, D POSIBLE ISOMERO DEL INDIGO.

CINETICA DE LA PRODUCCION DE INDIGO.

Se estudió la producción de índigo de las cepas de *E. coli* indicadas en la sección de materiales y métodos. Para la enzima NDO se empleó la cepa JM101. La cinética se realizó tres veces. Como se puede observar de la gráfica 2 la máxima producción alcanzada es de 28 $\mu\text{g ml}^{-1}$. La gráfica 3 indica la cinética de producción de la cepa JM101 con el plásmido pUI301.

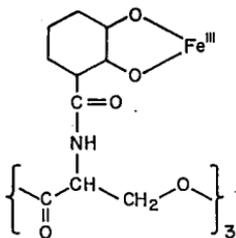
EFFECTO DEL HIERRO SOBRE LA PRODUCCION DE INDIGO

Algunas de las dificultades que afectan al proceso microbiano para la producción del índigo incluyen la relativa baja actividad de la naftaleno dioxigenasa (NDO), que es la enzima responsable de la etapa final en la bioconversión del índigo, en *E. coli* recombinante.

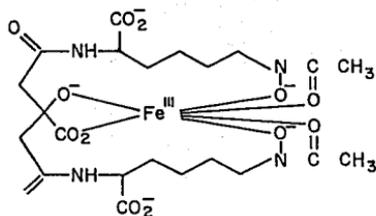
La actividad de esta enzima en el organismo recombinante necesita de un mejoramiento en la etapa de la oxidación de indol a índigo. La vida media de la enzima NDO en la catálisis de la oxidación del indol a índigo es de una a dos horas. Este valor requiere de un substancial mejoramiento para generar un proceso económico de vida larga (20). Bajo condiciones naturales, hay poco indol libre en la célula y la producción de triptofano es conducida sólo a los requerimientos de la célula.

Se ha encontrado que la actividad específica de NDO en muestras de cultivo declina después de la adición de indol. Dado que la actividad enzimática es estable en cultivos no expuestos a indol, la reacción de oxidación del indol a índigo podría involucrar la destrucción de la actividad enzimática. Esta pérdida de la actividad podría deberse a la desactivación de alguno(s) de los componentes del sistema enzimático (20).

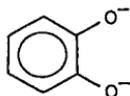
En este trabajo se propone que sea un producto intermediario de la reacción de oxigenación de la dioxigenasa el responsable de esta pérdida de actividad. La formación del dihidrodiol representa una vía potencial para explicar el requerimiento de ión ferroso para sostener la reacción enzimática. La estructura del *cis*-dihidrodiol es semejante al núcleo de ciertas moléculas que tienen afinidad por el hierro como son los sideróforos (23, 33). También el ión catecolato puede acomplejarse con el hierro. En la figura 13 se presentan las estructuras de moléculas con afinidad por hierro. Así, durante la



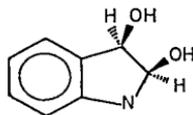
Enterobactina
(A)



Aerobactina
(B)



Ion catecolato
(C)



cis-2,3-dihidrodiol
(D)

FIGURA 13.- ESTRUCTURA DE DISTINTAS MOLECULAS CON AFINIDAD POR HIERRO

reacción de hidroxilación del indol por NDO produciría el dihidrodiol correspondiente, el cual podría seguir la ruta hasta la formación de índigo, o estar presente en el sitio activo de la enzima secuestrando el hierro libre que es requerido para la actividad enzimática. No se ha comprobado esto último, por lo que se requeriría de demostrar que sea un producto intermediario el causante de la pérdida de la actividad de NDO.

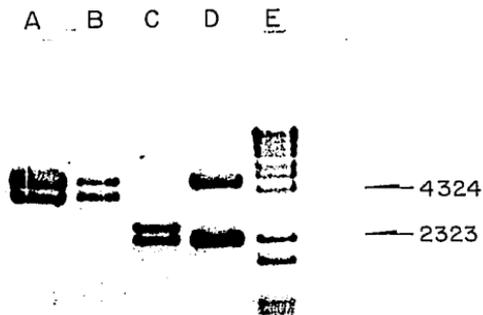
Por lo anterior se realizaron los experimentos trabajando con el plásmido pNDO y con el plásmido pFd figura ya que se sabe que el componente Fd es muy inestable (20). Se comparó la cantidad de índigo producido por las cepas de *E. coli* JM101.

Por otra parte se ensayó la adición de hierro exógeno al cultivo celular ya que se sabe que la enzima NDO requiere de hierro (Fe^{++}) para su actividad (8).

No se encontró un aumento significativo en la producción de índigo a las distintas concentraciones de hierro empleadas para ambos genes. Para conocer de manera directa el posible papel del hierro en la actividad de estas oxigenasas sería necesario determinar *in vitro* la actividad de las enzimas, pues en condiciones de cultivo, *E. coli* regula la entrada de hierro debido a que la célula lo requiere en concentraciones mínimas. Se podría pensar en trabajar con una cepa que tuviese incrementada la capacidad de transportar hierro al interior de la célula.

ESTUDIO DE LA XO BAJO DISTINOS PROMOTORES

En la fotografía 1 se demuestra la construcción de los plásmidos pXO y pTX. En la figura 8 se esquematiza la subclonación del fragmento XO en el vector pAC. El primero está bajo el promotor izquierdo de λ y el segundo bajo el promotor de triptofano. En la tabla 2 se indican los niveles de índigo producido (en un volumen de 30 ml de medio LB), por *E. coli* JM101 transformada con estos plásmidos. Con el promotor de triptofano se observa la mayor producción mientras que con el promotor izquierdo de λ es menor. Sin embargo, el plásmido pTX, al igual que el pTANDO, es muy inestable debido a que al realizar resiembras de la cepa con el plásmido y el promotor de



FOTOGRAFIA 1.- CLONACION DEL FRAGMENTO XO EN EL VECTOR pAC
BAJO EL PROMOTOR IZQUIERDO DEL FAGO LAMBDA. A Y B,
PLASMIDO pNDO DIGERIDO CON LAS ENZIMAS XbaI-
HindIII. C, PLASMIDO pUI301 DIGERIDO CON XbaI-
HindIII. D, PLASMIDO pXy11 DIGERIDO CON XbaI-
HindIII. E, MARCADOR DE ESO MOLECULAR.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

aerobiosis, la principal enzima para oxidar NADH, cabe la posibilidad de que la forma reducida del cofactor sea predominante sobre su forma oxidada presentándose un estado reductor dentro de la célula. Dicho estado se puso de manifiesto cuando se determinó el espectro de fluorescencia, en el intervalo de emisión para el NADH, de un cultivo celular con y sin rotenona, encontrándose un incremento en la intensidad de emisión de la fluorescencia. Como se puede observar de la tabla 3 los datos demuestran que hay un incremento del 40%, en comparación con el valor registrado para el testigo sin bloqueador, en la intensidad de la emisión cuando es adicionada la rotenona.

Tabla 3. MEDICION DEL NADH CELULAR POR FLUORESCENCIA EN PRESENCIA DE ROTENONA.

TABLA 3. MEDICION DEL NADH CELULAR POR FLUORESCENCIA EN PRESENCIA DE ROTENON

TIEMPO (minutos)	0	1	2.5	5	10	10
I.F.	72	117.5	113	120	114	70
U.K.	70	70	70	70	70	70

I.F. = Intensidad de la fluorescencia, unidades relativas

U.K. = Unidades Klett

Debido a que ambas oxigenasas (NDO y XO) requieren de la coenzima NADH para su actividad, es de esperarse que cuando éstas se están produciendo en *E. coli* van a requerir, además de ser expresadas, que la célula provea esta coenzima y por lo tanto van a competir con las NADH-reductasas presentes en *E. coli*. Lo anterior podría significar un gasto metabólico adicional para la célula. Por otra parte, la relación NADH/NAD⁺ representa una señal importante del estado redox de la célula, además de ser una de las principales señales de regulación del metabolismo central de la célula y la fuente primaria de electrones para la generación de ATP en condiciones de aerobiosis.

Esto sugiere que el NADH podría estar limitando la actividad de las oxigenasas debido a que *E. coli* posee también enzimas que requieren de NADH que son mas eficientes, como se puede deducir por las K_m registradas para las NADH-reductasas de la cadena respiratoria de *E. coli* (2).

Los resultados obtenidos empleando la fluorescencia emitida por el NADH en las células de *E. coli* JM101 apoyaron la hipótesis de un incremento relativo del NADH intracelular, lo cual permitió pensar en trabajar con mutantes de *E. coli* en cadena respiratoria que permitieran simular ahora el efecto de la rotenona evitando así trabajar con este compuesto, el cual es tóxico para humanos.

Por lo anterior, se pensó en trabajar con la cepa deficiente en el citocromo *d*. Los resultados con la cepa de *E. coli* deficiente en un citocromo permitieron encontrar evidencia de que la falta del citocromo *d* influye sobre la cinética de producción del índigo.

Cuando se realiza la cinética de crecimiento celular y producción de índigo de la cepa de *E. coli* JM101 con y sin la mutación sobre el citocromo *d* se encuentra que es mas corto el tiempo en que se inicia la producción de índigo en la cepa mutada en el citocromo *d*, sin embargo, la cantidad final de índigo producido por esta cepa es la misma que la cepa sin citocromo *d* funcional.

El efecto que tiene la rotenona es similar al observado empleando la mutación en el citocromo *d* en el sentido de que hay un aumento en la velocidad de producción de índigo. Sin embargo, la cantidad final de índigo producido es la misma que se obtiene sin emplear el bloqueador o la mutación. Si establecemos que la ecuación que define la producción de índigo es: $2 \text{ INDOL} + 2 \text{ NADH} + \text{O}_2 = \text{INDIGO} + 2 \text{ NAD}^+$

Entonces podemos establecer que, con base en la cantidad de índigo producido, podemos calcular la cantidad de NADH empleado para producir dicha cantidad de índigo. Así, para el intervalo de tiempo t_1 a t_2 de la gráfica 4 se tiene que la cantidad de índigo producido para la cepa JM101 es de 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y para la cepa JM101 d^- es de 7 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Lo que representa que en términos de NADH se requirieron de 9.95 y de 35.15 $\mu\text{g ml}^{-1}$ respectivamente. Este incremento representa una disponibilidad real de NADH en ciertos puntos de hasta más del triple

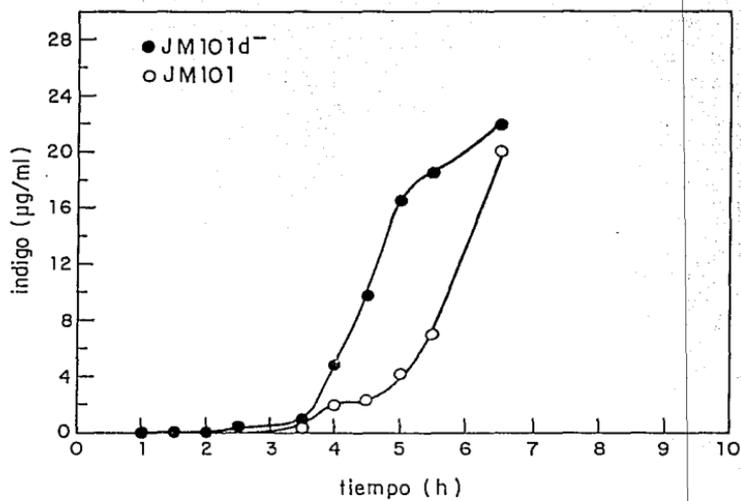


Fig *Cinética de producción de indigo por cepas de E. coli transformadas con pNDO.*

para la cepa con la mutación en el citocromo *d*. Los datos de densidad óptica indican que se requirieron menos células para producir índigo.

La cuestión que surge ahora es la de explicar por qué la cantidad de índigo producido por la cepa tratada con rotenona o con la mutante en el citocromo *d* al final es la misma con respecto a la cepa sin el tratamiento con rotenona y con el citocromo *d* funcional. Se puede encontrar respuesta si se toma en cuenta que el metabolismo de *E. coli* se modifica al pasar de condiciones aeróbicas a condiciones microaeróbicas o anaeróbicas dado que se pasa de un metabolismo predominantemente oxidativo a uno fermentativo (ácido-mixto). Debido a ésto, el flujo de electrones se desvía hacia la formación de especies parcialmente oxidadas, además que la cantidad de NADH producido por ciclo de Krebs está reducido y la cadena respiratoria aeróbica es poco activa. Así, la presencia de rotenona o de un citocromo *d* mutado en condiciones microaerofílicas tendrían poco efecto sobre la producción de índigo.

Los resultados que se presentan aquí empleando un bloqueador o con mutantes de cadena respiratoria sugieren que si se influye la oxidación del NADH a nivel de cadena respiratoria en *E. coli* JM101, o *E. coli d-*, se puede favorecer la conversión del indol a índigo cuando están presentes NDO o XO posiblemente debido a un aumento en la disponibilidad de NADH por estar afectada la oxidación de este cofactor. Para demostrar que realmente hay un aumento de la concentración intracelular de NADH se tendría que cuantificar este cofactor en las condiciones que aquí se ensayan.

V.- CONCLUSIONES:

A) En este trabajo se determinó que el mejor promotor para expresar NDO es el promotor izquierdo de lambda mientras que para XO el mejor promotor fue el de lactosa. El promotor de triptofano es un promotor fuerte, sin embargo, la actividad de ambas enzimas se pierde rápidamente al subcultivar, ya que surgen cepas no productoras, presumiblemente por modificaciones del plásmido recombinante.

B) En las condiciones probadas una copia adicional del componente Fd de la NDO no promueve una mayor actividad de la enzima, ni la adición de hierro exógeno provoca una mayor actividad de NDO o XO.

C) El empleo de la fluorescencia de cultivos bacterianos y el uso de un bloqueador de cadena respiratoria y/o mutantes en cadena respiratoria permitieron establecer una evidencia de que el NADH intracelular pudiera ser un factor limitante en la actividad de NDO y XO.

VI.- PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

Con base a los resultados y la discusión del presente trabajo se proponen las siguientes perspectivas para continuar con el estudio de las oxigenasas NDO y XO:

1.- Empleo de la mutagénesis para mejorar la actividad enzimática. En el caso de XO esto se puede llevar a cabo mediante dos alternativas.

a) Empleando mutagénesis al azar y buscando aquellas mutantes que produjeran mas índigo en comparación con la enzima original de XO. Posteriormente se llevaría a cabo la secuenciación del gene mutado para identificar los sitios que se hubieran modificado.

b) Emplear mutagénesis sitio dirigida, la cual debe de estar sólidamente sustentada para realizar los cambios pertinentes ya que tratándose de una enzima con diversos sitios implicados en la actividad enzimática se tendría que establecer cuál de estos sitios sería un candidato adecuado para ser mutagenizado.

2.- También es posible considerar el uso de otras oxigenasas con la finalidad de establecer su factibilidad de uso para procesos de bioconversión. Debido a la inestabilidad de estas enzimas y al requerimiento del cofactor de NAD(P)H se ha preferido emplear células completas.

3.- Estudio básico con agentes bloqueadores de cadena respiratoria. Existen otro tipo de bloqueadores que pueden ser empleados además de la rotenona. Por ejemplo la piericidina A que tiene un efecto bloqueador del 90% sobre al actividad de NADH-deshidrogenasa de *E. coli* mientras que la rotenona tiene un efecto del 55% sobre la misma actividad. La capsaicina es otro agente bloqueador de la misma deshidrogenasa y que también puede ser considerada para tales estudios. Sin embargo, el uso de los bloqueadores no puede llevarse mas alla del estudio en matráz debido a que estas sustancias están reguladas por su toxicidad.

4.- Empleo de mutantes en cadena respiratoria. Esto puede aportar datos interesantes en cuanto a la comprensión del ambiente oxidoreductor de una célula cuando los componentes de cadena respiratoria están afectados. Como se menciona en el trabajo la disponibilidad de la coenzima $\text{NADH}+\text{H}^+$ puede influir sobre la actividad de las oxigenasas, y de otras enzimas que requieren de este cofactor.

- 1.- Amato, I. 1991. Bacterial indigo gives the blues to industrial chemists. *Science*. vol: 1213.
- 2.- Anraku, Y. and R.B. Gennis. 1987. The aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. *TIBS* 12: 262-266.
- 3.- Connors, M.A. and E.A. Barnsley. 1982. Naphtalene plasmids in *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* 149: 1096-1101.
- 4.- Draths, K.M. and J.W. Frost. 1991. Conversion of D-glucose into catechol: The not-so-common pathway of aromatic biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 113: 9361-9363.
- 5.- Ensley, Jr. 1985. Microbial production of indigo. United States Patent No. 4,520,103.
- 6.- Ensley, B.D., B.J. Ratzkin, T.D. Osslund, and M.J. Gibson. 1983. Expression of naphtalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in biosynthesis of indigo. *Science*. 222: 167-169.
- 7.- Farr, S.R. and T. Kogoma. 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol.Rev.* 55: 561-585.
- 8.- Gibson, D.T., G.J. Zylastra, and S. Chauhan. 1990. Biotransformations Catalyzed by Toluene Dioxygenase from *Pseudomonas putida*. In *Pseudomonas Biotransformations, Pathogenesis, and Evolving Biotechnology*. S. Silver, A. N. Chakrabarty, B. Iglewski, and S. Kaplan. (Editores). pág. 121.
- 9.- Green, G.N. and R.B. Gennis. 1983. Isolation and characterization of an *Escherichia coli* mutant lacking cytochrome d terminal oxidase. *J. Bacteriol.* 154: 1269-1275.
- 10.- Haigler, B.E. and D.T. Gibson. 1990. Purification and properties

of NADH-Ferredoxin NADP reductase, a component of naphtalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB9816. J. Bacteriol. **172**: 457-464.

11.- Harayama, S. and M. Kok. and E.L. Neidle. 1992. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. Ann. Rev. Microbiol. **46**: 565-601.

12.- Harayama, S., M. Rekik, A. Bairoch, E.L. Neidle, and L.N. Ornston. 1991. Potential DNA slippage structures acquired during evolutionary divergence of *Acinetobacter calcoaceticus* chromosomal benABC and *Pseudomonas putida* TOL pWWO pasmid xylXYZ, genes encoding benzoate dioxygenases. J. Bacteriol. **173**: 7540-7548.

13.- Junker, B.H., D.I.C. Wang and T.A. Hatton. 1988. Fluorescence sensing of fermentation parameters using fiber optics. Biotechnol. Bioeng. **32**: 55-63.

14.- Keil, H., C.M. Saint, and P.A. Williams. 1987. Gene organization of the first catabolic operon of TOL plasmid pWW53: Production of indigo by the xyl gene product. J. Bacteriol. **169**: 764-770.

15.- Kita, K., K. Konishi, and Y. Anraku. 1984. Terminal oxidases of *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. J. Biol. Chem. **259**: 3368-3374.

16.- Kurkela, S., H. Lehvaslaiho, E.T. Palva and T.H. Teeri. 1988. Cloning, nucleotide sequence and characterization of genes encoding naphtalene dioxygenase of *Pseudomonas putida* strain NCIB9816. Gene. **73**: 355-362.

17.- Lin, E.C.C. and S. Tuchi. 1991. Regulation of gene expression in fermentative and respiratory systems in *Escherichia coli* and related bacteria. Ann. Rev. Genet. **25**: 361-387.

18.- Mason, H.R. and R. Cammack. 1992. The electron-transport

proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. Ann. Rev. Microbiol. 46: 277-305.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

19.- Morris, C.F. 1987. DNA plasmids. United States patent No. 4,710,473.

20.- Murdock, D., B. D. Ensley, C. Serdar and M. Thalen. 1993. Construction of metabolic operons catalyzing the *de novo* biosynthesis of indigo in *Escherichia coli*. Biotechnology. 11: 381-386.

21.- Neidle, E.L., C. Harnett, N. Ornston, A. Bairoch, M. Rekik and S. Harayama. 1991. Nucleotide sequences of the *Acinetobacter calcoaceticus* benABC genes for benzoate 1,2-dioxygenase reveal evolutionary relationships among multicomponent oxygenases. J. Bacteriol. 173: 5385-5395.

22.- Nermod, N., S. Harayama, and K.N. Timmis. 1986. New route to bacterial production of indigo. Biotechnology. 4: 321-324.

23.- O'Brien, I.G., G.B. Cox and F. Gibson. 1970. Biologically Active Compounds Containing 2,3-Dihydroxy-Benzoic Acid and Serine Formed by *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta. 201: 453-460.

24.- Pi, J., P.J. Wookey, and A.J. Pittard. 1991. Cloning and sequencing of the pheP gene, which encodes the phenylalanine-specific transport system of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 173: 3622-3629.

25.- Pridmore, R.D. 1987. New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. Gene. 56: 309-312.

26.- Sambrook, J., F. E. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning; A Laboratory Manual. Volume 1.

27.- Sarsero, J.P., P.J. Wookey, P. Gollnick, C. Yanofsky and A.J. Opittard. 1991. A new family of integral membrane proteins involved in transport of aromatic amino acids in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 173: 3231-3234.

- 28.- Siano, S.A. and R. Mutharasan. 1989. NADH and flavin fluorescence responses of starved yeast cultures to substrate additions. *Biotechnol. Bioeng.* **34**: 660-670.
- 29.- Suzuki, H., T. Hayakawa, J.P. Shaw, M. Rekik, and S. Harayama. 1991. Primary structure of xylene monooxygenase: Similarities to and differences from the alkane hydroxylation system. *J. Bacteriol.* **173**: 1690-1695.
- 30.- Walker, C.C. and P. Dhurjati. 1989. Use of culture fluorescence as a sensor for on-line discrimination of host and overproducing recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 500- 505.
- 31.- Wierenga, R.K., P. Terpstra and W.G.J. Hol. 1986. Prediction of the occurrence of the ADP-binding BAB-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J. Mol. Biol.* **187**: 101-107.
- 32.- Xu, X., A.M. Yagi and T. Yagi. 1991. The NADH-binding subunit of the energy-transducing NADH-ubiquinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*: Gene cloning and deduced primary structure. *Biochemistry.* **30**: 6422-6428.
- 33.- Harris, R.W., C.J. Carrano, S.R. Cooper, S.R. Sofen, A.F. Avdeef, J.V. McArdle, and K.N. Raymond. 1979. Coordination chemistry of microbial iron transport compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **101**: 6097-6104.
- 34.- Yagi, T. 1987. Inhibition of NADH-Ubiquinone reductase activity by N, N'-Dicyclohexylcarbodiimide and correlation of this inhibition with the occurrence of energy-coupling site 1 in various organisms. *Biochemistry.* **26**: 2822-2828.
- 35.- Yagi, T. and T.M. Dinh. 1990. Identification of the NADH-binding of NADH-Ubiquinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry.* **29**: 5515-5520.

36.- Yagi, T. 1991. Bacterial NADH-Quinone Oxidoreductases. J. Bioenerg. Biomembr. 23: 211-225.

37.- Yanofsky, C., V. Horn and P. Gollnick. 1991. Physiologic studies of tryptophan transport and tryptophanase operon induction in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 173: 6009-6017.