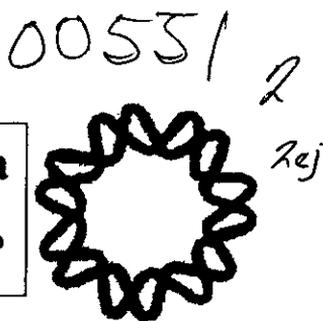




Instituto de Biotecnología

Universidad Nacional Autónoma de México



**"Efecto de la inactivación del Sistema Fosfotransferasa en
el rendimiento de aromáticos a partir de glucosa en
Escherichia coli"**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
Maestro en Ciencias Bioquímicas**

PRESENTA:

I.Q. José Luis Báez Viveros

274757

Cuernavaca, Morelos

1999

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 esta 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 de tesis de maestría fue realizado en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, siendo el asesor del mismo el Dr. Guillermo Gosset Lagarda. Durante el desarrollo de este trabajo se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto 27375-N y de la beca 91646

Dedicatoria:

A Dios

Por todo.

A mi madre:

Gracias a tí he podido alcanzar las metas que me he planteado. Gracias por ese cariño incondicional, por apoyarme y alentarme en los momentos adversos. No tengo palabras que puedan expresar elucuentemente este sentimiento de cariño y agradecimiento a tí mamá.

A mis hermanas:

Ana Silvia, Martha Leticia, Griselda y María Victoria por todo el cariño brindado que me alimenta y por esos lazos insolubles que nos unen al haber compartido tantos momentos inolvidables.

A mis primas:

María de Jesús y Verónica.

A mis sobrinos:

Julissa, Noel Antonio, Karen Michelle, Melissa, Araí, Karina, Moisés, Luis Alberto y Katia Daniela.

A mis amigos:

Clara Sampieri, Juan L. Tapia, Edgar Mújica, Victor González y Nathalie Latulippe por ser mi fortuna y bendición.

Agradecimientos:

Al **Dr. Guillermo Gosset Lagarda** por invitarme a ser pionero en su reciente grupo de investigación, por compartir conmigo su conocimiento, por el apoyo y la oportunidad de incursionar en el campo de la Ingeniería Metabólica.

Mi especial agradecimiento a **Mercedes Enzaldo** nuestra Técnico Laborarorista modelo por ser la eficiencia hecha persona, por su invaluable ayuda, amistad y buena voluntad en todo momento.

A mi comité tutorial integrado por:

Dr. Rodolfo Quintero Ramírez

Dr. Mario Soberón Chávez

Dr. Guillermo Gosset Lagarda

por su valiosa participación y aportación durante los exámenes tutoriales.

A mis compañeros:

Anabel Ortíz, Ramón de Anda, Laura Moreno, Roberto Sigüenza, Joel Espinosa, Francisco Villaseñor, Martha Méndez, Vera Petricevich, Laura Palomares, Edith L. Chalini, Claudia Berdugo, Angélica Meneses y a mis compañeros de generación por hacer más agradable con su amistad mi estancia en este Instituto.

Jurado:

Dr. Lourival Domingos Possani Postay

Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich

Dr. Mario Soberón Chávez

Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo

Dr. Guillermo Gosset Lagarda

Gracias, por su revisión crítica a mi tesis, por sus valiosos comentarios y acertadas sugerencias a la misma.

Indice General

Indice General	i
Indice de Figuras	iii
Indice de Tablas	iv
Nomenclatura	v
Resumen	1
1. INTRODUCCION	3
2. ANTECEDENTES	7
2.1 Ingeniería de vías metabólicas.	7
2.2 El mercado de aminoácidos.	11
2.3 Síntesis química de aminoácidos aromáticos.	11
2.4 Síntesis biocatalítica de compuestos aromáticos.	12
2.5 Análisis de vías metabólicas :	17
2.5.1 El nodo fosfoenolpiruvato (PEP)	18
2.5.2 El sistema de transporte fosfotransferasa (PTS)	20
2.6 Enfoques tradicionales para incrementar la biosíntesis de aromáticos :	23
2.6.1 Regulación alterada de enzimas clave	23
2.6.2 DAHP sintasa	25
2.6.3 Biosíntesis de aromáticos limitada por sustrato.	26
2.6.4 Impedimentos del flujo de carbono a través de la vía común de aminoácidos aromáticos.	29
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo general	31
3.2 Objetivos específicos	31

4	MATERIALES Y METODOS	32
	4.1 Cepas y plásmidos	32
	4.2 Medios y condiciones de cultivo	34
	4.3 Inóculos	34
	4.4 Métodos analíticos	36
	4.4.1 Determinación de glucosa	36
	4.4.2 Determinación de DAHP	36
	4.4.3 Determinación de biomasa	37
	4.5 Diseño de oligonucleótidos	37
	4.6 Herramientas de biología molecular utilizadas en este trabajo :	38
	4.6.1 Mutagénesis por inserción sitio-dirigida	38
	4.6.2 Transducción	38
	4.7 Cálculo de rendimientos, productividades, velocidades de consumo y de producción.	39
5	RESULTADOS Y DISCUSION	44
	5.1 Construcción del pBSL46 <i>aroB</i>	44
	5.2 Integración en cromosoma del gene <i>aroB::cat</i> .	44
	5.3 Construcción de las mutantes <i>aroB</i> ⁻ por transducción con fago P1	46
	5.4 Cultivos en matraces : biomasa, concentración de glucosa y DAHP, productividades y rendimientos.	49
	5.5. Cálculo de flujos de carbono internos	59
	5.6 Flujo a través de <i>aroB</i>	63
	5.7 Perspectivas	66
6	CONCLUSIONES	69
	BIBLIOGRAFIA	70

Indice de Figuras

Figura	Descripción	Página
1	Muestra las vías del metabolismo central de <i>E. coli</i> que suministran los esqueletos de carbono hacia la biosíntesis de compuestos aromáticos, y metabolitos relevantes sintetizados por vía normal. Así como otros compuestos producidos en <i>E. coli</i> por la acción de enzimas heterólogas.	13
2	Nodo de distribución del fosfoenolpiruvato (PEP) en <i>Escherichia coli</i> , mostrando los porcentajes de los flujos en reacciones que compiten por el PEP.	19
3	Organización y reacciones de fosfotransferencia del PTS en <i>Escherichia coli</i> para los carbohidratos: manitol, glucosa y manosa.	21
4	Comparación entre los sistemas de transporte de glucosa en cepas PTS ⁺ (panel A) y PTS ⁻ Glc ⁺ (panel B).	22
5	Muestra el metabolismo central, vía común y vías terminales de aminoácidos aromáticos, así como puntos de control en la vía común de aromáticos en <i>E. coli</i>	24
6	Protocolo para la preparación de inóculos y cultivos de alta densidad celular.	35
7	Esquematiza los flujos internos óptimos para alcanzar rendimientos máximos teóricos en las cepas PTS ⁺ (panel A) y PTS ⁻ Glc ⁺ (panel B).	42
8	Construcción del plásmido pBSL46aroB::cat.	45
9	PCR de colonias de <i>E. coli</i> ATCC47002 transformadas con el pBSL46aroB::cat.	47
10	PCR de colonias transductantes PB103B y NF9B.	47
11	Cultivos en matraces agitados de las cepas PB103, PB103B, NF9 y NF9B. Panel A, biomasa; Panel B, glucosa residual; panel C concentración de DAHP.	51
12	Productividad volumétrica de DAHP de las cepas PB103, PB103B, NF9 y NF9B.	53
13	Rendimientos molares de DAHP/Glc de las cepas PB103, PB103B, NF9 y NF9B	56

14	Comparación de los $Y_{\text{Tro}/\text{Glc}}$ (panel A) y $Y_{\text{Phe}} \text{ ó } Y_{\text{Tyr}/\text{Glc}}$ (panel B) con los rendimientos máximos teóricos molares y con datos industriales.	58
15	Muestra los flujos internos relacionados a la biosíntesis de aromáticos para las cepas PB103B (panel A) y NF9B (panel B).	62
16	Flujos de DAHP excretados por las cepas aroB^+ (panel A) y por las aroB^- (panel B).	64

Tablas	Descripción	Página
I	Cepas y plásmidos empleados en este estudio.	33
II	Desviaciones estándar promedio de los datos experimentales de biomasa, concentración de glucosa y DAHP.	52
III	Rendimientos molares DAHP/Glc, velocidades de consumo de glucosa y producción de DAHP.	55
IV	Flujos internos medidos y calculados a través las vías centrales (EMP y vía de las pentosas) y vía común de aminoácidos aromáticos, en cepas PTS^+ y $\text{PTS}^- \text{ Glc}^+$.	63
V	Flujos de carbono a través de aroB en las cepas PB103 y NF9.	65

Nomenclatura

ADC	4-amino-4-desoxi-corismato
ANTH	Antranilato
aroB	Gene de acetil transferasa (DHQ sintasa)
aroF, aroG	Genes de las isozimas DAHP sintasas
aroH	
aroG^{br}	Gene de DAHP sintasa resistente a retroinhibición
ATP	Adenosin trifosfato
CA	Corismato
cat	Gene de resistencia a cloramfenicol
CDRP	1-(o-Carboxifenilamino)-1-desoxiribulosa 5-fosfato
DAHP	3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DHQ	5-deshidroquinato
DHS	Acido deshidroxishiquímico
E4P	Eritrosa-4-fosfato
EI, HPr, EIIs	Proteínas generales de PTS
EPSP	3-enolpiruvil-shiquimato 5-fosfato
F6P	Fructosa 6-fosfato
G6P	Glucosa 6-fosfato
GA	Acido gálico
GalP	Permeasa de galactosa
GAP	Gliceraldehido 3-fosfato
Glc	Glucosa
HPP	p-Hidroxifenilpiruvato
InGP	Indol-3-glicerol fosfato
Man	Manosa
Mtl	Manitol
PABA	Acido para-aminobenzoico
PEP	Fosfoenolpiruvato
PHB	Acido para-hidroxibenzoico
Phe	Fenilalanina
PIR	Piruvato
PPA	Prefenato
Ppc	PEP carboxilasa
Pps	PEP sintasa

PPY	Fenilpiruvato
PRA	N-5'-Fosforibosil-antranilato
PTS	Sistema de transporte fosfotransferasa
<i>ptsH, ptsI</i>	Genes que codifican para las proteínas generales del PTS
<i>pykA</i>	Genes de las izosimas piruvato cinasas
<i>pykF</i>	
R5P	Ribosa 5-fosfato
S3P	Shiquimato 3-fosfato
S7P	Sedoheptulosa 7-fosfato
SHIK	Shiquimato
TCA	Ciclo del ácido tricarboxílico
<i>tktA</i>	Gene de la transcetolasa
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
X5P	Xilulosa 5-fosfato
$Y_{DAHP/Glc}$	Rendimiento DAHP a partir de glucosa
Y_{pts}	Rendimiento producto sustrato
1,6 FDP	Fructosa 1,6-bifosfato

RESUMEN

Análisis estequiométricos muestran que existen muchas enzimas que compiten por el fosfoenolpiruvato (PEP) intracelular, el cual es uno de los precursores directos en la vía de los compuestos aromáticos. El principal consumidor de PEP es el Sistema de Transporte Fosfotransferasa (PTS), el cual utiliza PEP como donador de fosfato durante la internalización de la glucosa, consumiendo una molécula de PEP por cada molécula de glucosa internalizada. El objetivo de este estudio es determinar el efecto de la inactivación del sistema PTS sobre el rendimiento DAHP/Glucosa ($Y_{\text{DAHP/Glc}}$) y productividad en *Escherichia coli*. Con este propósito, se realizó un bloqueo en el segundo paso de la vía de los aminoácidos aromáticos en cepas de *E. coli* para poder calcular los $Y_{\text{DAHP/Glc}}$ absolutos inactivando el gene *aroB* mediante la inserción del gene que codifica para la resistencia a cloramfenicol (*cat*). La mutación *aroB::cat* fue transducida a las cepas PB103 (PTS⁺) y NF9 (PTS⁻Glc⁺). Las cepas transductantes (*aroB*⁻) fueron transformadas con plásmidos que portan los genes que codifican para la transcetolasa (*tktA*) y DAHP sintasa resistente a retroinhibición (*aroG^{tr}*). Con estas cepas se llevaron a cabo cultivos en matraces para calcular los $Y_{\text{DAHP/Glc}}$ molares y productividades de DAHP. La cepa PB103B (PTS⁺*aroB*⁻) alcanzó un rendimiento de 0.43 mol DAHP/mol Glc, el cual es igual al rendimiento máximo teórico para una cepa PTS⁺. La cepa NF9B (PTS⁻Glc⁺*aroB*⁻) alcanzó un rendimiento de 0.71 mol DAHP/mol Glc. Por consiguiente, la inactivación del PTS en la cepa NF9B tiene un impacto relevante al incrementar el rendimiento molar en un 65% con respecto al control (cepa PTS⁺). La cepa NF9B alcanzó rendimientos que son un 82.5% del rendimiento máximo teórico que puede alcanzar una cepa PTS⁻ que es de 0.86 mol DAHP/mol Glc.

Análogamente, la inactivación del PTS también tiene un gran efecto positivo al incrementar considerablemente la productividad máxima de DAHP en un 83%. Adicionalmente, otros parámetros tales como la velocidad de consumo de glucosa y las velocidades de producción de DAHP fueron calculadas para determinar los flujos internos de carbono a través de las vías metabólicas centrales (glicólisis y vía de las pentosas) en las cepas PB103B y NF9B. El cálculo de flujos de carbono internos reveló que el flujo de carbono a través de glicólisis es significativamente mayor (33 %) en las cepas PTS⁺ que en sus contrapartes PTS⁻. Por el contrario, el flujo de carbono a través de la vía del brazo no oxidativo de las pentosas es 64% mayor en las cepas PTS⁻ que en las PTS⁺. Asimismo, a partir de la velocidad de producción se calcularon los flujos de DAHP que son dirigidos hacia la formación de deshidroquinato (DHQ) a través de la enzima deshidroquinato sintasa (codificada por el gene *aroB*), siendo estos de 0.556 y 0.928 mmolDAHP/g peso seco-h para las cepas PB103 y NF9, respectivamente.

INTRODUCCION

Es conocido que plantas y microorganismos poseen la capacidad para convertir carbohidratos simples tales como glucosa a aminoácidos aromáticos y a metabolitos relacionados. *Escherichia coli* y otros microorganismos sintetizan aromáticos a partir de la vía común de aminoácidos aromáticos. El primer paso que está comprometido hacia la producción de aromáticos en *E. coli* es la biosíntesis de 3-desoxi-D-arabino-heptulose-7-fosfato (DAHP), este paso es irreversible. El DAHP es producido durante la reacción de condensación entre el fosfoenolpiruvato (PEP) y la eritrosa-4-fosfato (E4P) catalizados por las isozimas DAHP sintetasas, codificadas por los genes *aroF*, *aroG* y *aroH*, cuyos productos son retroinhibidos por tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe) y triptofano (Trp), respectivamente. El flujo de carbono en forma de DAHP es transformado en otros intermediarios de la vía común de aminoácidos aromáticos hasta generar corismato. En este punto el flujo de carbono es dividido hacia diferentes vías para la producción de Phe, Tyr y Trp de acuerdo a las necesidades de la célula. En diversos estudios se han empleado las mediciones de DAHP como indicador para poder inferir la magnitud del flujo de carbono que es canalizado hacia la vía común de aminoácidos aromáticos.

Existen otros compuestos que son producidos a partir de la vía común de compuestos aromáticos, tales como, quinonas, folato y enteroquelina (figura 1). Las quinonas son moléculas liposolubles que median la transferencia de electrones entre proteínas de la cadena respiratoria. *E. coli* sintetiza tres tipos quinonas: benzoquinona, ubiquinona (coenzima Q) y dos naftoquinonas (menaquinona y dimetilmenaquinona). Por otro lado, el ácido fólico sirve como donador de un carbono en una amplia variedad de reacciones celulares y los derivados del folato participan en diferentes funciones

celulares. La enteroquelina es uno de los seis sistemas transportadores de hierro en *E. coli*. Estas estructuras transportadoras de hierro son conocidas como sideróforos.

Los aminoácidos aromáticos como Phe, Tyr y Trp son producidos industrialmente y son usados principalmente como suplementos en las dietas de humanos y animales. De particular interés, es la producción de fenilalanina debido a que es una de las materias primas esenciales en la elaboración del edulcorante aspartame. La fenilalanina puede ser enzimática o químicamente convertida a aspartame (Oyama *et al.*, 1987), el cual se estima que es 150 veces más dulce que la sacarosa, y actualmente posee un amplio mercado mundial al ser el aditivo alimenticio con las más altas ventas (Thayer, 1991). Por otro lado, la introducción de genes específicos, tales como, el gene de la naftaleno dioxigenasa o el gene de la tirosinasa (*mel*) a un microorganismo, resulta en la biosíntesis de índigo (Ensley *et al.*, 1983, Murdock *et al.* 1993) o en la producción de eumelanina (della-Cioppa and Garger, 1990).

Otros compuestos que también tienen importancia industrial son algunos de los intermediarios de la vía común de aminoácidos aromáticos, como por ejemplo, el ácido para-aminobenzoico (PABA), los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico (PHB), el ácido deshidroshiquímico (DHS), el ácido gálico (GA) y los derivados de GA como el propil galato. Otro derivado del DHS es el catecol. A partir del DHS puede obtenerse el ácido adípico que se utiliza para producir nylon 6-6, entre otros (ver aplicaciones de estos compuestos en sección 2.4).

La producción biosintética de compuestos aromáticos a partir de glucosa a través de la vía común de los aminoácidos aromáticos, tiene el potencial de

reducir significativamente los costos de producción de estos compuestos químicos en comparación con los métodos químicos tradicionales (Frost and Lievense, 1994). Además, los compuestos aromáticos producidos por métodos de síntesis química tienen la desventaja de que son generalmente obtenidos a partir del benceno, tolueno y xileno, provenientes a su vez de fuentes no renovables como el petróleo. La biosíntesis de los aromáticos empleando fuentes renovables como la D-glucosa, puede constituir una alternativa más eficiente a las rutas industriales comunes de síntesis de aromáticos. La ingeniería metabólica se ha empleado para mejorar el rendimiento y productividad de cepas sobreproductoras de estos metabolitos. El mejoramiento puede ser alcanzado alterando el metabolismo central que suministra los precursores y la energía para la biosíntesis, y redirigiendo el flujo de carbono hacia la vía formadora de producto.

Para reducir el costo de la producción biosintética industrial de compuestos aromáticos y otros derivados, es necesario incrementar el flujo de esqueletos de carbono hacia la vía común de compuestos aromáticos. La viabilidad comercial de la producción de compuestos aromáticos empleando microorganismos recombinantes depende del rendimiento producto/sustrato y de la productividad. Análisis teóricos de las vías metabólicas involucradas en la producción de compuestos aromáticos indican que el rendimiento de aromáticos está considerablemente limitado por fosfoenolpiruvato (PEP), debido a que existen muchas enzimas que compiten por el PEP intracelular. Asimismo, el rendimiento también puede estar limitado por la disponibilidad de eritrosa-4-fosfato (E4P) de acuerdo con algunos estudios, en donde se ha demostrado que la sobreexpresión de transcetolasa incrementa el flujo de carbono a la vía común de los aromáticos, al aumentar los niveles de E4P (Draths *et al.*, 1992), (Patnaik and Liao, 1994), (Gosset *et al.*, 1996). El PEP es uno de los mayores

bloques de construcción en varias vías biosintéticas y es el donador de fosfato utilizado por el PTS durante la internalización de la glucosa. Para contender con el problema de disponibilidad de PEP, se han adoptado diversos enfoques, algunos de ellos han sido el empleo de fuentes de carbono que no utilicen PTS, el reciclamiento de PEP por sobreexpresión de PEP sintasa (Patnaik *et al.*, 1995), inactivación de piruvato cinasas, selección de mutantes que tienen inactivado PTS y que son capaces de transportar glucosa por GalP, empleando glucocinasa y ATP para fosforilar la glucosa (Flores *et al.* 1996), o una combinación de estos enfoques (Gosset *et al.*, 1996).

En nuestro laboratorio se han construido mutantes que tienen inactivado el PTS, y mediante un sistema de selección en quimiostato se han aislado mutantes PTS⁻ que poseen la capacidad de transportar glucosa al interior de la célula, donde es fosforilada. Asimismo, estas mutantes con el fenotipo PTS⁻ Glc⁺ fueron seleccionadas por sus altas velocidades de crecimiento. Teóricamente, la disponibilidad de PEP intracelular en estas mutantes PTS⁻ Glc⁺ debe ser mayor. Por lo que en el presente estudio se planteó esta interrogante, y se determinó el efecto de la inactivación del PTS sobre el rendimiento y la productividad del primer intermediario en la biosíntesis de los compuestos aromáticos (DAHP) en *Escherichia coli*. Asimismo, se calcularon los flujos internos de carbono en las vías metabólicas centrales tanto de la cepa PTS⁺ *aroB*⁻ como de la mutante PTS⁻ Glc⁺ *aroB*⁻ a partir de las velocidades de consumo de glucosa y de las velocidades de producción de DAHP. Además, se calculó el flujo de carbono que es metabolizado a través de la enzima DHQ sintasa (codificada por *aroB*) en las cepas PTS⁺ y PTS⁻.

2. ANTECEDENTES

2.1 Ingeniería de vías metabólicas

Las actividades enzimáticas de las células son realizadas por sistemas de transporte de membrana selectivos y por una compleja red de aproximadamente 1000 reacciones catalizadas por enzimas que están altamente acopladas, y algunas sujetas a control alostérico. Sin embargo, las redes metabólicas que han evolucionado en forma natural no han sido genéticamente optimizadas para objetivos importantes en aplicaciones prácticas o industriales. De aquí que la ejecución de un bioproceso puede ser mejorado a través de la modificación genética de las células, aplicando métodos de DNA recombinante para reestructurar las redes metabólicas (Bailey, 1991).

La ingeniería de vías metabólicas emergió como un campo de la investigación científica apuntando al mejoramiento directo de las propiedades celulares a través de la modificación de reacciones bioquímicas específicas o la introducción de nuevas, empleando la tecnología de DNA recombinante (Bailey, 1991). La oportunidad de introducir genes heterólogos y elementos regulatorios distingue la ingeniería metabólica de los enfoques genéticos tradicionales para mejorar una cepa. Esta capacidad hace posible la construcción de configuraciones metabólicas con características nuevas y benéficas. De esta forma, la función celular puede ser modificada a través de alteraciones específicas.

La ingeniería metabólica promete beneficios tecnológicos, así como contribuciones a la ciencia básica, agricultura, industria alimenticia y al campo de la medicina (Yarmush and Berthiaume, 1997). Con este propósito han

emergido una base de estrategias, herramientas y experiencias que ayudarán a identificar, implementar y refinar un conjunto particular de manipulaciones genéticas. Por ejemplo, después de que una nueva cepa ha sido creada mediante alguna manipulación genética, las limitaciones que pudieran existir, en principio, pueden ser franqueadas por una subsecuente manipulación genética. Así, un ciclo iterativo de alteraciones genéticas, un análisis de las consecuencias y un diseño de un cambio ulterior, análogo al estructurado por ingeniería de proteínas puede ser utilizado para crear una cepa optimizada.

Típicamente, la ruta de reacciones que conducen a la formación del producto deseado pasa a través de varios nodos u horquillas, en donde los intermediarios pueden entrar alternativamente a diferentes vías metabólicas. En tales bifurcaciones de flujo metabólico se puede contribuir a dos o más procesos paralelos. La maximización de la formación de producto requiere que la ruta deseada en cada horquilla sea una prioridad, y que el tráfico en una vía alternativa sea minimizado lo más posible sin disminuir la viabilidad celular.

La modificación de las redes metabólicas, empleando la ingeniería de vías metabólicas, intenta redirigir el flujo de carbono para un fin específico; generalmente, con el propósito de incrementar el rendimiento o la velocidad de formación de algún producto específico. Para lograr este objetivo, es necesario identificar las uniones críticas (nodos) en una red metabólica que tengan impacto directo en la formación del producto final y determinar el tipo exacto de modificación enzimática necesaria para obtener el resultado deseado. Este tipo de modificaciones puede ser amplificación, inhibición, desregulación enzimática o una combinación de éstas (Erlich *et al.*, 1991). Stephanopoulos y Sinskey (1993) señalaron la importancia de manipular tanto la vía formadora de producto como las vías metabólicas centrales para generar los precursores,

cofactores y energía de la vía formadora de producto. Con este enfoque, se ha demostrado el poder que posee la ingeniería metabólica en *Escherichia coli* para el mejoramiento en la producción de compuestos aromáticos a partir de glucosa (Alan Berry, 1996). Este sistema es probablemente el mejor ejemplo a la fecha de la manipulación del metabolismo central para redirigir el flujo de carbono y mejorar la producción de metabolitos. Esta manipulación ha sido ampliamente facilitada por la disponibilidad de herramientas de biología molecular para este microorganismo. Sin embargo, al ser alterado el metabolismo, puede existir resistencia inherente al cambio en el flujo metabólico a través de vías metabólicas particulares debido a mecanismos de regulación, los cuales son requeridos para asegurar el crecimiento balanceado del organismo, a esto se le conoce como rigidez metabólica (Stephanopoulos and Vallino, 1991). Para sortear estos problemas, los estudios de regulación a nivel transcripcional y enzimático han ofrecido la posibilidad de controlar la actividad catalítica y función de enzimas a nivel genético mediante mutagénesis sitio dirigida. Asimismo, mediante esta tecnología ha sido posible modificar sitios activos de las enzimas con objeto de modular la actividad enzimática o cambiar la regulación y control de las mismas. De esta forma, se ha logrado identificar y remover los puntos rígidos en vías que exhiben arquitecturas de control y que resisten alteraciones en los flujos. Por otro lado, el entendimiento de la información que proporcionan los flujos metabólicos y su control es un componente integral del campo de la ingeniería metabólica. La combinación de métodos analíticos para cuantificar flujos y su control con técnicas de biología molecular para implementar las modificaciones genéticas es la esencia de la ingeniería metabólica (Stephanopoulos, 1998).

La ingeniería metabólica emplea conceptos de ingeniería de reacción y termodinámica y su enfoque está centrado en el análisis de redes de

bio-reacciones completas, aspectos relacionados con vías de síntesis, flujos y control de éstos. El flujo metabólico puede ser definido como la velocidad a la cual el material es procesado a través de una vía metabólica. La determinación y estudio *in vivo* ha sido llamado análisis de flujo metabólico y ocupa un lugar central en la ingeniería de vías metabólicas. El flujo es un determinante fundamental de la fisiología celular y un parámetro crítico de una vía metabólica. En conjunto con las concentraciones de metabolitos intracelulares, los flujos definen la mínima información necesaria para describir el estado metabólico y la fisiología celular. Además, los flujos metabólicos y en particular, los cambios de los flujos metabólicos en respuesta a los diferentes tipos de perturbaciones genéticas y medio ambientales, pueden ser usados en la elucidación sistemática del control metabólico en la estructura de grupos de reacciones y en el análisis del control metabólico (Stephanopoulos, 1999).

2.2. El mercado de aminoácidos

Los aminoácidos obtenidos de procesos fermentativos representan los mayores productos de tecnología biológica tanto en volumen como en valor. Con mayores mercados en nutrición animal, la demanda mundial de aminoácidos se está incrementando entre 5 y 10 % por año. Con un mercado mundial creciente, la capacidad de producción biológica también se está incrementando (John Hodgson, 1994). La tendencia más relevante en el mercado de aminoácidos ha sido el incremento de la presencia de compañías japonesas en inversión y adquisición de corporaciones en Norteamérica y en Europa Occidental. De particular interés, es la producción biotecnológica de aminoácidos aromáticos, en donde empresas japonesas (Mitsubishi y Kyowa Hakko) han desarrollado tecnologías que incorporan procesos de DNA recombinante para la producción de triptofano en géneros de bacterias como *E. coli*, *Brevibacterium* y *Corynebacterium*, obteniendo la aprobación del empleo de L-triptofano como aditivo en alimentos para humanos (John Hodgson, 1994).

2.3. Síntesis química de aminoácidos aromáticos

La industria química (excepto farmacéutica) típicamente emplea catalizadores químicos y materias primas derivadas del petróleo. Como una fuente natural no renovable, el petróleo ocasiona varios problemas medio ambientales negativos y su empleo está asociado a problemas geopolíticos. Además, la industria química hace uso de materia prima, intermediarios y reactivos que resultan tóxicos. En contraste, el almidón y la celulosa son fuentes de glucosa renovables y abundantes.

Los químicos han sabido las ventajas potenciales de usar simples carbohidratos tales como D-glucosa como materia prima para la producción de compuestos orgánicos de mayor valor agregado. Por ejemplo, los carbohidratos son relativamente baratos y son una fuente casi ilimitada de bloques de construcción. Desgraciadamente, en la síntesis química, la conversión de carbohidratos a productos tales como aminoácidos aromáticos frecuentemente requiere de largos procesos de síntesis. Típicamente, sólo una pequeña cantidad de producto es obtenido al final del proceso. Un enfoque alternativo para contender con este tipo de problemas es la alteración genética de microorganismos para generar nuevos capaces de convertir carbohidratos como la D-glucosa al producto deseado. La ventaja del enfoque genético es que se crea una entidad catalítica con características prominentes para la manufactura de productos químicos a nivel industrial (Frost and Draths, 1995).

2.4. Síntesis biocatalítica de compuestos aromáticos

La biosíntesis de aromáticos sirve como un paradigma de como los microorganismos pueden ser manipulados para alcanzar el rendimiento, productividad y criterios de pureza requeridos en la industria química. El incremento en el flujo de carbono dirigido hacia la vía común de aminoácidos aromáticos permite la síntesis de una gran variedad de productos químicos. En la **figura 1** se esquematizan las vías del metabolismo central de *Escherichia coli* y el flujo de esqueletos de carbono hacia la vía del shiquimato o vía común de los aminoácidos aromáticos, así como algunos metabolitos derivados del corismato por biosíntesis normal. Asimismo, se muestran otros compuestos que son producidos en *E. coli* por enzimas heterólogas o compuestos como el

aspartame que es producido a partir de fenilalanina por procesos químicos o bioquímicos acoplados a procesos de fermentación. Los aminoácidos aromáticos, tales como, la fenilalanina y triptofano figuran prominentemente entre los productos químicos que están siendo producidos por microorganismos a partir de glucosa. La fenilalanina puede ser enzimática o químicamente convertida a aspartame (Oyama *et al.*, 1987), el cual tiene las más altas ventas en volumen de todos los aditivos alimenticios (Thayer, 1991).

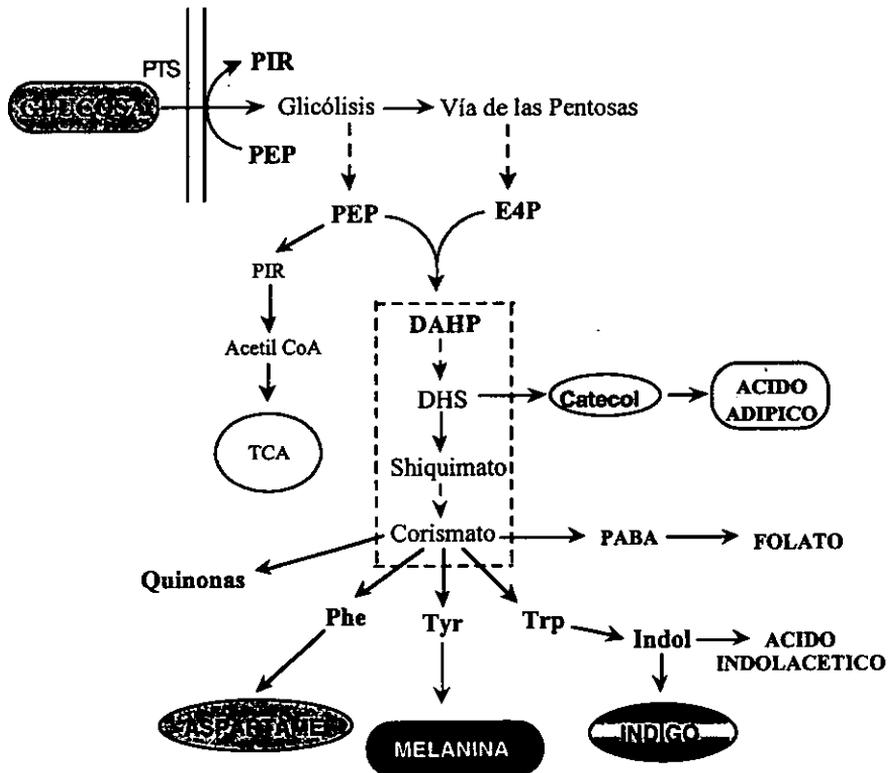


Figura 1. Muestra las vías del metabolismo central de *E. coli* que suministran los esqueletos de carbono hacia la biosíntesis de compuestos aromáticos. La vía común está indicada por un recuadro punteado. Además, esquematiza algunos metabolitos relevantes sintetizados por vía normal, así como otros compuestos que han sido producidos en *E. coli* por la acción de enzimas heterólogas.

La clonación y expresión de genes heterólogos puede servir para diversos propósitos útiles, incluyendo la extensión de una vía existente para la obtención de un nuevo producto, creando arreglos de actividades enzimáticas que sintetizan una estructura nueva, cambiando el flujo de metabolitos hacia el producto deseado y/o acelerando la velocidad de un paso determinante (Bailey, 1991). La introducción de una enzima heteróloga funcional o un sistema de transporte a un microorganismo puede resultar en la generación de nuevos compuestos que a su vez pueden emprender reacciones subsecuentes. La diversidad genética y metabólica que existe en la naturaleza provee una colección de organismos con un amplio espectro de asimilación de sustratos y de capacidad de síntesis de productos. En lo que concierne al área de producción de compuestos aromáticos, Ensley *et al.*, (1983) y Murdock *et al.* (1993) introdujeron el grupo genes *nahA* que codifican para la enzima naftaleno dioxigenasa en un microorganismo productor de triptofano que además expresa triptofanasa, dando como resultado la biosíntesis de índigo. El índigo es uno de los compuestos más antiguos utilizado por el hombre en el teñido de algodón y lana. Este compuesto es el que da la coloración azul en el teñido de mezclilla y se produce en grandes volúmenes a nivel mundial (13×10^6 kg/año), más que de cualquier otro colorante. Otro ejemplo interesante, es la introducción del gene de la tirosinasa (*mel*) de *Streptomyces antibioticus* en *E. coli* para la producción de melanina (della-Cioppa and Garger, 1990), la cual es producida a partir de la tirosina. La melanina es el pigmento (color café-negro) encontrado en animales, hongos, plantas superiores y microorganismos, y es de especial interés debido a la capacidad que posee para absorber la luz UV, por lo que es empleada como protector solar en algunas lociones bronceadoras.

Algunos metabolitos intermediarios en la vía común de aminoácidos aromáticos también pueden ser valiosos como productos químicos. Por ejemplo, el ácido para-aminobenzoico (PABA) es biosintetizado por la conversión inicial de corismato (CA) a 4-amino-4-desoxi-corismato (ADC) seguido por eliminación de piruvato. Los genes asociados con la conversión de CA a PABA (*pabA*, *pabB* y *pabC*) han sido secuenciados y clonados en *E. coli* (Goncharoff and Nichols, 1984) (Green *et al.*, 1992), (Kaplan and Nichols, 1983). El PABA es un intermediario en la biosíntesis de ácido fólico. Además, se utiliza en la industria química como un ingrediente en lociones bronceadoras y puede ser esterificado para generar un anestésico local conocido como benzocaina. El PABA se sintetiza químicamente a partir del tolueno.

El CA también puede ser convertido directamente a ácido para-hidroxibenzoico (PHB) en una reacción catalizada por CA-piruvato liasa (UbiC). Ésteres de PHB son usados como preservadores de alimentos. PHB es también un componente de polímeros líquidos cristalinos termotrópicos, tales como el Xidar. Esta clase de polímeros ha atraído considerablemente la atención debido a su uso como termoplásticos de gran versatilidad.

El ácido deshidroshiquímico (DHS) es otro sustrato de la vía común de aminoácidos aromáticos que posee una potente actividad antioxidante y puede ser convertido a productos químicos de gran utilidad industrial. La oxidación de DHS produce ácido gálico (GA) que es usado en aplicaciones que van desde el curtido de pieles, hasta elaboración de tintas y colorantes. Derivados de GA incluyen el propil galato un importante antioxidante para alimentos y el pirogalol, un producto de descarboxilación química enzimática de GA. Pirogalol es uno de los agentes reductores aromáticos más fuertes y es empleado en el desarrollo de soluciones fotográficas. Además, es un bloque de

construcción en la manufactura de bendiocarb, un insecticida ampliamente usado.

El empleo de catalizadores heterólogos expande más allá el número de moléculas que pueden ser sintetizadas a partir de glucosa. La producción de hidroquinona y benzoquinona sirve como un ejemplo (Shearon et al, 1952). La reducción selectiva de la hidroquinona de los iones de plata fotoactivados es la base de este uso ampliamente conocido en la fotografía. Benzoquinona es un importante precursor químico en la fabricación de varios compuestos.

El catecol comúnmente es sintetizado químicamente a partir de fenol. Sin embargo, también puede ser biosintetizado a partir de glucosa a través de la vía común de aminoácidos aromáticos, a partir de DHS (Draths and Frost, 1995). El catecol es usado para hacer vanillina. Este es el compuesto responsable del sabor asociado a los extractos de vainilla y es el segundo en términos de ventas volumétricas como aditivo de alimentos, después del aspartame (Thayer, 1991).

Un producto que tiene una alta demanda es el ácido adípico, se producen 1.9×10^9 kg cada año para producir nylon 6-6, un polímero producido por la condensación del ácido adípico. Casi todo el ácido adípico es producido por síntesis química a partir del benceno. Bioquímicamente, el ácido adípico también puede ser sintetizado a partir de glucosa a través de la vía común de aminoácidos aromáticos, a partir de DHS (Draths and Frost, 1994).

2.5. Análisis de vías metabólicas

Para la producción de metabolitos, las vías terminales son frecuentemente los primeros blancos de la ingeniería metabólica. Sin embargo, después de que todos los cuellos de botella en las vías terminales han sido removidos, el metabolismo central comienza a ser la vía limitante que controla el flujo de carbono que va hacia las vías terminales. El metabolismo central suministra monómeros, energía y poder reductor para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares. Las velocidades metabólicas y la distribución del flujo en esas vías están bien controladas, y los intentos para alterar estas vías probablemente encuentren resistencia debido a la existencia de muchos mecanismos regulatorios en la célula. Stephanopoulos y Sinskey (1993) remarcaron la importancia de manipular tanto la vía formadora de producto como las vías metabólicas centrales para generar los precursores, cofactores y energía. Con este enfoque, la ingeniería metabólica se ha empleado para mejorar el rendimiento y la productividad de cepas sobreproductoras de diversos metabolitos.

El análisis teórico de las vías centrales involucradas en la producción de algunos metabolitos de interés es trascendental para la planeación de estrategias que incrementen el rendimiento. Es necesario identificar los puntos o nodos clave en una red metabólica que tengan impacto directo sobre el rendimiento. El análisis teórico de las vías centrales relacionadas a la producción de aromáticos en *E. coli* sugiere que el rendimiento de aromáticos podría estar limitado por el PEP y/o la E4P (precursores directos), ya que existen varias reacciones que consumen el PEP y que podrían afectar considerablemente el rendimiento de aromáticos, como se discutirá en las siguientes secciones. Por otro lado, la E4P puede llegar a ser limitante al

incrementarse la actividad de DAHP sintasa por sobreexpresión de los genes *aroF*, *aroG* ó *aroH*.

2.5.1. El nodo fosfoenolpiruvato (PEP)

La glucosa puede proveer todos los esqueletos de carbono que necesita la célula para sintetizar los precursores metabólicos, los cuales son formados a través diferentes vías metabólicas tales como: glicólisis, pentosas y el ciclo del ácido tricarboxílico. El nodo del fosfoenolpiruvato (PEP) representa un cruce estratégico en donde el carbono es distribuido hacia varias vías metabólicas para la biosíntesis de muchos compuestos importantes en todas las células vivas. Este nodo de distribución es especialmente importante para la producción industrial de varios metabolitos, ya que el PEP es un intermediario clave para la biosíntesis de varias biomoléculas relevantes como puede observarse en la **figura 1**.

En la **figura 2** se muestran las reacciones relevantes que compiten por el PEP intracelular en *E. coli*. El principal consumidor de PEP es el Sistema de Transporte Fosfotransferasa (PTS) y asimismo es el mayor productor de piruvato (PIR). Holms (1986) calculó los flujos de carbono de las vías centrales que se dirigen a biosíntesis en *E. coli* ML308, en cultivos continuamente alimentados creciendo aeróbicamente en glucosa. Al inicio de los cultivos (modo lote) la máxima velocidad de crecimiento fue de $\mu=0.94 \text{ h}^{-1}$. Asimismo, en este trabajo se calculan los flujos de carbono que son dirigidos hacia la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. De los resultados de este trabajo, se observa que el flujo de carbono metabolizado a PEP, a través de la enolasa, es un 76% del flujo de entrada. De todo el PEP producido (100%) el 66% es consumido por el PTS para el transporte y fosforilación de la glucosa. Las

isozimas piruvato cinasas (Pyk) y la PEP carboxilasa (Ppc) consumen el 14.5% y el 16.2% del PEP, respectivamente. Solamente el 3.3% de PEP es dirigido hacia biosíntesis de compuestos aromáticos.

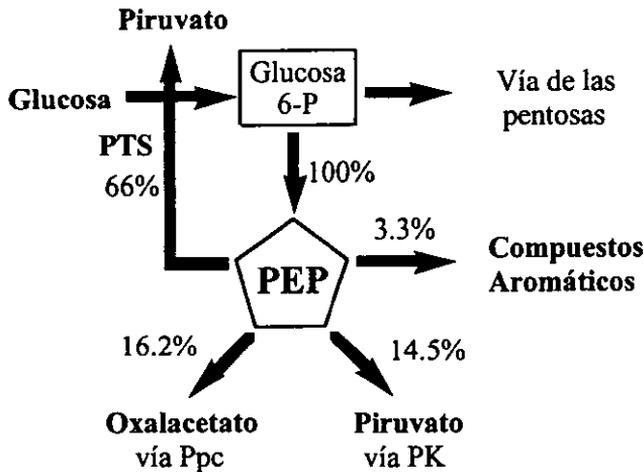


Figura 2. Nodo de distribución del fosfoenolpiruvato (PEP) en *Escherichia coli*, mostrando los porcentajes de los flujos en las reacciones que compiten por el PEP.

La distribución de los flujos depende principalmente de la fuente de carbono empleada y de la velocidad de crecimiento. Existen enzimas que funcionan solo cuando se emplean sustratos particulares o bajo ciertas condiciones (PEP sintasa). Las variaciones del flujo través de algunas enzimas como las piruvato cinasas y PEP carboxilasa presumiblemente dependen de mecanismos de control.

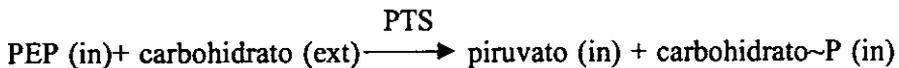
Como puede observarse en la **figura 2** existe una gran competencia por el PEP intracelular entre las diversas reacciones que lo consumen. Bajo estas condiciones, al intentar forzar el flujo de PEP hacia la vía común de aminoácidos aromáticos, la disponibilidad del PEP podría llegar a ser limitante. Por esta razón, en numerosos estudios se ha puesto gran énfasis para

incrementar la disponibilidad de PEP aplicando diversos enfoques que se discutirán en la sección 2.6.

2.5.2. El Sistema de Transporte Fosfotransferasa (PTS)

Las bacterias pueden utilizar una amplia variedad de fuentes de carbono y su transporte a través de la membrana citoplasmática es catalizada por una variedad de sistemas de transporte específicos. El sistema de transporte fosfotransferasa (PTS) está involucrado en el transporte y fosforilación de un gran número de carbohidratos (carbohidratos PTS), en transducción de señales durante la quimotaxis y en la regulación de un número de vías metabólicas relacionadas a la asimilación de azúcares.

El PTS cataliza el siguiente proceso global:



La fosforilación del carbohidrato está acoplada a la translocación del carbohidrato a través de la membrana citoplasmática, la energía para este proceso es suministrada por el intermediario glicolítico PEP. Estequiométricamente se necesita una molécula de PEP por cada molécula de carbohidrato internalizada y fosforilada.

En la **figura 3** se muestra la organización del PTS (Postma *et al.* 1987). EI y HPr son las proteínas generales para todas los PTSs. Las EIIs son proteínas de unión a membrana y son específicas para carbohidratos. De todas las EIIs sólo tres son mostradas en la **figura 3**, las específicas para manitol (Mtl), Glucosa (Glc) y manosa (Man). Cada una contiene dos dominios hidrofílicos IIA (EIII o III, en la nomenclatura antigua) conteniendo el primer sitio de fosforilación (P-His) y IIB el segundo sitio de fosforilación (ya sea un

residuo P-Cys o P-His). El dominio hidrofóbico de unión a membrana IIC puede estar dividido en dos dominios (IIC y IID). II^{Mn} , II^{Glc} y II^{Man} son específicas para manitol, glucosa y manosa, respectivamente. P~ indica las formas fosforiladas de varias proteínas. El grupo fosfato es transferido del PEP al carbohidrato que es internalizado a través de las proteínas intermediarias EI, HPr, EIIA y EIIB. La **figura 3** ilustra esquemáticamente las reacciones de fosfotransferencia del PTS, así como su naturaleza con respecto al transporte y fosforilación.

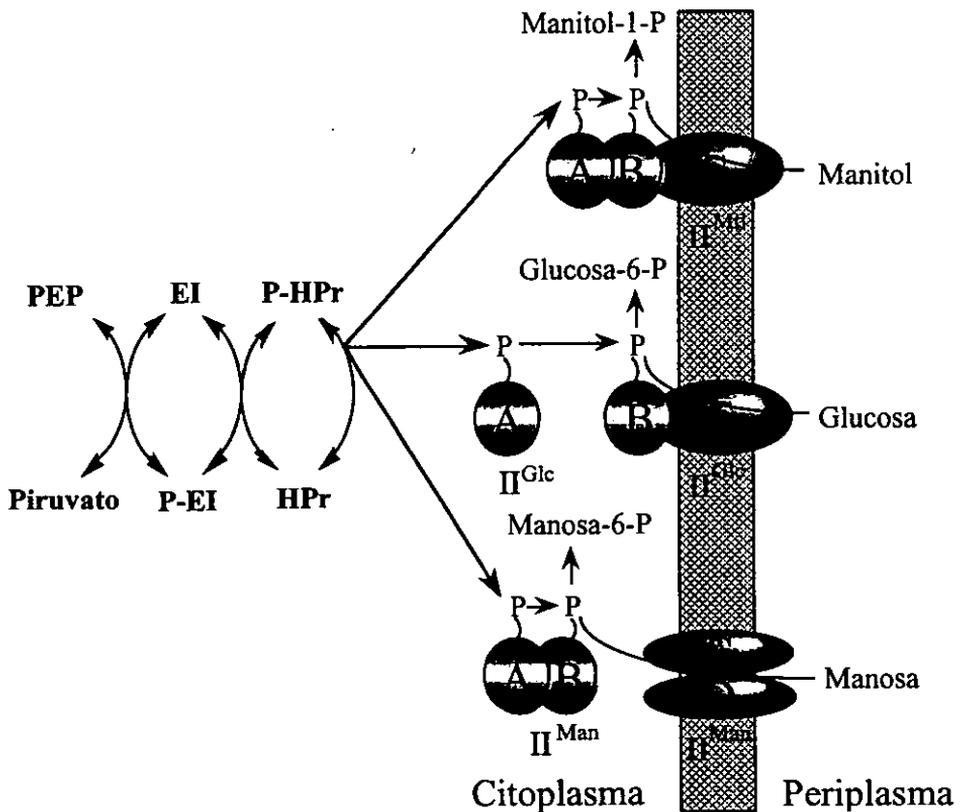


Figura 3. Organización y reacciones de fosfotransferencia del PTS en *Escherichia coli* para los carbohidratos: manitol, glucosa y manosa.

Por otro lado, los genes que codifican para las proteínas del PTS se encuentran agrupados en diferentes operones o regulones. Los genes estructurales *ptsH* y *ptsI* codifican para las proteínas generales del PTS, HPr y EI, respectivamente, y están agrupados en un operón *pts* junto con el gene *crr*. El operón *pts* es expresado en forma constitutiva. Mutantes deficientes en EI y/o HPr son incapaces de utilizar carbohidratos PTS como única fuente de carbono para crecer. Además, tales mutantes *ptsHI* son incapaces de crecer en un número de fuentes de carbohidratos no PTS (Postma *et al.* 1987).

En nuestro laboratorio se han construido cepas mutantes de *E. coli* que tienen inactivado el PTS, mediante la delección de los genes *ptsH*, *ptsI* y *crr*. A través un sistema de selección en quimiostato, se lograron seleccionar cepas derivadas de estas mutantes que ahora poseen la capacidad de asimilar glucosa y de crecer tan rápidamente como una cepa silvestre. En la **figura 4** se ilustran y comparan los mecanismos de transporte de glucosa entre una cepa silvestre de *E. coli* (**figura 4A**) y una PTS⁻ Glc⁺ (**figura 4B**). Estas mutantes llamadas PTS⁻ Glc⁺ emplean la permeasa de galactosa (GalP) para internalizar la glucosa y glucocinasa y ATP para fosforilarla (Flores *et al.* 1996).

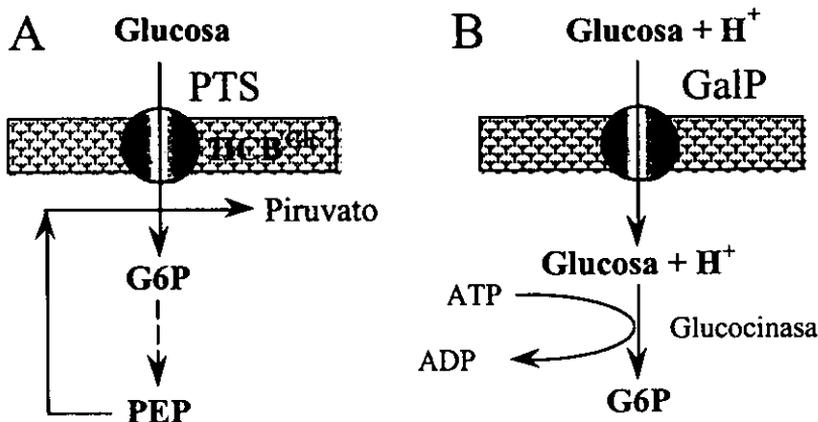


Figura 4. Comparación entre los sistemas de transporte de glucosa en cepas PTS⁺ (panel A) y PTS⁻ Glc⁺ (panel B).

2.6. Enfoques tradicionales para incrementar la biosíntesis de aromáticos :

2.6.1. Regulación alterada de enzimas clave

Poco se conoce sobre lo que controla la velocidad global del catabolismo de sustratos de carbono y la distribución del flujo metabólico debido a la compleja naturaleza de las redes metabólicas, la cual consiste de una multitud de vías interconectadas a través de metabolitos comunes y cofactores que interactúan a nivel de regulación genética y enzimática. En numerosos estudios experimentales se ha intentado incrementar los flujos en ciertas vías metabólicas basándose en la sobreexpresión de enzimas claves del microorganismo que pueden influenciar fuertemente el flujo de carbono a través de una vía particular (Emmerling *et al.*, 1999). Sin embargo, muchos circuitos regulatorios en la célula pueden resistir alteraciones en vías críticas (Stephanopoulos and Vallino, 1991). Esta resistencia a manipulaciones moleculares es explicada por la distribución del control del flujo a través del sistema. En muchas vías, pasos clave están fuertemente regulados por interconexiones alostéricas, tales como, cambios en niveles de enzima acompañados por cambios compensatorios en actividad enzimática. Así, un enfoque obvio para incrementar los flujos a través de una vía es alterar las propiedades alostéricas de enzimas críticas o sobreexpresar enzimas alternativas que no estén sujetas a control. Estas enzimas desreguladas pueden ser generadas por mutación y selección para remover las características de control y mantener las actividades catalíticas.

Todo el flujo de carbono dirigido hacia la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y metabolitos secundarios relacionados debe pasar inicialmente a través de siete enzimas de la vía común de aminoácidos aromáticos (**figura 5**).

La velocidad de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos es controlada por modulación de la actividad catalítica de la primera enzima de la vía común y la primera enzima en cada ramificación de las vías terminales. El control de las actividades catalíticas de las tres isozimas diferentes de DAHP está dictado por regulación transcripcional y retroinhibición.

2.6.2. DAHP sintasa

Diferentes estrategias, individuales o en combinación, nos permiten incrementar el porcentaje de glucosa que es comprometida hacia la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. La manipulación de la actividad catalítica *in vivo* de la isozima sensible a tirosina (*aroF*) de la DAHP sintasa sirve como un ejemplo. Una opción es introducir una mutación en el locus que codifica el aporrepresor (TyrR) para la transcripción de *aroF*. De esta forma, la transcripción de *aroF* es desreprimida y el número de moléculas de AroF se incrementa (Pittard, 1987). La amplificación de la expresión de una sintasa de DAHP sensible a tirosina puede ser incrementada aumentando el número de copias de *aroF*, usualmente de forma extracromosomal, clonando *aroF* en un plásmido de alto número de copias. Incrementando el número de genes *aroF* más allá del número de moléculas de represor activado por tirosina TyrR se supera la regulación transcripcional de *aroF*. Este enfoque puede expandir el número de moléculas de AroF más allá del logrado por la mutación en el locus del *tyrR*.

La expresión amplificada de DAHP sintasa no necesariamente significa que esta actividad *in vivo* también haya sido incrementada, debido al prominente papel regulatorio que juega la retroinhibición (Takashi *et al.*,

1982). Varios alelos que codifican para DAHP sintasas resistentes a retroinhibición han sido obtenidos por mutación de los loci de *aroF* (Weaver, 1990), *aroG* (Draths *et al.*, 1992) y *aroH* (Ray *et al.*, 1988). No se requieren mutaciones extensivas para hacer que la DAHP sintasa sea resistente a retroinhibición. Por ejemplo, un simple cambio de un aminoácido puede cambiar la actividad catalítica de AroF volviéndola insensible a la concentración de tirosina (Weaver, 1990). DAHP sintasas resistentes a retroinhibición incrementan la actividad catalítica *in vivo* de cada molécula de DAHP sintasa.

En el presente estudio se empleó una DAHP sintasa insensible a retroinhibición por fenilalanina (efector alostérico normal) codificada por el gene *aroG^{fbr}* (Mascarenhas *et al.*, 1991), el cual se encuentra bajo el promotor *lac* para regular su expresión (P_{lacUV5} -*aroG^{fbr}*). Este cassette fue clonado en el vehículo pRW300 (construido con el vector pBR322 y pACYC184) que contiene el gene *lacI* para regular la expresión de *aroG^{fbr}*.

2.6.3. Biosíntesis de aromáticos limitada por sustrato

La actividad catalítica de DAHP sintasa se incrementa hasta un punto donde una mayor amplificación, aún de DAHP sintasa resistente a retroinhibición, no incrementa la biosíntesis de aromáticos debido a que la disponibilidad de PEP podría estar limitando la actividad catalítica *in vivo* de la DAHP sintasa amplificada, dado que, existen varias enzimas dependientes de PEP mediando diferentes procesos celulares. Por ejemplo, el consumo de cada molécula de glucosa por *E. coli* está mediado por el PTS y requiere del gasto de una molécula de PEP. La reacción de PEP y ADP catalizada por las isozimas

piruvato cinasas es esencial para la regeneración de ATP. La reacción de PEP con bióxido de carbono catalizada por PEP carboxilasa determina los niveles de oxalacetato en procariontes tales como *E. coli*. A su vez, la concentración de oxalacetato determina la velocidad global de reacción del ciclo del ácido cítrico

Intentos para incrementar *in vivo* el suministro de PEP incluyen la inactivación de PEP carboxilasa para evitar la pérdida de PEP como un resultado de la formación de oxalacetato (Miller *et al.*, 1987). Algunos investigadores han examinado el reciclamiento de piruvato a PEP (Chao *et al.*, 1993) por la amplificación de la expresión de PEP sintasa. Esta enzima gluconeogénica cataliza la conversión de piruvato a PEP a expensas de dos de los enlaces fosfodiéster de ATP.

Otra estrategia para incrementar la disponibilidad del PEP intracelular es el empleo de microorganismos que no requieran del gasto de PEP durante el consumo de glucosa. Desafortunadamente, pocos microorganismos han sido estudiados tan extensamente como *E. coli* del cual se cuenta con el conocimiento en bioquímica, biología molecular y con un extenso banco de datos de secuencias. Otra alternativa consiste en cambiar las fuentes de carbono de *E. coli*. Por ejemplo, empleando fuentes de carbono que no requieren sistemas de transporte dependientes de PEP, tales como carbohidratos de cinco átomos de carbono como la xilosa o dicarboxilatos de cuatro átomos de carbono como el ácido succínico. Sin embargo, ninguna de las fuentes de carbono empleadas por *E. coli* que eviten el consumo PEP durante la internalización del carbohidrato son tan económicas como la glucosa. La xilosa debido a su aislamiento enzimático puede obtenerse a partir de xilanos y puede llegar a ser una alternativa viable como materia prima, aunque su costo sería mayor al de la glucosa.

Otra estrategia para evitar el consumo de PEP durante la internalización de la glucosa es inactivar el sistema de transporte fosfotransferasa (PTS) en *E. coli* e introducir diferentes sistemas de transporte de glucosa que no dependan del consumo de PEP. Un ejemplo exitoso es la expresión de los genes *glf* y *glk* de *Zymomonas mobilis* in *E. coli* ZSC113 que carece de PTS y que es capaz de transportar glucosa. *Z. mobilis* utiliza difusión facilitada para transporte de glucosa codificada por el locus *glf*. Después del transporte, la fosforilación de la glucosa es catalizada por la glucocinasa codificada por *glk*.

El segundo sustrato requerido para la biosíntesis de DAHP es la E4P. Experimentos para investigar si la amplificación de la expresión de la transcetolasa podría incrementar la disponibilidad de E4P comenzaron con los estudios de Draths y Frost (1990). Este estudio llevó al aislamiento del gene *tkt* que codifica la transcetolasa. La expresión del gene *tkt* portado en un plásmido resultó en la amplificación de diez veces los niveles de la transcetolasa comparados con los expresados en *E. coli* silvestre (Draths *et al.*, 1992). Asimismo, en este estudio se comparó la expresión amplificada de la DAHP sintasa resistente a retroinhibición en ausencia y presencia de la transcetolasa amplificada, indicando que la actividad de la transcetolasa *in vivo* puede duplicar la cantidad de flujo de carbono dirigido hacia la biosíntesis de aminoácidos aromáticos.

El descubrimiento del impacto de la catálisis de la transcetolasa en la biosíntesis de aromáticos ha dirigido la investigación hacia enzimas de la vía de las pentosas. La transcetolasa juega un papel preponderante en el metabolismo primario al incrementar el flujo de carbono comprometido hacia la síntesis de aromáticos al máximo teórico, cuando son sobreexpresadas conjuntamente la PEP sintasa, transcetolasa y DAHP sintasa insensible a retroinhibición (Patnaik

and Liao, 1994). La expresión amplificada de PEP sintasa teóricamente debe reciclar el piruvato a PEP. El hecho de que la sola amplificación de PEP sintasa no incremente el flujo de carbono hacia la vía común de los aminoácidos aromáticos sugiere que la concentración de E4P inicialmente limita la actividad de DAHP sintasa en *E. coli* (Patnaik and Liao, 1994). La sola sobreexpresión de transcetolasa incrementa el nivel de E4P. Sin embargo, el PEP puede llegar a ser el sustrato limitante en la reacción de biosíntesis de DAHP catalizada por la DAHP sintasa. Una alternativa para elevar la disponibilidad del PEP, superando esta limitación, consiste en sobreexpresar la PEP sintasa (Patnaik and Liao, 1994).

2.6.4 Impedimentos del flujo de carbono a través de la vía común de Aminoácidos Aromáticos.

El flujo de carbono dirigido hacia la vía común de aminoácidos aromáticos en *E. coli* con expresión amplificada de DAHP sintasa resistente a retroinhibición y transcetolasa, substancialmente excede el flujo de carbono dirigido hacia esta vía en cepas silvestres. En esta situación metabólica, una enzima individual de la vía común puede llegar a ser limitante, es decir, la enzima que controla el paso limitante comenzará a acumular sustrato al ser incapaz de catalizar la conversión de sustrato a producto a una velocidad adecuada. Sin embargo, la exportación de este sustrato del citoplasma al medio extracelular es usualmente rápido para prevenir la acumulación intracelular de concentraciones sustanciales. Una vez depositado el sustrato en el sobrenadante del cultivo, este es generalmente excluido del metabolismo de la célula.

La exportación de sustratos provee un mecanismo para la detección de enzimas limitantes y para poder inferir el flujo de carbono que puede ser

canalizado hacia ciertas vías metabólicas. El uso de mutantes auxótrofas apropiadas y el análisis de sobrenadantes de cultivos es una herramienta poderosa para detección e identificación de enzimas limitantes de velocidad. Por ejemplo, *E. coli* AB2834 es una mutante auxótrofa deficiente de actividad catalítica en shikimato deshidrogenasa (*aroE*) (ver figura 5) que acumula ácido 3-deshidroshiquímico (DHS) en el sobrenadante del cultivo. Cuando esta cepa es transformada con el plásmido multicopia pKD130 que porta los genes *aroF* y *tktA* resulta en la acumulación de DAHP y DHS. Una transformación subsecuente de esta cepa con el plásmido multicopia pKD130 que porta el locus *aroB* que codifica la DHQ sintasa, y además, porta los genes *aroF* y *tktA* resulta en la acumulación de una mayor concentración de DHS y la ausencia de DAHP en el sobrenadante del cultivo (Draths and Frost, 1990).

Varios esfuerzos se han realizado para analizar las enzimas limitantes de velocidad de la vía común de aminoácidos aromáticos (Dell and Frost, 1993) (Takashi *et al.*, 1982). Dell y Frost (1993) identificaron algunas enzimas limitantes de la vía común de aminoácidos aromáticos en *E. coli* D2704 transformada con plásmidos que incrementan la actividad catalítica *in vivo* de DAHP sintasa y transcetolasa. Sin embargo, la limitación catalítica de las enzimas de la vía común de aromáticos depende de la magnitud del flujo de carbono que es canalizado hacia la misma vía. Por consiguiente, para superar los problemas por limitación enzimática es necesario conocer el flujo de carbono que es dirigido hacia la ruta metabólica, las actividades enzimáticas involucradas y las enzimas limitantes (en ciertas condiciones de flujo). Sin lugar a dudas, en futuras investigaciones este conocimiento será relevante para poder incrementar el flujo de carbono hacia el producto final deseado.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General :

Determinar el efecto de la inactivación del Sistema de Transporte Fosfotransferasa (PTS) en el rendimiento y productividad del primer intermediario en la vía de los compuestos aromáticos (DAHP) a partir de glucosa en *Escherichia coli*.

3.2. Objetivos específicos :

1. Inactivar en cromosoma el gene *aroB* en las cepas PB103 (PTS⁺) y NF9 (PTS⁻ Glc⁺).
2. Calcular rendimientos y productividades de DAHP en las cepas PB103, NF9, PB103B (PTS⁺*aroB*⁻), y NF9B (PTS⁻ Glc⁺*aroB*⁻).
3. Calcular los flujos internos en las cepas PB103B y NF9B a partir de la velocidad de consumo de glucosa y la velocidad de producción de DAHP.
4. Cuantificar del flujo de carbono que pasa a través de *aroB* en las cepas PB103 y NF9.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Cepas y plásmidos

Se empleó la cepa *Escherichia coli* PB103 cuyo genotipo relevante es W3110 F⁻ $\Delta(\text{argF-lac})$ U169 *trpR tnaA2*. La cepa NF9 fue derivada originalmente de la PB103 y posee mutaciones que inactivan el sistema PTS (Flores *et al.*, 1996). Las cepas PB103 y NF9 fueron usadas como cepas hospederas para la producción de 3-desoxi-D-arabino-heptulose-7-fosfato (DAHP). A estas cepas se les transdujo la mutación del gene *aroB::cat*. Para esto, previamente se construyó el plásmido pBSL46*aroB::cat* (ver construcción en la sección de Resultados y Discusión) que porta el gene *aroB* inactivado con un cassette de resistencia a cloramfenicol (gene *cat*). La cepa *E. coli* ATCC47002 fue transformada con el plásmido pBSL46*aroB::cat*. Las transformantes fueron seleccionadas en medio Luria adicionado con cloramfenicol (10 $\mu\text{g/ml}$), subsecuentemente se les verificó sensibilidad a ampicilina (20 $\mu\text{g/ml}$). Las colonias que presentaron este fenotipo (Cm^R, Ap^S) presumiblemente contenían la integración en cromosoma del gene *aroB* inactivado con el gene *cat*. Esta inactivación fue verificada mediante la técnica de PCR, empleando oligonucleótidos adecuados (ver sección 4.5). La mutación *aroB::cat* fue transducida (método Miller, 1992) a las cepas PB103, NF9 para obtener las mutantes PB103B y NF9B, respectivamente. Las mutantes PB103B y NF9B fueron transformadas con los plásmidos pCL*tkt* y pRW300. El pCL*tkt* contiene el gene *tktA* clonado (Draths *et al.*, 1992) en el vector pCL1920 (Lerner *et al.*, 1990). El pRW300 fue construido a partir del plásmido pBR322 (Bolivar *et al.*, 1977) y porta el cassette P_{lacUV5}-*aroG*^{fbr}. El gene *aroG*^{fbr} codifica para la enzima DAHP sintasa (primera enzima en la vía de los compuestos aromáticos) y está bajo el promotor *lacUV5* (Beckwith, 1987) que controla su

expresión. Asimismo, contiene clonado el gene *lacI* para regular la expresión de *aroG^{fbr}*. Las cepas y plásmidos relevantes están resumidos en la **tabla I**.

Tabla I. Cepas y plásmidos empleados en este estudio.

Cepa o plásmido	genotipo relevante	fuelle o referencia
ATCC47002	F ⁻ <i>lacZ⁺ leu-6 his-4 ara-14 recB21 recC22 sbc15λ⁻</i>	-
PB103	W3110 F ⁻ $\Delta(\textit{argF-lac})\textit{U169 trpR maA2}$	Wyman et al., 1985
PB103B	igual a la PB103, pero <i>aroB::cat</i>	Este estudio
NF9	igual a la PB103, pero PTS ⁻ glucosa ⁺	Flores et al., 1996
NF9B	igual a la NF9, pero <i>aroB::cat</i>	Este estudio
Plásmidos		
pBSL46 <i>aroB::cat</i>	<i>aroB::cat</i> (proveniente del replicón pBSL46, resistente a carbecilina y cloramfenicol)	Este estudio
pCLtk	<i>tktA</i> (proveniente del replicón pCL1920, resistente a estreptomina o espectinomina).	Draths et al., 1992
pRW300	P _{lacUV5} - <i>aroG^{fbr}</i> (proveniente del replicón pBR322, resistente a tetraciclina).	Beckwith, 1987

4.2. Medio y condiciones de cultivo.

Los procedimientos de clonado fueron llevados a cabo en medio Luria-Bertani y el medio empleado para la recuperación de células en los procedimientos de electroporación fue YT2X, que contiene (por litro) bactotripton (16 g), extracto de levadura (10 g) y NaCl (5 g). El medio utilizado para la preparación de los preinóculos fue Luria-Bertani. La formulación (por litro) del medio rico para la obtención de altas densidades celulares de los inóculos fue extracto de levadura (15 g), K_2HPO_4 (14 g), KH_2PO_4 (16 g), $(NH_4)_2SO_4$ (5 g), $MgSO_4$ (1 g) glucosa (18 g) y tiamina (1 mg). La composición (por litro) del medio mínimo M9 utilizado para la resuspensión de los cultivos experimentales de alta densidad celular fue K_2HPO_4 (14 g), KH_2PO_4 (16 g), $(NH_4)_2SO_4$ (5 g), $MgSO_4$ (1 g), glucosa (18 g), tiamina (1 mg) y elementos traza (1 ml) (Gosset *et al.*, 1993). Este medio fue suplementado con aminoácidos aromáticos y vitaminas aromáticas: L-tirosina (8 mg), L-fenilalanina (8 mg), L-triptofano (4 mg), ácido 2-3 dihidroxibenzoico (35 mg), ácido para-hidroxibenzoico (48 mg) y ácido para-aminobenzoico. Para la selección y el mantenimiento estable de los plásmidos se adicionó tetraciclina (50 μ g/ml) y estreptomycin (50 μ g/ml).

4.3. Inóculos

Todos los cultivos fueron realizados en matraces bafleados de 250 ml y crecidos a 250 rpm e incubados a 37°C. El protocolo para la preparación del inóculo y de los cultivos experimentales está esquematizado en la **figura 6**. El preinóculo fue crecido en 20 ml de medio Luria-Bertani durante la noche y subcultivado en 50 ml a una densidad óptica de 0.2 (660 nm), para más tarde

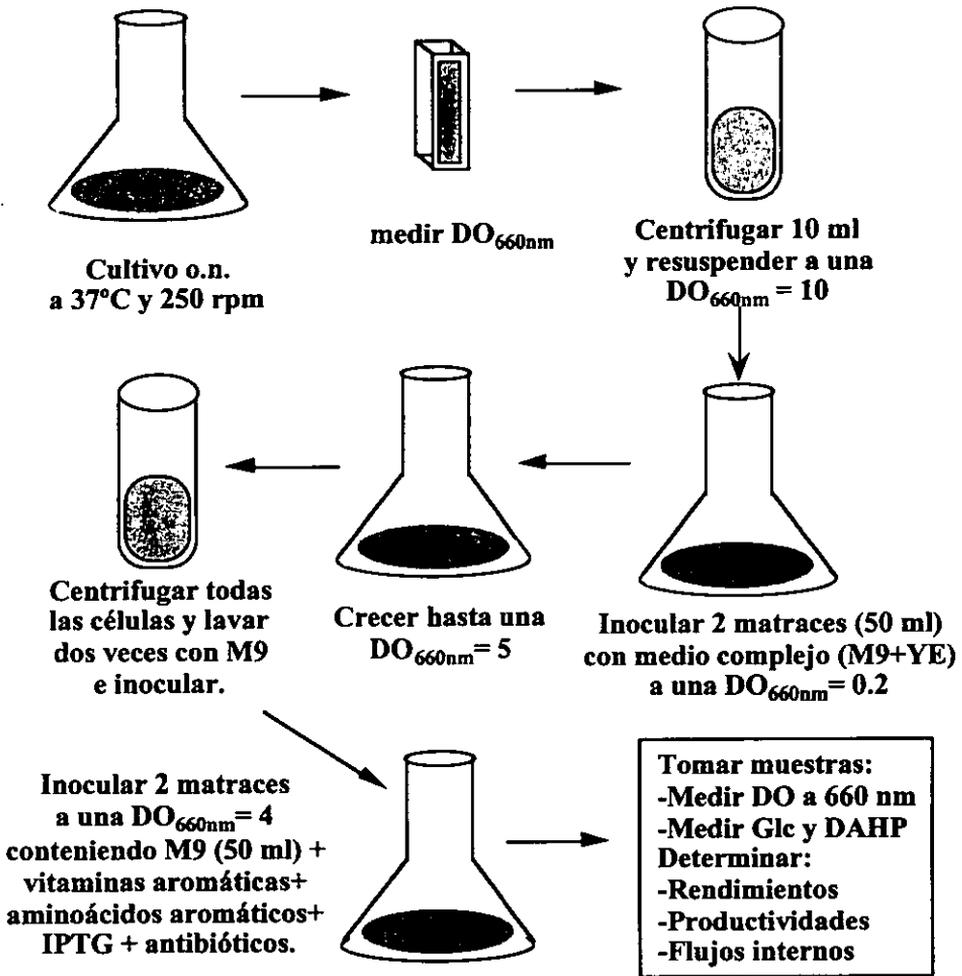


Figura 6. Protocolo para preparación de inóculos y cultivos de alta densidad celular.

ser cosechado al alcanzar una densidad óptica de 5, que corresponde a la fase exponencial del cultivo. Estas células fueron lavadas dos veces con medio mínimo M9 antes de ser empleadas como inóculos de los cultivos experimentales, los cuales fueron realizados en matraces conteniendo 50 ml de medio mínimo M9 suplementado con aminoácidos aromáticos, vitaminas

aromáticas e isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración de 1 mM para inducir la expresión del gene *aroG*^{fbr}. El pH inicial de los cultivos fue ajustado a 7.4 y no estuvo sujeto a control durante el tiempo que duraron los cultivos. Durante el transcurso de los cultivos, se tomaron muestras para medir DO (a 660 nm) y calcular la biomasa en g de peso seco/L. Las células fueron removidas inmediatamente por centrifugación y el sobrenadante fue almacenado a 4°C hasta ser utilizado para determinar concentraciones de DAHP.

4.4. Métodos analíticos:

4.4.1. Determinación de glucosa

La concentración de glucosa residual en el sobrenadante fue determinada enzimáticamente (glucosa oxidasa) empleando el analizador Kodak Ektachem DT 60 II.

4.4.2. Determinación de DAH(P).

La concentración de DAHP fue determinada por el ensayo tiobarbitúrico (Srinivasan and Sprinson, 1958, Gollub *et al.*, 1971). Este ensayo no distingue entre DAH y DAHP. La determinación de DAHP fue realizada al sobrenadante, ya que el DAHP intracelular resultó despreciable. Primeramente, se realizaron diluciones del sobrenadante (entre 10 y 200 veces), de tal forma que al realizar el ensayo, la absorbancia incidiera dentro del intervalo 0.3-0.6, que corresponde al segmento lineal de la correlación entre absorbancia y concentración de DAHP. En seguida, se tomó una alícuota de la dilución (61 μ l)

y se trató con ácido tricloroacético al 20% (15 μ l) y m-periodato de sodio (76 μ l) por 30 min a 37°C. Posteriormente, se añadieron a la mezcla solución de arsenito de sodio (0.152 μ l) y ácido tiobarbitúrico (606 μ l) y se incubó en baño de agua hirviendo durante 10 min. La mezcla de reacción fue mantenida a 55°C hasta realizar las lecturas de absorbancia en espectrofotómetro a una $\lambda=549$ nm.

4.4.3. Determinación de biomasa.

Se tomaron muestras periódicamente durante el transcurso de los cultivos para determinar la concentración celular. Para esto, se hicieron diluciones de las muestras y se tomaron lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro (Beckman DU-70 Spectrophotometer) a una longitud de onda de 660 nm. Posteriormente, estos datos de absorbancia fueron convertidos a gramos de peso seco/L multiplicando por un factor de 0.45, el cual fue obtenido previamente a partir de una curva patrón de peso seco.

4.5. Diseño de oligonucleótidos

Para verificar la inactivación del gene *aroB* (integración del gene *aroB::cat* a cromosoma) se amplificó el gene *aroB* por PCR. Para esto, se diseñaron los oligonucleótidos *aroB* 5' GAA-GAG-ATT-GCC-GAC-GTG-ACC y *aroB* 3' ACA-CCG-CGC-TGA-TAA-CTC-GCC. La amplificación por PCR del gene *aroB* silvestre empleando estos oligos genera una banda de 511 pb, mientras que la del gene *aroB::cat* genera una banda de 1511 pb.

4.6. Herramientas de biología molecular utilizadas en este trabajo :

4.6.1. Mutagénesis por inserción sitio-dirigida.

Con el desarrollo de técnicas de DNA recombinante, ha sido posible generar mutaciones sitio dirigidas, puntuales o deleciones específicas de un gene clonado *in vitro*. En algunos trabajos se han efectuado reemplazamientos de un gene cromosomal específico por una forma mutante de ese gene. (Hamilton *et al.* 1989). En el presente estudio, se utilizó un sistema de reemplazamiento de genes que emplea la transformación de la cepa *Escherichia coli* ATCC47002, la cual posee mutaciones *recBC*, *sbcB* (Jason and Schimmel, 1984, Winans *et al.*, 1985) que favorecen la recombinación e integración de genes al cromosoma y la pérdida del plásmido. La técnica puede ser usada para generar deleciones específicas, reemplazamientos genéticos y ejecutar *in vivo* el clonado de un locus cromosomal. La integración procede por eventos de recombinación homóloga entre el gene en el cromosoma y las secuencias homólogas portadas en el plásmido. Una vez integrado y reemplazado el gene deseado en el cromosoma, este gene puede ser transferido a otras cepas receptoras por procesos de transducción.

4.6.2. Transducción

La transducción es la transferencia de material genético por infección viral. En bacteria, se reconocen dos tipos de transducción : generalizada y especializada. En este trabajo, se hizo empleo de la transducción generalizada que permite la transferencia de cualquier marcador cromosomal a través del empacamiento al azar de segmentos de DNA bacterial en las cápsides de los fagos (Margolin, 1987). En *E. coli*, el fago P1 realiza transducción

generalizada. Después de la infección el DNA del hospedero es cortado, y ocasionalmente un fragmento del DNA hospedero es empaquetado en la cabeza del fago. En el caso de P1, el 0.01% de las partículas de fago portan DNA bacterial. Durante la infección, los segmentos del DNA del hospedero original pueden ser transferidos e incorporados al cromosoma bacterial de otras cepas receptoras por procesos de recombinación homóloga. Dos entrecruzamientos son requeridos para intercambiar un segmento del fragmento bacterial por un segmento correspondiente del hospedero. En el sentido práctico, la transducción por fago P1 es muy útil para la construcción de cepas. P1 es un fago moderado y tiene la ventaja de evitar lisogenizar cepas receptoras, ya que el fago P1 residente puede restringir la entrada de DNA en subsecuentes cruas genéticas.

4.7. Cálculo de rendimientos, productividades, velocidades de consumo y de producción.

En numerosos estudios donde se ha aplicado la Ingeniería de Vías Metabólicas a microorganismos se ha puesto un gran énfasis en el potencial de producir compuestos aromáticos biológicamente a costos más bajos que los producidos químicamente. El objetivo ha sido desarrollar cepas que tengan un rendimiento suficientemente alto para competir con los métodos químicos.

El rendimiento producto/sustrato Y_{ps} es un parámetro relevante, ya que representa la eficiencia de conversión del sustrato a producto y define el producto formado por unidad de sustrato consumido. La forma de determinar el rendimiento experimentalmente es midiendo la cantidad de producto

formado y sustrato consumido en un periodo de tiempo de acuerdo con la ecuación 1:

$$Y_{p/s} = \Delta P / \Delta S \quad (1)$$

donde : ΔP y ΔS son la diferencia entre las concentraciones de producto y de sustrato tomadas en los tiempos 1 y 2, respectivamente.

Existen diferentes coeficientes de rendimiento producto/sustrato. Por ejemplo, el rendimiento global (ecuación 2) representa el producto formado comparado con el sustrato consumido desde el inicio hasta el término del cultivo, o el rendimiento instantáneo (ecuación 3) que puede ser medido en cualquier intervalo pequeño de tiempo durante el transcurso del cultivo.

$$Y_{p/s} = (P_f - P_i) / (S_i - S_f) \quad \text{Rendimiento global} \quad (2)$$

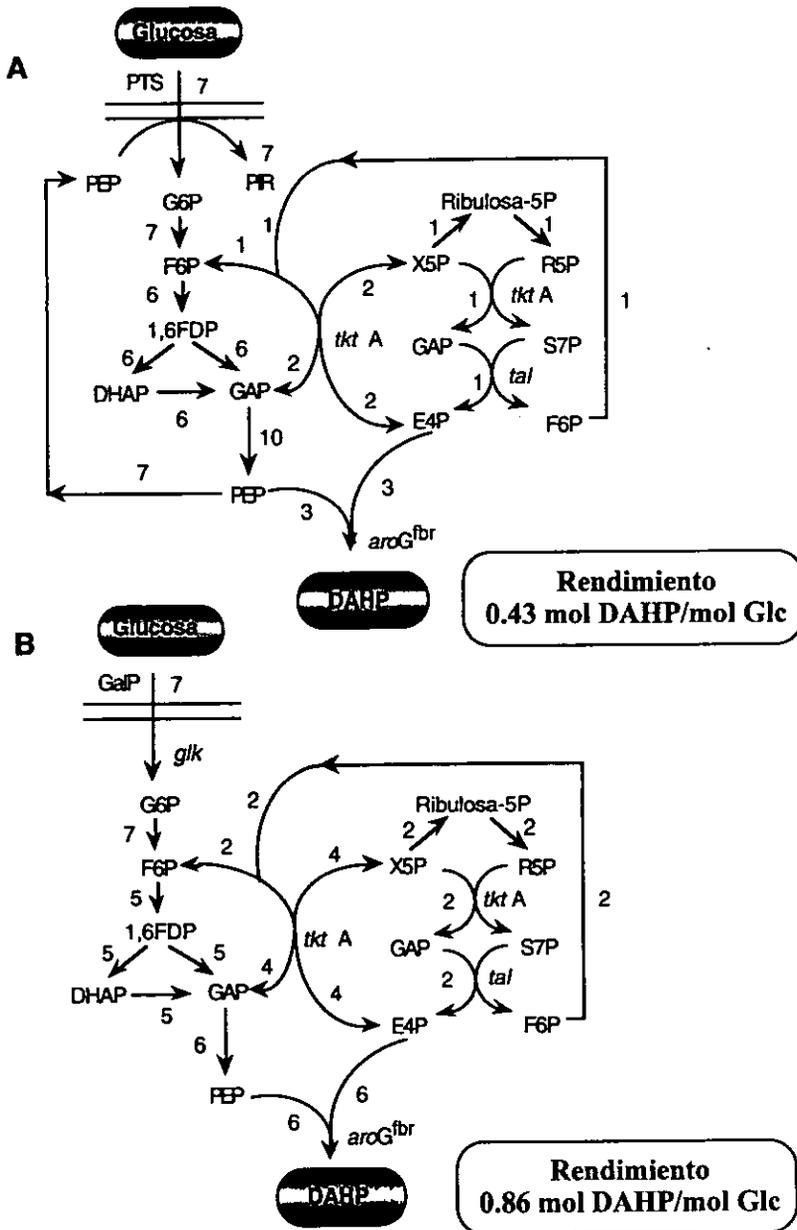
$$Y_{p/s} = (P_{n+1} - P_n) / (S_n - S_{n+1}) \quad \text{Rendimiento instantáneo} \quad (3)$$

donde : P y S son las concentraciones de los productos y sustratos, respectivamente. Los subíndices i y f representan condiciones iniciales y finales, respectivamente. El subíndice (n+1) es el tiempo inmediato seguido al tiempo n.

Los rendimientos máximos teóricos pueden ser comparados con los rendimientos obtenidos experimentalmente para determinar la eficiencia particular de un proceso de fermentación. Los rendimientos máximos teóricos producto/sustrato pueden ser calculados mediante el análisis teórico de vías metabólicas y la estequiometría de reacciones que describen la formación del producto. De acuerdo a esto, el rendimiento máximo para aminoácidos aromáticos a partir de glucosa puede ser incrementado dos veces si todo el piruvato generado es reciclado a PEP (Forberg *et al.*, 1988). El rendimiento

máximo teórico es calculado asumiendo que todas las vías que compiten por el flujo de carbono están bloqueadas y que éste es canalizado de la forma más eficiente hacia la vía formadora de producto. Bajo estas condiciones, el flujo relativo hacia cada paso en estado estacionario puede ser calculado mediante un balance de flujo de entrada y salida de cada metabolito. Como se muestra en la **figura 7 panel A**, el rendimiento máximo teórico de DAHP a partir de glucosa para una cepa PTS⁺ es de 0.43 molar, ya que se requieren 7 moles de glucosa para producir 3 moles de DAHP y 7 moles de piruvato, el cual es metabolizado. Asimismo, se muestra también el flujo relativo a través de cada paso intermediario a través de glicólisis y del brazo no oxidativo de la vía de las pentosas. La formación de piruvato es ineludible debido a la estequiometría del PTS para el consumo de glucosa. En presencia de glucosa, piruvato no es reciclado eficientemente a PEP ya que la enzima PEP sintasa (Pps) no es inducida. En la **figura 7 panel B**, se presenta el rendimiento máximo teórico que puede alcanzar una cepa asumiendo que todas las vías que compiten por PEP están bloqueadas y que todo el flujo de carbono es dirigido hacia la vía común de aminoácidos aromáticos. En estas condiciones, el rendimiento máximo teórico que puede alcanzarse es de 0.86 molar, ya que se requieren de 7 moles de glucosa para producir 6 moles de DAHP.

Los productos pueden ser formados durante la fase de crecimiento, en este caso la velocidad de síntesis de producto está directamente relacionada a la velocidad de crecimiento, o pueden ser formados independientemente de la velocidad de crecimiento. Ocasionalmente, la síntesis puede comenzar después de un periodo de crecimiento debido a la acumulación de algunos metabolitos primarios que pueden ser canalizados hacia la formación de producto.



Figuras 7. Esquematiza los flujos internos óptimos para alcanzar los rendimientos máximos teóricos en las cepas PTS⁺ (Panel A) y PTS⁻ Glc⁺ (Panel B).

La productividad o velocidad de síntesis de producto es otro de los parámetros relevantes en los bioprocesos y está dada en unidades de concentración de producto por unidad de tiempo, por ejemplo : mmol/L-h. La velocidad específica de producción q_p , relaciona la velocidad de síntesis de producto con la concentración de biomasa y está dada en mmol/g peso seco-h. La velocidad específica de consumo de sustrato q_s proporciona información valiosa para el cálculo de flujos internos de carbono y puede ser expresada en moles de sustrato /g de peso seco-h.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Construcción del plásmido pBSL46aroB::cat.

Para la construcción del pBSL46aroB::cat se partió de los plásmidos pBSL46, pACYCaroB y pBSL121 (ver figura 8). El gene *aroB* fue escindido con Eco RI del plásmido pACYCaroB y el cassette *cat* fue cortado con Sma I del plásmido pBSL121 (Alexeyev *et al.*, 1995). Del pBSL46 se escindió el cassette de resistencia a kanamicina (digiriendo con Eco RI) y se reemplazó ligando el vector resultante con el gene *aroB* para generar el plásmido pBSL46aroB, el cual posee resistencia a ampicilina (Ap). Posteriormente, el gene *aroB* portado en este plásmido fue inactivado por inserción en el sitio único Hpa I del gene *cat*, generando de esta forma el plásmido pBSL46aroB::cat. La construcción correcta del pBSL46aroB::cat fue verificada por patrones de restricción. Después se procedió a integrar este gene inactivado al cromosoma de *E. coli*.

5.2. Integración en cromosoma del gene *aroB*::cat.

La cepa ATCC47002 fue transformada con el pBSL46aroB::cat, y el resultado de esta transformación fue plateado en cajas con medio agar-Luria adicionado con cloramfenicol (10µg/ml). A las transformantes seleccionadas (50 colonias Cm^R) se les verificó sensibilidad a ampicilina (20µg/ml) y las que resultaron Cm^R, Ap^S (sólo 3 colonias) presumiblemente portaban la interrupción en cromosoma del gene *aroB*::cat. Esto fue verificado amplificando por PCR un fragmento cromosomal del gene *aroB* de estas

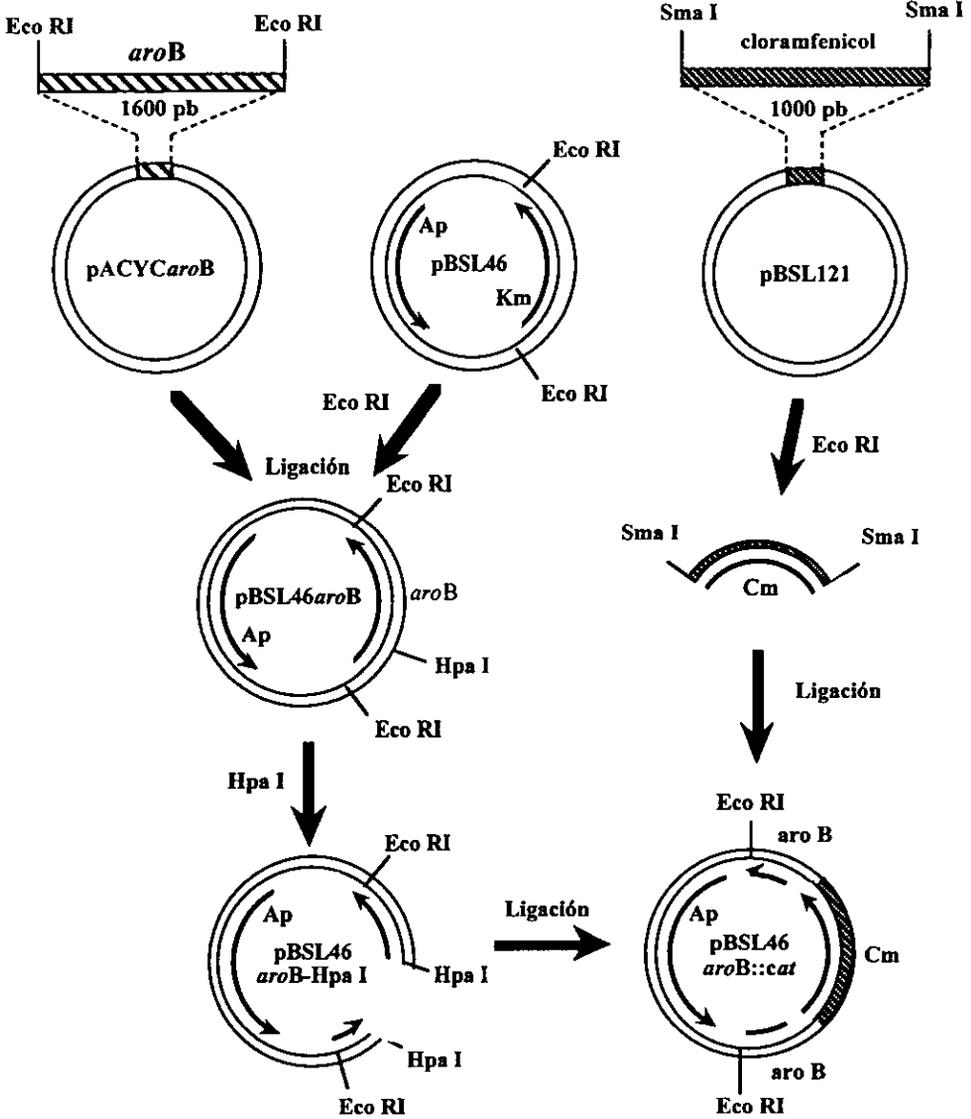


Figura 8. Construcción del plásmido pBSL46aroB::cat.

transformantes, así como del respectivo control. La **figura 9** muestra el gel del resultado de PCR, en los carriles 1, 2 y 3 se observa la banda de 1511 pb que corresponde al gene interrumpido *aroB::cat*. En el carril izquierdo el marcador λ -BstE II y el derecho la banda de 511 pb correspondiente al gene silvestre (control negativo, cepa ATCC47002). Las colonias 1 y 3 portan el gene *aroB* interrumpido y no presentan amplificación del gene silvestre. Se verificó que estas colonias mutantes ATCC47002*aroB* fueran auxótrofas de aminoácidos aromáticos, se eligió una de ellas (colonia 1), la cual se conservó en glicerol a -70°C para posteriormente ser empleada en los experimentos de transducción.

5.3. Construcción de las mutantes *aroB*⁻ por transducción con fago P1.

Se prepararon lisados con el fago P1 a partir de la cepa ATCC47002*aroB* que fueron empleados para transducir el gene *aroB::cat* a las cepas PB103 y NF9, aplicando el método Miller para realizar transducciones. El resultado de la transducción de las cepas PB103 y NF9 fue plateado en cajas con agar-Luria adicionado con cloramfenicol (10 $\mu\text{g/ml}$). En estas cajas solamente crecieron 2 colonias transductantes tanto para la PB103 como de la NF9. A estas 4 colonias transductantes se les verificó la integración a cromosoma del gene *aroB::cat* por PCR. En la **figura 10** se muestra el gel de los productos de PCR, en donde se observa que las 2 colonias transductantes PB103B (*aroB*⁻) y las 2 NF9B (*aroB*⁻) presentan amplificación de banda de 1511 pb indicando que el gene *aroB* fue correctamente reemplazado en cromosoma por el gene inactivado *aroB::cat*. En el carril izquierdo se observa el marcador λ -BstE II y el en carril derecho el control negativo. Las cepas PB103 y NF9 y las mutantes PB103B y NF9B

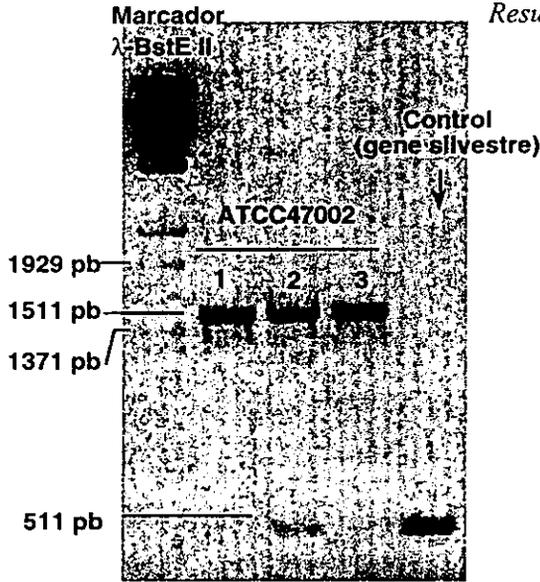


Figura 9. PCR de colonias de *E. coli* ATCC47002 transformadas con el pBSL46aroB::cat.

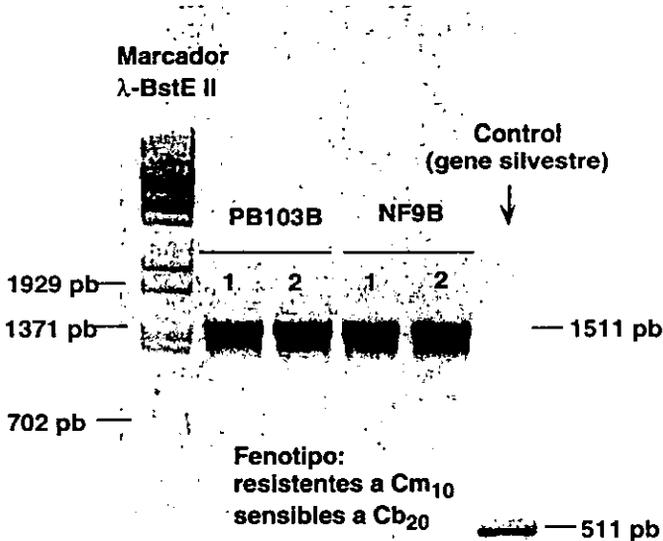


Figura 10. PCR de las colonias transductantes PB103B y NF9B.

fueron transformadas con los plásmidos pCL*tkt* y pRW300 (ver **tabla I**) que portan los genes de la transcetolasa (*tktA*) y de la DAHP sintasa (*aroG^{fbr}*), respectivamente. Después de la transformación, cada plásmido fue verificado en cada cepa por patrones de restricción, y posteriormente las cepas fueron conservadas en viales con glicerol a -70°C hasta ser utilizadas en los cultivos experimentales.

5.4. Cultivos en matraces : biomasa, concentración de glucosa y DAHP, productividades y rendimientos.

En el sistema de producción utilizado en este estudio se consideró el empleo de células en fase estacionaria para eliminar o reducir considerablemente el flujo de metabolitos hacia la generación de biomasa. Al suprimir o disminuir las vías metabólicas que compiten por los precursores directos (PEP y E4P) de los compuestos aromáticos es posible lograr una mayor conversión de glucosa a DAHP. Cuando el crecimiento es mínimo la demanda de precursores para otras funciones celulares disminuye significativamente. Esto tiene un impacto relevante en la disponibilidad de PEP y E4P, y por consiguiente, en el rendimiento producto/sustrato. Esta estrategia ha sido propuesta y demostrada experimentalmente para la producción de fenilalanina en *E. coli* (Forberg *et al.*, 1988). Con este propósito, el medio de cultivo se diseñó con concentraciones limitantes de aminoácidos aromáticos para restringir el crecimiento de las cepas auxótrofas de aminoácidos aromáticos (*aroB*⁻). La concentración de Phe, Tyr y Trp se calculó de acuerdo a los datos de composición química de *Escherichia coli* (Neidhart y HE Umbarger, 1996) para generar un incremento en crecimiento celular de 0.3 g de peso seco/L, aproximadamente. En la **Figura 11 panel A**, se muestran los datos de biomasa de los cultivos en matraces bafleados agitados de las cepas PB103, PB103B; NF9 y NF9B transformadas con los plásmidos pRW300 y pCL*tk*t. Las muestras fueron tomadas periódicamente durante el transcurso de los cultivos, cada punto representa el promedio de cuatro muestras. La desviación estándar promedio de los datos de biomasa no fue significativa (ver **tabla II**). Las concentraciones celulares iniciales empleadas para inocular estos cultivos fueron altas (entre 1.8 y 1.9 gramos de peso seco/L), previendo que el crecimiento celular de los cultivos sería relativamente pequeño debido a la

limitación por aminoácidos aromáticos. Las cepas que no tienen auxotrofia de aminoácidos aromáticos (PB103 y NF9) presentan también un bajo crecimiento en el medio de resuspensión debido al cambio nutricional de medio rico a medio mínimo. Al comienzo de estos cultivos existe un leve incremento en la concentración celular entre las primeras 2 y 3 horas. Después de este periodo, el incremento en la concentración celular es aún menor para las cepas *aroB*⁺ que entran a una fase de crecimiento quasi-estacionaria, mientras que las cepas *aroB*⁻ entran a una fase estacionaria a partir de la hora 2 del cultivo. La concentración celular alcanzada en las cepas *aroB*⁺ es ligeramente más alta que en las cepas *aroB*⁻. Estas fases de crecimiento estacionarias o quasi-estacionarias son mantenidas hasta el final de los cultivos. Con esta estrategia, restringiendo el crecimiento celular de los cultivos, se logra redirigir un gran flujo de carbono proveniente de la glucosa hacia la vía común de aromáticos.

En los cultivos experimentales se emplearon concentraciones iniciales de glucosa de 18 g/L. En la **Figura 11 panel B** y en la **tabla III** puede apreciarse que en estos cultivos existen dos velocidades de consumo de glucosa que corresponden a dos fases: 0-2 h y 2-9 h. Durante esta pequeña fase de crecimiento (0-2h) el consumo de glucosa fue 2 veces mayor que en la fase estacionaria (2-9h) para las cepas PB103B y NF9B, y 1.8 veces mayor para las cepas PB103 y NF9 (ver **tabla III**). Al final de los cultivos la concentración de glucosa fue variable dependiendo de la cepa. Sin embargo, la concentración de glucosa remanente se mantuvo por arriba de 55 mmol/L (9.9 g/L). En todos los casos, la desviación estándar promedio de los datos de glucosa no fue considerable (ver **tabla II**). Asimismo, puede observarse que en la fase de crecimiento la velocidad de consumo de glucosa es mayor en las cepas *PTS*⁺ que en las *PTS*⁻. Mientras que en la fase de crecimiento estacionaria la velocidad de consumo es muy semejante en todas las cepas.

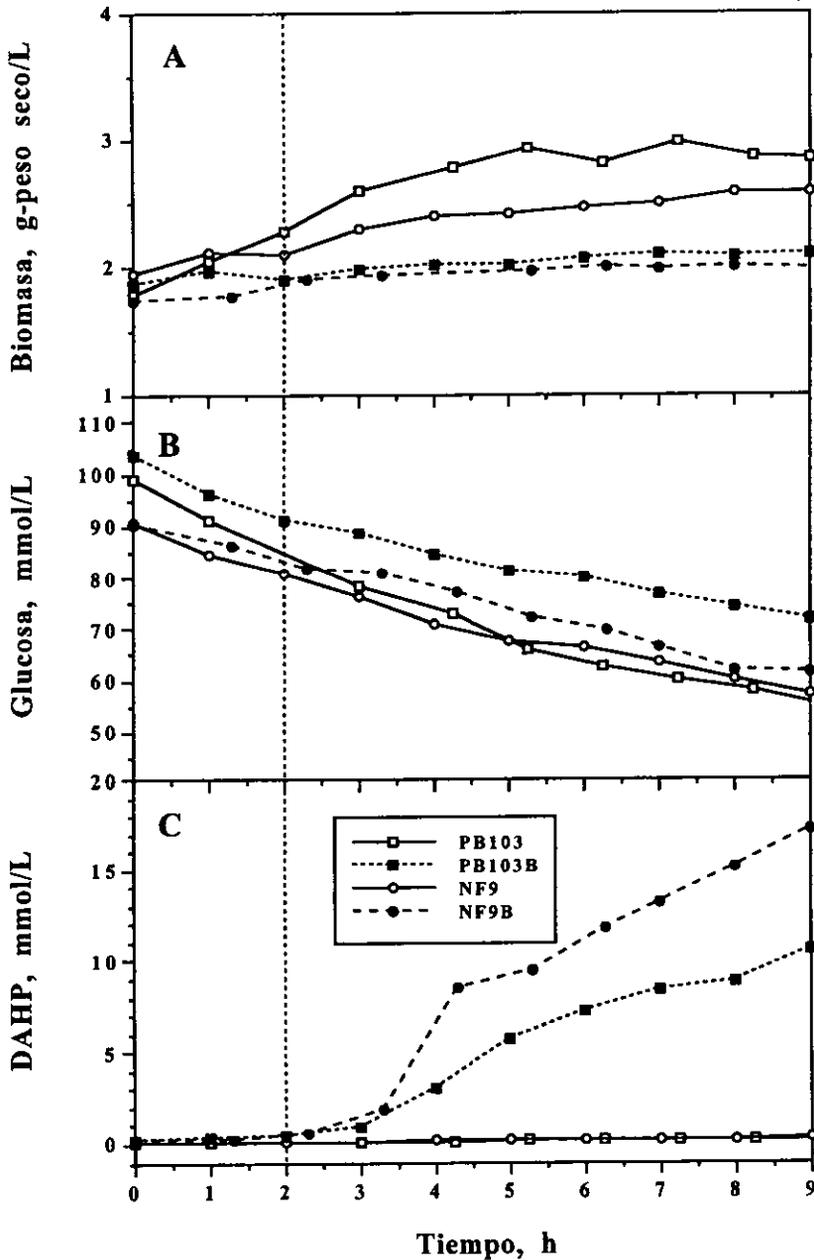


Figura 11. Cultivos en matraces agitados de las cepas PB103, PB103B, NF9 y NF9B. Cada punto representa el promedio de 4 muestras (ver desviación estándar promedio en tabla II). Panel A, biomasa (g-peso seco/L); panel B, glucosa residual (mmol/L); panel C, concentración de DAHP. La línea vertical punteada indica el inicio para el cálculo de los rendimientos DAHP/Glc.

Tabla II. Desviaciones estándar promedio de los datos experimentales de biomasa, concentración de glucosa y DAHP.

	Biomasa (g peso seco/L)	Glucosa (mmol/L)	DAHP (mmol/L)
PB103	2.615 ± 0.227	64.917 ± 2.415	0.136 ± 0.067
PB103B	2.022 ± 0.117	81.206 ± 1.998	5.237 ± 0.436
NF9	2.363 ± 0.081	62.824 ± 1.846	0.229 ± 0.193
NF9B	1.890 ± 0.023	74.492 ± 1.728	7.915 ± 0.254

Cuando se incrementa el flujo de carbono hacia la vía común de los aminoácidos aromáticos, el DAHP comienza a acumularse y a ser excretado de la célula debido a limitación de la enzima deshidroquinato sintasa. En las mutantes *aroB*⁻ esta acumulación y excreción de DAHP es considerablemente mayor que en las cepas *aroB*⁺. En la **Figura 11 panel C** se muestran las determinaciones de DAHP que fueron realizadas a partir del sobrenadante de las muestras previa eliminación de las células por centrifugación. La fracción de DAHP excretado por las cepas *aroB*⁺ fue muy baja comparada con las cepas *aroB*⁻, como se esperaba. Las cepas PB103 y NF9 acumularon al final del cultivo 0.21 y 0.34 mM de DAHP, respectivamente. Mientras que las correspondientes mutantes (*aroB*⁻) PB103B y NF9B produjeron 10.7 y 17.3 mM de DAHP, respectivamente. Estos resultados muestran claramente la importancia y el efecto del bloqueo en la acumulación de DAHP debido a la inactivación de *aroB*. Es decir, debido a la inactivación de la deshidroquinato sintasa, la concentración de DAHP se incrementa aproximadamente 51 y 64

veces entre las cepas PTS^+ y las PTS^- , respectivamente (en un periodo de 7 horas). Asimismo, puede apreciarse que la inactivación del PTS (NF9B) tiene un efecto positivo al incrementar 2 veces la concentración final de DAHP con respecto a su control (PB103B). Esto como consecuencia de existir mayor disponibilidad de PEP para ser redirigido a la vía común de aminoácidos aromáticos, al eliminar la competencia del PTS por el PEP. La desviación estándar promedio para los datos de DAHP para las cepas PB103B y NF9B no fue significativa. Sin embargo, para las cepas PB103 y NF9 si fue considerable debido a que las concentraciones de DAHP para estas cepas fueron relativamente pequeñas comparadas con las de sus contrapartes mutantes (tabla II).

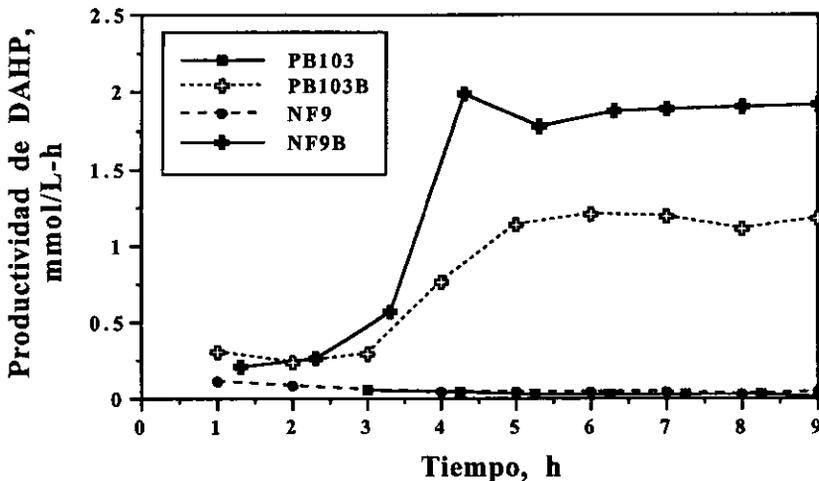


Figura 12. Productividad volumétrica de DAHP de las cepas PB103, NF9, PB103B y NF9B.

En la **Figura 12** se observa la productividad volumétrica de DAHP. Durante la fase de producción, la productividad se incrementa rápidamente hasta alcanzar un valor máximo y posteriormente un valor constante. Las

productividades volumétricas máximas para las cepas PB103 y NF9 fueron de 0.15 (hora 8) y 0.4 (hora 9) mM/h, respectivamente. Mientras que las cepas PB103B y NF9B alcanzaron productividades máximas mayores de 1.2 (hora 6) y 2.2 (hora 4) mM/h, respectivamente. Análogamente, puede observarse que la inactivación del PTS tiene un gran efecto positivo al aumentar considerablemente la productividad máxima de DAHP en un 80%.

Por otro lado, el rendimiento molar de DAHP a partir de glucosa ($Y_{\text{DAHP/Glc}}$) fue calculado a partir del cese ó disminución en el crecimiento de los cultivos (hora 2). En estas condiciones quasi-estacionarias de crecimiento, no existe demanda para síntesis de biomasa o ésta es mínima, en consecuencia, el flujo de carbono utilizado en este bioproceso puede ser canalizado hacia la vía común de aminoácidos aromáticos, y por consiguiente, el porcentaje de conversión DAHP/Glc puede ser incrementado considerablemente. El rendimiento máximo teórico es calculado asumiendo que las vías metabólicas interconectadas en los principales nodos de distribución de carbono están bloqueadas y que todo el flujo de carbono es dirigido hacia la vía formadora del producto deseado, sin la pérdida de éste como bióxido de carbono u otros metabolitos. En la **figura 13** se presentan los resultados de los rendimientos molares DAHP/Glc de las cepas PB103, PB103B, NF9 y NF9B (todas transformadas con pRW300 y pCL*tkl*) calculados durante un periodo de 7 horas (2-9h), en el cual las condiciones de los cultivos son óptimas para alcanzar altos rendimientos. La cepa PB103 alcanzó rendimientos DAHP/Glc menores al 0.01 mol/mol (0.003 mol/mol), mientras que la cepa NF9 alcanzó rendimientos de 0.01 mol/mol (**tabla III**). Los rendimientos más altos fueron alcanzados por las mutantes *aroB*⁻. La cepa PB103B alcanzó un rendimiento DAHP/Glc de 0.43 mol/mol, que es igual al rendimiento máximo teórico que puede alcanzar una cepa PTS⁺. La cepa NF9B alcanzó el rendimiento más alto

de 0.71 mol/mol (**tabla III**). Por consiguiente, puede observarse que la inactivación del PTS en la cepa NF9B tiene un impacto relevante al incrementar el rendimiento molar en un 65% con respecto al control (PB103B). La cepa NF9B alcanzó rendimientos DAHP/Glc que son un 82.5% del rendimiento máximo teórico que puede alcanzar una cepa PTS⁻ que es de 0.86 mol/mol (Patnaik and Liao, 1994). Esto es debido a que en la cepa NF9B se encuentran abiertas otras vías metabólicas que compiten por el PEP, tales como las isozimas piruvato cinasas y PEP carboxilasa.

Tabla III. Rendimientos molares DAHP/Glc, velocidades de consumo de glucosa y producción de DAHP.

CEPA	$Y_{\text{DAHP/Glc}}$ mol/mol promedio (2-9h)	$-q_s$ (0-2h) (mmol Glc/ gpeso seco-h)	$-q_s$ (2-9h) (mmol Glc/ gpeso seco-h)	q_p (2-9h) (mmol DAHP/ gpeso seco-h)
PB103	0.002	3.35	1.68	0.004
PB103B	0.43	3.28	1.29	0.55
NF9	0.008	2.49	1.42	0.012
NF9B	0.71	2.86	1.33	0.94

Resulta interesante observar que en la mutante NF9B se alcanzan rendimientos pico de aproximadamente 0.90 mol DAHP/mol Glc (hora 4) superiores al máximo teórico (**figura 13**). Sin embargo, este alto rendimiento no puede ser mantenido cayendo a un valor constante de aproximadamente 0.71 mol/mol. Puede especularse que, este valor de rendimiento superior al máximo teórico alcanzado puede ser una consecuencia lógica si dentro de la célula existe una acumulación de carbono en forma de polisacáridos de reserva o de metabolitos precursores, y que en cierto momento pueden ser

abruptamente canalizados hacia la vía común de aminoácidos aromáticos. Aunque para comprobar este hecho se requieren de más estudios.

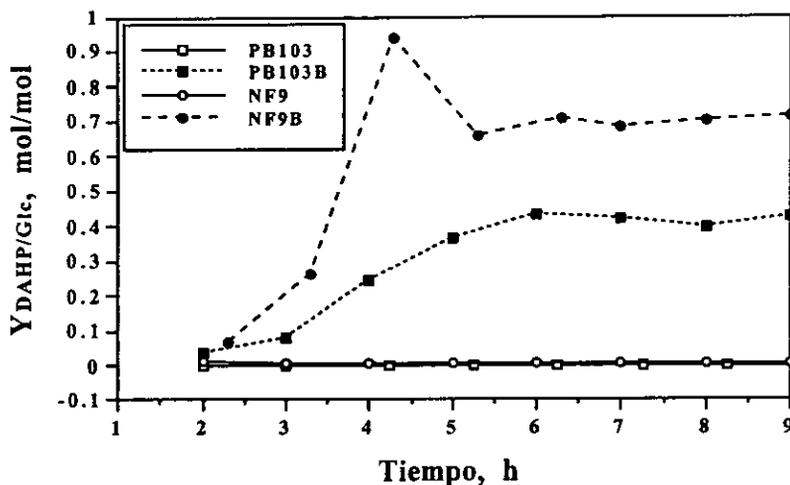


Figura 13. Rendimientos molares de DAHP/Glc de las cepas PB103, NF9, PB103B y NF9B.

Basándose en los datos experimentales de rendimiento molar de DAHP/Glc, en la estequiometría de reacciones para biosíntesis de aminoácidos aromáticos y asumiendo que todo el carbono que se encuentra como DAHP puede ser dirigido hacia la síntesis de aminoácidos aromáticos, es posible realizar sencillos cálculos teóricos que permiten estimar el rendimiento en la síntesis de triptofano, fenilalanina y tirosina (Frost and Lievens, 1994). En la **figura 14 (A y B)** se muestran los rendimientos molares estimados de Trp, Phe y Tyr a partir de glucosa de la cepa NF9B. En la **figura 14, panel A** se compara el rendimiento $Y_{\text{Trp/Glc}}$ mol/mol estimado para la producción de triptofano a partir de glucosa que es de 0.33 mol/mol (representado por círculos) con los rendimientos máximos teóricos. Las líneas rectas punteadas que atraviesan la gráfica representan estos rendimientos máximos teóricos $Y_{\text{Trp/Glc}}$ los cuales son de 0.20 y 0.42 mol/mol para una cepa PTS^+ y para una

PTS⁻, respectivamente (Frost and Lievens, 1994). Asimismo, se comparan con datos industriales (línea continua) (Genencor Int.) obtenidos a partir de cultivos alimentados de *E. coli* (PB103) en medio mínimo adicionado con glucosa (Berry, 1996). Esta cepa porta los plásmidos que sobreexpresan el gene *aroG*^{fbt} y el operon completo de triptofano (genes *trpEDCBA*) bajo el control transcripcional de *lacUV5*. El producto del gene *trpE*^{fbt} (codifica para la antranilato sintasa) y es insensible a retroinhibición por Trp. En estas fermentaciones industriales se obtuvo un $Y_{Trp/Glc}$ de 0.19 mol/mol, mientras que con la cepa NF9B, el $Y_{Trp/Glc}$ estimado es de 0.33 mol/mol, es decir, es 73% más alto que el rendimiento obtenido en dichas fermentaciones industriales. Asimismo, este $Y_{Trp/Glc}$ es 65% más alto que el rendimiento máximo teórico para una cepa PTS⁺ y es 79% del rendimiento máximo teórico para una cepa PTS⁻.

Análogamente, en la **figura 14, panel B** se comparan los rendimientos máximos teóricos, mol/mol (representados por líneas horizontales punteadas) con el rendimiento Phe ó Tyr/Glc ($Y_{Phe \text{ ó } Tyr/Glc}$) mol/mol, estimado a partir de los datos experimentales de la cepa NF9B (representado por cruces). Este $Y_{Phe \text{ ó } Tyr/Glc}$ estimado es de 0.48 mol/mol, mientras que los $Y_{Phe \text{ ó } Tyr/Glc}$ máximos teóricos para Phe y Tyr a partir de glucosa son de 0.56 mol/mol para una cepa PTS⁻ y de 0.30 mol/mol para una cepa PTS⁺. Por lo tanto, el $Y_{Phe \text{ ó } Tyr/Glc}$ molar es un 85% del rendimiento máximo teórico para una cepa PTS⁻, mientras que es un 60% mayor que el rendimiento máximo teórico para una cepa PTS⁺. Por consiguiente, estos resultados sugieren que el empleo de las cepas PTS⁻ Glc⁺ en procesos industriales para la producción de aminoácidos aromáticos, y en general, de compuestos aromáticos puede tener considerables ventajas al tener elevados rendimientos producto/sustrato, altas velocidades del flujo de carbono (DAHP) hacia la vía común de aromáticos y altas velocidades de crecimiento,

disminuyendo, consecuentemente, el costo potencial en la biosíntesis de estos compuestos.

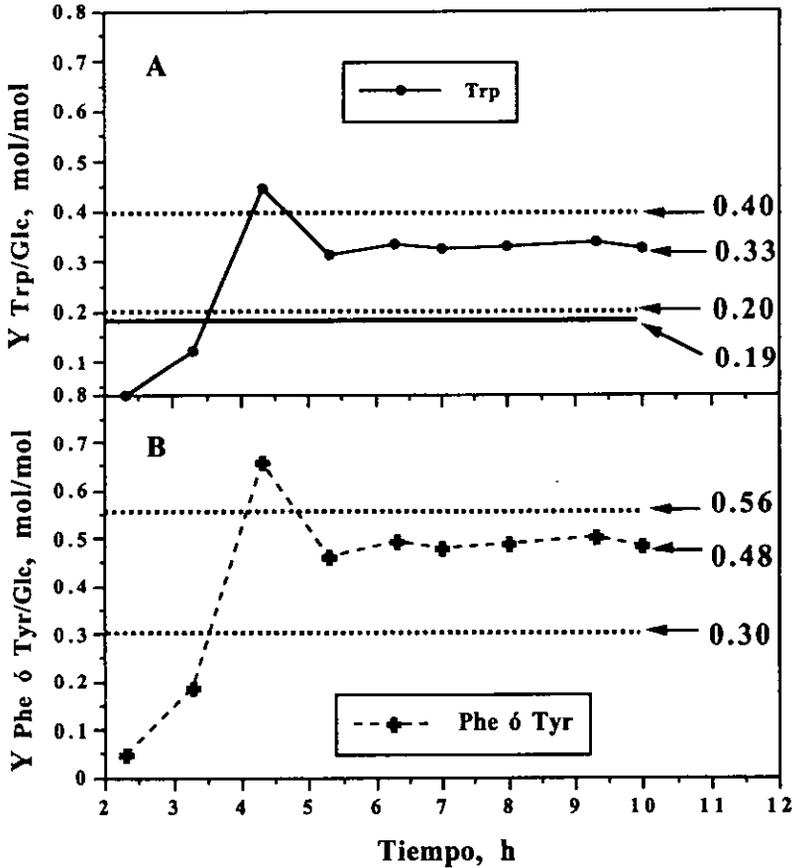


Figura 14. Comparación de los rendimientos $Y_{Trp/Glc}$ (Panel A) y $Y_{Phe \text{ ó } Tyr/Glc}$ (Panel B) estimados a partir de los $Y_{DAHP/Glc}$ molares de la cepa NF9B con los rendimientos máximos teóricos molares y con datos industriales (Genencor Int.). Las líneas horizontales representan los rendimientos máximos teóricos para cepas PTS^+ (línea inferior punteada) y PTS^- (línea superior punteada).

5.5. Cálculo de flujos de carbono internos

En la **tabla III** se presentan velocidades de consumo de glucosa y de producción de DAHP que fueron determinadas durante un intervalo de tiempo de 7 horas (2-9h) para las cepas PB103, PB103B, NF9 y NF9B (todas transformadas con pRW300 y pCL*tki*). Estos datos experimentales fueron utilizados para el cálculo de flujos internos en las vías metabólicas centrales en las cepas PB103B y NF9B empleando la estequiometría de síntesis de DAHP (Varma *et al.*, 1993). En la **figura 15** se muestran los puntos de las vías considerados en este análisis donde los flujos de carbono fueron medidos o calculados. Para el cálculo de los flujos de carbono se hicieron las siguientes suposiciones:

1. Durante los experimentos se mantuvo un estado quasi-estable en los flujos metabólicos.
2. Se alcanzó el rendimiento máximo teórico ($Y_{\text{DAHP/Glc}}$) en la cepa PTS⁺ (PB103B). Este rendimiento sólo puede ser alcanzado cuando todo el carbono proveniente de la glucosa consumida es dirigido hacia la síntesis de PEP y E4P (en cantidades equimolares), y subsecuentemente convertido en DAHP. Bajo estas condiciones, puede asumirse que no hay flujo de carbono ya sea hacia biomasa, a través del brazo oxidativo de la vía de las pentosas o a través de otras reacciones que consuman PEP.
3. Considerando que la cepa NF9B fue mantenida bajo las mismas condiciones de cultivo que la cepa PB103B se asumió que no hubo flujo de carbono a través del brazo oxidativo de la vía de las pentosas o hacia biomasa.

Los flujos internos fueron calculados usando las siguientes ecuaciones de balance de masa:

F_1 = Velocidad de consumo de glucosa (flujo de entrada de carbono).

F_{15} = Velocidad de producción de DAHP (flujo de salida de carbono).

$F_2 = 0$ = Flujo de carbono a través del brazo oxidativo de la vía de las pentosas.

$$F_3 = F_1 + F_9 - F_4$$

$$F_{13} = F_{11} + F_{12} - F_4$$

$$F_4 = F_5 + F_7$$

$$F_{14} = F_1$$

$$F_5 = (1/2)F_4$$

$$F_{15} = F_{13} - F_{14} - F_{16}$$

$$F_4 = (2/3)F_{15}$$

Para la cepa PTS⁺ $F_{16} = 0$:

$$F_5 = F_6$$

$$F_{15} = F_{13} - F_{14}$$

$$F_7 = F_8 = F_9$$

Para la cepa PTS⁻ :

$$F_{10} = F_3 = F_{11} = F_{12}$$

$$F_{15} = F_{13} - F_{16}$$

La figura 15 y la tabla IV muestran los flujos medidos y calculados de las cepas *aroB*⁻. La velocidad de consumo de glucosa (F_1) fue ajustada a 7 (mmol Glic/g-peso seco-h) y la velocidad de producción (mmol DAHP/g peso seco-h) fue ajustada proporcionalmente en ambas cepas (PB103B y NF9B). Al comparar los flujos de carbono entre las cepas PTS⁺ y PTS⁻ se observan diferencias importantes. Por ejemplo, la velocidad de producción de DAHP (F_{15}) para la cepa NF9B es 1.9 veces mayor que la de la PB103B. Asimismo, el flujo a través de la vía Embden-Meyorhof-Parnas (EMP), que corresponde a los flujos F_3 , F_{10} - F_{12} en la cepa PTS⁺, es significativamente más alto que en la PTS⁻. El flujo de carbono que lleva a la síntesis de PEP (figura 15) es 33% más alto en la cepa PTS⁺. Sin embargo, aunque el flujo de carbono en la vía EMP es mayor en la cepa PTS⁺, la mayor parte del PEP producido (aproximadamente 70%) es utilizado para el transporte y fosforilación de la glucosa por el PTS. Por esta razón, en la cepa PTS⁺, la disponibilidad del PEP

para ser utilizado en la reacción de condensación con la E4P, es menor (30% del PEP producido) que en la PTS⁻. Esta condición restringe la capacidad de la célula para poder dirigir ciertos precursores hacia otras vías para otras funciones celulares. Por otro lado, en la cepa PTS⁻ el flujo de PEP que ya no es utilizado por el PTS está ahora disponible para ser canalizado hacia la vía de aromáticos. Sin embargo, no todo el PEP disponible es redirigido hacia la vía de los aromáticos, ya que existen otras reacciones que compiten por el PEP evitando que en la cepa PTS⁻ se alcance el rendimiento máximo teórico. Puede especularse que las izosimas piruvato cinasas y PEP carboxilasa podrían ser las enzimas candidatas que compiten por el PEP en esta cepa. No obstante, se requieren de experimentos adicionales para comprobar esta hipótesis.

Existe otra diferencia importante entre las cepas PB103B y NF9B, que corresponde al flujo a través del brazo no oxidativo de la vía de las pentosas. La reacción catalizada por la transcetolasa que en la **figura 15** corresponde a el flujo F_4 es 64% más alta en la cepa PTS⁻ que en la PTS⁺. El flujo de carbono puede ser balanceado para llenar los requerimientos de la célula incrementando los niveles de E4P. El incremento en este flujo asegura un suministro adecuado de E4P para la síntesis de DAHP. Esto puede ser logrado debido a que en la cepa PTS⁻Glc⁺, el transporte de glucosa está desacoplado a la síntesis de PEP, y por consiguiente, el carbono puede ser distribuido de la vía EMP hacia otros puntos sin afectar el transporte de glucosa.

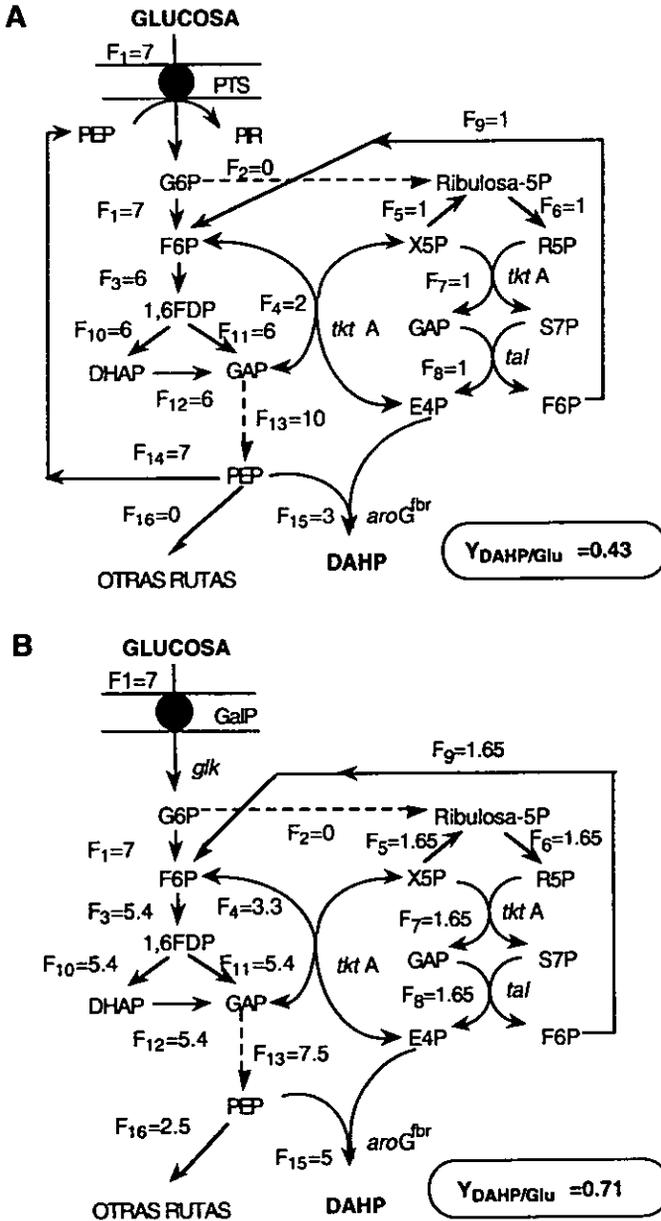


Figura 15. Muestra los flujos internos relacionados a la biosíntesis de aromáticos para las cepas PB103B (Panel A) y NF9B (Panel B).

Tabla IV. Flujos internos medidos y calculados a través las vías centrales (EMP y vía de las pentosas) y vía común de aminoácidos aromáticos, en cepas PTS⁺ y PTS⁻ Glc⁺.

Flujos	PB103B	NF9B
F ₁	7	7
F ₂	0	0
F ₃	6	5.4
F ₄	2	3.3
F ₅ - F ₉	1	1.65
F ₁₀ - F ₁₂	6	5.4
F ₁₃	10	7.5
F ₁₄	7	-
F ₁₅	3	5
F ₁₆	0	2.5

5.6. Flujo a través de *aroB*

En la **figura 16 panel A** se esquematiza la dirección del flujo de DAHP en la cepas *aroB*⁺. En estas cepas, una pequeña fracción del DAHP producido es excretado de la célula, denominado flujo X (ó q_p , **tabla III**). Todo el DAHP restante se asume que es metabolizado por la enzima deshidroquinato sintasa (flujo Z) dirigiendo el flujo de carbono a través de la vía común de aromáticos, ya que el DAHP no tiene otras funciones conocidas dentro de la célula. Por tanto, el flujo total de DAHP, denominado flujo Y estará dado por la suma de estos dos flujos (X + Z). El flujo Y es determinado experimentalmente y corresponde al flujo medido en las cepas *aroB*⁻ (q_p , **tabla III**) en las cuales debido al bloqueo en *aroB* todo DAHP es excretado de la célula (**figura 16 panel B**).

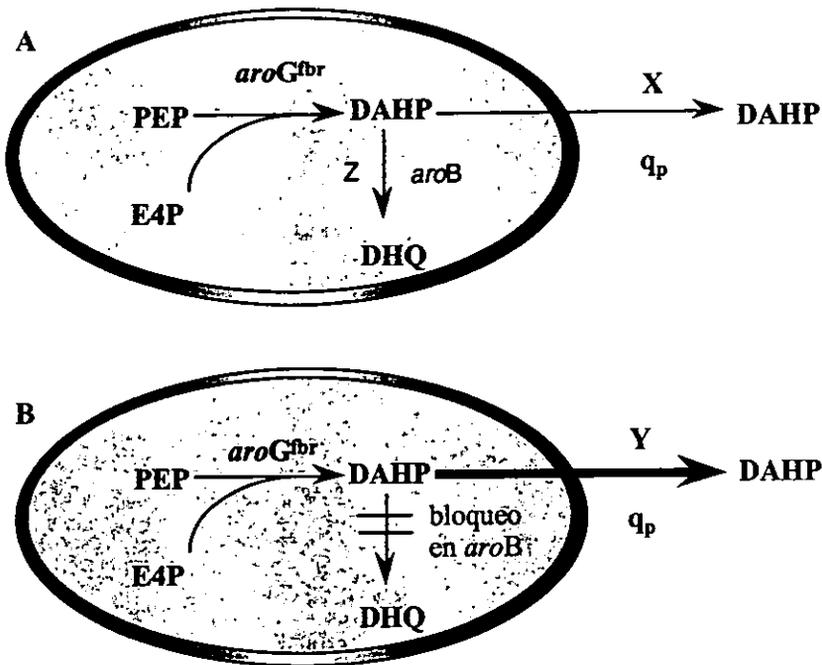


Figura 16. Flujos de DAHP excretados por las cepas *aroB*⁺ (Panel A) y por las *aroB*⁻ (Panel B).

Con estos datos experimentales obtenidos en este estudio, fue posible calcular el flujo de carbono que es catalizado por la enzima DHQ sintasa (codificada por el gene *aroB*) en las cepas *aroB*⁺ (PB103 y NF9). Este flujo de carbono (Z) que pasa a través de *aroB* (tabla IV) fue calculado por diferencia entre los flujos de DAHP excretado de las cepas *aroB*⁺ y sus contrapartes mutantes *aroB*⁻ ($Z = Y - X$).

Tabla V. Flujos de carbono a través de *aroB* en las cepas PB103 y NF9.

CEPAS	Flujo de carbono a través de <i>aroB</i> (mmol DAHP/gpeso seco-h)
PB103	0.546
NF9	0.928

Como puede observarse en la **tabla V**, los flujos de carbono que son dirigidos a través de *aroB* en las cepas PB103 y NF9 (*aroB*⁺) son muy altos comparados con los flujos de DAHP excretados en las cepas *aroB*⁺ (**tabla III**), los cuales son despreciables en estas mutantes. Asimismo, puede observarse que los flujos Y y Z entre las cepas *aroB*⁺ y *aroB*⁻ son casi iguales. Por otro lado, el flujo Z en la cepa NF9 es 67% más alto que en la PB103. Esto puede indicar que en la cepa PB103 aún no se han alcanzado condiciones de saturación de la enzima DHQ sintasa.

5.7 Perspectivas

El número de diferentes productos químicos que pueden ser sintetizados a partir de materias primas renovables tales como la glucosa puede ser virtualmente ilimitada. Esta diversidad en reactividad química es una de las características sobresalientes de la diversidad biológica. Lo que un microorganismo es incapaz de sintetizar puede ser producido frecuentemente por algún otro. Aún si la naturaleza no ofrece una vía biosintética para un producto químico en particular, es posible crear una vía usando genes de varias fuentes para construir el microorganismo (biocatalizador) adecuado. El espectro de productos químicos derivado de glucosa puede ser expandido aún más acoplando la síntesis química con biosíntesis. Muchos intermediarios de vías biosintéticas y productos que eran obtenidos solamente en pequeñas cantidades a precios exorbitantes ahora están siendo obtenidos en grandes volúmenes a precios más asequibles.

El futuro de los microorganismos recombinantes empleados en forma de biocatalizadores como una parte integral de la manufactura química puede tener sus propios problemas. La expresión de genes aislados de un organismo y su expresión subsecuente en microorganismos hospederos evolutivamente diferentes, puede generar toxicidad por productos e intermediarios. Las investigaciones deben ser dirigidas en este sentido para contender con este problema y con otros tales como el mejoramiento de la eficiencia con la que el flujo de carbono puede ser dirigida a través de una vía metabólica diseñada.

A pesar de las características medio ambientales y de utilización de glucosa favorables de los microorganismos recombinantes, la adopción de esta alternativa para la síntesis de productos químicos depende de la factibilidad de colocación en el mercado de los mismos a precios competitivos. Los costos de manufactura estimados para síntesis biocatalítica de varios productos químicos discutidos por Frost y Lievense (1994) son sorprendentemente competitivos en precio con los mismos productos sintetizados por métodos químicos tradicionales. Además, los costos asociados con síntesis biocatalítica de productos químicos obtenidos a partir de glucosa pueden descender sostenidamente. Por ejemplo, la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en *E. coli* está limitada considerablemente por la disponibilidad de sustratos para la DAHP sintasa (PEP y E4P). Sin embargo, incrementando la disponibilidad de estos precursores directos es posible mejorar el rendimiento reduciendo drásticamente los costos.

En el presente estudio se demostró que eliminando una de las principales vías consumidoras de PEP, como lo es el PTS, se logra incrementar la disponibilidad del PEP. Asimismo, que al redirigir ese flujo de carbono hacia la vía común de los aromáticos (por sobreexpresión de *aroG^{fbn}*) y por sobreexpresión conjunta del gene *tktA* es posible incrementar considerablemente el rendimiento y la productividad de primer intermediario en la síntesis de aromáticos (DAHP). En futuros estudios, creemos que este rendimiento de aromáticos logrado podría ser mejorado empleando cepas PTS⁻ que adicionalmente posean mutaciones en los genes que codifican para las piruvato cinasas (*pykA* y *pykF*). El efecto esperado en una cepa PTS⁻*pykA*⁻*pykF*⁻, en cuanto a disponibilidad de PEP, es que ésta sea mayor que en una cepa que sólo

sea PTS⁻. Por consiguiente, es de esperar que el rendimiento pueda incrementarse hasta valores cercanos al rendimiento máximo teórico. Cabe mencionar también que, este tipo de mutantes con el genotipo PTS⁻*pykA*⁻*pykF*⁻ presentan ciertas desventajas en cuanto a crecimiento se refiere, ya que sus velocidades de crecimiento son bajas, y estas características en un proceso industrial puede resultar inconveniente. Sin embargo, creemos que estos problemas pueden ser superados colocando algunos genes (por ejemplo, los genes *pykA* y *pykF*) bajo promotores inducibles que permitan que estos genes sean expresados en etapas de crecimiento del cultivo y que sean apagados en otras, como por ejemplo, en la etapa de producción. De esta forma, una cepa podría crecer a altas velocidades hasta alcanzar la biomasa deseada en un bioproceso, y posteriormente, estos genes al ser reprimidos podrían favorecer el decremento del flujo de carbono hacia otras vías que compiten por los metabolitos precursores, incrementando así el rendimiento y la productividad de los compuestos aromáticos a partir de glucosa.

CONCLUSIONES

★El bloqueo debido a la inactivación del gene *aroB* en las cepas PB103B y NF9B es absolutamente necesario para la determinación de los rendimientos absolutos de DAHP/Glucosa. La inactivación de la enzima deshidroquinato sintasa (gene *aroB*) tiene un efecto directo en la acumulación de DAHP.

★El $Y_{\text{DAHP/Glc}}$ para las cepas PB103B y NF9B fue de 0.43 y 0.71 mol/mol, respectivamente. Por consiguiente, la inactivación PTS tiene un impacto positivo relevante en el $Y_{\text{DAHP/Glc}}$ al incrementarlo en un 65% con respecto al máximo teórico para una cepa PTS⁺.

★La inactivación del PTS también tiene un efecto positivo sobre la productividad de DAHP. En las cepas PTS⁻ Glc⁺ la máxima productividad se incrementa en un 80% con respecto a las cepas PTS⁺.

★Las diferencias en los flujos internos calculados entre las cepas PTS⁺ y PTS⁻Glc⁺ explican satisfactoriamente la mayor disponibilidad de los precursores directos (PEP y E4P) para la biosíntesis de aromáticos.

★La cepa PTS⁻ Glc⁺ (NF9) es una buena candidata para la producción industrial de aromáticos a partir de glucosa al tener ésta altos rendimientos y altas productividades.

★Los flujos de carbono (DAHP) que pasan a través de *aroB* en las cepas PB103 y NF9 (*aroB*⁺) son de 0.556 y 0.928 mmol DAHP/ g peso seco-h, respectivamente.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

BIBLIOGRAFIA

Alexeyev MF, IN Shokolenko and TP Croughan. 1995. Improved antibiotic gene and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and *in vitro* deletion/insertion mutagenesis. *Gene* 160 : 63-67.

Bailey J E. 1991. Toward a science of metabolic engineering. *Science* 252 : 1668-1675.

Beckwith J. 1987. The lactose operon. In : *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology, Vol 2 (Neidhart FC, JL Ingraham, KB Low, B Magasanik, M Schaechter and HE Umbarger, eds). Pp 1444-1452, American Society for Microbiology, Washington, DC.

Berry A. 1996. Review. Improving production of aromatic compounds in *Escherichia coli* by metabolic engineering. *Trends Biotechnol.* 14 : 250-256.

Bolivar F, RL Rodríguez, PJ Greene, MC Betlach, HL Heyneker and HW Boyer. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2 : 95-113.

Chao YP, R Patnaik, WD Roof, RF Young and JC Liao. 1993. Control of the gluconeogenic growth by *pps* and *pck* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175 : 6939-44.

Dell KA and JW Frost. 1993. Identification and removal of impediments to biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: rate-limiting enzymes in the common pathway of aromatic amino acid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 115 : 11581-89.

della-Cioppa G, SJ Garger, GG Sverlow, TH Turpen and LK Grill. 1990. Melanine production in *Escherichia coli* from a cloned tyrosinase gene. *Biotechnology*. 8 : 634-38.

Draths KM and JW Frost, 1990. Genomic direction of synthesis during plasmid-based biocatalysis. *J. Am. Chem. Soc.* 112 : 9630-32.

Draths KM, DL Pompliano, DL Conley, JW Frost, A Berry, GL Disbrow, RJ Staversky and JC Lievens. 1992. Biocatalytic synthesis of aromatic from D-glucose : the role of transketolase. *J. Am. Chem. Soc.* 114 : 3956-3962.

Draths KM and JW Frost. 1994. Environmentally compatible synthesis of adipic acid from D-glucose. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 399-400.

Draths KM and JW Frost. 1995. Environmentally compatible synthesis of catechol from D-glucose. *J. Am. Chem. Soc.* 117: 2395-400.

Emmerling M, JE Bailey and U Sauer. 1999. Glucose catabolism of *Escherichia coli* strains with increased activity and altered regulation of key glycolytic enzymes. *Metabolic Engineering*. 1 : 117-127.

Ensley BD, BJ Ratskin, TD Osslund, MJ Simon, LP Wackett and DT Gibson. 1983. Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. *Science* 222 : 167-169.

Erlich HA, D Gelfand and JJ Sninsky. 1991. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 252, 1643-1675.

Flores N, J Xiao, A Berry, F Bolivar and F Valle. 1996. Pathway engineering for the production of the aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnol.* 14. 620-623.

Forberg C, T Eliaeson and L Haggstrom. 1988. Correlation of theoretical and experimental yields of phenilalanine from non-growing cells of a rec *Escherichia coli* strain. *J. Biotechnol.* 7 :319-332.

Frost JW and JC Lievense. 1994. Prospects for biocatalytic synthesis of aromatics in the 21st century. *New J. Chem.* 18 : 341-248.

Frost JW and KM Draths. 1995. Biocatalytic syntheses of aromatics from D-glucosa. *Annu. Rev. Microbiol.* 49 : 557-79.

Gollub E, H Zalkin and DB Sprinson. 1971. Assay for 3-deoxy D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate synthase. *Methods in Enzymology.* 17A:349-350.

Goncharoff P and Nichols BP. 1984. Nucleotide sequence of *Escherichia coli pabB* indicates a common evolutionary origin of p-aminobenzoate synthetase and anthranilate synthetase. *J. Bacteriol.* 159 : 57-62.

Gosset G, R de Anda, N Cruz, A. Martínez, R Quintero and F Bolivar. 1990. Recombinant protein production in cultures of and *Escherichia coli trp⁻* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39 :541-546.

Gosset G, J Xiao and A Berry. 1996. A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol* 17 : 47-52.

Green JM, WK Merkel and BP Nichols. 1992. Characterization and sequence of *Escherichia coli pabC*, the gene encoding aminodeoxycorismato lyase, a pyridoxal phosphate containing enzyme. *J. Bacteriol.* 174 : 5317-23.

Hamilton CM, M Aldea, BK Washburn, P Babitzke and SR Kushner. 1989. New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 171 : 4617-4622.

Hodgson J. 1994. Bulk amino-acid fermentation : technology and commodity trading. BioTechnology. Vol. 12 :152-155.

Jason M and P Schimmel, 1984. Deletion of an essential gene in *Escherichia coli* by site-specific recombination with lineal DNA fragments. J. Bacteriol. 159: 783-786.

Kaplan JB and BP Nichols. 1983. Nucleotide sequence of *Escherichia coli pabA* and its evolutionary relationship to *trp(G)D*. J. Biol. Mol. 168 : 451-68.

Lerner GC and M Inouye. 1990. Low copy number plasmids for regulated low-level expression of cloned genes in *Escherichia coli* with blue/white insert screening capability. Nucl. Acids Res. 18 : 4631.

Margolin P. 1987. Generalized transduction. In : *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology (Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik V, Schaechter and HE Umberger, eds) pp. 1184-1168. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Miller JE, KC Backman, MJ O'Connor and RT Hatch. 1987. Production of phenylalanine and organic acids by phosphoenolpyruvate carboxylase-deficient mutants of *Escherichia coli*. J. Ind. Microbiol. 2 :143-49.

Miller JM.1992. Preparation and use of P1_{vir} lysates. In a short course in bacterial genetics, pp 268-274. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.

Murdock D, BD Ensley, C Serdar and M Thalen. 1993. Construction of metabolic operons catalyzing de novo biosynthesis of indigo in *Escherichia coli*. *Biotechnology* 11 : 381-86.

Neidhart FC and HE Umbarger. 1996. Chemical composition of *Escherichia coli*: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology, Vol 1 (Neidhart FC, JL Ingraham, KB Low, B Magasanik, M Schaechter and HE Umbarger, eds). Pp 13-16, American Society for Microbiology, Washington, DC.

Oyama K, S Irino and N Hagi. 1987. Production of aspartame by immobilized thermoase. *Methods Enzymol.* 136 : 503-17.

Patnaik R and JC Liao. 1994. Engineering of *Escherichia coli* central metabolism for aromatic metabolite production with near theoretical yield. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 : 3903-8.

Patnaik R, RG Spitzer and JC Liao. 1995. Pathway engineering for production of the aromatics in *Escherichia coli*: Confirmation of stoichiometric Analysis by independent modulation of AroG, TktA and Pps Activities. *Biotechnol. and Bioeng.* 46 : 361-370.

Postma PW, JW Lengeler and GR Jacobson. 1987. Phosphoenolpyruvate : Carbohydrate Phosphotransferase Systems. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology, Vol. 2 (Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik V, Schaechter and HE Umbarger, eds), pp 1149-1165, American Society for Microbiology, Washington, DC.

Ray JM, C Yanofsky and R Bauerle. 1988. Mutational analysis of the catalytic and feedback sites of the tryptophan-sensitive 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate synthase of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 170 :5500-6.

Srinivasan PR and DB Sprinson. 1959. 2-keto-3-deoxy-D-arabo-heptonic acid 7-phosphate syntase. J. Biol. Chem. 234 : 716-722.

Stephanopoulos G and AJ Sinskey. 1993. Review. Metabolic engineering methodologies and future prospects. Trends Biotechnol. 11, 392-396.

Stephanopoulos G and JJ Vallino. 1991. Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. Science 252 : 1675-1681.

Stephanopoulos G. 1999. Metabolic fluxes and metabolic engineering. Metabolic Engineering 1 : 1-11.

Stephanopoulos. 1998. Metabolic Engineering. Biotechnol. and Bioeng. 58 : 119-120.

Takashi O, C Garner, JL Markley and KM Herrmann. 1982. Biosynthesis of aromatic compounds : 13 C NMR spectroscopy of whole *Escherichia coli* cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 : 5928-32.

Thayer AM. 1991. Use of specialty food additives to continue to grow. Chem. Eng. News. 69 : 9-12.

Valle F, E Muñoz, E Ponce, N Flores and F Bolivar. 1996. Basic and Applied aspects of metabolic diversity : the phosphoenolpyruvate node. J. of Ind. Microbiol. 17 : 458-462.

Varma A, BW Boesch and BO Palsson. 1993. Stoichiometric interpretation of *Escherichia coli* glucose catabolism under various oxygenation rates. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 : 2465-2473.

Weaver LM and KM Herrmann. 1990. Cloning of an *aroF* allele encoding a tyrosine-insensitive 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate synthase. *J. Bacteriol.* 172 : 6581-84.

Winans SC, SJ Elledge, JH Krueger and GC Walker. 1985. Site-direct insertion and deletion mutagenesis with cloned fragments in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 161: 1219-1221.

Wyman AR, LB Wolfe and D Botstein. 1985. Propagation of some human DNA sequences in bacteriophage λ vectors requires mutant *E. coli* hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82 : 2880-2884.

Yarmush ML and F Berthiaume. 1997. Metabolic engineering and human disease. *Nature Biotechnol.* 15: 525-528.