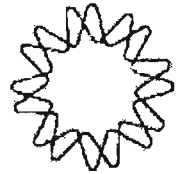




**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



**Efecto de la inactivación de las isoenzimas de piruvato
cinasa sobre el metabolismo central y la capacidad de
síntesis de compuestos aromáticos en cepas de
Escherichia coli que carecen del sistema de
fosfotransferasa.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A
Q. ADRIANA CORTAZAR MARTÍNEZ**

M: 0349418

Cuernavaca, Mor.

Septiembre, 2005



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

**EL PRESENTE TRABAJO SE
REALIZÓ BAJO LA
DIRECCIÓN DEL DR.
GUILLERMO GOSSET
LAGARDA EN EL
DEPARTAMENTO DE
INGENIERÍA CELULAR Y
BIOCATÁLISIS DEL
INSTITUTO DE
BIOTECNOLOGÍA DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Adriana Cortazar

Martínez

FECHA: 18 Agosto - 2005

FIRMA: [Firma manuscrita]

MIEMBROS DEL JURADO

Presidente: Dr. Edmundo Calva Mercado

Secretario: Dr. Guillermo Gosset Lagarda

Vocal: Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos

Suplente: Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo

Suplente: Dr. Mario Soberón Chávez

DEDICATORIA:

Papá, Mamá, Orlando... ustedes son mi motivo para seguir adelante.

Papá. Te quiero y te admiro. Me has inspirado a seguir adelante.

Mamá. Eres mi ejemplo por ser una gran mujer. Tu amor y la enseñanza que me has dado me han permitido lograr todo esto.

Orlando. Te quiero mucho. De tu dedicación, tu esfuerzo y tu amor hacia los demás he aprendido mucho.

Familia Cortazar, Familia Martínez. Su confianza y su cariño han sido un gran aliento para mí. A las "Señoras", a mi consentida, a mi abuelito, en fin... a cada uno de ustedes, por haber dejado algo hermoso en mi vida.

A mis amigas Kris, Arge, Magaly, Quilla, Gretel, Rosita. En todo este tiempo, su amistad incondicional me ha ayudado a seguir adelante. Ustedes forman una parte importante de mi vida.

Álvaro, Inés, Lidia, Marina, Naty, Paty. Este tiempo en el IBt no hubiera sido lo mismo sin ustedes. De cada uno de ustedes pude aprender mucho. Los admiro por su dedicación y su trabajo. Los quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco de todo corazón a cada persona que de alguna manera ha estado conmigo. A mi familia, mis amigos, mis maestros. GRACIASiii

A Dios, por ser quien guía mi camino.

Al Dr. Gosset por darme la confianza de pertenecer a su grupo de trabajo. Por su paciencia, guianza y experiencia. Usted es un ejemplo no solo como investigador, sino como persona. Gracias.

Al Dr. Alfredo Martínez. Su interés, su dedicación y sus consejos hicieron que me superara. Gracias por su apoyo.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Joel Osuna, Dr. Tonatiuh Ramírez. Gracias por sus críticas y sugerencias que permitieron llevar a cabo este proyecto.

A los miembros del jurado, por su tiempo, su dedicación y sus comentarios acerca de esta tesis.

José Luis Báez. Gracias por tu enseñanza y el interés que siempre demostraste en este proyecto.

Mechita, Silvia y Geo... No solamente agradezco su trabajo y su ayuda sin el cual no hubiera sido posible terminar esta tesis, sino también el ejemplo acerca del profesionalismo y excelencia en el trabajo.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio Bolívar-Gosset. Adelfo, Ramón, Lidia, Noemí, Montse, Silvia, Tere, Juan Carlos, Paty, Eugenio, Gerardo, Marina, Joyce, Susana, José, Andrea, Inés, Naty, Álvaro, Karla. Muchas gracias por sus aportaciones, sus consejos, su ayuda y por hacer mi estancia en el laboratorio mucho mas fácil y agradable.

A mis compañeros de generación, por los momentos de estudio y de diversión.

I. ÍNDICE GENERAL

I. ÍNDICE GENERAL	i
II. ÍNDICE DE FIGURAS	iv
III. ÍNDICE DE TABLAS	vii
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	5
3.1. Metabolismo central	5
3.2. El nodo de PEP	7
3.2.1. Sistema de transporte de fosfotransferasa (PTS)	8
3.2.1.1. Distribución de flujos de carbono en la cepa PB12	9
3.2.2. Isoenzimas piruvato cinasas	10
3.2.3. Producción de compuestos de interés industrial utilizando cepas con modificaciones en el metabolismo central.	12
3.3. Aminoácidos aromáticos y sus derivados.	14
3.3.1. Biosíntesis de los aminoácidos aromáticos	16
3.3.2. Vía del siquimato	18
3.3.2.1. 3-Desoxi-D-arabino-heptulosoato 7-fosfato Sintasa	19
3.3.2.2. Estrategias que se han seguido en <i>E. coli</i> para la producción de aminoácidos aromáticos	21
3.3.2.2.1. Incremento en la disponibilidad de eritrosa-4-fosfato (E4P)	21
3.3.2.2.1.1. Sobreexpresión de las enzimas transcetolasa (TKT) y transaldolasa (TAL)	21
3.3.2.2.1.2. Inactivación de la enzima fosfoglucoasa isomerasa (PGI)	22
3.3.2.2.2. Incremento en la disponibilidad de PEP	22
3.3.2.2.2.1. Inactivación de la enzima PEP carboxilasa (PPC)	23
3.3.2.2.2.2. Inactivación de las isoenzimas piruvato cinasas (PYKA, PYKF)	23
3.3.2.2.2.3. Sobreexpresión del gen <i>pps</i>	23
3.3.2.2.2.4. Inactivación del sistema PTS	23
3.3.2.2.2.5. Utilización de azúcares no PTS	24

3.3.2.2.3. Eliminación de la inhibición por retroalimentación	24
3.3.2.2.4. Evolución dirigida de proteínas.	25
3.3.3. Síntesis de fenilalanina	25
3.3.3.1. Corismato Mutasa/prefenato deshidratasa (CM-PDT)	26
3.3.3.2. Rendimiento máximo teórico de fenilalanina	27
3.3.3.3. Ejemplos en la producción de fenilalanina	27
3.3.3.4. Ejemplos de producción de aminoácidos aromáticos y sus derivados	28
3.3.3.4.1. Triptofano e Índigo	28
3.3.3.4.2. Siquimato (SHIK)	29
3.3.3.4.3. 3-dehidrosiquimato (DHS) y derivados	29
4. JUSTIFICACIÓN	30
5. HIPOTESIS	31
6. OBJETIVOS	32
6.1. Objetivo general	32
6.2. Objetivo particular	32
7. MATERIALES Y METODOS	33
7.1. Plásmidos	33
7.2. Cepas	33
7.3. Construcción de las cepas de <i>E. coli</i> modificadas por ingeniería genética e ingeniería de proteínas.	33
7.4. Medios de cultivo	34
7.5. Condiciones de cultivo	35
7.6. Métodos analíticos	35
7.6.1. Evaluación de los metabolitos excretados mediante HPLC	36
7.6.1.1. Determinación de Glucosa	36
7.6.1.2. Determinación de aminoácidos aromáticos	36
7.6.1.3. Determinación de Ácidos Orgánicos e intermediarios de la vía de aromáticos.	36
7.6.1.3.1. Método Aromáticos Aminex	37
7.6.1.3.2. Método Acqua	37
8. RESULTADOS Y DISCUSION	38
8.1. Sistema de células en reposo (Resting cells)	38

8.2. Evaluación de la máxima capacidad de síntesis de fenilalanina en la cepa PB28 utilizando células en reposo.	39
8.2.1. Consumo de Glucosa	40
8.2.2. Acumulación de intermediarios	45
8.2.3. Producción de fenilalanina	46
8.2.4. Distribución de flujos metabólicos en el nodo de PEP	47
8.3. Evaluación de los metabolitos excretados mediante HPLC	51
8.4. Efecto de la alimentación de piruvato sobre el metabolismo central en la cepa PB28	52
8.4.1. Consumo de Glucosa	52
8.4.2. Acumulación de intermediarios	53
8.4.3. Producción de L-fenilalanina	55
8.4.4. Distribución de flujos metabólicos en el nodo de PEP	56
8.5. Efecto de la presencia de los plásmidos en las cepas PB28, JM101 y PB12.	59
8.5.1. Consumo de glucosa en las cepas JM101, PB12 y PB28.	59
8.5.2. Consumo de glucosa en la cepa PB28 transformada con diferentes plásmidos.	60
8.5.3. Replicación de plásmido durante un sistema de células en reposo	62
9. CONCLUSIONES	64
10. PERSPECTIVAS	66
11. REFERENCIAS	67
12. ANEXOS	72
12.1. Anexo 1. Nomenclatura	72
12.2. Anexo 2. Reacciones en las que participa el piruvato	75

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Compuestos que pueden obtenerse a partir del metabolismo central y la vía de síntesis de compuestos aromáticos de <i>E. coli</i> .	3
2	Metabolismo central de <i>E. coli</i> .	6
3	Flujos metabólicos a nivel del nodo de fosfoenolpiruvato en <i>E. coli</i> .	7
4	Componentes del Sistema de Transportes Fosfotransferasa (PTS).	8
5	Comparación de la distribución de los flujos de carbono en el metabolismo central, determinados por resonancia magnética nuclear para las cepas JM101 y PB12.	10
6	Compuestos que pueden generarse a partir del PEP.	12
7	Cantidad de DAHP acumulado en Mol DAHP/g DCW utilizando diferentes modificaciones en el metabolismo central.	13
8	Compuestos de importancia industrial derivados de la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos.	15
9	Aminoácidos aromáticos.	16
10	Biosíntesis de aminoácidos aromáticos.	17
11	Vía del siquimato.	18
12	Regulación de la DAHP sintasa.	20
13	Biosíntesis de L-Fen	26
14	Densidad óptica a 600 nm de los cultivos de células en reposo.	39
15	Comparación entre el q_{Glc} , q_{Phe} y $Y_{L-Fen/Glc}$ para las cepas PB28tkGev1 y PB28tkGev2.	40
16	Gráfica representativa del consumo de glucosa en la cepa PB28tkGev2.	41
17	Comparación entre la q_{Glc} de las cepas JM101, PB12 y PB28 transformadas con los plásmidos $pTrc_{pPheA}^{ev2}$, $pJLBaroG^{fbr}$ y $pCLtk$	41
18	Cinética de producción de SHIK y DHS	45
19	Perfil de producción de L-Fenilalanina para la cepa PB28tkGev2.	46
20	Comparación entre la q_{L-Fen} de las cepas JM101, PB12 y PB28 transformadas con los plásmidos $pTrc_{pPheA}^{ev2}$, $pJLBaroG^{fbr}$ y $pCLtk$	47

Figura	Descripción	Página
21	Comparación entre el $Y_{L-Fen/Glc}$ de las cepas JM101, PB12 y PB28 transformadas con los plásmidos $pTrc_{pheA}^{ev2}$, $pJLBaroG^{fbr}$ y $pCLtkk$	47
22	Distribución parcial de flujos de carbono a nivel del nodo de PEP en la cepa PB28tkkGev2, JM101tkkGev2 y PB12tkkGev2.	48
23	Comportamiento del TCA en anaerobiosis. La rama oxidativa se muestra a la derecha y la rama reductiva a la izquierda.	50
24	Vía de las PP	51
25	Gráfica representativa del perfil de consumo de glucosa y de piruvato.	52
26	Consumo de glucosa y de piruvato para la cepa PB28tkkGev2 en un sistema de células en reposo suplementado con glucosa y piruvato	53
27	Gráfica representativa de la cinética de producción de a) DHS b) SHIK y c) ácido acético en los cultivos de células en reposo suplementados con glucosa y suplementados con glucosa y piruvato.	54
28	q_{SHIK} y q_{DHS} en los cultivos de células en reposo suplementados con glucosa y suplementados con glucosa y piruvato.	55
29	Gráfica representativa de la cinética de producción de L-Fen en los cultivos de células en reposo suplementados con glucosa y suplementados con glucosa y piruvato.	55
30	q_{L-Fen} en los cultivos de células en reposo suplementados con glucosa y suplementados con glucosa y piruvato.	56
31	$Y_{L-Fen/Glc}$ en los experimentos con células en reposo suplementados con glucosa y suplementados con glucosa y piruvato.	56
32	Distribución parcial de flujos de carbono alrededor del nodo de PEP	57
33	Vías metabólicas en las cuales se puede producir ATP.	58
34	Consumo de glucosa para las cepas JM101, PB12 y PB28.	59
35	Consumo de glucosa para la cepa PB28 transformada con diferentes plásmidos.	61

Figura	Descripción	Página
36	A) Cuantificación relativa mediante densitometría de la cantidad de los plásmidos pTrc99A y pACYC184 presente en un sistema de células en reposo. B) Gráfica representativa de la cantidad relativa de plásmido y la biomasa en un sistema de células en reposo.	63

III. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1	Actividades enzimáticas de las enzimas PykA y PykF y crecimiento de cepas de <i>e. coli</i> con diferentes fondos genéticos.	11
2	Reacciones de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en <i>E. coli</i> y su regulación.	19
3	Cepas y plásmidos que se utilizarán en este proyecto de investigación.	34
4	Estimación aproximada de la cantidad de ATP producida	45
5	Cepas originadas a partir de PB28 utilizando diversas combinaciones de plásmidos	60
6	Consumo de glucosa para las diferentes versiones de PB28.	61

1. RESUMEN

La biosíntesis de los aminoácidos aromáticos, L-Tirosina, L-Triptofano y L-Fenilalanina, en *Escherichia coli* es de gran interés por las aplicaciones de estos compuestos en la industria. Algunas de las estrategias para mejorar la capacidad de síntesis de aromáticos se basan en aumentar la disponibilidad de los precursores (fosfoenolpiruvato y eritrosa-4-fosfato). El sistema de fosfotransferasa (PTS) y las piruvato cinasas son las dos principales vías que consumen fosfoenolpiruvato por lo que la inactivación de estas vías pudiera ocasionar un aumento en la producción de aromáticos. En el trabajo de Báez Viveros (2004) se transformó una cepa que carece del sistema PTS pero que puede transportar glucosa eficientemente (PB12, PTS-Glc⁺), con plásmidos (pCLtkt, pJLBaroG^{br} y pTrcpheA^{ev2}) que le permiten dirigir un mayor flujo hacia aromáticos. Con esta cepa se pueden obtener rendimientos cercanos al 60% del máximo teórico. En este trabajo se evaluó una cepa derivada de PB12, que tiene inactivas las piruvato cinasas (PB28, PTS-Glc⁺, pykA-F⁻), y se transformó con los mismos plásmidos que a PB12 (PB28/pCLtkt, pJLBaroG^{br} y pTrcpheA^{ev2}, PB28tktGev2). Se utilizaron cultivos de células en reposo suplementados con glucosa. La inactivación de las piruvato cinasas podría ocasionar un aumento en la disponibilidad de fosfoenolpiruvato que pudiera utilizarse en la producción de L-Fenilalanina. Sin embargo, lo que se observó fue que en la cepa PB28tktGev2 hay un aumento en el consumo de glucosa y un menor flujo de carbono hacia aromáticos con respecto a la cepa PB12tktGev2. La cepa PB28 no tiene las dos principales vías de síntesis de piruvato, por lo que se propone que se encuentra limitada en su capacidad de síntesis de ATP. Esto ocasiona un aumento significativo en el flujo glucolítico, ya que la cepa PB28 obtiene energía principalmente a través de la glucólisis. Además la falta de ATP y precursores derivados del piruvato hacen que esta cepa dirija un menor flujo de carbono hacia la síntesis de aromáticos. En un medio suplementado con glucosa y piruvato, el consumo de glucosa para la cepa PB28tktGev2 disminuyó mientras que el flujo hacia aromáticos aumentó al doble. Esto se debe a que la célula cuenta con los precursores y el ATP que pueden sintetizarse a partir de piruvato. El consumo de glucosa de la cepa PB28 sin transformar fue similar al de las cepas JM101 y PB12, en un sistema de células en reposo en M9 suplementado con glucosa. Cuando la cepa PB28 se transforma con algún plásmido, el consumo de glucosa se incrementa debido a la carga metabólica, ya que el plásmido se sigue replicando aún cuando se tenga un sistema de células en reposo.

2. INTRODUCCIÓN

Actualmente, un número importante de grupos de investigación en el mundo dedican su esfuerzo al estudio de diversos aspectos de la fisiología microbiana, con el propósito de aplicar el conocimiento generado al desarrollo de cepas de producción capaces de sintetizar compuestos que previamente solo se podían obtener mediante síntesis química. Estas nuevas cepas microbianas pueden constituir la base de nuevas tecnologías biológicas para la producción sustentable de compuestos de interés industrial. Sin embargo, muchas de estas cepas aún no alcanzan niveles de producción cercanos al máximo teórico y no pueden competir económicamente con los procesos tradicionales.

La ingeniería metabólica (IM) tiene como objetivo la modificación de las vías metabólicas, de manera que se altere el perfil de productos que acumula un organismo. Es un campo interdisciplinario que usa principios y técnicas de varias ciencias como la genética, la bioquímica, la biología celular y molecular, la ingeniería bioquímica, etc. El objetivo es redirigir los flujos metabólicos para incrementar la producción de metabolitos que el organismo produce; lograr que el organismo sintetice nuevos metabolitos; ampliar el rango de los sustratos que utiliza; mejorar las propiedades celulares para facilitar algunos bioprocesos; etc. Hasta hace poco, esto se hacía de modo empírico, por ensayo y error (rondas sucesivas de mutagénesis y rastreo o selección de mutantes). El desarrollo de tecnologías de DNA recombinante ha permitido el diseño y el desarrollo de microorganismos sobreproductores de metabolitos de interés industrial. Esto se lleva a cabo realizando modificaciones específicas en las vías metabólicas.

Hay muchos ejemplos reportados en la literatura sobre la aplicación de la IM para incrementar los rendimientos y productividades de diferentes procesos. Muchos compuestos de interés industrial se derivan del metabolismo central de *E. coli*, como son los aminoácidos aromáticos, productos de fermentación, ácidos orgánicos, etc. Además con la introducción de genes heterólogos se pueden crear nuevas rutas de síntesis para otros compuestos. (Figura 1).

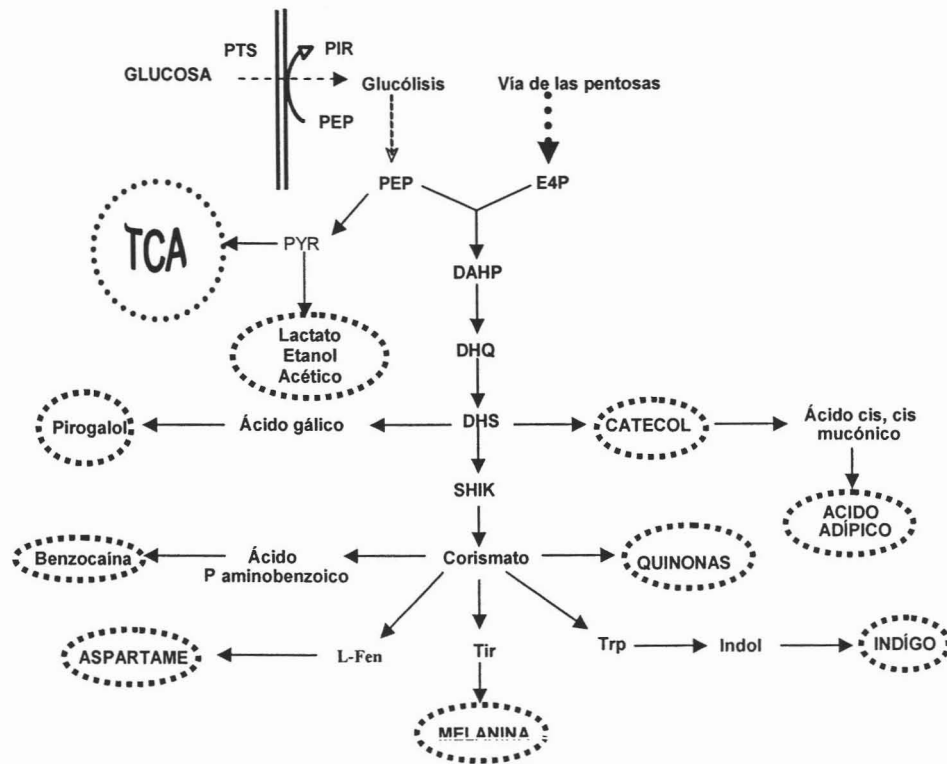


Figura 1. Compuestos que pueden obtenerse a partir del metabolismo central y la vía de síntesis de compuestos aromáticos de *E. coli*. El metabolismo central de *E. coli* comprende una gran variedad de reacciones. A partir del metabolismo central se generan intermediarios, como el fosfoenolpiruvato y el piruvato. Estos intermediarios pueden utilizarse como precursores de compuestos de interés industrial, generándolos a partir del metabolismo, con nuevas vías metabólicas mediante la introducción de genes heterólogos o bien mediante síntesis enzimática o química.

E. coli puede utilizarse para la producción de productos de fermentación como lactato, etanol, ácido acético, succinato, etc. de manera natural y en condiciones anaeróbicas. Además, se han realizado manipulaciones genéticas con el fin de aumentar la producción del compuesto de interés y disminuir la producción de algunos subproductos. También se han manipulado las vías metabólicas para poder producir mayoritariamente un producto que anteriormente solamente se sintetizaba bajo condiciones específicas. Un ejemplo de esto es la producción de succinato en condiciones aeróbicas (Lin *et. al.*, 2005).

Los intermediarios y productos finales de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos tienen un gran interés, por sus propiedades y aplicaciones en la industria farmacéutica, la cosmética y la alimenticia. Se han realizado considerables esfuerzos enfocados a la construcción de microorganismos recombinantes sobreproductores de

aminoácidos aromáticos. Estos metabolitos, así como los intermediarios de esta vía, pueden utilizarse como precursores para sintetizar otros compuestos por métodos químicos o producirlos utilizando una nueva ruta biosintética con la introducción de genes heterólogos.

La fenilalanina puede ser química o enzimáticamente convertida al edulcorante dietético aspartamo, el cual se usa ampliamente en el mercado mundial. Mediante la aplicación de la IM se ha modificado genéticamente el metabolismo central de *E. coli*, empleando estrategias para mejorar la producción de fenilalanina a partir de glucosa. La base de algunas de estas estrategias es aumentar la disponibilidad de los precursores mediante la sobreexpresión de las enzimas que los producen o mediante la eliminación de las vías que compiten por esos mismos.

La melanina es un compuesto de interés debido a su potencial para ser utilizada en la industria química y farmacéutica. *E. coli* puede sintetizar melanina mediante la introducción de los genes *melA* de *Rhizobium etli*, que codifican para una tirosinasa (Lagunas, 2004).

Otro ejemplo de la aplicación de la IM es la producción de índigo. Este compuesto es un colorante que se usa para teñir la mezclilla. Se puede obtener a partir de fuentes vegetales o mediante síntesis química. Se ha podido introducir genes con el fin de producir índigo en cepas de *E. coli* sobreproductoras de algunos intermediarios de su metabolismo central.

El metabolismo central se considera como una red, donde las enzimas y sus reacciones se encuentran interrelacionadas, por lo que una alteración en una de ellas puede ocasionar cambios en todo el metabolismo. Este trabajo se enfoca al estudio de los efectos sobre el metabolismo central que causa la inactivación de las piruvatoquinasas en cepas de *E. coli* que carecen del sistema de fosfotransferasa (PTS).

3. ANTECEDENTES

3.1. Metabolismo central

Entre las especies bacterianas comúnmente utilizadas en procesos biotecnológicos, *E. coli* es el que mejor se conoce, ya que su metabolismo se ha estudiado y caracterizado extensivamente.

En la figura 2 se muestra parte del metabolismo central de *E. coli*, el cual comprende numerosas reacciones. El metabolismo central forma una red que está constituida principalmente por el sistema de fosfotransferasa (PTS), las vías glucolíticas (Vía de Embden-Meyerhof-Parnas, EMP), la vía de las pentosas fosfato (PP) y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). El sistema PTS consta de varias proteínas que funcionan como una cadena de transportadores del grupo fosfato de alta energía del fosfoenolpiruvato (PEP) hasta el azúcar a transportar en cuestión. En *E. coli* el sistema PTS permite el transporte de glucosa, de manosa, de fructosa y de los polioles sorbitol y manitol. La vía de EMP genera energía en forma de ATP, poder reductor (NADH) y piruvato como producto final. Este último puede irse hacia el TCA para generar más ATP, más poder reductor y precursores como el α -cetoglutarato, succinilCoA y oxaloacetato. En la vía de las pentosas fosfato se genera poder reductor en forma de NADPH y precursores (Eritrosa 4-fosfato, E4P) necesarios para la biosíntesis.

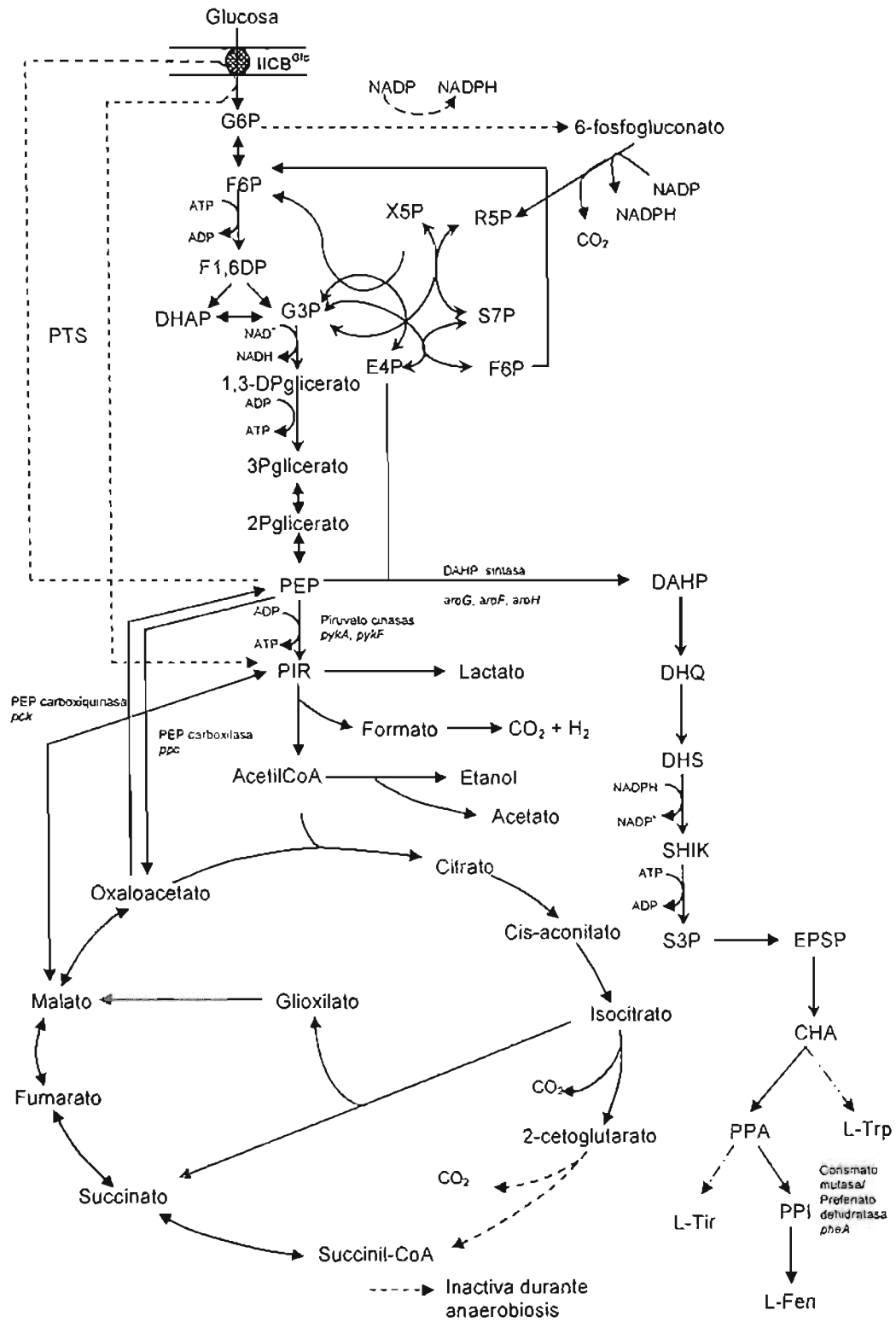


Figura 2. Metabolismo central de *E. coli*.

En *E. coli* el flujo glucolítico lo controlan dos enzimas de la vía EMP: la fosfofructocinasa y piruvato cinasa. Parte de este control depende de la demanda de ATP (Koebmann *et. al.*, 2002)

3.2. El nodo de Fosfoenolpiruvato (PEP)

El PEP es un intermediario clave dentro de varios procesos celulares y participa en la síntesis de varios compuestos por lo que representa un nodo importante en el metabolismo central. El flujo de carbono que llega a PEP puede dirigirse hacia la síntesis de aminoácidos aromáticos a través de la enzima DAHP sintasa, aunque normalmente solo un pequeño porcentaje del PEP producido se utiliza en la biosíntesis de aromáticos. La enzima PEP carboxilasa (PPC) convierte el PEP a oxaloacetato en una de las reacciones anapleróticas que sirven para suplir el TCA. La mayor parte del PEP producido se dirige hacia la formación de piruvato (PIR), principalmente a través del sistema PTS y en menor proporción por las isoenzimas piruvato cinasas (PYK).

En el trabajo de Holms (1996) se calcularon los flujos metabólicos en *E. coli* (Figura 3) y se determinó que el principal consumidor del PEP es el sistema PTS. En estudios recientes (Flores *et. al.*, 2002) se ha demostrado que además del sistema PTS, las isoenzimas piruvato cinasas consumen una cantidad importante del PEP.

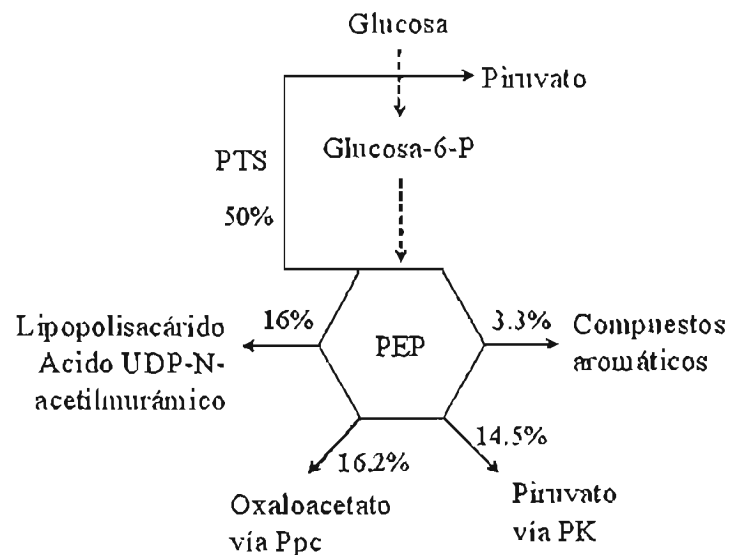


Figura 3. Flujos metabólicos a nivel del nodo de fosfoenolpiruvato (PEP) en *E. coli*.

La disponibilidad del PEP es un factor limitante en la producción de ciertos compuestos por lo que se han realizado numerosas estrategias para poder aumentar la disponibilidad del PEP y poder dirigir el flujo hacia la producción de estos compuestos. Una de estas estrategias es utilizar sistemas de transporte alternativos al PTS (Yi *et. al.*, 2003), usar azúcares no-PTS como la xilosa (Frost y Draths, 1995) o utilizar cepas que carezcan del sistema PTS (Flores *et. al.*, 1996, Gosset *et. al.*, 1996). Otra estrategia que se ha seguido es la inactivación de las enzimas que consumen PEP como las dos isoenzimas piruvato cinasas (Gosset *et. al.*, 1996) o la PEP carboxilasa (Patnaiak y Liao, *et. al.* 1994). El piruvato (PIR) puede convertirse a PEP mediante la enzima PEP sintasa (PPS), por lo que la sobreexpresión de esta enzima se ha estudiado con el fin de aumentar la disponibilidad de PEP (Miller *et. al.*, 1987)

3.2.1. Sistema de Transporte Fosfotransferasa (PTS)

En *E. coli*, el transporte de algunos azúcares como la glucosa, depende de un sistema constituido por varias proteínas denominado sistema de fosfotransferasa (PTS) (Postma *et. al.* 1987). Es un sistema complejo que consta de proteínas que funcionan como una cadena de transportadores del grupo fosfato de alta energía del PEP hasta el azúcar a transportar (Figura 4)

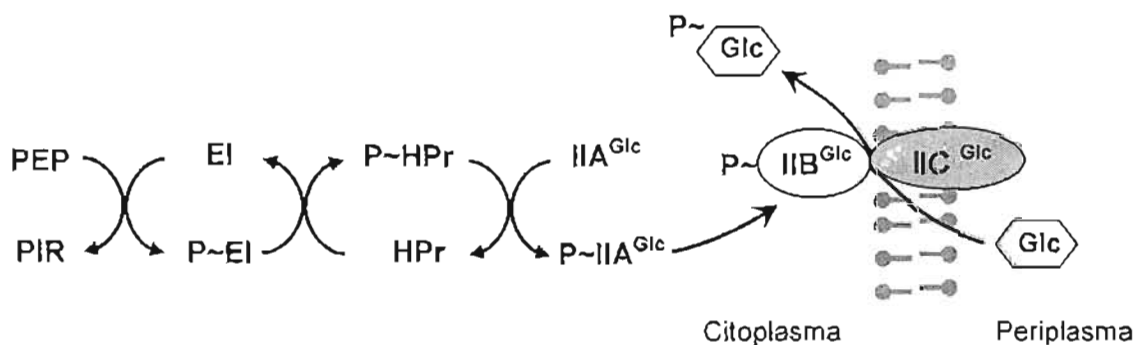


Figura 4. Componentes del Sistema de Transportes Fosfotransferasa (PTS).

Las dos primeras proteínas son comunes a los diversos sustratos a transportar, se localizan en el citoplasma y se conocen como Enzima I (EI) y HPr (esta última es una pequeña proteína termoestable, rica en histidina). El otro componente, llamado Enzima II (EII) es específico para cada azúcar. La enzima II específica para glucosa

consta de tres subunidades. El dominio soluble se denomina IIA^{Glc} (codificado por el gen *crr*) y dos dominios unidos a la membrana (IICB^{Glc}, codificados por el gen *ptsG*).

En la glucólisis, por cada molécula de glucosa que se internaliza en la célula, se generan dos moléculas de PEP. Una de esas moléculas de PEP se consume por el sistema PTS en el transporte de la siguiente molécula de glucosa que entra.

El control fino y complejo que el sistema ejerce sobre el consumo de mezclas de azúcares y su dependencia de PEP para transportar azúcares, constituyen una desventaja para algunos procesos ya que representa un factor limitante en la producción de compuestos que se deriven parcial o totalmente del PEP, entre ellos los llamados aromáticos.

Considerando esta situación, en trabajos previos (Flores et al. 1996), nuestro grupo decidió emplear la ingeniería metabólica para desarrollar cepas de *E. coli* que carecieran del sistema PTS, pero que tuvieran la capacidad de transportar glucosa eficientemente. Con este propósito se generó la cepa PB11 por delección del sistema PTS (Δ PTS) a partir una cepa de *E. coli* (JM101). Esta cepa tiene una capacidad muy limitada para crecer utilizando glucosa como fuente de carbono (fenotipo PTS-Glc). A partir de esta mutante y por medio de cultivos en quimiostato con glucosa como única fuente de carbono, se aislaron cepas que son capaces de crecer en glucosa (PTS-Glc⁺). Estas mutantes se denominaron PB12 y PB13 y utilizan el sistema GalP para transportar glucosa y la enzima glucocinasa para fosforilarla (Flores, et al 1996; Flores et al. 2002).

3.2.1.1. Distribución de flujos de carbono en la cepa PB12

Como parte de la caracterización a nivel metabólico de estas cepas, se ha empleado la técnica de resonancia magnética nuclear (RMN) para caracterizar la distribución de flujos de carbono relativos (referidos como porcentajes molares de consumo de glucosa). En la figura 5 se muestran los flujos de carbono relativos de la cepa progenitora JM101 y de la cepa PB12, en cultivos en medio mínimo.

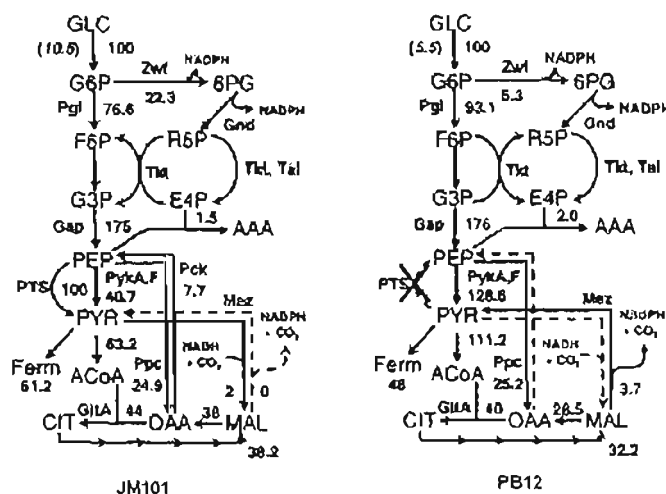


Figura 5. Comparación de la distribución de los flujos de carbono en el metabolismo central, determinados por resonancia magnética nuclear para las cepas JM101 y PB12. Los flujos de carbono relativos se encuentran referidos como porcentajes molares de consumo de glucosa.

Comparado con lo observado en la cepa JM101, existe una disminución importante en la PB12 del flujo de carbono hacia el brazo oxidativo de la vía de las pentosas. En la cepa JM101, el sistema PTS es el mayor consumidor de PEP (100%). En la cepa PB12 son las piruvato cinasas las que consumen la mayor cantidad de PEP (128.6%), por lo que su inactivación pudiera dar lugar a un incremento en la disponibilidad de este precursor que podría ser canalizado hacia la producción de aminoácidos aromáticos. El flujo de carbono metabolizado por la enzima Pck es prácticamente cero en la cepa PB12, contrario a lo observado en la cepa JM101 (7.7%), mientras que el flujo de carbono de la enzima málica hacia piruvato es de un 4% en la PB12 y 0% en la JM101 (Flores, et al 2002).

3.2.2. Isoenzimas Piruvato Cinasas

El piruvato es un intermediario clave en las reacciones catabólicas y biosintéticas. Cuando *E. coli* crece en glucosa como única fuente de carbono, sintetiza piruvato a través del sistema PTS. Otro mecanismo para sintetizar piruvato es mediante las piruvato cinasas. *E. coli* posee dos isoenzimas piruvato cinasas (PYK, codificadas por los genes *pykA* y *pykF*) que catalizan la conversión de PEP y ADP a piruvato y ATP. Esta reacción es el último paso de la vía glucolítica y es irreversible en condiciones fisiológicas. Junto con la fosfofructocinasa, estas enzimas juegan un rol importante en la regulación del flujo glucolítico.

En una cepa silvestre, la actividad de la enzima PYKF es 15 veces más alta que la isoenzima PYKA. Cuando una de ellas se inactiva, la actividad enzimática de la otra isoenzima se incrementa ligeramente (Tabla 1). La ausencia de una de las isoenzimas causa una ligera disminución en su crecimiento. Sin embargo la doble mutante tiene una disminución de su crecimiento del 28% con respecto a la cepa silvestre (Tabla 1). La doble mutante también presenta una mayor actividad en la vía de las PP. Por ensayos radiorespirométricos y medición de actividades enzimáticas, se concluyó que la glucosa se metaboliza principalmente a través de la vía de las PP (Ponce *et. al.* 1995; Ponce *et. al.* 1998).

En un fondo PTS⁻ Glc⁺ la inactivación de los genes *pykA* y *pykF* tiene consecuencias más drásticas. En el trabajo de Ponce y colaboradores (1995) se construyeron mutantes a partir de la cepa PB12 (PTS⁻ Glc⁺) que tuvieron inactivados una o ambas de las isoenzimas piruvato cinasas. En la tabla 1 se muestran los datos de crecimiento y actividades específicas para la cepa silvestre y las mutantes estudiadas. En cuanto a crecimiento, la mutante en *pykA* no muestra un cambio significativo con respecto a la cepa PB12, la mutante en *pykF* muestra un aumento en su tiempo de duplicación del 33% y la mutante *pykA*⁻*F*⁻ es incapaz de crecer en glucosa como única fuente de carbono. La cepa PB12 tiene una disminución en la actividad enzimática de PYKA. La actividad de PYKF en la mutante PTS⁻ Glc⁺ *pykA*⁻ permanece igual, mientras que la actividad de PYKA en la mutante PTS⁻ Glc⁺ *pykF*⁻ se incrementa en un 13% (Ponce *et. al.*, 1995).

Tabla 1. Actividades enzimáticas de las enzimas PykA y PykF y crecimiento de cepas de *E. coli* con diferentes fondos genéticos.

Cepa (Descripción)	t _D (min)	Act. Específica (IU/mg proteína)	
		PykA	PykF
JM101 (cepa silvestre)	58.8	0.42	0.026
PB22 (JM101, inactivada en <i>pykA</i>)	69.3	0.50	ND
PB24 (JM101, inactivada en <i>pykF</i>)	69.4	ND	0.029
PB25 (JM101, inactivada en <i>pykA</i> y <i>pykF</i>)	82.2	ND	ND
PB12 (mutante derivada de JM101, PTS ⁻ Glc ⁺)	106.4	0.25	0.037
PB26 (PB12, inactivada en <i>pykA</i>)	98.5	0.25	ND
PB27 (PB12, inactivada en <i>pykF</i>)	141.0	ND	0.042
PB28 (PB12, inactivada en <i>pykA</i> y <i>pykF</i>)		ND	ND

Con esto se puede ver que tanto en una cepa silvestre como en una cepa con el fenotipo PTS⁻ Glc⁺ la inactivación de una de las isoenzimas piruvato cinasas no causa un efecto tan marcado como el causado por una doble inactivación. En las mutantes sencillas la actividad de una de las isoenzimas compensa la que se inactivó. Sin embargo la doble inactivación de las isoenzimas piruvato cinasas causa un efecto más notorio. Este efecto es mayor en una cepa PTS⁻ Glc⁺ *pykA*⁻ *pykF*⁻ ya que pierde las dos principales vías de síntesis de piruvato y por lo tanto es incapaz de crecer en glucosa como única fuente de carbono.

3.2.3. Producción de compuestos de interés industrial utilizando cepas con modificaciones en el metabolismo central.

El PEP participa en algunas vías metabólicas como precursor de varios compuestos. (Figura 6). Es por eso que al aumentar la disponibilidad del PEP se puede dirigir un mayor flujo de carbono hacia alguna de estas rutas y obtener mayores rendimientos.

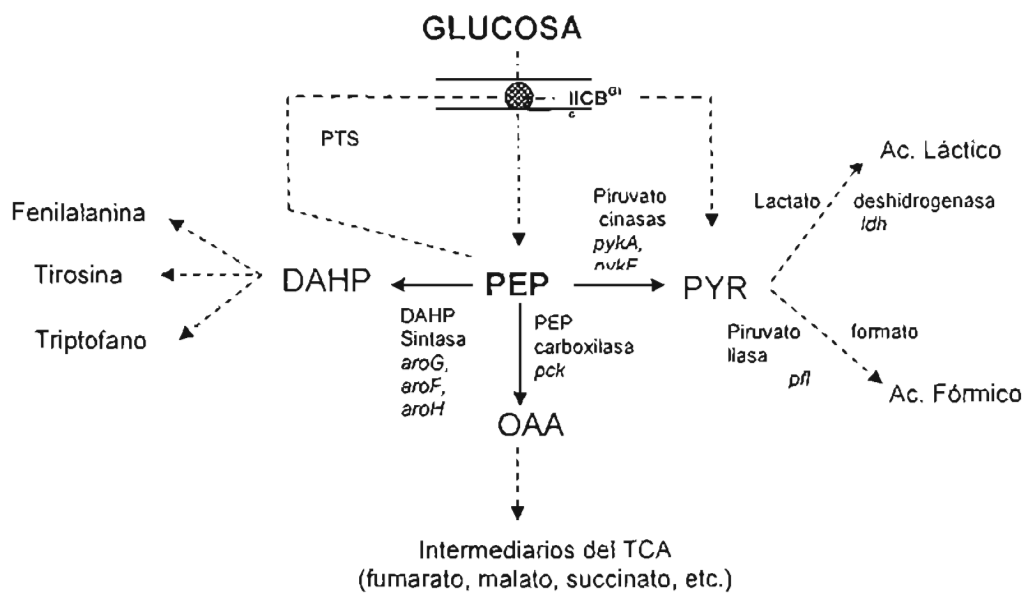


Figura 6. Compuestos que pueden generarse a partir del PEP.

Se han utilizado mutantes en *ptsG* para evaluar la producción de compuestos derivados del PEP como el succinato. Una cepa *pfl-ldh* (que tiene inactivadas la enzima piruvato formato liasa y la enzima lactato deshidrogenasa) con una mutación en el sistema de fosfotransferasa (*ptsG*) tuvo un rendimiento mayor de succinato en *E. coli*

(Chatterjee *et al.*, 2001). A partir de la cepa NZN11 (*pfl-ldh⁻*) se generó una mutante que recupera su capacidad de crecer fermentativamente en glucosa. La mutación que se generó se localiza en el gen *ptsG*, el cual codifica para una proteína del sistema PTS llamada EIICB^{Glc} que es específica para glucosa. Esta cepa cambia la distribución de sus productos de fermentación, obteniendo aproximadamente un mol de succinato por mol de glucosa.

Como parte de la caracterización fisiológica de las cepas con el fenotipo PTS-Glc⁺, se demostró que poseen el potencial para la síntesis de compuestos aromáticos con un alto rendimiento a partir de glucosa (Gosset, *et al.* 1996; Flores, *et al.* 1996; Báez *et al.*, 2001; Báez-Viveros *et al.*, 2004).

El trabajo de Gosset y colaboradores (1996) comparó la producción de los aromáticos en un medio rico, utilizando diferentes modificaciones sobre el metabolismo central como el sistema PTS y las isoenzimas piruvato cinasas. En la figura 7 se muestra la comparación entre las diferentes estrategias utilizadas.

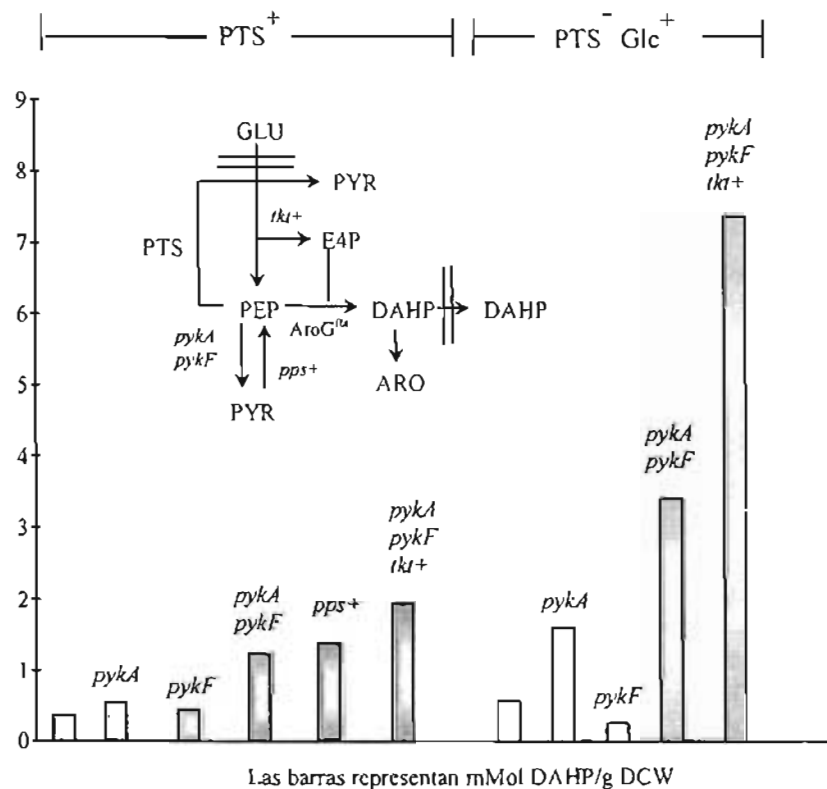


Figura 7. Cantidad de DAHP acumulado en mMol DAHP/g DCW utilizando diferentes modificaciones en el metabolismo central.

En este trabajo se evaluaron diferentes estrategias para incrementar el flujo hacia aminoácidos aromáticos, midiendo la cantidad de DAHP que las cepas excretan. En una cepa silvestre la inactivación de los genes *pykA* y *pykF* incrementaron el flujo de carbono hacia aromáticos 3.4 veces. La sobreexpresión del gen *pps* generó un incremento similar. Una cepa PTS⁻ Glc⁺ incrementa el flujo hacia aromáticos 1.6 veces más que la cepa silvestre. La inactivación de los genes *pykA* y *pykF* incrementó 5.8 veces el flujo hacia aromáticos. En esta cepa, la sobreexpresión del gen *tktA* incrementó el flujo hacia aromáticos 19.9 veces.

3.3. Aminoácidos Aromáticos y sus derivados.

Los aminoácidos aromáticos L-fenilalanina (L-Fen), L-tirosina (L-Tir), L-triptofano (L-Trp) y sus derivados son compuestos de importancia económica por su uso en la industria alimenticia como aditivos, saborizantes y aromatizantes. También se utilizan como precursores en la síntesis de fármacos y en la producción de cosméticos. (Bongaerts *et. al.*, 2001).

El triptofano tiene un uso importante en la industria alimenticia principalmente como aditivo. La fenilalanina se utiliza principalmente como precursor del edulcorante artificial (aspartame), aunque también se utiliza como aditivo en alimentos y saborizante. La tirosina se produce en una pequeña escala y tiene un uso importante en la producción de L- DOPA que es una droga que se utiliza en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. La tirosina también se utiliza como tratamiento para la enfermedad de Basedow y como suplemento alimenticio (Bongaerts *et. al.*, 2001).

Los aminoácidos aromáticos pueden sintetizarse a través métodos químicos, usando compuestos derivados del petróleo como materia prima . Entre algunos de los inconvenientes de la síntesis química esta la generación de contaminación y que la síntesis química genera mezclas racémicas de las formas L y D, por lo que es necesario un proceso de purificación. Estos productos de interés comercial también pueden sintetizarse utilizando microorganismos.

Existen numerosos microorganismos que tienen el potencial de sobreproducir aminoácidos aromáticos. Algunos de estos microorganismos son *Corinebacterium glutamicum* y *Escherichia coli*. . En la vía de síntesis de los aminoácidos aromáticos (o vía del siquimato) también se generan intermediarios que también son de interés industrial (Figura 8).

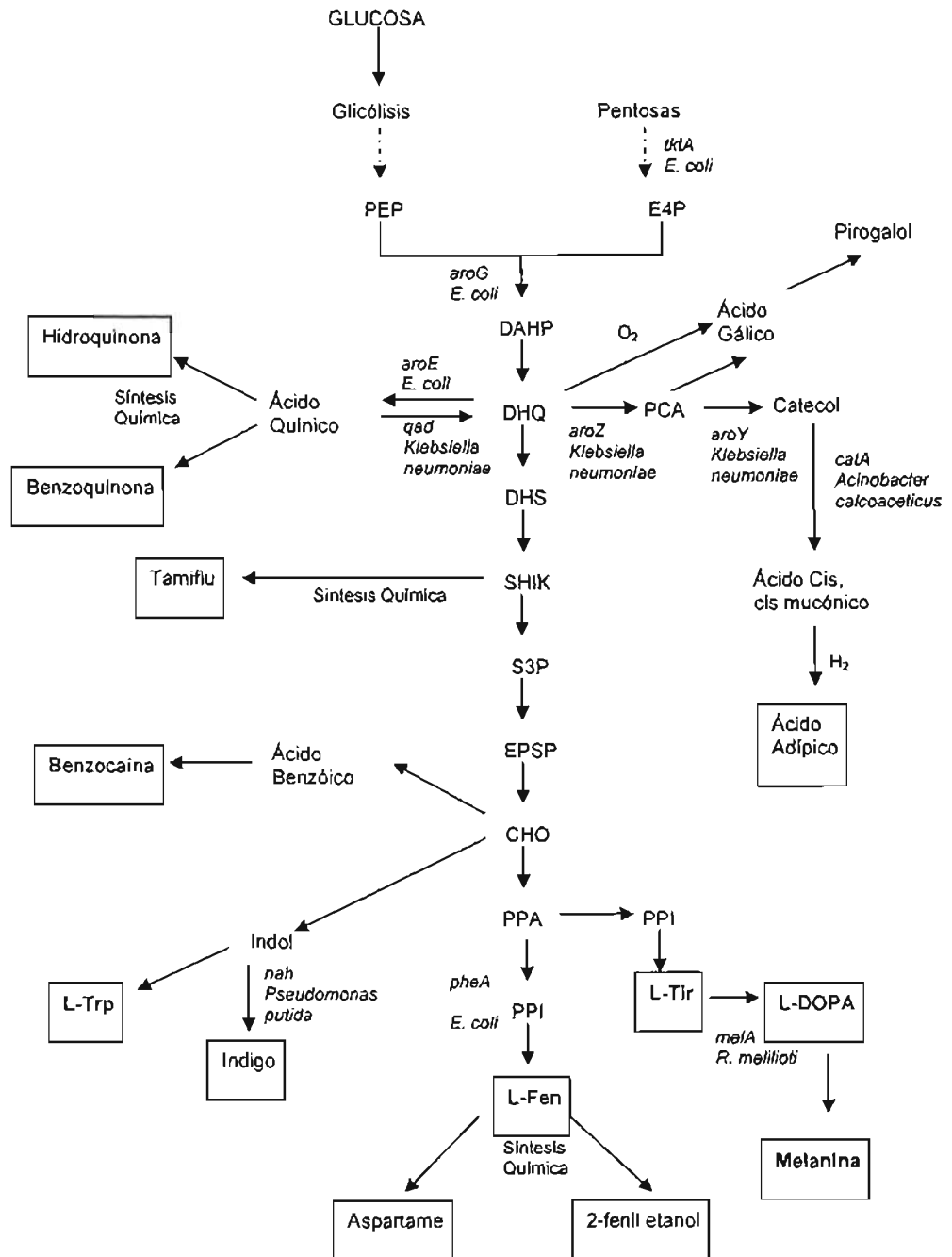


Figura 8. Compuestos de importancia industrial derivados de la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos.

Aparte de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) algunos de los compuestos de interés industrial que se han sintetizado utilizando microorganismos modificados son intermediarios de la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos, como el 3-desoxi-D-arabino-heptulosa 7-fosfato (DAHP) (Patnaiak y Liao, 1994; Gosset *et al.* 1992; Baez *et al.* 2001), 3-dehidroquinato (DHQ) (Draths *et al.*,

1992; Ran *et. al.*, 2001), 3-deshidrosiquimato (DHS) (Li, *et. al.*, 1999; Yi *et. al.*, 1991) y siquimato (SHIK) (Chandran, *et. al.*, 2003). Además, utilizando a estos intermediarios como precursores se ha podido sintetizar otros compuestos como melanina (Della-Cioppa, *et. al.*, 1990), índigo (Murdock *et. al.*, 1993; Berry *et. al.*, 1992), catecol (Draths y Frost, 1991), vainillina (Ki, *et. al.*, 1998), ácido adípico, L-Dopa, aspartamo (Murata *et. al.* 1993), ácido paraminobenzóico (Kaplan *et. al.*, 1983; Goncharoff *et. al.*, 1984; Green *et. al.*, 1992), etc.

3.3.1 Biosíntesis de Aminoácidos Aromáticos

Las plantas y los microorganismos poseen la maquinaria necesaria para convertir los carbohidratos simples, como la glucosa, en aminoácidos como glutamato, lisina, glutamina, arginina, y aminoácidos aromáticos. Los aminoácidos aromáticos se muestran en la figura 9. Cada uno de estos aminoácidos contiene nueve átomos de carbono, si se toma en cuenta el anillo aromático. Dos moléculas de fosfoenolpiruvato y una molécula de eritrosa 4-fosfato aportan estos átomos de carbono, perdiendo un átomo de carbono en forma de CO_2 .

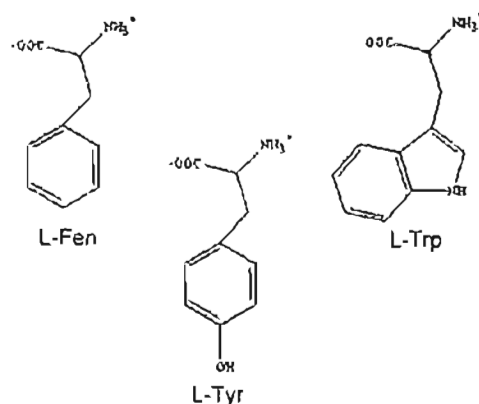


Figura 9. Aminoácidos aromáticos.

La vía de síntesis de compuestos aromáticos es una fuente de metabolitos esenciales, así como de un gran número de los llamados metabolitos secundarios en bacterias y plantas.

En la figura 10 se muestra un esquema de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y su regulación en *E. coli*. La biosíntesis de aminoácidos aromáticos comprende una vía común denominada vía del siquimato y tres vías específicas para

cada aminoácido. Como se puede observar, esta ruta biosintética está altamente regulada de forma alostérica y transcripcional.

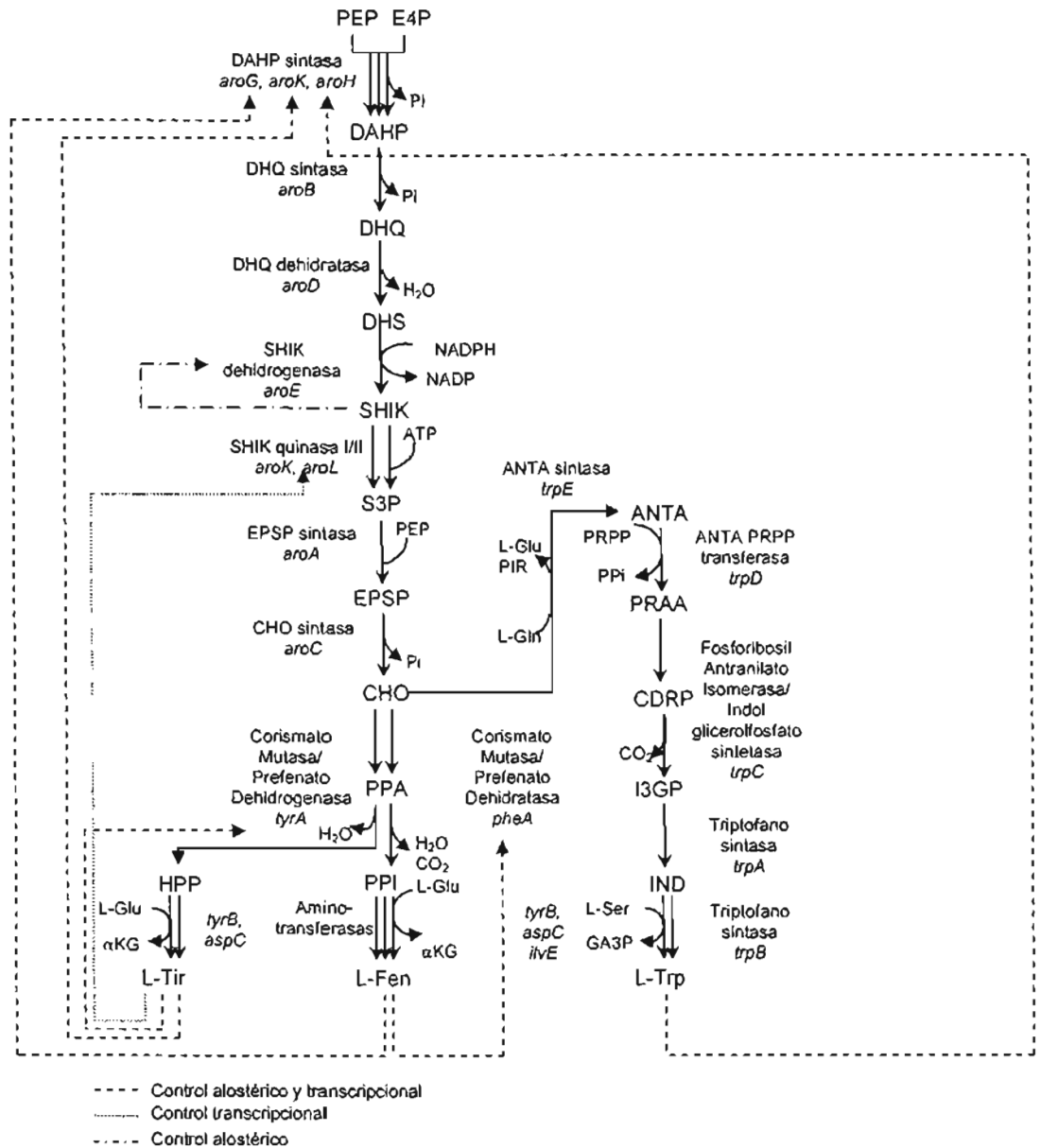


Figura 10. Biosíntesis de aminoácidos aromáticos. Las abreviaciones usadas son: ANTA, antranilato; α KG, α -cetoglutarato; CDRP, 1-(*o*-carboxifenilamino)-1-deoxiribulosa-5-fosfato; CHO, corismato; DAHP, 3-deoxi-*D*-arabino-heptulosa-7-fosfato; DHQ, 3-dehidroquinato; DHS, 3-dehidrosiquimato; EPSP, 5-enolpiruvatosiquimato 3-fosfato; E4P, eritrosa 4-fosfato; GA3P, gliceraldehído 3-fosfato; HPP, 4-hidroxifenilpiruvato; I3GP, indol 3-glicerol-fosfato; IND, indol; L-Glu, L-glutamina; L-Glu, L-Glutamato; L-Fen, L-fenilalanina; L-Ser, L-serina. L-Trp, L-triptófano; L-Tir, L-tirosina; PEP, fosfoenilpiruvato; PPA, prefenato; PPI, fenilpiruvato; PRAA, fosforibosil antranilato; PRPP, 5-fosforibosil- α -pirofosfato; PIR, piruvato; SHIK, siquimato; S3P, siquimato 3-fosfato.

3.3.2. Vía del siquimato

La biosíntesis de los aminoácidos aromáticos comprende una vía común (Vía del siquimato) que comienza con la condensación de E4P y PEP para formar DAHP, y tras siete reacciones enzimáticas llega a la formación de corismato (Figura 11). A partir de éste se generan las vías de síntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano, así como la de otros compuestos aromáticos como la ubiquinona, menaquinona, ácido fólico, vitaminas aromáticas, etc.

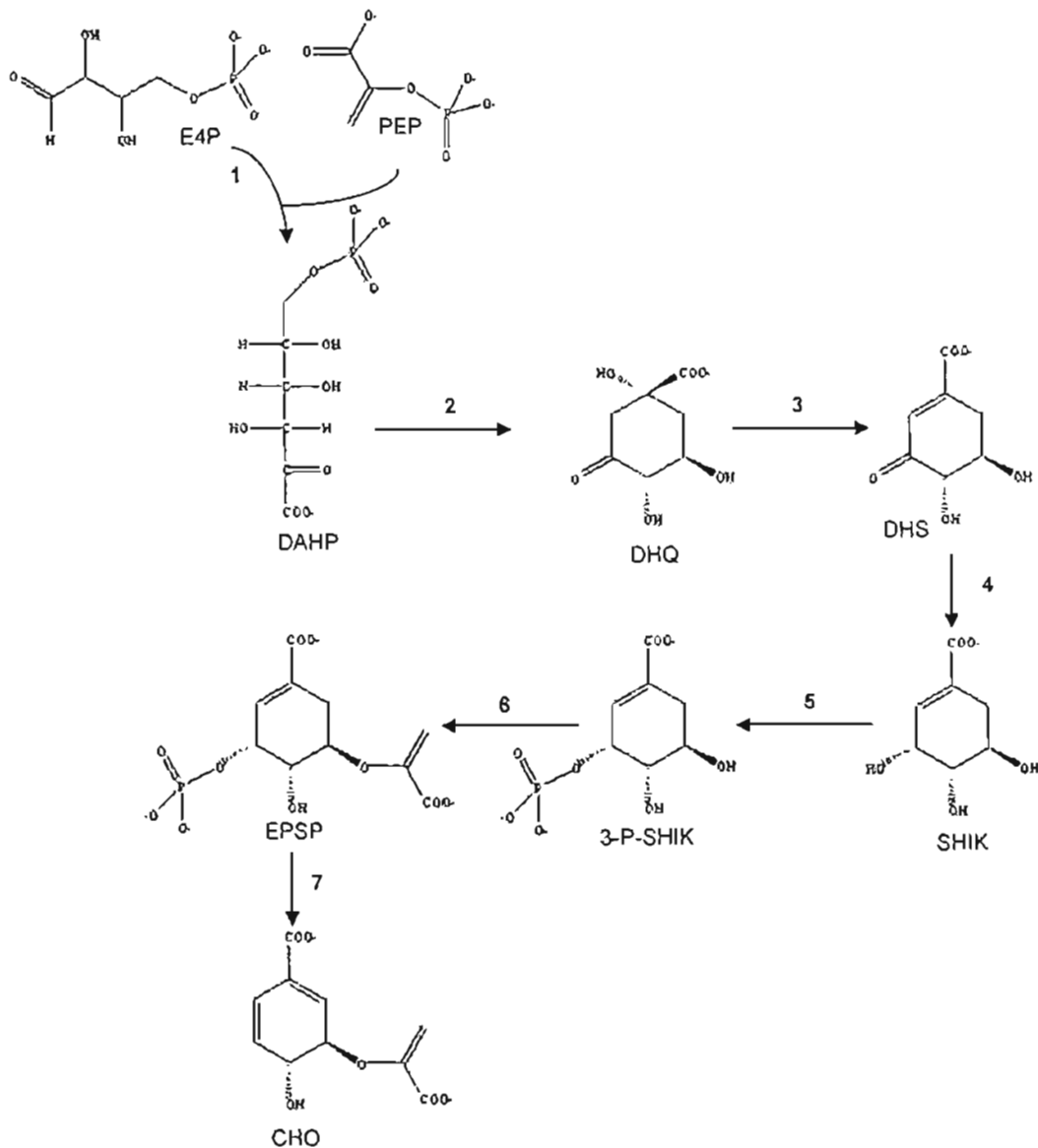


Figura 11. Vía del Siquimato.

Esta vía se encuentra altamente regulada de manera transcripcional y alostérica. La regulación transcripcional de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, así como su transporte se encuentra mediada por *tyrR* (Wallace *et. al.*, 1969; Camakaris *et. al.*, 1973) y *trpR* (Cohen *et. al.*, 1959). Además de la regulación en el nivel de expresión, existe una inhibición alostérica en el primer paso de la vía común, llevado a cabo por la enzima DAHP sintasa, así como en las enzimas corismato mutasa/prefenato dehidrogenasa, corismato mutasa/prefenato dehidrogenasa y la antranilato sintasa. En la tabla 2 se muestran las reacciones así como la regulación de la vía común de aminoácidos aromáticos y de la vía de síntesis de fenilalanina.

Tabla 2. Reacciones de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en *E. coli* y su regulación.

Número de reacción (Figura 11)	Enzima	Gene	Regulación	Producto sintetizado
1	3-desoxi-D- <i>arabino</i> -heptulosonato-7-fosfato (DAHP) sintasa	<i>aroF</i> , <i>aroG</i> , <i>aroH</i>	<i>tyrR/trpR</i> , L-Tir, L-Fen, L-Trp	DAHP
2	3-deshidroquinato (DHQ) sintasa	<i>aroB</i>		DHQ
3	3-dehidroquinato (DHS) deshidratasa	<i>aroD</i>		DHS
4	3-dehidrosiquimato (DHS) deshidrogenasa	<i>aroE</i>	SHIK	SHIK
5	Siquimato cinasa I/III	<i>aroL</i> , <i>aroK</i>	<i>tyrR, trpR</i>	S3P
6	5-enolpiruvatosiquimato-3-fosfato (EPSP) sintasa	<i>araA</i>		EPSP
7	Corismato (CHO) sintasa	<i>aroC</i>		CHO
	Corismato mutasa/prefenato deshidratasa	<i>pheA</i>	<i>tyrR</i> , L- Fen	PPA y PPY
	Amino transferasas	<i>tyrB</i> , <i>aspC</i> , <i>itvE</i>		Fen

3.3.2.1. 3-Desoxi-D-*arabino*-heptulosonato 7-fosfato Sintasa

El primer paso enzimático de la vía de aminoácidos aromáticos consiste en la condensación de E4P y PEP para formar DAHP y fosfato. Esta reacción la lleva a cabo la enzima DAHP sintasa. *E. coli* posee tres isoenzimas DAHP sintasas codificadas por los genes *aroF*, *aroG* y *aroH*. Estas enzimas se controlan a nivel transcripcional y alostérico por cada uno de los aminoácidos aromáticos: tirosina (*aroF*), fenilalanina

(*aroG*) y triptofano (*aroH*) (Pittard, *et. al.*, 1996). En la figura 12 se muestra la regulación de la DAHP sintasa.

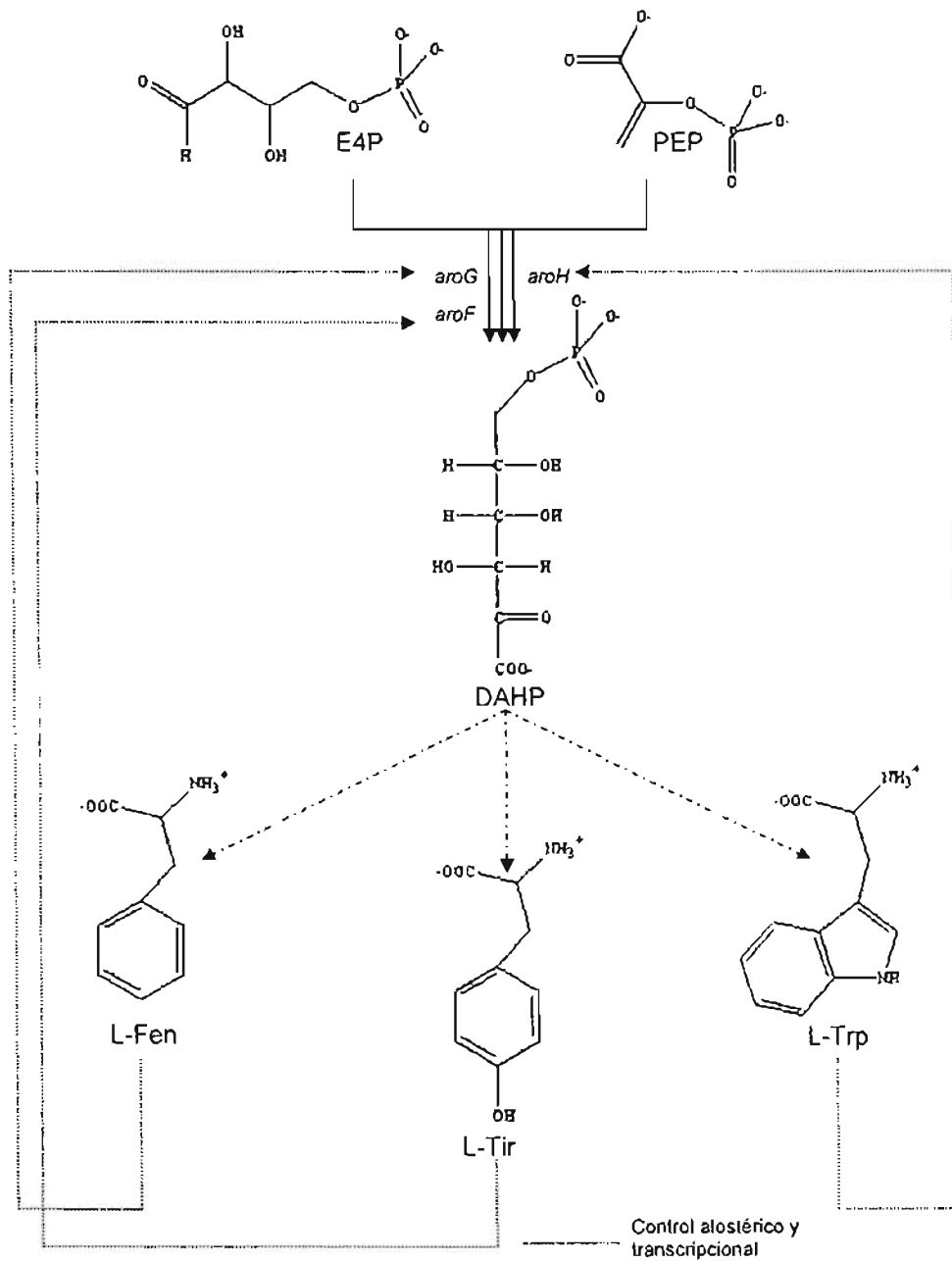


Figura 12. Regulación de la DAHP sintasa. *E. coli* posee tres isoenzimas DAHP sintasas (*aroF*, *aroG* y *aroH*). Estas enzimas están controladas a nivel transcripcional y alostérico por producto final (tirosina, fenilalanina y triptofano).

En una cepa silvestre de *E. coli* la enzima codificada por el gen *aroG* contribuye un 80% a la actividad total de la enzima DAHP sintasa (Tribe *et. al.*, 1976).

3.3.2.2. Estrategias que se han seguido en *E. coli* para la producción de aminoácidos aromáticos.

La biosíntesis de los aminoácidos aromáticos puede modificarse para producir una gran cantidad de estructuras aromáticas, que pueden utilizarse en la síntesis de compuestos industriales y medicinales, a partir de fuentes de carbono baratas y que no son tóxicas. Sin embargo, todos estos cambios pueden afectar el rendimiento, la velocidad de conversión producto/sustrato o la pureza del compuesto que se busca sintetizar.

Para obtener cepas productoras de compuestos aromáticos, un alto porcentaje de la glucosa consumida debe ser dirigida hacia la síntesis de DAHP. Finalmente el flujo de carbono debe dirigirse hacia la síntesis particular de cada uno de los aminoácidos aromáticos.

La sobreexpresión de la DAHP sintasa es solo uno de los elementos necesarios para incrementar el flujo de carbono hacia la vía común de aminoácidos aromáticos. Un factor crítico es el control alostérico que existe sobre algunas enzimas de la vía de aromáticos, por lo que el uso de DAHP sintasas insensibles a inhibición alostérica es una de las principales estrategias que se ha seguido para la síntesis microbológica de forma comercial de algunos productos como la L-Fen y L-Trp.

La disponibilidad de los precursores (E4P y PEP) también es un factor importante que limita la actividad de la DAHP sintasa in vivo.

3.3.2.2.1. Incremento en la disponibilidad de eritrosa-4-fosfato (E4P)

La E4P es uno de los precursores de los aminoácidos aromáticos, la disponibilidad de éste es un aspecto que se ha tratado de incrementar para obtener mejores rendimientos de aminoácidos aromáticos o de algún intermediario de la vía de síntesis.

3.3.2.2.1.1. Sobreexpresión de las enzimas transcetolasa (TKT) y transaldolasa (TAL)

La E4P es uno de los precursores de los aminoácidos aromáticos. Este compuesto se produce en la parte no oxidativa de la vía de las pentosas fosfato. Las enzimas transcetolasa y transaldolasa catalizan las reacciones que llevan de fructosa-6-

fosfato a gliceraldehído-3- fosfato y E4P. El incremento en la disponibilidad de E4P se ha estudiado cuando los niveles de expresión de la transcetolasa o la transaldolasa son mayores.

Se ha demostrado que la sobreexpresión de la transcetolasa incrementa el flujo de carbono hacia la vía de aromáticos (Draths *et. al.*, 1992). El impacto de la transaldolasa sobre el flujo hacia aromáticos se ha analizado y se ha demostrado que incrementa el flujo hacia aromáticos significativamente (Lu *et. al.*, 1997).

3.3.2.2.1.1. Inactivación de la enzima fosfoglucosa isomerasa (PGI)

La delección del gen *pgi* altera el metabolismo de glucosa de tal manera que la conversión de glucosa a triptofano aumenta en una cepa modificada genéticamente para la producción de aromáticos (Mascareñas, 1991). El aumento del flujo hacia la vía de las pentosas genera un incremento en la disponibilidad de precursores necesarios para la biosíntesis de aromáticos:

3.3.2.2.2. Incremento en la disponibilidad de fosfoenolpiruvato (PEP)

El PEP es un intermediario que se encuentra involucrado en numerosos procesos celulares (Valle *et. al.*, 1996). El sistema PTS es el principal consumidor de PEP. Otras enzimas que utilizan PEP son las enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa (PPC), las piruvato cinasas (PYKA y PYKF) y la DAHP sintasa. Además de la glucólisis, hay otras vías que generan PEP. Las enzimas que participan en la formación de PEP son la PEP sintasa (PPS) y la PEP carboxiquinasa (PCK). Esta última actúa en condiciones gluconeogénicas. Dado que el PEP es precursor de los aminoácidos aromáticos, el aumento en la disponibilidad de PEP podría ocasionar un aumento en la síntesis de aminoácidos aromáticos. Algunas estrategias que se han seguido para aumentar la disponibilidad de PEP es inactivar las reacciones que lo consumen (PPC, PYKA, PYKF, PTS) o aumentar la formación de PEP, sobreexpresando las enzimas que lo producen (PPS).

3.3.2.2.1 Inactivación de la enzima PEP carboxilasa (PPC)

La enzima PPC cataliza la conversión de PEP a oxaloacetato. La inactivación de esta enzima aumentó la producción de fenilalanina en una cepa de *E. coli* aunque también se incrementó la producción de acetato y piruvato. Además de eso, la cepa *ppc-* genera menos biomasa y requiere de la adición de otro sustrato para crecer (Miller *et.al.*, 1987). En una cepa productora de DAHP, la inactivación del gen *ppc* no aumentó la producción de DAHP (Patnaiak y Liao *et.al.*, 1994).

3.3.2.2.2. Inactivación de las isoenzimas piruvato cinasas (PYKA, PYKF)

Las isoenzimas piruvato cinasas catalizan la reacción que convierte el PEP en piruvato. La inactivación de estas enzimas se evaluó en base a la capacidad de producción de DAHP en medio LB (Gosset *et. al.*, 1996). La inactivación de *pykA* o de *pykF* no aumentó significativamente el flujo hacia aromáticos. La inactivación de ambas isoenzimas en combinación con otras estrategias (uso de una cepa PTS-Glc⁺ y la sobreexpresión de *tklA*) incrementó 19.9 veces el flujo de carbono hacia la biosíntesis de aromáticos.

3.3.2.2.3. Sobreexpresión del gen *pps*

Una de las estrategias que se ha seguido para aumentar la disponibilidad de PEP es sobreexpresar el gen *pps*. Este gen codifica para la enzima PEP sintasa que cataliza la conversión de piruvato a PEP. En condiciones normales, *E. coli* no lleva a cabo esa reacción debido al costo energético que tiene. La sobreexpresión del gen *pps* tuvo un efecto positivo sobre la producción de DAHP en una cepa en donde también se sobreexpresaba *tklA* y un gen que codifica para una DAHP sintasa insensible a retroinhibición (Patnaiak *et. al.*, 1994).

3.3.2.2.4. Inactivación del sistema PTS

Una cepa que no utilice el sistema PTS para transportar glucosa tendría, en teoría, dos moles de PEP disponibles por cada mol de glucosa que entre. Esta cepa

tendría el potencial de dirigir un mayor flujo de carbono hacia la biosíntesis de aminoácidos aromáticos.

En varios trabajos se ha evaluado el aumento en la disponibilidad de PEP cuando se utilizan cepas con alguna modificación en el sistema PTS, ya sea una delección de algún gen, la inactivación total del sistema PTS y la sustitución del sistema PTS por otro mecanismo de transporte de glucosa (Báez *et. al.*, 2001; Chen *et. al.*, 1997; Chandran *et. al.*, 2003; Gosset *et. al.*, 1996; Yi *et. al.*, 2003).

La cepa PB12 (mutante generada a partir de una cepa PTS⁻) puede dirigir un flujo mayor de carbono hacia la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (Gosset *et. al.*, 1996; Flores *et. al.*, 1996). Recientemente se inició un proyecto para desarrollar cepas PTS-Glc⁺ de *E. coli* con la capacidad de sintetizar fenilalanina con un alto rendimiento a partir de glucosa (Báez-Viveros *et. al.*, 2004) utilizando también técnicas de evolución dirigida de proteínas.

3.3.2.2.5. Utilización de azúcares no PTS

El sistema PTS es uno de los principales consumidores de PEP y por lo tanto es una desventaja para la producción de aminoácidos aromáticos. Además el piruvato producido por el PTS no puede convertirse en PEP debido a que la enzima que lleva a cabo esta reacción (PPS) no se induce en presencia de glucosa. Utilizando azúcares no-PTS como la xilosa se puede aumentar el flujo hacia aromáticos (Frost, *et.al.*, 1995; Patnaiak, 1995). La producción de DAHP utilizando xilosa como sustrato alcanza el rendimiento máximo teórico (0.71 mol/mol) en cepas de *E. coli* que sobreexpresan la DAHP sintasa.

3.3.2.2.3. Eliminación de la inhibición por retroalimentación

En cepas productoras de aromáticos, la actividad de la DAHP sintasa se reduce considerablemente como resultado de control por retroalimentación de los productos finales. La regulación a nivel transcripcional se puede eliminar colocando los genes regulados bajo promotores que no se regulen por TrpR/TTR o por delección de los reguladores (LaDuca *et. al.*, 1999; Berry, 1996). La inhibición alostérica se puede eliminar utilizando mutantes resistentes a inhibición. Algunas de estas DAHP sintasas

mutantes han sido caracterizadas y utilizadas para la producción de aminoácidos aromáticos.

También se han seleccionado mutantes de la enzima CM-PDT que son resistentes a inhibición por L-Fen. La modificación de Trp226 y Trp338 dan como resultado mutantes resistentes a inhibición por L-Fen (Gething *et. al.*, 1976), así como las sustituciones en la Serina 330 o la eliminación de los residuos de aminoácidos localizados después de este residuo (Tonouchi *et. al.*, 1997). Las mutaciones en los codones 304 al 310 del gen *pheA* exhiben una completa resistencia a inhibición por retroalimentación, incluso en presencia de altas concentraciones de L-Fen (Nelms *et. al.*, 1992). Algunas de estas versiones del gen *pheA^{br}* (resistentes a inhibición por retroalimentación) se han utilizado para evaluar la producción de aminoácidos aromáticos.

3.3.2.2.4. Evolución dirigida de proteínas.

Se generó una versión mutante de la enzima corismato mutasa-prefenato deshidratasa (CM-PDT) que carece del dominio de inhibición alostérica. El gene *pheA* truncado se le nombró *pheA^{br}*. Para mejorar los parámetros catalíticos de la enzima que codifica el gene *pheA^{br}* se decidió emplear una estrategia de ingeniería de proteínas, llamada evolución dirigida, para seleccionar variantes de la proteína PheA^{br}. De esta manera se obtuvieron las mutantes evolucionadas PheA^{ev1} y PheA^{ev2}.

Se han logrado rendimientos para la producción de fenilalanina a partir de glucosa, cercanos al 60% del máximo teórico al utilizar la cepa PB12 que expresa el gene que codifica para las enzimas PheA^{ev1} ó PheA^{ev2}.

3.3.3. Síntesis de fenilalanina

La fenilalanina se produce industrialmente. Mediante métodos químicos o enzimáticos, la fenilalanina puede convertirse en aspartame (Pietsch ,1976, Ager, 1998) o en 2-feniletanol (Etschmann *et. al.* 2002). Estos dos compuestos se utilizan en la industria alimenticia. El aspartame es un edulcorante artificial de bajas calorías y el 2-feniletanol es un compuesto saborizante y aromatizante que se utiliza en la industria alimenticia y cosmética (Clark, 1990; Fabre *et. al.*, 1998)

La vía particular para la biosíntesis de L-Fen, L-Tir y L-Trp están sujetas a control transcripcional y alostérico. En *E. coli* la biosíntesis de L-Fen (Figura 13) comienza con la conversión de corismato (CHO) a preferato (PPA) y de preferato a fenilpiruvato (PPY). Estas dos reacciones las cataliza la enzima corismato mutasa-preferato deshidratasa (PheA). Esta enzima está retroinhibida alostéricamente por L-Fen.

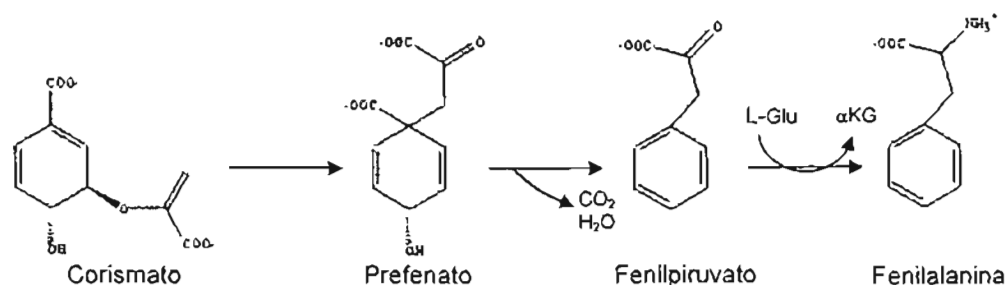


Figura 13. Biosíntesis de L-Fen.

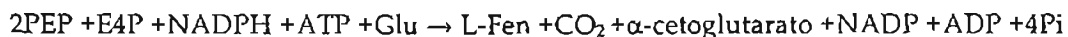
La producción biotecnológica de fenilalanina emplea cepas modificadas de *E. coli*. En particular, el tipo de alteración que se introduce es la resistencia a inhibición alostérica de las enzimas que regulan el flujo de carbono hacia la vía de síntesis del aminoácido. Estas tecnologías distan aún mucho de ser eficientes ya que el rendimiento promedio en la síntesis del aminoácido a partir de glucosa se aproxima al 30% del nivel máximo teórico. Una mejora significativa a las tecnologías actuales sería incrementar el rendimiento de fenilalanina a partir de glucosa.

3.3.3.1. Corismato Mutasa-preferato deshidratasa (CM-PDT)

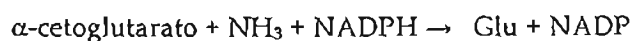
La conversión de CHO a PPA y de PPA a PPI se cataliza por la enzima corismato mutasa-preferato deshidratasa (*pheA*). Esta enzima se regula mediante mecanismos de represión y retroinhibición alostérica por L-Fen. Esta enzima bifuncional contiene dos dominios catalíticos, uno con actividad de corismato mutasa (residuos 1-109) y el otro con actividad de preferato deshidratasa (residuos 101-205). Además posee un dominio R responsable de la inhibición por retroalimentación por fenilalanina. La eliminación de este dominio inactiva el efecto de inhibición por L-Fen, aunque disminuye la afinidad por corismato (Pohnert *et. al.* 1999; Zhang *et. al.*, 1998).

3.3.3.2. Rendimiento máximo teórico de fenilalanina

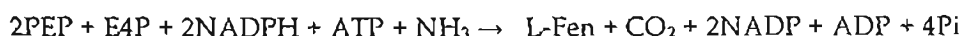
La estequiometría para la síntesis de fenilalanina se puede derivar de la vía común de aminoácidos aromáticos y de tres pasos finales que llevan a la formación de L-Fen (reacción 1)



La formación de glutamato se lleva a cabo como se muestra en la reacción 2:



Combinando las reacciones 1 y 2, tenemos que:



El rendimiento máximo teórico de L-Fen ($^{\text{max}}Y_{\text{L-Fen/Glc}}$) a partir de glucosa se ha calculado en base a la estequiometría de la biosíntesis de L-Fen, bajo diversas situaciones metabólicas (Förberg, 1998; Patnaiak, 1994). Para cepas silvestres el $^{\text{max}}Y_{\text{L-Fen/Glc}}$ es 0.275 g/g. Para una cepa modificada genéticamente, donde el PIR sea reciclado a PEP o que carezca del sistema PTS, el $^{\text{max}}Y_{\text{L-Fen/Glc}}$ puede incrementarse teóricamente a 0.55 g/g.

3.3.3.3. Ejemplos de producción de fenilalanina (L-Fen)

Existen varios trabajos donde se evalúa la producción de fenilalanina (L-Fen) utilizando microorganismos modificados (Förberg *et. al.* 1988, Chen *et. al.* 1997; Weikert *et. al.*, 1998; Tatarko y Romeo, 2002; Báez-Viveros *et. al.* 2004).

La inactivación de la enzima PPC en cepas de *E. coli*, que sobreexpresan una DAHP sintasa (*aroF*) y una enzima corismato mutasa preferato deshidratasa (CM-PDT) insensible a regulación, dio como resultado un rendimiento del 5% correspondiente al máximo teórico (Miller *et. al.*, 1987).

Förberg y colaboradores reportaron en 1988, la producción de fenilalanina en una cepa que portaba los genes *aroF* y *pheA^{br}* (CM-PDT insensible a retroinhibición por fenilalanina) en un sistema de células en reposo, obteniendo rendimientos del 50% del máximo teórico.

La inactivación del sistema PTS también se ha evaluado como una estrategia para aumentar la producción de fenilalanina. Cheng y colaboradores en 1997, utilizaron una cepa que utilizaba un sistema de transporte diferente al PTS (simporte de protones). Contrario a lo que se esperaba, esta cepa produce menos fenilalanina que una cepa silvestre. Sin embargo, existen otros trabajos donde la inactivación del sistema PTS, han dado como resultado un aumento en el flujo de aromáticos (Flores *et. al.* 1996; Gosset *et. al.* 1996). En una cepa de *E. coli* con el fenotipo PTS-Glc⁺, sobreexpresando los genes *tktA*, *aroG^{br}* y *pheA^{br}* se obtuvieron rendimientos de fenilalanina hasta del 60% del máximo teórico (Báez-viveros *et. al.*, 2004)

3.3.3.4. Ejemplos de la producción de compuestos aromáticos en *Escherichia coli*.

3.3.3.4.1. Triptofano e Índigo.

La vía de síntesis de aminoácidos aromáticos se ha tratado de optimizar no solo para la producción de éstos, sino para la producción de otros compuestos aromáticos de interés industrial. Un ejemplo de esto es la producción de índigo en *E. coli* utilizando cepas modificadas en la vía de aromáticos y mediante la introducción de genes heterólogos.

Las cepas recombinantes de *E. coli* usadas para la producción de índigo están modificadas en la vía del triptofano. Una de las estrategias para obtener cepas sobreproductoras de triptofano es introducir los genes que codifican para una DAHP sintasa y una antranilato sintasa insensibles a inhibición (*aroG^{br}* y *trpE^{br}*) en una cepa que contiene numerosas mutaciones (definidas e indefinidas) que le permiten incrementar la producción de triptofano (Berry, 1996).

En una cepa sobreproductora de triptofano como la que se describió anteriormente la inactivación de los genes *trpR* y *tnaA2* da como resultado una cepa con altos niveles de producción de indol que es el precursor del colorante. La introducción de los genes de *Pseudomonas putida*, que codifican para una naftaleno

dioxigenasa (NDO) le permiten a esta cepa producir indol a partir de glucosa (Berry *et. al.* 2002).

3.3.3.4.2. Siquimato (SHIK)

El SHIK es un precursor en la síntesis varios compuestos como el catecol, el ácido gálico y el pirogalol. También se utiliza como materia prima para la fabricación de Tamiflú, un agente antiinfluenza. El SHIK es uno de los intermediarios de la síntesis de aminoácidos aromáticos.

Una estrategia que se ha seguido para la producción de SHIK en *E. coli* es la sobreexpresión de los genes que codificaran para una DAHP sintasa insensible a retroinhibición (*aroF^{hr}*) y para la transcetolasa (*tktA*). Además para incrementar la disponibilidad de PEP se ha evaluado la sobreexpresión de la enzima PEP sintasa (PPS) y el uso de diferentes sistemas de transporte de glucosa (Chandran *et. al.*, 2002; Yi, *et. al.*, 2002; Yi *et. al.*, 2003).

3.3.3.4.3. 3-dehidrosiquimato (DHS) y derivados

El DHS es un intermediario aromático que se utiliza como precursor en la síntesis del catecol, el ácido adípico y la vainillina.

En el trabajo de Niu y colaboradores (2002) se construyeron cepas de *E. coli* sobreproductoras de DHS para evaluar la síntesis de ácido *cis, cis* mucónico a partir de glucosa. También se evaluó la hidrogenación de este compuesto para formar ácido adípico. El ácido *cis, cis* mucónico se sintetiza a partir de DHS mediante la introducción de dos genes heterólogos.

La vainillina es un saborizante aromático utilizado en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética. Se ha podido sintetizar vainillina a partir del DHS que acumula una cepa de *E. coli* sobreproductora de DHS. (Priefert, *et. al.*, 2001)

4. JUSTIFICACIÓN

- Las tecnologías de producción de L-fenilalanina aún pueden mejorarse ya que el rendimiento promedio en la síntesis a partir de glucosa se aproxima al 30% del nivel máximo teórico. Una mejora significativa a las tecnologías actuales sería incrementar el rendimiento de fenilalanina a partir de glucosa. Es por eso que en este trabajo se pretende evaluar el rendimiento y la productividad de L-Fenilalanina a partir de glucosa en cepas carentes del sistema PTS y que además tienen inactivadas las isoenzimas piruvato cinasas. Estas modificaciones ocasionarían una mayor disponibilidad de PEP que pudiera canalizarse hacia la biosíntesis de L-Fenilalanina.

5. HIPÓTESIS

- Si en una cepa PTS-Glc⁺, que expresa los genes *pheA^{ev1}* ó *pheA^{ev2}*, *aroG^{br}* y *tktA*, existe una conversión significativa de fosfoenolpiruvato en piruvato por las isoenzimas de piruvato cinasa, la inactivación de estas enzimas causará un incremento en la productividad y el rendimiento de L-fenilalanina a partir de glucosa.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

- Estudiar el efecto de la inactivación de las isoenzimas de piruvato cinasa sobre el metabolismo central y la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en cepas PTS⁻ Glc⁺ de *E. coli*.

6.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la máxima capacidad de síntesis de fenilalanina en la cepa PB28 (PTS⁻Glc⁺, *pykA-F*) en términos de rendimiento y productividad de L-Fen utilizando experimentos de células en reposo en medio mínimo M9 suplementado con glucosa (10g/L).
- Comparar la capacidad de producción de L-fenilalanina de la cepa PB28 con las cepas JM101 (PTS⁺) y PB12 (PTS⁻Glc⁺) transformadas con los plásmidos pJLBaroG^{fab}, pCL*tk*t y pTrc*pheA*^{ev2}. En base a estos resultados, determinar los pasos limitantes en la producción de L-Fen para la cepa PB28
- Evaluar el efecto de la alimentación de piruvato sobre el consumo de glucosa y la producción de aromáticas en la cepa PB28*tk*tGev2.
- Determinar el efecto de la presencia de plásmidos sobre la velocidad específica de consumo de glucosa en la cepa PB28.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Plásmidos

Todos los plásmidos que se utilizaron en este estudio se describen en la Tabla 3. El plásmido pCL*tkt* (Draths *et. al.*, 1992) contiene el gen *tktA* que codifica para la tranacetolasa A. El plásmido pJLBaroG^{fbr} (Báez-Viveros *et. al.*, 2004) porta el gen *aroG^{fbr}* bajo el control del promotor *lacUV5* y codifica para una DAHP sintasa insensible a retroinhibición (fbr) por L-Fen. Los plásmidos pTrc*pheA^{ev1}* y pTrc*pheA^{ev2}* (Báez- Viveros *et. al.*, 2004) contienen dos genes mutados que se generaron a partir del gen *pheA^{fbr}*. Los genes *pheA^{ev1}* y *pheA^{ev2}* codifican cada uno para una enzima corismato mutasa preferato deshidratasa resistente a retroinhibición por fenilalanina. Estas enzimas se obtuvieron mediante evolución dirigida de la proteína PheA^{fbr} (insensible a retroinhibición por fenilalanina) (Osuna *et. al.*, datos por publicar).

Los plásmidos se purificaron mediante el método de lisis alcalina y se cuantificaron por densitometría utilizando un analizador de imagen Eagle Eye II Stratagene.

7.2. Cepas

Todas las cepas utilizadas en este trabajo se encuentran descritas en la Tabla 3. *Escherichia coli* JM101 (PTS⁺) y sus derivadas PB12 (PTS⁻ Glc⁺) y PB28 (PTS-Glc⁺PykA⁻PykF⁻) fueron hospederos para la construcción de las cepas sobreproductoras de L-Fen fue. JM101 es la cepa progenitora de la mutante PB11, en la cual el operón PTS se escindió. En la cepa PB11 su capacidad de transporte y consumo de glucosa disminuyó drásticamente. Utilizando un cultivo continuo se seleccionó la cepa mutante PB12 a partir de la cepa PB11 por su habilidad de crecer más rápido utilizando glucosa como fuente de carbono (Flores, *et. al.* 1996). La cepa PB28 tiene el fenotipo PTS-Glc⁺ y tiene inactivadas las dos isoenzimas piruvato cinasas (Ponce, *et. al.*1995).

7.3. Construcción de las cepas de *E. coli* modificadas por ingeniería genética e ingeniería de proteínas.

La cepa PB28 se transformó con los plásmidos pJLBaroG^{fbr}, pCL*tkt* y se seleccionó con antibióticos. Posteriormente estas cepas se transformaron con el

plásmido pTrc*pheA*^{ev1} o pTrc*pheA*^{ev2}. La cepa PB28 también se transformó con diferentes combinaciones de plásmidos sin genes clonados. Se generaron un total de 8 combinaciones posibles, éstas se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Cepas y plásmidos que se utilizarán en este proyecto de investigación.

Cepa/plásmido	Características
JM101	<i>suoE</i> , <i>thi</i> , $\Delta(lac-proAB)$, <i>F'</i>
PB12	Similar a JM101, <i>ptsHI</i> ⁻ , <i>crr</i> y Glc ⁺
PB28	Similar a PB12, <i>pykA::cat</i> <i>pykf::genf</i>
PB28/pCL1920	PB28 transformada con el plásmido pCL vacío.
pB28/pTrc99A	PB28 transformada con el plásmido pTrc99A vacío.
PB28/pTrc99A,pACYC184	PB28 transformada con los plásmidos pTrc99A y pACYC184 vacíos
PB28Gev2	PB28/pJLBaroG ^{fb} r y pTrc <i>pheA</i> ^{ev2}
PB28tk	PB28/pCL <i>tk</i>
PB28tkG	PB28/pJLBaroG ^{fb} r y pCL <i>tk</i>
PB28tkGev1	PB28/pJLBaroG ^{fb} r, pCL <i>tk</i> y pTrc <i>pheA</i> ^{ev1}
PB28tkGev2	PB28/pJLBaroG ^{fb} r, pCL <i>tk</i> y pTrc <i>pheA</i> ^{ev2}
pCL <i>tk</i>	<i>tkA</i> (resistente a estreptomicina o espectinomicina)
pJLBaroG ^{fb} r	<i>aroG</i> ^{fb} r bajo el control del promotor <i>lacUV5</i> , genes <i>lacI^q</i> y <i>tet</i> . Origen de replicación de pACYC184
pTrc <i>pheA</i> ^{ev1} pTrc <i>pheA</i> ^{ev2}	<i>pheA</i> ^{ev1} o <i>pheA</i> ^{ev2} Resistente a inhibición por fenilalanina
pCL1920	Replicón derivado de pSC101, tamaño de 4.6 kbp, bajo n(úmero de copias (5 aproximadamente), resistente a estreptomicina o espectinomicina.
pACYC184	Replicón derivado de p15A , tamaño de 4.2 kbp, bajo número de copias (10 aproximadamente), resistente a tetraciclina
pTrc99A	Replicon de la familia de ColE1, tamaño de 4.2 kbp, alto número de copias (30 aproximadamente), resistente a ampicilina

7.4. Medios de cultivo

La composición química del medio M9 fue 211 mM Na₂HPO₄, 42.8 mM NaCl, 110 mM KH₂PO₄, 74.7 mM NH₄Cl, 1 mM MgSO₄, 50 μM CaCl₂ y 0.3 μM vitamina B1, 100 μM IPTG y 1 ml/L de solución de elementos traza conteniendo 0.1 g/L CaCl₂ · 2H₂O, 0.02 g/L de CuCl₂ · 5H₂O, 0.1 g/L de CoCl₂ · 6H₂O, 0.2 g/L de FeSO₄ · 7H₂O, 0.1

g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.01 g/L de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Se adicionó glucosa a una concentración de 10 g/L. Para los cultivos de células en reposo suplementados con glucosa y piruvato se adicionaron ambos compuestos a una concentración de 10 g/L.

7.5. Condiciones de cultivo

Cepas. Las cepas se almacenaron en crioviales a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ en medio Luria-Bertani con glicerol al 50%.

Preinóculos. Se tomó una azada a partir de los crioviales. Se inoculó en un tubo con LB y los antibióticos adecuados para el mantenimiento de los plásmidos. Se crecieron a 37°C y 250 rpm.

Inóculos. Al día siguiente, los preinóculos se subcultivaron en matraces bafleados conteniendo 50 ml de medio M9 suplementado con glucosa (10 g/L) y extracto de levadura (5g/L). Se adicionó IPTG a una concentración de 100 μM .

Sistema de células en reposo. Estas células provienen de un preinóculo creciendo en fase exponencial y tienen un estado fisiológicamente activo. Cuando las células en el inóculo alcanzaron una densidad óptica de 2 (600 nm) se cosecharon por centrifugación (a 7000 rpm y $4\text{ }^\circ\text{C}$), se lavaron con medio M9 y se usaron como inóculo para las células en reposo. Se resuspenden estas células en matraces bafleados conteniendo 50 ml de medio mínimo M9, el crecimiento se detuvo con cloranfenicol a una concentración de 100 $\mu\text{g/L}$. No se adicionaron otros antibióticos.

7.6. Métodos Analíticos

La densidad óptica (absorbancia a 600 nm) se determinó en un espectrofotómetro (Beckman DU-70). El peso seco de las células se calculó multiplicando la absorbancia por un factor de 0.45 g/L, que se determinó previamente. En los cultivos de células en reposo, se tomaron muestras de 1.5 ml periódicamente durante 10 horas. Las muestras se centrifugaron, el sobrenadante se colectó para analizar los principales productos generados en estos cultivos.

7.6.1. Evaluación de los metabolitos excretados mediante HPLC

Los metabolitos en los sobrenadantes filtrados se determinaron utilizando un equipo de HPLC (cromatografía líquida de alta presión) con detectores de índice de refracción y de arreglo de diodos. Además se utilizó con un sistema de HPLC conectado a un detector de masas (ESIMCHPLC) modelo Agilent 1100. Con este equipo para realizar espectrometría de masas se puede confirmar la identidad química de algunos de los metabolitos producidos por las cepas recombinantes.

7.6.1.1. Determinación de glucosa

Para la determinación de glucosa se empleó una columna Aminex HPX-87H, utilizando como fase móvil H_2SO_4 5mM, a un flujo de 0.5 ml/min y a una temperatura de 50° C. La glucosa se detectó por índice de refracción.

7.6.1.2. Determinación de Aminoácidos Aromáticos

Para la determinación de fenilalanina, triptofano, tirosina y fenilpiruvato, se utilizó con un sistema de HPLC conectado a un detector de masas (ESIMCHPLC) modelo Agilent 1100 con una columna Supelco Discovery C18. La fase móvil fue 0.2 % TFA en 40% de metanol, a un flujo de 0.5 ml/min. La detección se hizo por arreglo de diodos, a 220nm para la fenilalanina y 280nm para los demás analitos.

Con este sistema se cuantificó fenilalanina. Se detectó tirosina y triptofano, pero no se pudo cuantificar debido a que las cantidades que produce PB28tkG2 son muy pequeñas. También se intentó medir fenilpiruvato pero este no pudo detectarse bajo estas condiciones.

7.6.1.3. Determinación de Ácidos Orgánicos e intermediarios de la vía de aromáticos.

Se utilizó un equipo de HPLC con un detector de arreglo de diodos a 235 nm para DHS y 210 para los demás metabolitos. Se utilizaron dos métodos para analizar los sobrenadantes de los experimentos de células en reposo para detectar algún intermediario del TCA (oxaloacetato, malato, fumarato y succinato), productos de

fermentación (acético, láctico, fórmico) e intermediarios de la vía de aromáticos (DHS, SHIK).

7.6.1.3.1. Método Ácidos Aminex

Este método utiliza una columna tipo Aminex HPX-87H, utilizando como fase móvil H_2SO_4 5mM, a un flujo de 0.5 ml/min y a una temperatura de 50° C. Los compuestos que se analizaron con este método fueron DHS, SHIK, acético, láctico, fórmico, glicerol, piruvato, PEP, malato, fumarato, oxaloacetato y siquimato.

En este método el succinato coeluye con el siquimato y aparece un solo pico en 14 minutos con un máximo de absorbancia de 213

Se cambiaron las condiciones de corrida (fase móvil y temperatura). Se utilizó una fase móvil H_2SO_4 5mM, 20 mM, 20 mM (1% acetonitrilo), un flujo de 0.5 ml/min y temperaturas de 50° C y ambiente. En ninguna de estas condiciones se pudo obtener picos separados para el siquimato y el succinato.

7.6.1.3.1.2. Método Acqua

Se montó un método de cuantificación de ácidos orgánicos basado en un técnica de HPLC de fase reversa (Tormo M., *et. al.*, 2004). Se utilizó una columna marca phenomenex de tipo aqua C18 de 150x4.6 mm. Como fase móvil se utilizó 1% de acetonitrilo en buffer de fosfatos 20 mM ajustado a un pH de 2.2 con ácido fosfórico y un flujo de 0.5 ml/min. Con este método se analizaron estándares de los siguientes compuestos: DHS, SHIK, acético, láctico, fórmico, glicerol, piruvato, PEP, malato, fumarato, oxaloacetato y siquimato.

En estas condiciones se pudieron separar el siquimato y el succinato en una curva estándar, además de que se obtuvieron picos diferenciables para otros metabolitos (oxaloacetato, fórmico, láctico, fumarato, DHS).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Sistema de células en reposo (resting cells)

Las herramientas de la ingeniería genética se han desarrollado de tal manera que en la actualidad se pueden optimizar procesos biocatalíticos para la producción de compuestos de interés químico y farmacéutico (Nielsen, 1998). Para algunos bioprocesos como bioremediación, producción de metabolitos o biocatálisis pueden utilizarse células en crecimiento o células en reposo (resting cells).

El sistema de células en reposo es útil para varios procesos metabólicos intracelulares, que se activan cuando las células pasan de un estado de crecimiento exponencial a un estado de fase estacionaria. Este sistema también puede utilizarse cuando se requiere un estado de células en reposo para mantener la viabilidad, ya que se controlan factores ambientales que pueden ser desfavorables para la célula como la escasez de nutrientes o una cantidad excesiva de biomasa. Además, utilizando un sistema de células en reposo no hay flujo de carbono hacia la producción de biomasa. Como consecuencia, un sistema de células en reposo constituye un estado fisiológico seguro para el mantenimiento de las células. Estas células provienen de un cultivo creciendo en fase exponencial y por lo tanto están en un estado fisiológico activo (Báez-Viveros *et. al.*, 2004; Lloyd *et. al.*, 1996).

Por estas razones se decidió emplear este tipo de cultivos en este trabajo. En estas condiciones de no crecimiento la producción de biomasa se reduce completamente. Las células que se utilizaron se encuentran en un estado metabólico activo por las condiciones de cultivo que se utilizaron. Proviene de células creciendo en fase exponencial en un medio mínimo M9 enriquecido con extracto de levadura (ver materiales y métodos). Con estas células se inocularon matraces bafleados de 250 ml conteniendo 50 ml de medio M9 suplementado con glucosa (10g/L) e IPTG (100 μ M) para inducir la expresión de los genes contenidos en los plásmidos. Además se añadió cloranfenicol (100 μ g/ml), que es un bacteriostático, para detener el crecimiento celular. La competencia por los precursores que se utilizan para la formación de biomasa se elimina, aumentando la capacidad de biosíntesis de L-Fen.

8.2 Evaluación de la máxima capacidad de síntesis de fenilalanina en la cepa PB28 utilizando células en reposo.

La cepa PB28 se transformó con los plásmidos pTrc*pheA*^{ev1} ó pTrc*pheA*^{ev2}, pJLBaroG^{br} y pCL*tkl*, de esta manera se obtuvieron las cepas PB28*tklGev1* y PB28*tklGev2* (Tabla 3). Posteriormente se hicieron experimentos con células en reposo.

La concentración celular inicial en los cultivos de células en reposo se ajustó a una densidad de 2.2 que corresponde a 1 g de biomasa/L (Figura 14). Los matraces se incubaron a 37 °C y 250 rpm, tomando muestras cada hora durante 10 horas. La biomasa se mantuvo constante durante todo el cultivo. La biomasa se removió por centrifugación y los sobrenadantes se colectaron por decantación y se filtraron para su posterior análisis por HPLC.

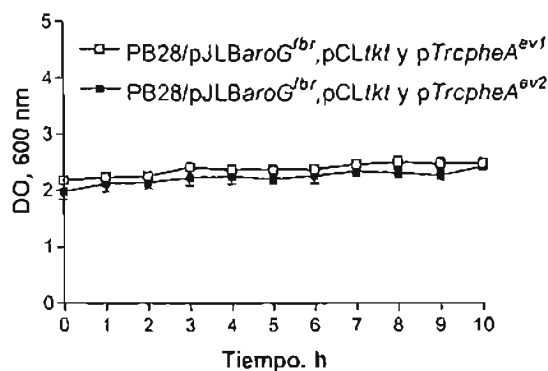


Figura 14. Densidad óptica a 600 nm de los cultivos de células en reposo.

En el trabajo de Báez-Viveros (2004) no se observaron diferencias significativas entre las cepas JM101 y PB12 transformadas con los plásmidos pTrc*pheA*^{ev1} o pTrc*pheA*^{ev2} sin embargo se evaluaron los dos plásmidos dado que la cepa PB28 es una cepa con modificaciones adicionales en su metabolismo y pudiera presentar alguna diferencia más notable al expresar los genes *pheA*^{ev1} ó *pheA*^{ev2}.

Se observó que la velocidad de consumo de glucosa se mantuvo relativamente constante durante las 10 horas que duró el experimento. La producción de L-Fen, DHS y SHIK se incrementó linealmente (Figuras 18 y 19). Estos datos se discutirán más adelante.

En la figura 15 se muestra la comparación entre el consumo de glucosa (q_{Glc}), la productividad de fenilalanina (q_{L-Fen}) y el rendimiento de fenilalanina a partir de glucosa

($Y_{L-Fen/Glc}$). Como puede observarse, no hubo diferencias significativas entre las cepas PB28tkGev1 y PB28tkGev2.

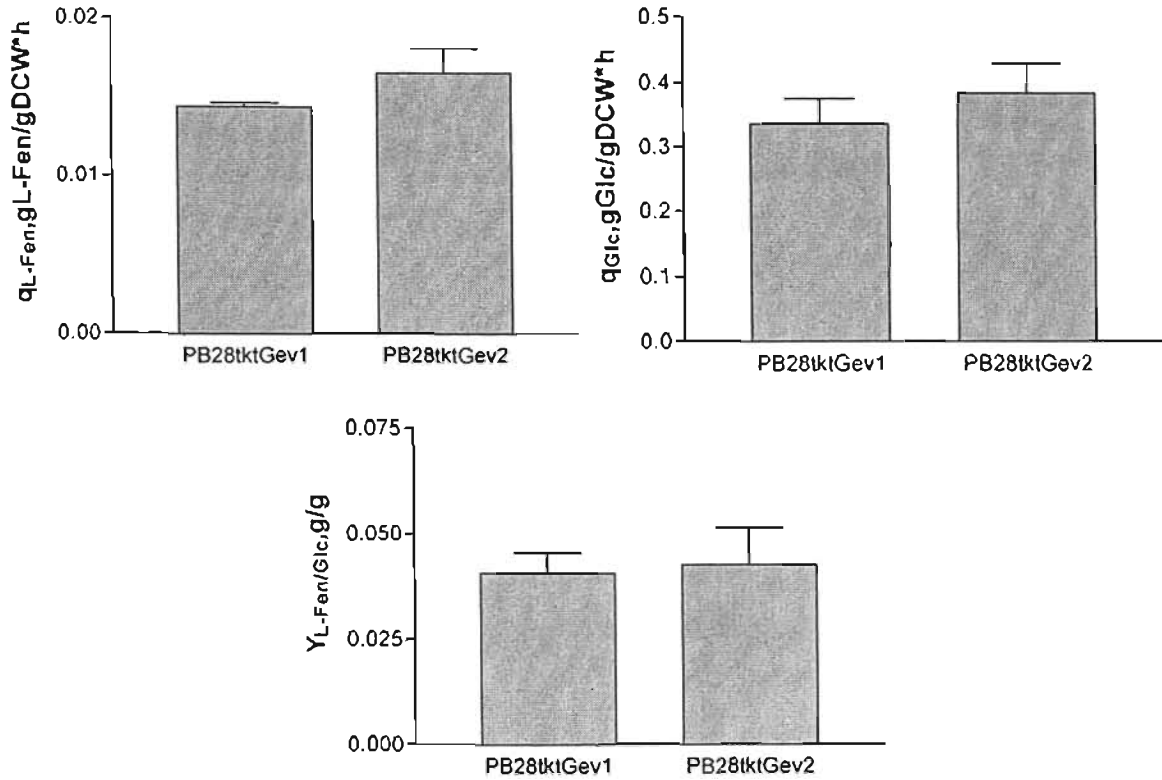


Figura 15. Comparación entre el q_{Glc} , q_{Phe} y $Y_{L-Fen/Glc}$ para las cepas PB28tkGev1 y PB28tkGev2.

Debido a que no se encontraron diferencias significativas entre los resultados obtenidos para las cepas PB28tkGev1 y PB28tkGev2, se escogió arbitrariamente a PB28tkGev2 para seguir trabajando. Los datos que se presentan a continuación son únicamente para la cepa PB28tkGev2.

8.2.1. Consumo de glucosa

En la figura 16 se muestra el perfil de consumo de glucosa, La velocidad de consumo de glucosa se mantuvo relativamente constante, los datos se ajustaron a una ecuación lineales con coeficiente de correlación mayor a 0.9.

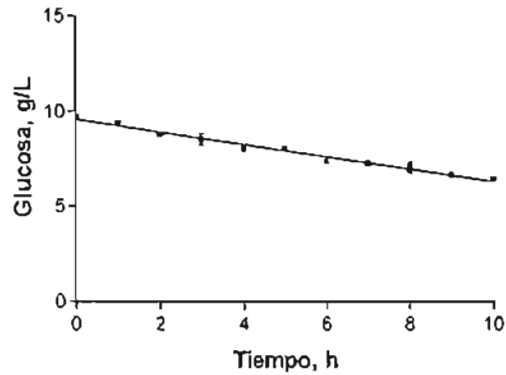


Figura 16. Gráfica representativa del consumo de glucosa en la cepa PB28tkGev2.

El consumo específico de glucosa (q_{Glc}) se calculó en base a la concentración de glucosa y la biomasa utilizando la ecuación $q_{Glc} = \Delta G_{lc} / (\Delta t * X_{prom})$, en donde ΔG_{lc} es el cambio de concentración de glucosa, Δt es el cambio en el tiempo y X_{prom} es la biomasa promedio entre dos puntos. A lo largo de 10 horas, la q_{Glc} de la cepa PB28tkGev2 se mantuvo constante y con un valor de 0.36 ± 0.03 g/gDCW*h. En el trabajo de Baez-Viveros (2004) se utilizaron las cepas JM101 y PB12 transformadas con los plásmidos pTrcp $pheA^{ev2}$, pJLBaroG obr y pCL tkl (JM101tkGev2 y PB12tkGev2). Las cepas JM101tkGev2 y PB12tkGev2 presentan una q_{Glc} de 0.17 y 0.12 g/gDCW*h respectivamente (Báez-Viveros *et. al.* 2004). La cepa PB28tkGev2 tiene una q_{Glc} tres veces mayor que la de PB12tkGev2 y dos veces mayor que la de JM101tkGev2 en condiciones de células en reposo. En la figura 17 se muestra la comparación del consumo de glucosa entre las cepas PB28, JM101 y PB12 transformadas con los mismos plásmidos.

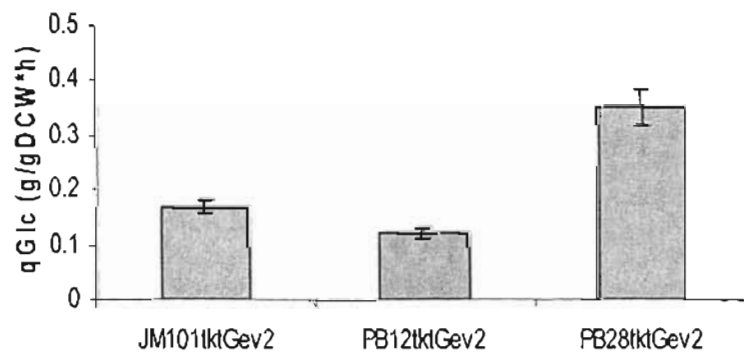


Figura 17. Comparación entre la q_{Glc} de las cepas JM101, PB12 y PB28 transformadas con los plásmidos pTrcp $pheA^{ev2}$, pJLBaroG obr y pCL tkl . Los datos de las cepas JM101 y PB12 se obtuvieron del trabajo de Báez Viveros (2004).

El incremento observado en la q_{Glc} para la cepa PB28tkGev2 podría deberse a una deficiencia energética. Se ha reportado que el flujo glucolítico lo controla la demanda de ATP (Koebsmann, *et. al.*, 2002). El ATP regula de manera negativa a la fosfructocinasa, una de las enzimas que controlan la glucólisis, así que cuando hay una situación metabólica donde hay escasez de ATP, el flujo glucolítico aumenta. A partir del piruvato la célula puede generar ATP de manera directa o indirecta a partir de compuestos derivados del piruvato que pueden entrar a cadena respiratoria para generar ATP. En la cepa PB28, la posible limitación en la capacidad de síntesis de piruvato podría ocasionar una situación metabólica de limitación de ATP.

El piruvato se sintetiza principalmente a partir del PEP mediante el sistema PTS y las piruvato cinasas. Sin embargo, existen dentro del metabolismo de *E. coli* una gran variedad de reacciones cuyo producto es el piruvato (Anexo 2). A continuación se muestra una lista con las reacciones reportadas para la síntesis y consumo de piruvato que pudieran llevarse a cabo considerando una cepa con las modificaciones en el metabolismo como la PB28 y las condiciones de no crecimiento en medio mínimo suplementado únicamente con glucosa (www.ecocyc.com).

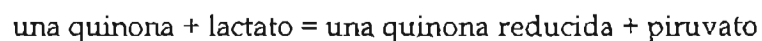
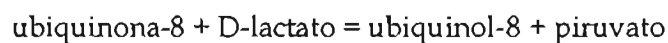
REACCIONES EN LAS QUE SE SINTETIZA PIRUVATO

Metabolismo central

Gluconeogénesis

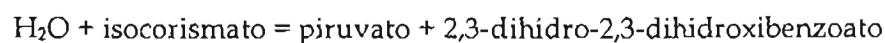


Respiración, como donador de electrones

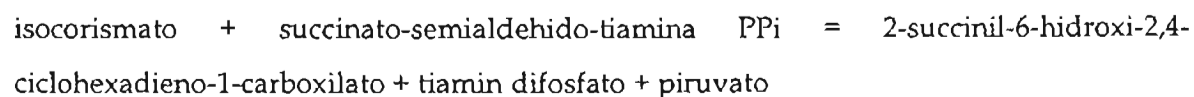


Biosíntesis

Biosíntesis de enterobactina



Biosíntesis de menaquinona



Biosíntesis de tetrahidrofolato

4-amino-4-deoxicorismato = p-aminobenzoato + piruvato

Biosíntesis de ubiquinona

corismato = p-hidroxibenzoato + piruvato

Biosíntesis de aminoácidos

Biosíntesis de metionina

cistationina + H₂O = piruvato + NH₃ + homocisteína

Biosíntesis de triptofano

corismato + L-glutamina = antranilato + piruvato + L-glutamato

REACCIONES EN LAS QUE SE CONSUME PIRUVATO

Metabolismo central

Fermentación

piruvato + coenzima A = formiato + acetil-CoA

NADH + piruvato = NAD⁺ + D-lactato

piruvato + ubiquinona-8 + H₂O = acetato + CO₂ + ubiquinol-8

Gluconeogénesis

H₂O + piruvato + ATP = fosfato + PEP + AMP

piruvato dehidrogenasa

piruvato + AceF-lipoato = AceF-S-acetildihidrolipoato + CO₂

Biosíntesis

Biosíntesis de isopentenil difosfato

piruvato + D-gliceraldehido-3-fosfato = CO₂ + 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato

Biosíntesis de piridoxal 5'-fosfato

piruvato + D-gliceraldehido-3-fosfato = CO₂ + 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato

Biosíntesis de tiamina

piruvato + D-gliceraldehido-3-fosfato = CO₂ + 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato

Biosíntesis de aminoácidos

Biosíntesis de alanina

piruvato + L-valina = L-alanina + 2-ceto-isovalerato

L-glutamato + piruvato = α-cetoglutarato + L-alanina

Biosíntesis de isoleucina

piruvato + 2-oxobutanoato = 2-aceto-2-hidroxi-butirato + CO₂

Biosíntesis de lisina

piruvato + L-aspartato-semialdehído = 2 H₂O + L-2,3-dihidrodipicolinato

Biosíntesis de valina

2 piruvato = 2-aceto-lactato + CO₂

Son pocas las reacciones generadoras de piruvato que estarían presentes en PB28, en un cultivo en medio mínimo suplementado con glucosa. Debido a que tenemos una situación artificial de no crecimiento, las reacciones de biosíntesis estarían limitadas. Esta cepa tiene inactivas las dos principales vías de síntesis de piruvato, que son el sistema PTS y las piruvato cinasas. Existen otras reacciones a través de las cuales la cepa PB28 pudiera estar sintetizando piruvato como las enzimas málicas que catalizan la conversión reversible de piruvato a malato, aunque el flujo de carbono que se dirige por esta reacción generalmente es mínimo (Flores *et. al.* 2002). El piruvato pudiera obtenerse en la degradación de algunos aminoácidos. Sin embargo, esta cepa está limitada tanto en ATP como por precursores, por los que la biosíntesis de estos compuestos también estaría limitada. Estos compuestos no se generarían en grandes cantidades que permitieran que su degradación generara el piruvato necesario para suplir las necesidades de la célula. Además la presencia de glucosa reprimiría algunas de estas reacciones.

En la tabla 4 se muestra una estimación aproximada de la capacidad de producción de ATP para una cepa silvestre y para una cepa que no sintetice piruvato, como se asume que ocurre en PB28. El piruvato constituye la conexión fundamental entre la glucólisis y el TCA. Las dos moléculas de piruvato que se obtienen en glucólisis pueden ser utilizadas en el TCA, después de convertirse a AcetilCoA. A partir de los intermediarios producidos en el TCA (NADH, FADH₂) se pueden producir 25 moléculas de ATP si entran a cadena respiratoria. En total una cepa silvestre puede producir 32 moléculas de ATP a partir de una molécula de glucosa. Una cepa con las piruvato cinasas inactivas y que además tenga el fenotipo PTS- tendrá una deficiencia considerable en la capacidad de producción de ATP. Esta cepa podría generar 5 moles de ATP a partir de los dos moles de NADH que se producen en glucólisis. No habría producción de ATP por las piruvato cinasas, ni habría AcetilCoA que pudiese entrar al TCA.

Tabla 4. Estimación aproximada de la cantidad de ATP producida.

	Cepa Silvestre	ATP	Cepa PTS-Glc ⁻ PykAF	ATP
Glucólisis	2 NADH *	5	2 NADH	5
	2 ATP	2		0
Oxidación de piruvato	2 NADH *	5		0
TCA	6 NADH*	15		0
	2 FADH ₂ *	3		0
	2 ATP	2		0
Total		32		5

* 1 NADH ≈ 2.5 ATP

1 FADH₂ ≈ 1.5 ATP

8.2.2. Acumulación de intermediarios

El análisis por HPLC mostró la acumulación de DHS y SHIK, intermediarios de la vía de síntesis de aromáticos, en la cepa PB28tkGev2. La concentración de DHS y SHIK se incrementó linealmente durante el tiempo que duró el experimento (Figura 18) y alcanzaron concentraciones de 0.05 g/L para ambos compuestos a las 10 horas.

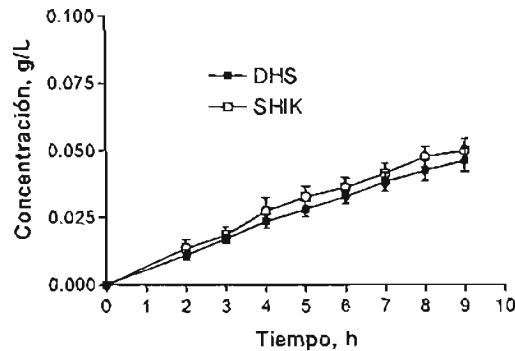


Figura 18. Cinética de producción de SHIK y DHS

La acumulación de SHIK y DHS puede deberse al control alostérico sobre alguna enzima de la vía o a la deficiencia de ATP. En la figura 10 (ver Antecedentes) se muestra la ruta metabólica de biosíntesis de aminoácidos aromáticos y su regulación. El paso que cataliza la conversión de SHIK a S3P requiere de ATP. La cepa PB28tkGev2, al tener una capacidad menor de sintetizar ATP, probablemente no pueda convertir eficientemente SHIK a S3P, esto ocasiona la acumulación de SHIK. El SHIK a su vez, inhibe de manera alostérica a la enzima SHIK dehidrogenasa. Esta enzima cataliza la conversión de DHS a SHIK. Probablemente debido a esto observamos la acumulación de DHS.

8.2.3. Producción de fenilalanina

Uno de los parámetros que se utiliza para determinar la rapidez con la que el sustrato es convertido a producto es la velocidad específica de producción o productividad específica (q_p , gP/gDCW*h). Este valor se calcula a partir de los datos de formación del producto y de concentración celular de acuerdo con la ecuación $q_p = \Delta P / (\Delta t * X_{prom})$, en donde ΔP es el cambio en la concentración del producto, Δt es el cambio en el tiempo y X_{prom} es la biomasa promedio entre dos puntos.

La concentración de la L- fenilalanina en la cepa PB28tkGev2 se incrementó de manera lineal alcanzando concentraciones de 0.14 g/L después de 10 horas (Figura 19).

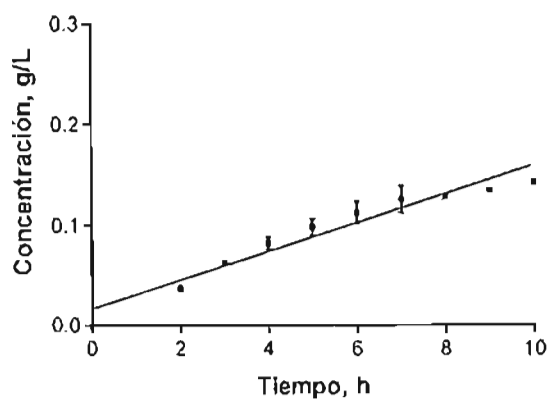


Figura 19. Perfil de producción de L-Fenilalanina para la cepa PB28tkGev2.

Los valores de la biomasa y de la productividad de fenilalanina se utilizaron para calcular la productividad específica de fenilalanina (q_{L-Fen}). Para las cepas JM101tkGev2 y PB12tkGev2 (Báez *et al.*, 2004) los valores de q_{L-Fen} son de 0.036 y 0.041 gL-Fen/g-DCW*h respectivamente. El valor de q_{L-Fen} para la cepa PB28tkGev2 fue de 0.017 ± 0.002 gL-Fen/g-DCW*h, que representa el 45% de la q_{L-Fen} obtenida para la cepa JM101tkGev2 y el 40% del obtenido para la cepa PB12tkGev2 (Figura 20).

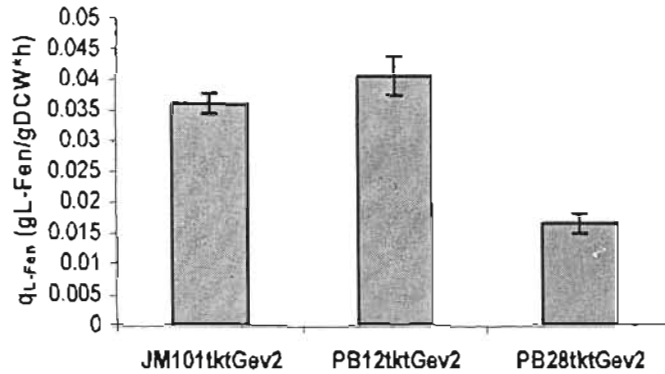


Figura 20. Comparación entre la q_{L-Fen} de las cepas JM101, PB12 y PB28 transformadas con los plásmidos $pTrcpheA^{ev2}$, $pJLBaroG^{fbz}$ y $pCLtkt$. Los datos de las cepas JM101 y PB12 se obtuvieron del trabajo de Báez Viveros (2004).

Los rendimientos de L-fenilalanina a partir de glucosa ($Y_{L-Fen/Glc}$) se calcularon usando la siguiente ecuación $Y_{L-Fen/Glc} = q_{L-Fen}/q_{Glc}$. En la cepa silvestre JM101tkGev2 el $Y_{L-Fen/Glc}$ es de 0.21 g/g mientras que en una cepa que carece del sistema PTS como la PB12tkGev2 el $Y_{L-Fen/Glc}$ es de 0.34 (Báez et al., 2004). En la cepa PB28tkGev2 el $Y_{L-Fen/Glc}$ que se obtuvo fue de 0.04 g/g, lo que representa el 19% del que se obtuvo con la cepa JM101 transformada con los mismos plásmidos (Figura 21).

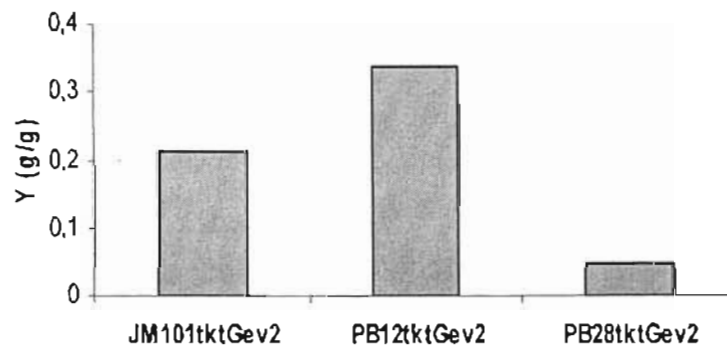


Figura 21. Comparación entre el $Y_{L-Fen/Glc}$ de las cepas JM101, PB12 y PB28 transformadas con los plásmidos $pTrcpheA^{ev2}$, $pJLBaroG^{fbz}$ y $pCLtkt$. Los datos de las cepas JM101 y PB12 se obtuvieron del trabajo de Báez Viveros (2004).

8.2.4. Distribución de flujos metabólicos en el nodo de PEP

En la Figura 22 se observa la distribución parcial de flujos de carbono a nivel del nodo de PEP. En la cepa PB28tkGev2 no hay producción de acético debido a que carece

de las dos principales vías de síntesis de piruvato, que es precursor del acético, mientras que en las cepas JM101tkGev2 y PB12tkGev2 el flujo de carbono que se dirige hacia la formación de acético es del 60.1% y 32.7% respectivamente. El flujo de carbono que PB28tkGev2 dirige hacia aromáticos es del 12.63%; este valor es aproximadamente 3 veces menor que para la cepa PB12tkGev2 e incluso es la mitad del flujo que dirige una cepa silvestre transformada con los mismos plásmidos (JM101tkG2).

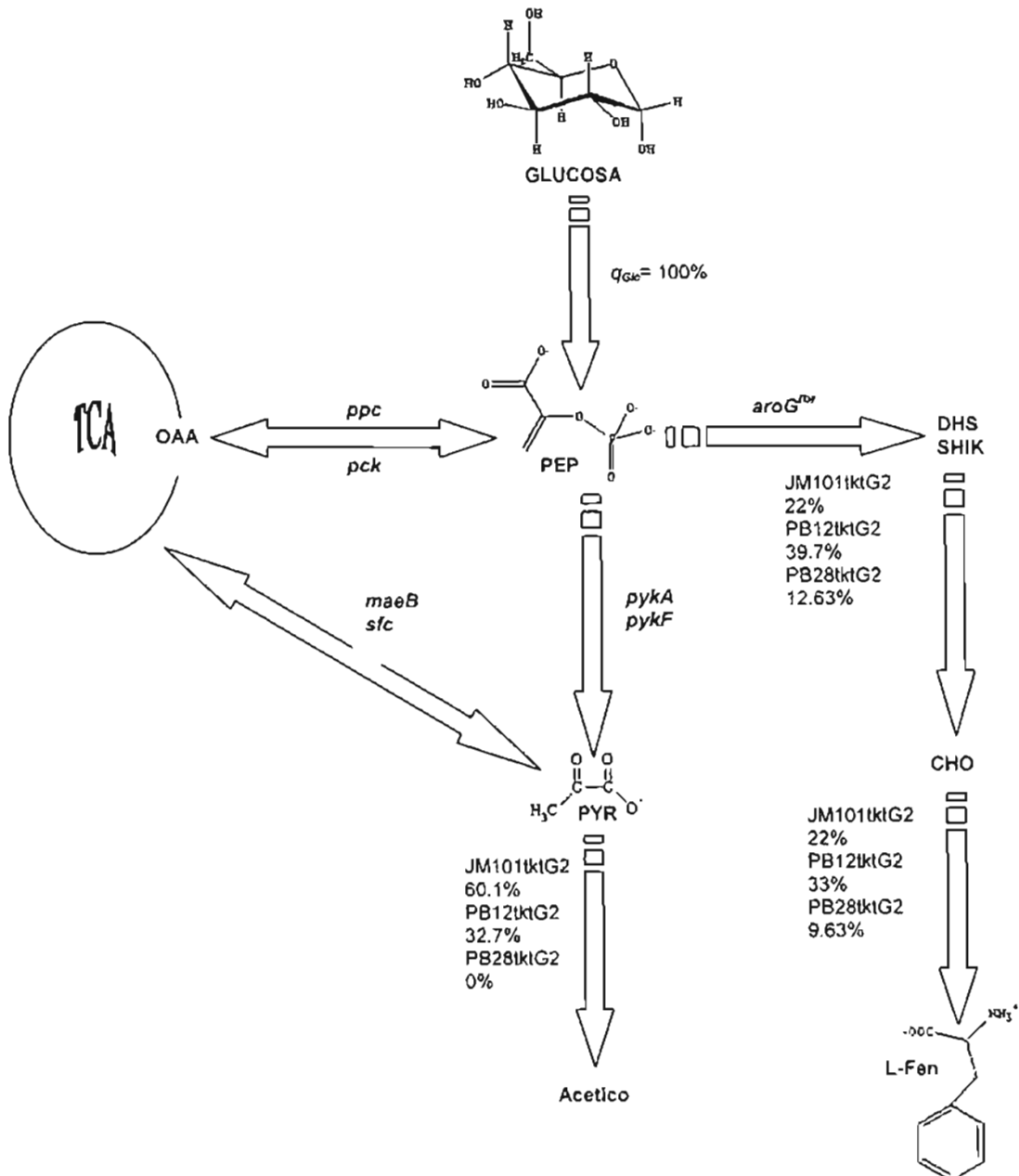
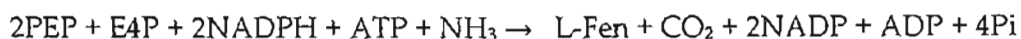


Figura 22. Distribución parcial de flujos de carbono a nivel del nodo de PEP en la cepa PB28tkGev2, JM101tkGev2 y PB12tkGev2.

En la cepa PB28 debería existir una mayor disponibilidad de PEP que pudiera dirigirse a la síntesis de aromáticos. Sin embargo, este carbono no se dirige hacia fenilalanina. Esto podría ser debido a la falta de algún precursor o al costo energético que representa la síntesis de fenilalanina en los pasos finales de la vía (Figura 10). En la siguiente reacción se muestra la estequiometría de las reacciones de biosíntesis de L-Fen:



La poca capacidad de la cepa PB28tkGev2 de sintetizar ATP pudiera ser uno de los limitantes para que el flujo de carbono se dirigiera hacia la biosíntesis de L-Fen, ya que este es un proceso que requiere de ATP. Además la cepa PB28, al no sintetizar piruvato, también podría tener una capacidad reducida para sintetizar otros compuestos derivados del TCA como es el caso de glutamato. En el último paso de síntesis de fenilalanina se requiere glutamato para transaminar el fenilpiruvato y convertirlo en fenilalanina. La conversión de siquimato a siquimato-3-fosfato requiere de una molécula de ATP. Como ya se mencionó la cepa PB28tkGev2 probablemente tenga una baja capacidad de síntesis de ATP, por lo que la eficiencia de esa reacción estaría limitada.

Puesto que el flujo de carbono no se está dirigiendo hacia la síntesis de aromáticos, posiblemente se dirija hacia alguna ruta que metabolice el PEP, como el TCA. En la cepa PB28tkGev2 la distribución de flujos en el metabolismo central podría ser similar al que presenta una cepa en anaerobiosis, donde el TCA no se comporta como un ciclo, sino se parte en dos ramas: una oxidativa y una reductiva (Figura 23)

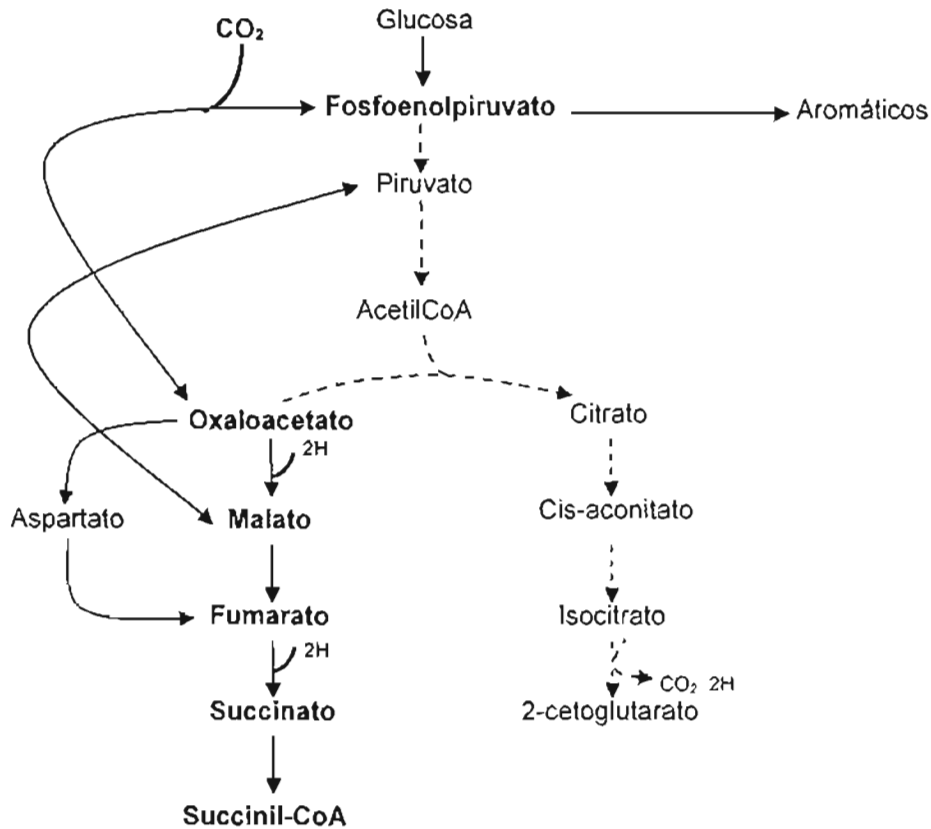


Figura 23. Comportamiento del TCA en anaerobiosis. La rama oxidativa se muestra a la derecha y la rama reductiva a la izquierda.

En la figura 23 se muestran con líneas punteadas las vías que podrían estar inactivas total o parcialmente en la cepa PB28. El TCA en la cepa PB28tkGev2 podría estar funcionando incompleto, ya que la formación de citrato y de los intermediarios que provienen de él (isocitrato y 2-cetoglutarato) no se favorecen porque esta cepa no puede sintetizar AcetilCoA (por la deficiencia de piruvato) y la rama oxidativa estaría inactiva. La otra rama del TCA estaría funcionando como en anaerobiosis y debería observarse una acumulación de uno o varios intermediarios del TCA de la rama reductiva. Esta redistribución de flujos permitiría regenerar poder reductor.

Otra opción es que el flujo de carbono se estuviera dirigiendo preferencialmente hacia la vía de las pentosas (Figura 24). Los plásmidos presentes en la cepa PB28 pudieran estar generando una mayor carga metabólica por lo que la vía de las pentosas pudiera estar más activa para poder sintetizar precursores y NADPH necesarios para biosíntesis. Parte del carbono que entra pudiera estar desprendiéndose en forma de CO_2 .

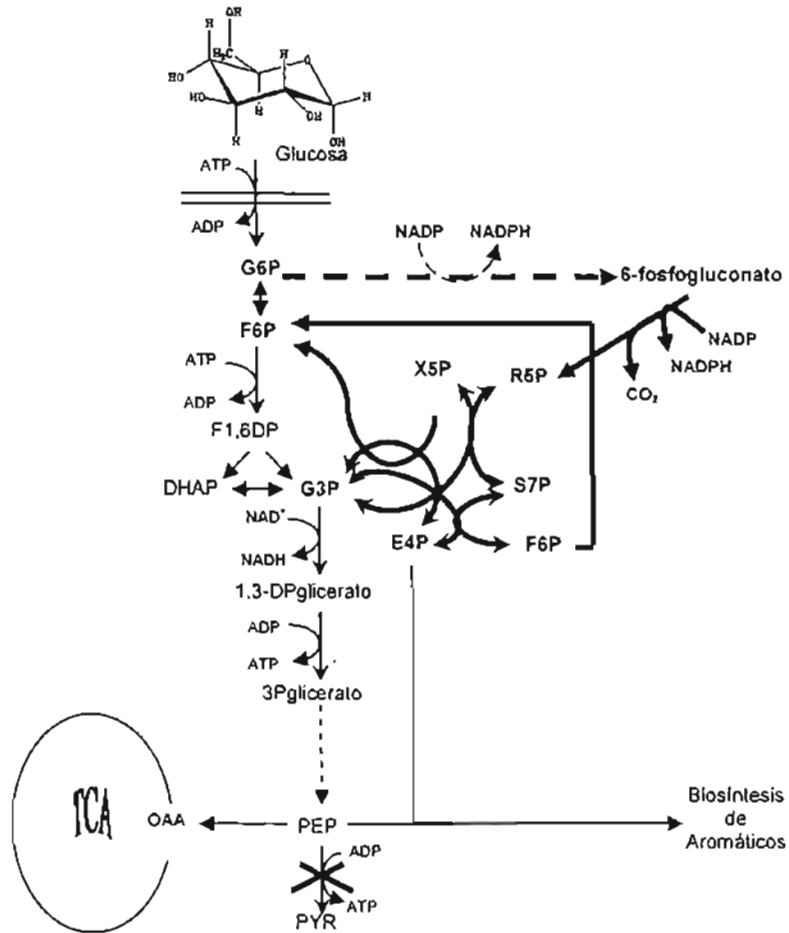


Figura 24. Vía de las PP

8.3. Evaluación de los metabolitos excretados mediante HPLC

Además de las metodologías con las que se contaba en el laboratorio, se montó un método de cuantificación de ácidos orgánicos basado en una técnica de HPLC de fase reversa (Tormo M., *et. al.*, 2004). Utilizando este nuevo método y las metodologías establecidos en nuestro laboratorio se metieron estándares de diferentes compuestos para tratar de identificar el perfil de metabolitos que la cepa PB28tkkGev2 excreta.

Estas metodologías permiten detectar los siguientes compuestos: fenilalanina, tirosina, triptófano, acético, fórmico, láctico, fumarato, PEP, PIR, malato, succinato, DHS y SHIK.

Para la cepa PB28tkkGev2 se cuantificó fenilalanina. Se detectó tirosina y triptófano, pero no se pudo cuantificar debido a que las cantidades que produce

PB28tktGev2 son muy pequeñas. También se intentó medir fenilpiruvato pero este no pudo detectarse bajo estas condiciones. Con estos diferentes métodos se confirmó que la cepa PB28tktGev2 acumula DHS, SHIK y fenilalanina principalmente.

8.4. Efecto de la alimentación de piruvato sobre el metabolismo central en la cepa PB28

Con la cepa PB28tktGev2 se realizaron experimentos con células en reposo en medio M9 suplementado con glucosa y piruvato a 10 g/L. Si el alto consumo de glucosa se debe a la falta de energía, la alimentación de piruvato le permitiría a la célula generar energía ya que el piruvato que entre se puede dirigir a la formación de acético ó hacia el TCA, y producir ATP, NADH y FADH₂. Estos dos últimos compuestos pueden entrar a cadena respiratoria para generar ATP. Además la producción de L-Fen aumentaría ya que se sintetizarían los precursores necesarios para su biosíntesis tales como glutamato, NADPH y ATP.

8.4.1. Consumo de glucosa

En la figura 25 se muestra el perfil de consumo de glucosa y piruvato, se mantuvieron relativamente constantes, los datos se ajustaron a ecuaciones lineales con coeficientes de correlación mayores a 0.9.

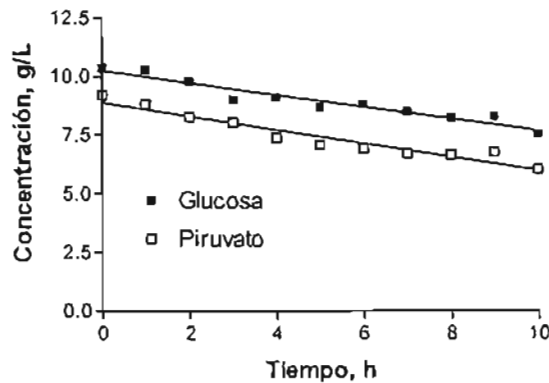


Figura 25. Gráfica representativa del perfil de consumo de glucosa y de piruvato.

La cepa PB28tktGev2 en medio mínimo suplementado con glucosa y piruvato disminuyó su consumo de glucosa en un 28% (0.26 ± 0.04 gGlc/gDCW*h) comparado con

la misma cepa en M9 suplementado únicamente con glucosa (0.36 ± 0.03 g/gDCW*h). El consumo de piruvato es muy similar al consumo de glucosa (0.26 ± 0.05 gGlc/gDCW*h) (Figura 26).

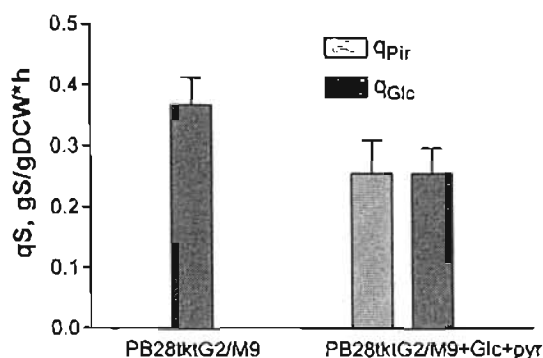


Figura 26. Consumo de glucosa y de piruvato para la cepa PB28tkiGev2 en un sistema de células en reposo suplementado con glucosa y piruvato

Al adicionar piruvato al medio de cultivo, la cepa PB28tkiGev2 obtendría ATP a partir del piruvato que entra y no sólo a partir de la glucosa que se metaboliza en glucólisis. El consumo de piruvato incrementaría la capacidad de producción de ATP de la cepa PB28tkiGev2, ya que el piruvato puede dirigirse hacia la formación de acetilCoA, ácido acético o metabolizarse en el TCA (Figura 33).

8.4.2. Acumulación de intermediarios

En la figura 27 se muestra el perfil de producción de intermediarios aromáticos y ácido acético de los cultivos en M9 suplementado con piruvato y glucosa, comparándolos con el perfil de producción de intermediarios en cultivos de células en reposo en M9 suplementado con glucosa. Se puede observar que la producción de intermediarios de la vía de aromáticos (DHS y SHIK) disminuyó significativamente. Además en los cultivos suplementados con piruvato se observó la producción de ácido acético. Esto se debe a que el piruvato que entra puede metabolizarse hacia la producción de acetilCoA y de acético. La $q_{Acético}$ en la cepa PB28tkiGev2 en medio M9 suplementado con glucosa y piruvato fue de 0.02 ± 0.007 gAcético/gDCW*h.

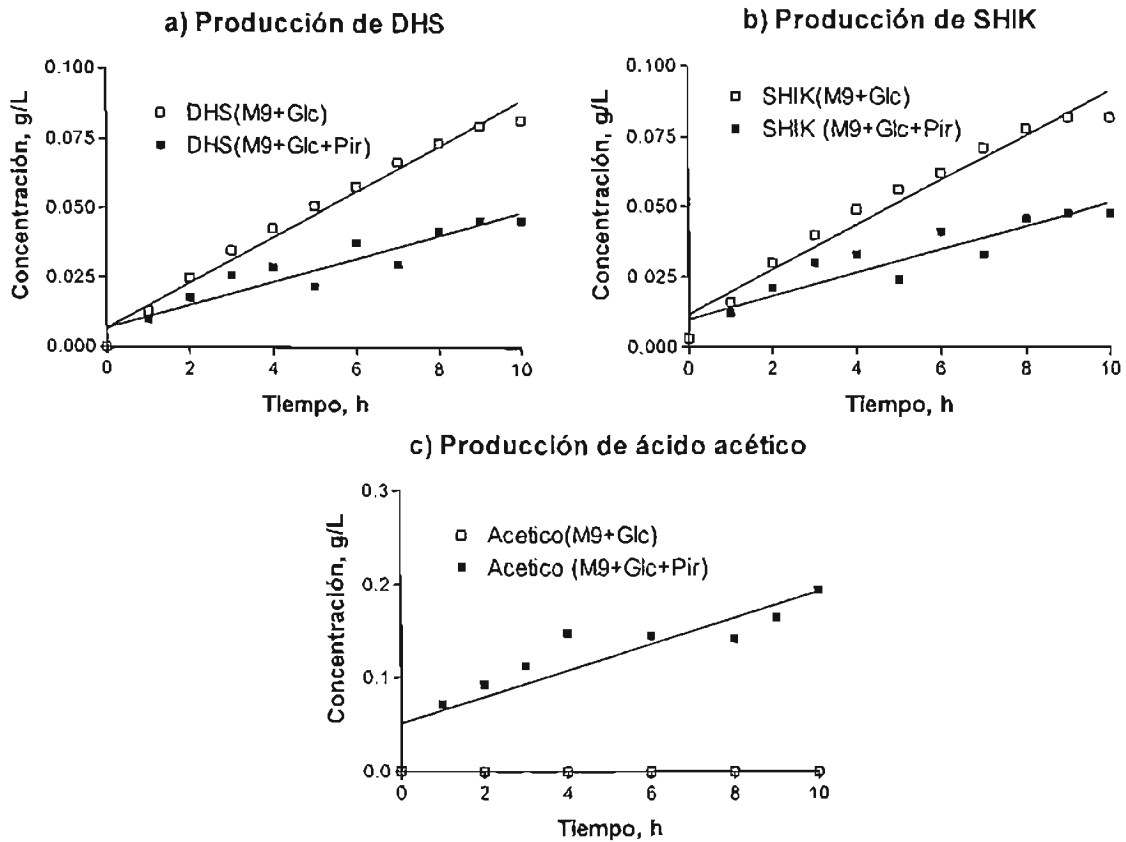


Figura 27. Gráfica representativa de la cinética de producción de a) DHS, b) SHIK y c) ácido acético en los cultivos con células en reposo suplementados con glucosa y suplementados con glucosa y piruvato.

En la figura 28 se muestran las productividades de DHS y SHIK. La productividad de DHS en M9 suplementado con glucosa y piruvato es de 0.003 ± 0.001 gDHS/gDCW*h. Ésto representa el 60% de la productividad de DHS en M9 suplementado con glucosa (0.005 ± 0.002 gDHS/gDCW*h). En el caso del SHIK, la q_{shik} en M9 suplementado con glucosa y piruvato (0.003 ± 0.001 gShik/gDCW*h) es el 60% de la que se obtiene en M9 suplementado con glucosa (0.005 ± 0.001 gShik/gDCW*h).

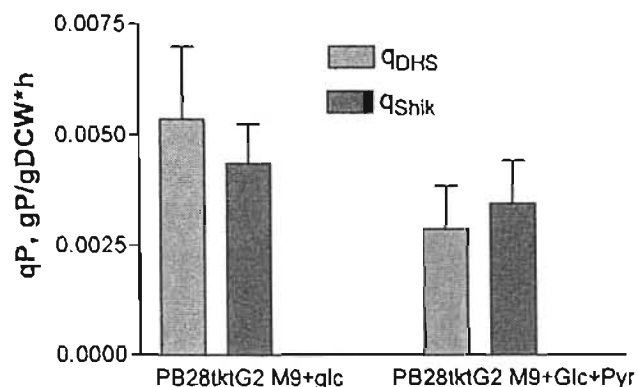


Figura 28. q_{Shik} y q_{DHS} en los cultivos de células en reposo suplementados con glucosa y suplementados con glucosa y piruvato.

8.4.3. Producción de L-fenilalanina

La L-fenilalanina se acumuló de manera lineal. En la figura 29 se muestra el perfil de producción de fenilalanina para la cepa PB28tkGev2 en M9 suplementado con glucosa y piruvato y en M9 suplementado con glucosa. Se observó que en M9 suplementado con glucosa y piruvato, la cepa PB28tkGev2 produjo el doble de L-fenilalanina (0.24 g/L), en comparación con los cultivos hechos en M9 suplementados con glucosa (0.14 g/L).

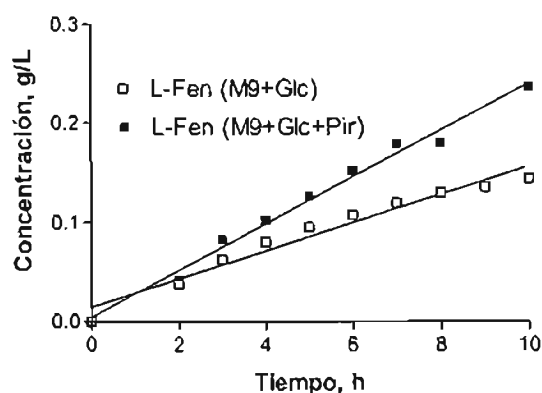


Figura 29. Gráfica representativa de la cinética de producción de L-Fen en los cultivos de células en reposo suplementados con glucosa y suplementados con glucosa y piruvato.

La productividad específica de L-fenilalanina se muestra en la figura 30. La q_{L-Fen} en medio M9 suplementado con glucosa y piruvato es de 0.031 ± 0.006 gL-Fen/gDCW*h, esto representa el doble de la q_{L-Fen} obtenida en M9 suplementado con glucosa.

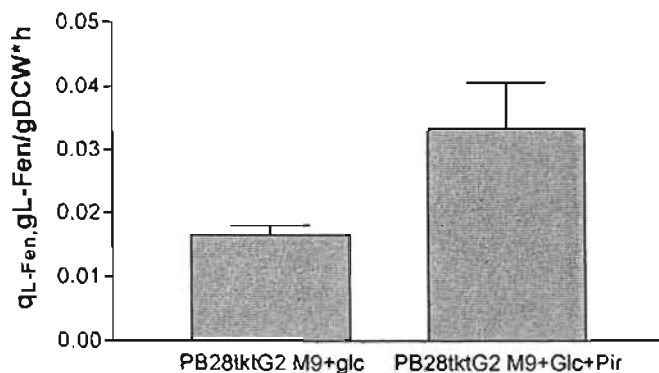


Figura 30. q_{L-Fen} en los cultivos de células en reposo suplementados con glucosa y suplementados con glucosa y piruvato.

El rendimiento de L-fenilalanina a partir de glucosa ($Y_{L-Fen/Glc}$) fue tres veces mayor para los cultivos donde se utilizó M9 suplementado con glucosa y piruvato comparándolo con los cultivos donde únicamente se utilizó glucosa.

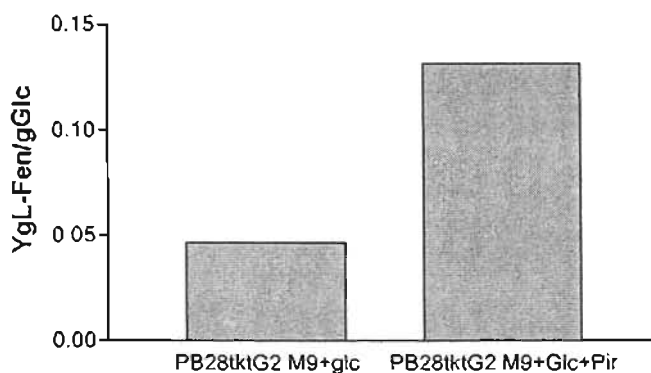


Figura 31. $Y_{L-Fen/Glc}$ en los experimentos con células en reposo suplementados con glucosa y suplementados con glucosa y piruvato.

8.4.4. Redistribución de flujos metabólicos en el nodo de fosfoenolpiruvato

En la figura 32 se muestra la distribución parcial de flujos de carbono alrededor del nodo de PEP en la cepa PB28tkGev2 cuando se utiliza medio M9 suplementado con glucosa y piruvato.

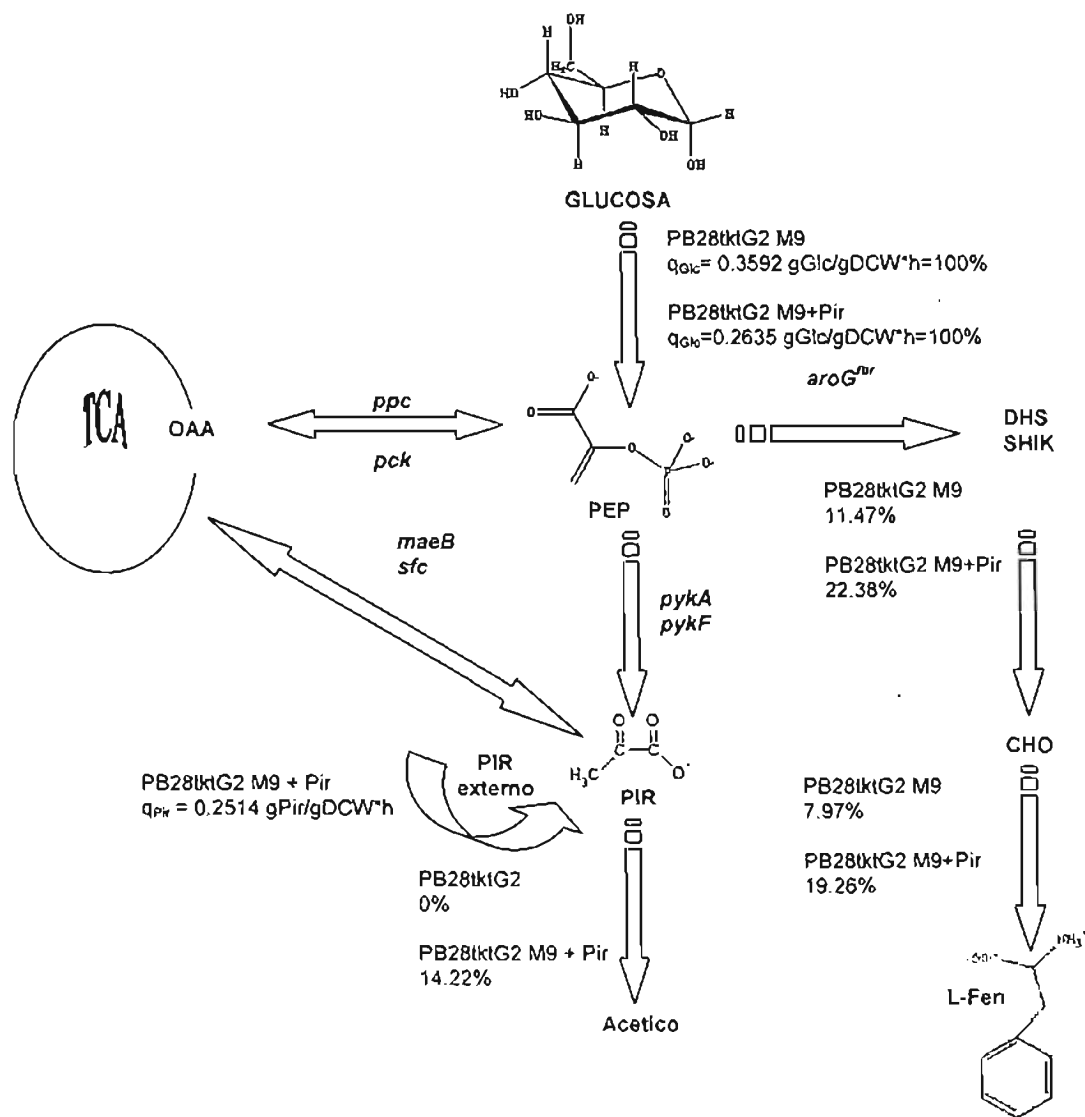


Figura 32. Distribución parcial de flujos de carbono alrededor del nodo de PEP.

Al alimentar piruvato encontramos que el flujo glucolítico disminuye, debido a que la célula puede generar ATP a través de la glucólisis y además otras vías. El piruvato que entra puede ser utilizado en el TCA, después de convertirse en AcetilCoA, produciendo NADH y FADH₂ estos dos compuestos pueden entrar a cadena respiratoria y así generar ATP. En la Figura 33 se muestra la cantidad de ATP que puede producirse a partir de una molécula de piruvato que entra dependiendo de la ruta metabólica que siga. Al haber una mayor producción de ATP el flujo glucolítico disminuiría debido a la regulación negativa que ejerce el ATP sobre una de las enzimas control, la fosfofructocinasa.

Otra de las consecuencias de la inactivación de las PYK sobre la síntesis de aromáticos es su disminución en la producción de fenilalanina, posiblemente por la falta de algunos precursores. La síntesis de fenilalanina es un proceso que requiere de ATP, NADPH y glutamato. Estos precursores se obtienen principalmente a partir del TCA. En la cepa PB28 hay una escasez en la síntesis de estos precursores, derivados del piruvato. Cuando se utilizan cultivos suplementados con glucosa y piruvato, se observó un aumento en la producción de fenilalanina y una disminución en los intermediarios aromáticos (DHS y SHIK). Esto pudiera deberse a que la célula cuenta con piruvato externo para sintetizar precursores (ATP, NADPH y glutamato) necesarios en la biosíntesis de aromáticos. Esto ocasiona que se acumulen menos intermediarios aromáticos y que el flujo de carbono se dirija hacia la síntesis de fenilalanina.

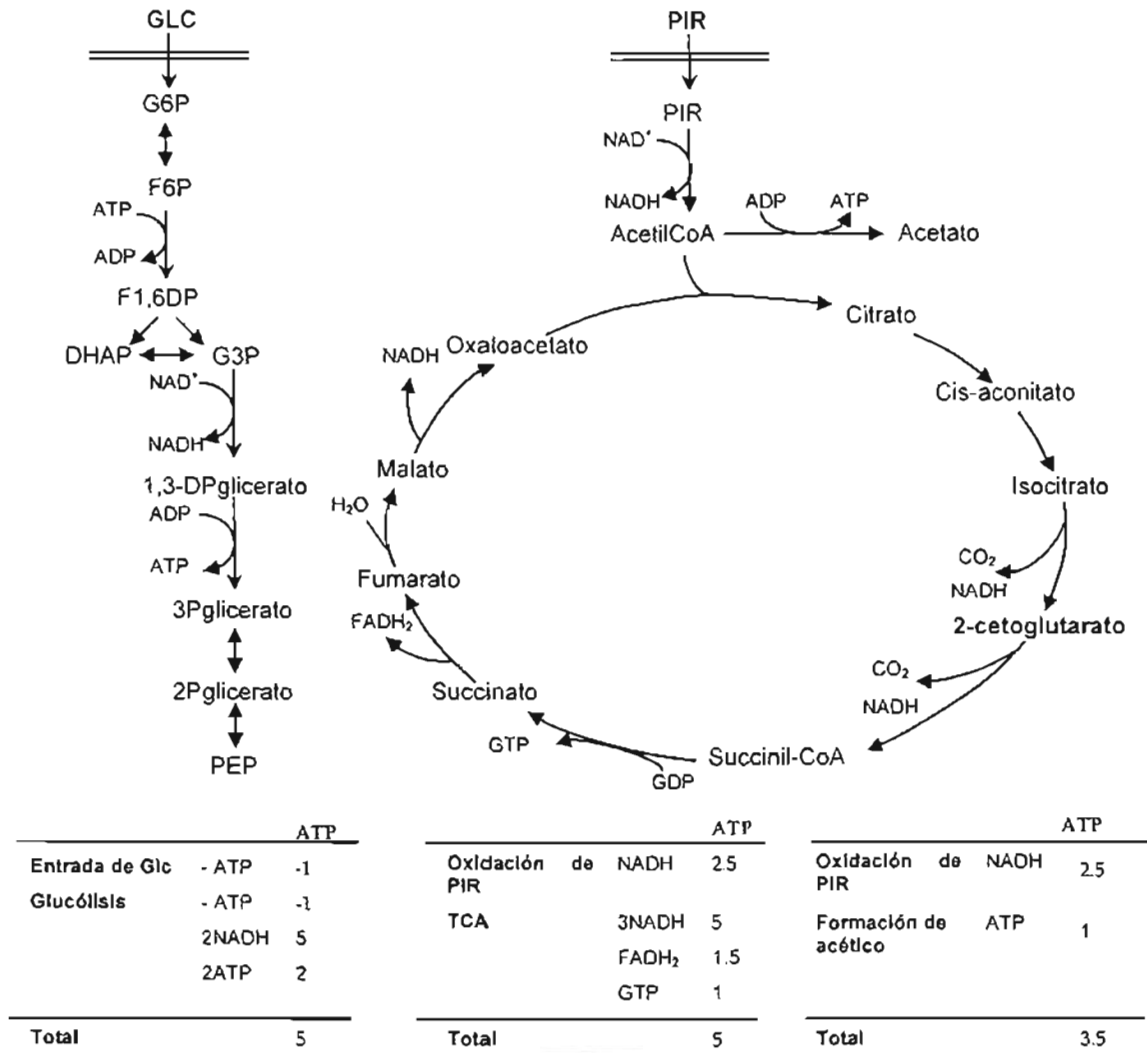


Figura 33. Vías metabólicas en las cuales se puede producir ATP.

8.5. Efecto de la presencia de los plásmidos en las cepas PB28, JM101 y PB12.

8.5.1. Consumo de glucosa en las cepas JM101, PB12 y PB28.

Se decidieron hacer experimentos con las cepas PB28, JM101 y PB12, sin transformar, para medir el consumo de glucosa y compararlo con los obtenidos al transformar a las cepas con los plásmidos *pJLBaroG^{fb}*, *pCLtkl* y *pTrcpheA^{ev2}*. Esto nos permitiría ver si el aumento en el consumo de glucosa es un fenómeno que se presenta solamente en la cepa PB28 (transformada y sin transformar), o si ese aumento en el consumo de glucosa se presentaba cuando la cepa se transformaba con los plásmidos.

En la figura 34 se muestra la comparación de la velocidad específica de consumo de glucosa entre las cepas transformadas con tres plásmidos y las cepas sin transformar. Para las cepas JM101 y PB12 no se observaron cambios significativos entre las cepas con plásmidos y las cepas sin transformar. El cambio más significativo se observó en la cepa PB28. Esta cepa transformada con los plásmidos *pJLBaroG^{fb}*, *pCLtkl* y *pTrcpheA^{ev2}* presentó un incremento en el consumo de glucosa del 200% con respecto a la cepa sin transformar.

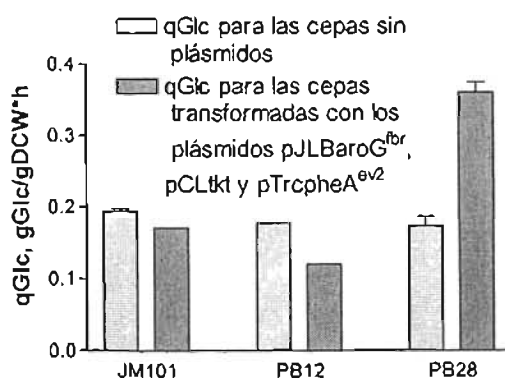


Figura 34. Consumo de glucosa para las cepas JM101, PB12 y PB28. Los datos de las cepas JM101 y PB12 transformadas con los plásmidos *pTrcpheA^{ev2}*, *pJLBaroG^{fb}* y *pCLtkl* se obtuvieron del trabajo de Báez Viveros (2004).

Las diferencias en el consumo de glucosa entre la cepa PB28 transformada y sin transformar puede deberse a la carga metabólica que genera la presencia de los plásmidos o bien a la actividad de las enzimas que expresan los genes contenidos en los plásmidos. La carga metabólica generada por los plásmidos puede ocasionar que aumenten los

requerimientos de ATP. Una de las modificaciones en el metabolismo de PB28 que podrían causar los plásmidos es el aumento en el consumo de glucosa para así poder generar una mayor cantidad de ATP. Este aumento solo se ve en la cepa PB28, ya que esta más limitada en su capacidad de sintetizar ATP y precursores que una cepa silvestre.

La cepa sin transformar tiene un bajo consumo de glucosa en un sistema de células en reposo, debido probablemente a que no requiere ATP ni precursores para biosíntesis, por lo que solamente utilice una cantidad mínima de ATP para su mantenimiento.

Al transformarla con diferentes plásmidos, la célula incrementa el flujo glucolítico y probablemente el flujo hacia la vía de las pentosas fosfato (PP) para generar una mayor cantidad de ATP y de precursores necesarios para la replicación de plásmidos y la generación de los productos de estos genes.

8.5.2. Consumo de glucosa en la cepa PB28 transformada con diferentes plásmidos

Se realizaron experimentos de células en reposo en M9 suplementado con glucosa utilizando a la cepa PB28 transformada con varios plásmidos para comprobar que el aumento en el consumo de glucosa se debe a la carga metabólica causada por los plásmidos o bien sea ocasionado por la expresión de los genes que contienen dichos plásmidos.

Para ello se utilizaron diversas combinaciones de los plásmidos pTrc*pheA*^{ev2}, pJL*BaroG*^{br} y pCL*tkl*, además de algunas combinaciones con plásmidos sin genes clonados (Tabla 5).

Tabla 5. Cepas originadas a partir de PB28 utilizando diversas combinaciones de plásmidos

Nombre	Características
PB28/pCL	PB28 transformada con el plásmido pCL vacío.
pB28/pTrc99A	PB28 transformada con el plásmido pTrc99A vacío.
PB28tkl	PB28/pCL <i>tkl</i>
PB28/pTrc99A,pACYC184	PB28 transformada con los plásmidos pTrc99A y pACYC184
PB28Gev2	PB28/pJL <i>BaroG</i> ^{br} y pTrc <i>pheA</i> ^{ev2}
PB28tklG	PB28/pJL <i>BaroG</i> ^{br} y pCL <i>tkl</i>
PB28tklGev1	PB28/pJL <i>BaroG</i> ^{br} , pCL <i>tkl</i> y pTrc <i>pheA</i> ^{ev1}
PB28tklGev2	PB28/pJL <i>BaroG</i> ^{br} , pCL <i>tkl</i> y pTrc <i>pheA</i> ^{ev2}

En la figura 35 se muestra el consumo de glucosa para las cepas transformadas de PB28 con diferentes combinaciones de plásmidos.

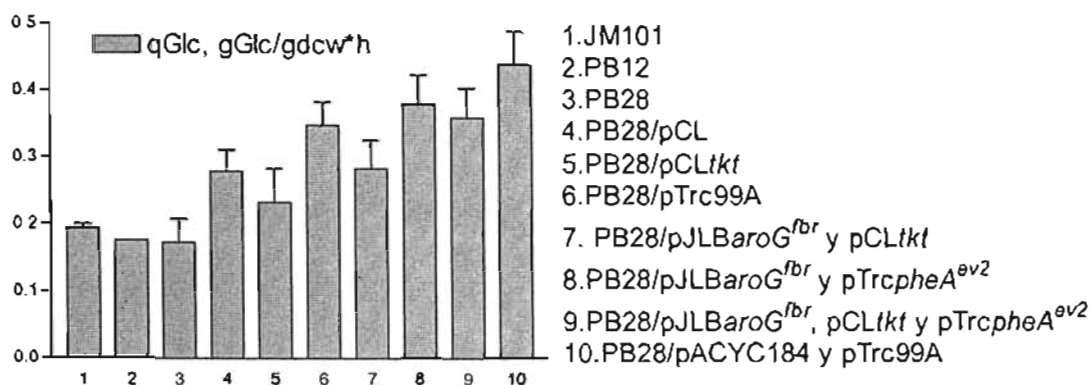


Figura 35. Consumo de glucosa para la cepa PB28 transformada con diferentes plásmidos.

Como se puede ver en la figura 34, el consumo de glucosa de la cepa PB28 sin transformar es similar al de las cepas PB12 y JM101 sin transformar. El consumo de glucosa para la cepa PB28 aumenta cuando la cepa se transforma con uno o con varios plásmidos. En la tabla 6 se observa el consumo de glucosa promedio para cada combinación, el número de copias aproximado de los plásmidos y el aumento en el consumo de glucosa de cada cepa con respecto a la cepa sin transformar.

Tabla 6. Consumo de glucosa para las diferentes versiones de PB28.

Cepa	# de copias de los plásmidos	q _{Glc} , Glc/gDCW*h	% de aumento en q _{Glc} con respecto a PB28
PB28		0.17 ± 0.01	
PB28/pCLtkt	~5	0.23 ± 0.05	35.29
PB28/pCL1920	~5	0.28 ± 0.03	64.71
PB28/pJLBaroG ^{fbr} y pCLtkt	~15	0.28 ± 0.04	64.71
PB28/ pTrc99A vacío.	~30	0.35 ± 0.03	105.88
PB28/pJLBaroG ^{fbr} y pTrcpheA ^{ev2}	~40	0.38 ± 0.04	123.53
PB28/pTrc99A y pACYC184	~40	0.44 ± 0.05	158.82
PB28/pJLBaroG ^{fbr} , pCLtkt y pTrcpheA ^{ev2}	~45	0.36 ± 0.04	111.76

El aumento en el consumo de glucosa para la cepa transformada va desde un 35% (PB28tkt) hasta un 150% (PB28 transformada con pTrc99A y pCL1920). Existe un aumento en el consumo de glucosa cuando la cepa PB28 es transformada con algún plásmido,

independientemente del número de plásmidos con el que se transforme o de la actividad que contengan los plásmidos. Las cepas se transformaron con el plásmido pTrc99A son las que tienen el mayor aumento en el consumo de glucosa,

La carga metabólica ocasionada por los plásmidos es la responsable del aumento en el consumo de glucosa, ya que la cepa aumenta el flujo glucolítico para poder sintetizar más ATP a través de la glucólisis. Probablemente, está aumentado el flujo de carbono en la vía de las pentosas este aumentado para poder sintetizar NADPH y precursores.

8.5.3. Replicación de plásmido durante un sistema de células en reposo

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosomales que se encuentran en una amplia variedad de especies bacterianas. Generalmente son moléculas de DNA circular de doble cadena con un rango de tamaño desde 1 kb hasta 200 kb. En muchos casos los plásmidos contienen genes que codifican para enzimas que bajo ciertas circunstancias resultan ventajosas para la célula. La replicación de los plásmidos se lleva a cabo por muchas de las enzimas que se usan para duplicar el cromosoma bacteriano.

Un método utilizado para obtener grandes cantidades de plásmido es adicionar cloranfenicol (50 g/ml) a un cultivo de células en crecimiento. El cloranfenicol es un antibiótico bacteriostático que actúa inhibiendo la síntesis de proteínas. Esto impide que la célula siga creciendo, pero favorece la replicación del plásmido. Este fenómeno de replicación de plásmido en presencia de cloranfenicol está reportado para los plásmidos con origen de replicación derivado de ColE1.

Se evaluó la cantidad de plásmidos presentes en la cepa PB28 transformada con los plásmidos pTrc99A y pACYC184. Se tomaron muestras a diferentes horas en un sistema de células en reposo para posteriormente purificar y cuantificar los plásmidos (Figura 36)

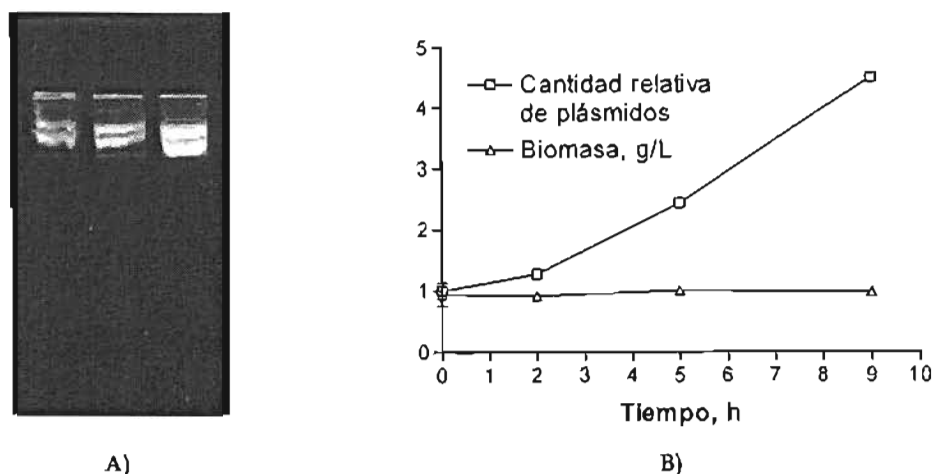


Figura 36. A) Cuantificación relativa mediante densitometría de la cantidad de los plásmidos pTrc99A y pACYC184 presente en un sistema de células en reposo. B) Gráfica representativa de la cantidad relativa de plásmido y la biomasa en un sistema de células en reposo. La cantidad de plásmido a la hora 0 se tomó como referencia para evaluar cuantas veces aumentó la cantidad de plásmido presente. Se puede observar que la cantidad de plásmido se incrementó a través del tiempo, mientras que la biomasa permaneció constante.

En la figura 36 se muestra una grafica representativa de la biomasa y la cantidad relativa de los plásmidos pTrc99A y pACYC184 en este sistema de células en reposo. La biomasa (g/L) se mantuvo constante mientras que la cantidad de plásmido relativa se incrementó a lo largo del tiempo. El consumo de glucosa se mantuvo constante y con un valor de q_{Glc} de 0.36 ± 0.04 gGlc/gDCW*h durante las 10 horas que duró el experimento.

Como puede observarse, la cepa PB28/pTrc99A y pACYC184 sintetiza plásmido a pesar de que no se encuentra creciendo. La cantidad de biomasa permanece constante, pero la cantidad de plásmido se incrementa.

El plásmido pTrc99A tiene como replicón a ColE1. Este origen de replicación se encuentra en un grupo de plásmidos que pueden replicarse en ausencia de la síntesis de proteínas. La presencia de cloranfenicol, a niveles que inhiban la síntesis de proteínas impide la replicación del DNA cromosomal. Sin embargo, el plásmido ColE1 continúa replicándose. Esta amplificación puede llegar a ser hasta de 50 veces (Scott 1984; Del Solar *et. al.*, 1998; Clewell 1972).

9. CONCLUSIONES

La inactivación de las isoenzimas piruvato cinasas en cepas que carecen del sistema de fosfotransferasa no es una buena estrategia para la producción de aminoácidos aromáticos. Los $Y_{L-Fen/Glc}$ y q_{L-Fen} , menores para la cepa PB28tktGev2 al compararla con la cepa PB12tktGev2, indican que el flujo de carbono se dirige en una menor proporción hacia la síntesis de fenilalanina. Esto probablemente se deba a la falta de glutamato y a que la vía final de síntesis de fenilalanina requiere de ATP. Una cepa que pueda utilizarse para la producción de L-Fen, con altos rendimientos, requiere una capacidad de producir piruvato mayor que en la PB28 pero en niveles menores que la cepa PB12.

El cálculo del balance energético (ATP) sugiere fuertemente que la cepa PB28tktGev2 esta limitada en su capacidad de sintetizar piruvato lo que limita su capacidad de generar ATP al 15% de una cepa silvestre. Este estado metabólico de limitación de ATP causa un flujo glucolítico alto, debido a que el ATP es un regulador negativo de la fosfofructocinasa, por lo que la inactivación de las piruvato cinasas en un fondo PTS⁻ Glc⁺ en mutantes que sobreexpresan simultáneamente *aroG^{fbr}*, *tkt* y *phe^{ev2}* (PB28tktGev2), incrementa significativamente la q_{Glc} comparada con las cepas JM101 y PB12 transformada con los mismos plásmidos.

La alimentación de piruvato disminuye el consumo de glucosa en un 30% en la cepa PB28tktGev2, mientras que el flujo hacia aromáticos aumenta al doble comparado con el que presenta la misma cepa utilizando glucosa como única fuente de carbono. La célula utiliza parte del piruvato que entra para sintetizar ATP, lo que ocasiona una disminución en el flujo glucolítico. Además de ATP, el piruvato adicionado en la célula puede sintetizar precursores derivados del TCA que permiten aumentar el flujo hacia la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos.

La cepa PB28 sin plásmidos tiene un consumo de glucosa menor que la cepa PB28tktGev2. Esto se debe a que para contender con la carga metabólica ocasionada por los plásmidos, la cepa requiere aumentar el flujo glucolítico para poder generar más ATP.

En esta cepa se observó la replicación de plásmido en un sistema de células en reposo. Es por eso que a pesar de que la célula no está creciendo, requiere de ATP para replicar los plásmidos, además de precursores para biosíntesis. Este fenómeno de replicación es la causa del aumento en el consumo de glucosa. Este aumento solo se ve en la cepa PB28, ya que esta es más limitada en su capacidad de sintetizar ATP que una cepa silvestre, como la JM101.

10. PERSPECTIVAS

Dado que la inactivación de las isoenzimas piruvato cinasas no fue una estrategia exitosa para dirigir el flujo de carbono hacia la producción de fenilalanina, se plantea utilizar una mutante sencilla (PTS⁻ Glc⁺ pykF⁻ o PTS⁻ Glc⁺ pykA⁻), o bien, una versión de las piruvato cinasas que no sea eficiente. El metabolismo de la cepa PB28 está tan afectado que la síntesis de L-Fen no se favorece debido a la falta de precursores y de ATP. Con las estrategias antes mencionadas se buscará que el consumo de PEP por las piruvato cinasas sea únicamente para sintetizar precursores y energía necesarios.

En el trabajo de Gosset (1996) se demostró que la inactivación de las piruvato cinasas era una buena estrategia para dirigir el flujo hacia aromáticos, aunque se trabajó con un medio complejo y se evaluó solamente un intermediario de la vía. En un medio suplementado con glucosa y piruvato se obtuvo un mayor flujo hacia aromáticos; el uso de un medio de cultivo complejo podría ser una estrategia para incrementar la producción de L-fenilalanina.

Se podrían medir algunos intermediarios a fin de completar la caracterización de la cepa PB28tkGev2, con el propósito de evaluar el perfil de metabolitos que esta cepa excreta. Esta medición puede incluir la medición de CO₂ para evaluar la pérdida de carbono. Mediante estudios radiorespirométricos y actividades enzimáticas se puede evaluar si la vía de las PP se encuentra más activa en la cepa PB28.

Existen otros compuestos derivados del PEP que son de interés industrial. La cepa PB28 tiene una mayor disponibilidad de PEP, por lo que podría ser utilizada para producir compuestos derivados de PEP además de los compuestos aromáticos. Mediante estrategias de ingeniería de vías metabólicas se puede evaluar el potencial de la cepa PB28 para sobreproducir otros compuestos derivados del PEP, por ejemplo, intermediarios del TCA o intermediarios de la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos.

11. REFERENCIAS.

1. Báez J. L., Bolívar F., Gosset G. 2001. Determination of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate productivity and yield from glucose in *Escherichia coli* devoid of the glucose phosphotransferase system. *Biotechnol Bioeng.* 73, 6: 530-535.
2. Báez J. L., Osuna J., Hernández G., Soberón X., Bolívar F., Gosset G. Metabolic engineering and Protein directed evolution increase the yield of L-Phenylalanine synthesized from glucose in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 2004.
3. Berry A., Dodge T. C., Pepsin M., Weyler W. 2002. Application of metabolic engineering to improve both the production and use of biotech indigo. *J Ind Microbiol. Biotech.* 28: 127-133.
4. Bongaerts J., Krämer M., Müller U. Raeven L., Wubbolts M. 2001. Metabolic engineering for microbial production of aromatic aminoacids and derived compounds. *Metab Eng* 3:289-300.
5. Chandran S. S., Yi J., Draths K. M., Daeniken R. Weber W., Frost J. W. 2003. Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. *Biotechnol Prog* 19: 808-814
6. Chatterjee R. Millard S. C., Champion K., Clark D. Donnelly M. 2001. Mutation of the *ptsG* gene results in increased production of succinate in fermentation of glucose by *Escherichia coli*. *Appl Env Microbiol*, 68: 148-154.
7. Chen R., Hatzimanikatis V., Yap WMGJ, Postma Pw, Bayley JE. 1997. Metabolic consequences of phosphotransferase (PTS) mutation in a phenylalanine-producing recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog* 13:768 775
8. Clewell B. D. 1972. Nature of col E1 plasmid replication in *Escherichia coli* in the presence of chloramphenicol. *Journal Bacteriol.* 110:667-676.
9. Del Solar G. Giraldo R. Ruiz-Echevarría M. Espinosa, Díaz-Orejas R. 1998. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62:434-464.
10. Draths K. M., Pompliano D. L., Conley D. L., Frost J. W. , Berry A., Disbrow G. L., Straversky R. J., Lievens J. C. 1992. Biocatalic synthesis of aromatic from D-glucose: the role of transketolase. *J. Am Chem Soc* 114: 3956-3962.

11. Flores N., Yong-Xiao J., Berry A., Bolívar F., Valle F., 1996. Pathway engineering for the production of aromatics compounds in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 14: 620-623.
12. Flores S., Gosset G., Flores N., de Graff., Bolívar F. 2002. Analisis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by ¹³C labeling an NMR spectroscopy. *Metab Eng* 4: 124-137.
13. Förberg C., Eliaeson T., Häggström L. 1988. Correlation of theoretical and experimental yields of phenylalanine from non growing cells of a *rec Escherichia coli* strain. *J. Biotechnol* 7:319-332.
14. Frost JW, Draths KM. 1995 Biocatalytic synthesis of aromatics from D-Glucosa: Renewable microbial sources of aromatics compounds. *Annu Rev Microbiol.* 49: 557-2579.
15. Gething M.J., Davidson b. E., Dopheide T. A., 1976. Chorismate mutase/prefenate desidratase from *Escherichia coli* K-12. *Eur J Biochem.* 71:317-325.
16. Gosset G., Yong Xiao J., Berry A. 1996. A direct comparision of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol* 17:47-52.
17. Irani H. M., Maitra P. K. 1977. Properties of *Escherichia coli* mutants deficient in enzymes of glycolisis. *J Bacteriol.* 132:398-410
18. Koebmann B., Westerhoff H., Snoep J., Nilsson D., Jensen P. 2002. The Glycolitic Flux en *Escherichia coli* is controlled by the demand for ATP. *J. Bacteriol.* 14:3909-3916.
19. Koebmann B., Westerhoff H., Snoep J., Solem C., Pederson M., Nilsson D., Michelsen O., Jensen P. 2002. The extent to which ATP demand controls the glycolitic flkuz depends strongly on the organism and conditions growth. *Molec. Biol. Rep.* 29:41-45.
20. Lagunas Muñoz, V. H. 2004. Estudio paramétrico para la producción de melanina en *Escherichia coli* recombinante. Instituto de Biotecnología, UNAM. Tesis de licenciatura.
21. Lang J. V., Leystra-Lantz C., Cook R. 1987. Characterizacion of the specific pyruvate ransport system in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*

22. Lee Y. S., Hong H. S. Moon Y. S. 2002. *In silico* metabolic pathway analysis and design: succinic production by metabolically engineered *Escherichia coli* as an example. *Genome Informatics* 13: 214-223.
23. Lin H. Bennet G. San K. 2005. Genetic reconstruction of the aerobic central metabolism in *Escherichia coli* for the absolute aerobic production of succinate. *Biotechnol Bioeng* 89: 148-156.
24. Lloyd J. R., Thomas G.H., Finlay J. A., Cole J. A., Macaskie L. E. 1999. Microbial reduction of technetium by *Escherichia coli* and *Desulfovibrio desulfuricans*: enhancement via the use of high-activity strains and effect of process parameters. *Biotechnol Bioeng*. 66:122-130.
25. Lu J.l., Liao J.C. 1997. Metabolic engineering and control analysis for production of aromatics: role of transaldolase. *Biotechnol Bioeng* 53:132-138.
26. Mascarenhas D., Ashworth D. J., Chen C. S. 1991. Deletion of *pgi* alters tryptophan biosynthesis in a genetically engineered strain of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 57: 2995-2999.
27. Miller E. J., Backman C. K., O'Connor M. J., Hatch T. R. 1987. Production of phenylalanine and organic acids by phosphoenolpyruvate carboxylase-deficient mutants of *Escherichia coli*. *Journal Ind Microbiol*. 2: 143-149
28. Nelms J., Gonzalez D. H., Yoshida T., Fotheringham I. 1992. Novel mutations in the *pheA* gene of *Escherichia coli* K-12 which result in highly feedback inhibition-resistant variants of chorismate mutase/prephenate dehydratase. *Appl Environ Microbiol*. 58:2592-2598.
29. Niu W., Draths KM., Frost J. W., 2002. Benzene-free synthesis of adipic acid. *Biotechnol Prog* 18:201-211.
30. Patnaiak R. Spitzer R. G. Liao J.C. 1995. Pathway engineering for production of the aromatics in *Escherichia coli*
31. Patnaiak R., Liao J. C., 1994. Engineering of *Escherichia coli* central metabolism for aromatic metabolite production with near theoretical yield. *Appl Environ Microbiol*. 60: 3903-3908.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

32. Pohnert G., Zhang S., Husain A. Wilson D. B., Ganem B. 1999. Regulation of phenylalanine biosynthesis. Studies on mechanism of phenylalanine binding and feedback inhibition in the *Escherichia coli* P-protein. *Biochem* 38:(12212-12217)
33. Ponce E., Flores N., Martínez A., Valle F., Bolívar F. 1995 Cloning of two pyruvate kinase isoenzymas structural genes from *Escherichia coli* : the relative roles of these enzymes in pyruvate biosynthesis. *J. Bacteriol* 177: 5719-5722.
34. Ponce E., Martínez A., Bolívar F., Valle F. 1998. Stimulation of glucosa catabolism through the pentose pathway by the absence of the two pyruvate kinase isoenzymes in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 58:292-295.
35. Postma P.W., Lengeler J. W. Jacobson G. R. 1987. Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate Phosphotransferase Systems. In: *Escherichica 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.
36. Priefert H., Rabenhorst J., Steinbuchel A. 2001. Biotechnological production of vainillin. *Appl Microbiol Biotechnol*. 56:296-314.
37. Scott R. J. 1984. Regulation of plasmid replication. *Microbiol rev*. 48:1-23.
38. Tonouchi, N., Kojima H., Matsui H. 1997. Recombinant DNA sequences encoding feedback inhibition released enzymes, plasmids comprising the recombinant DNA sequences, transformed microorganisms useful in the production of aromatic aminoacids and a precess for preparing aromatic aminoacids bye fermentation. EP 0488424 B1.
39. Tormo M., Izco J. M., 2004. Alternative reversed-phase high-performance liquid chromatography method to analyse organic acids in dairy products. *J Chromatography A*. 1033:305-310.
40. Yi J. Draths K. M. Li K., Frost J. W. 2002. Modulation of phoesphoenolpiruvate synthasa expression increases shikimate pathway product yields in *E. coli*. *Biotechnol Prog*. 18:1141-11418
41. Yi J. Draths K. M. Li K., Frost J. W. 2003. Altered glucose transport and shikimate pathway yields in *E. coli*
42. Zhan S., Pohnert G., Kongsaree P., Wilson D. B., Clardy J., Ganem B. 1998. Chorismate mutase-prefenate dehydratase from *Escherichia coli*. Study of catalytic

and regulatory domains using genetically engineered proteins. J Biol chem. 273:6248-6253.

12. ANEXOS

12.1. Anexo 1. Nomenclatura

A continuación se muestra la nomenclatura utilizada en este trabajo.

NOMENCLATURA

Metabolito	Nombre
α KG	α -cetoglutarato
6PG	6-fosfogluconato
Acetil-CoA	acetil coenzima A
ANTA	antranilato
CDRP	1-(<i>o</i> -carboxifenilamino)-1-deoxiribulosa-5-fosfato
CHO	corismato
CHO	corismato
CIT	citrato
DAHP	3-desoxi-D- <i>arabino</i> -heptulosonato 7-fosfato
DHAP	dihidroxi-acetona-fosfato
DHQ	3-deshidroquinato
DHS	3-dehidrosiquimato
E4P	eritrosa 4- fosfato
EPSP	5- <i>enol</i> piruvilsiquimato 3-fosfato
F6P	fructosa 6- fosfato
G3P	gliceraldehido-3-fosfato
G6P	glucosa 6- fosfato
GA3P	gliceraldehido 3-fosfato
Glc	glucosa
HPP	4-hidroxifenilpiruvato
I3GP	indol 3-glicerol-fosfato
IND	indol
L-Fen	L-fenilalanina
L-Gln	L-glutamina
L-Glu	L-glutamato
L-Ser	L-serina
L-Tir	L-tirosina

L-Trp	L-triptofano
MAL	malato
OAA	oxaloacetato
PEP	fosfoenolpiruvato
PPA	prefenato
PPI	fenilpiruvato
PRAA	fosforibosil antranilato
PRPP	5-fosforibosil- α -pirofosfato
R5P	ribosa 5-fosfato
S3P	siquimato-3-fosfato
S7P	sedoheptulosa 7- fosfato
SHIK	siquimato
X5P	xilulosa 5-fosfato

Gene	Enzima
<i>aroA</i>	EPSP sintasa
<i>aroB</i>	DHQ sintasa
<i>aroC</i>	CHO sintasa
<i>aroD</i>	DHQ deshidrogenasa
<i>aroE</i>	SHIK deshidrogenasa
<i>aroF, aroG, aroH</i>	DAHHP sintasa
<i>aroL, aroK</i>	SHIK cinasa
GalP	Galactosa permeasa
<i>glk</i>	Glucocinasa
<i>ldh</i>	Lactato deshidrogenasa
<i>melA</i>	Tirosinasa
<i>pck</i>	PEP carboxiquinasa (PCK)
<i>pfl</i>	Piruvato formato liasa
<i>pgi</i>	Fosfoglucosa isomerasa (PGI)
<i>pheA</i>	Corismato mutasa-prefenato deshidratasa (PheA)
<i>ppc</i>	PEP carboxilasa (PPC)
PTS	Sistema de transporte fosfotransferasa
<i>ptsHI, crr</i>	Proteínas generales del PTS y enzima IIA ^{Glc} , respectivamente.

<i>talA</i>	Transaldolasa
<i>tktA</i>	Transcetolasa

Símbolo	Definición
ATP	Adenosín trifosfato
Cm	Cloramfenicol
DO	Densidad óptica a determinada longitud de onda
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMP	Vía de Embden-Meyerhof-Parnas
FADH ₂	Flavina Adenín Dinucleótido
IM	Ingeniería Metabólica
IPTG	Inductor gratuito de la expresión del operón de lactosa (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido)
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
NADH	Nicotinamida adenín dinucleótido
NADPH	Nicotiamida-Adenín Dinucleótido Fosfato,
PP	Vía de las pentosas fosfato
PTS	Sistema de fosfotransferasa
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
Δ	Eliminación

Parámetros de cultivo

Símbolo	Unidades	Definición
DCW	gDCW/L	Peso seco de células, por sus siglas en inglés Dry Cell Weight
q _{Glc}	gGlc/gDCW*h	Velocidad específica de consumo de glucosa.
q _{L-Fen}	gL-Fen/gDCW*h	Productividad específica de fenilalanina.
q _P	gP/gDCW*h	Velocidad específica de formación del producto.
q _{PIR}	gPir/gDCW*h	Velocidad específica de consumo de piruvato.
q _S	gS/gDCW*h	Velocidad específica de consumo del sustrato
Y _{L-Fen/Glc}	gL-Fen/gGlc	Rendimiento g/g de fenilalanina a partir de glucosa.

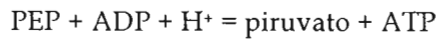
12.2. Anexo 2. Reacciones en las que participa el piruvato.

La siguiente lista muestra las reacciones reportadas para la síntesis y consumo de piruvato en *E. coli* (www.ecocyc.com).

REACCIONES EN LAS QUE SE SINTETIZA PIRUVATO

Metabolismo central

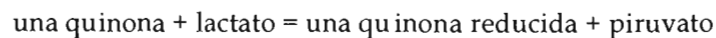
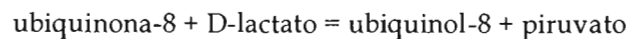
Glicólisis



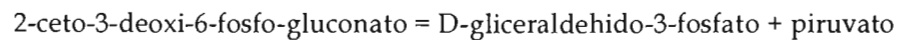
Gluconeogénesis



Respiración, como donador de electrones

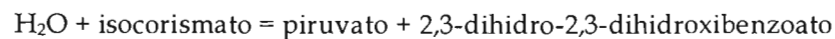


Vía de Entner Doudoroff

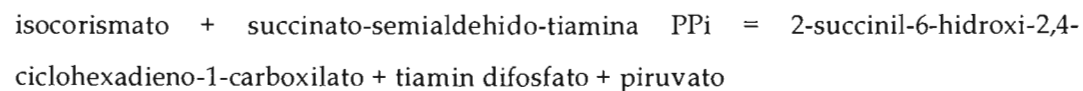


Biosíntesis

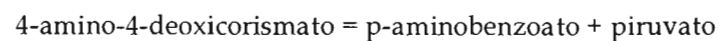
Biosíntesis de enterobactina



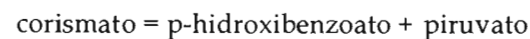
Biosíntesis de menaquinona



Biosíntesis de tetrahidrofolato

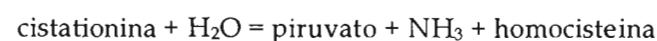


Biosíntesis de ubiquinona

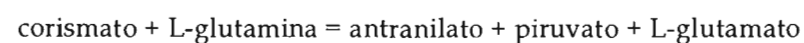


Biosíntesis de aminoácidos

Biosíntesis de metionina

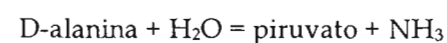


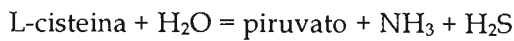
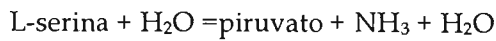
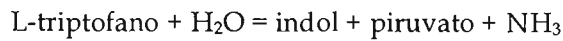
Biosíntesis de triptofano

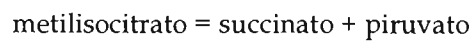
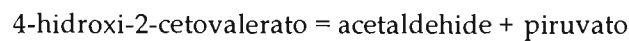
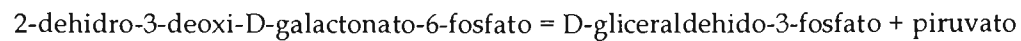
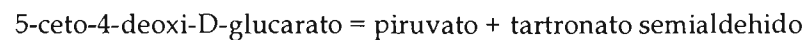
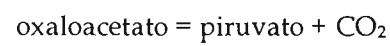
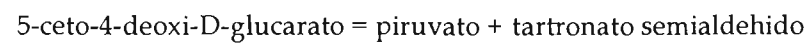
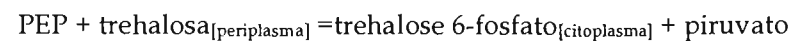
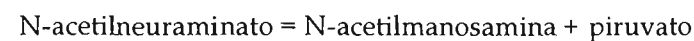


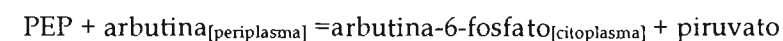
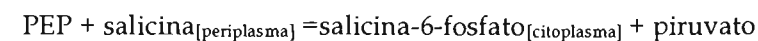
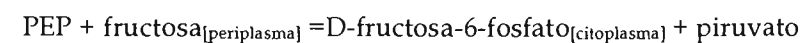
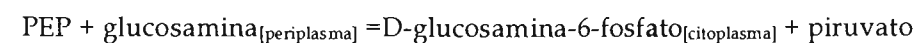
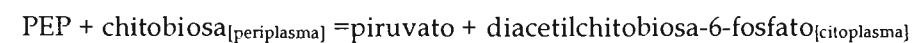
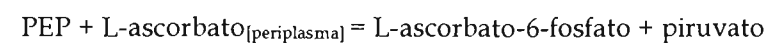
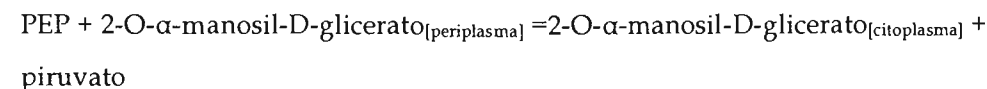
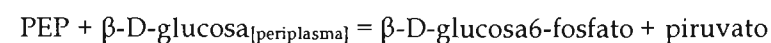
Degradación aminoácidos

Degradación de alanina



Degradación de L-cisteínaDegradación de L-serinaDegradación de L-triptofanoDegradación/Utilización/Asimilación

Ciclo del metilcitratoDegradación del 3-fenilpropionato y 3-(3-hidroxifenil)propionatoDegradación de galactonatoDegradación de D-galactaratoDegradación de glioxilatoDegradación de D-glucaratoDegradación de trehalosa (baja osmolaridad)Disimilación de N-acetilglucosamina, N-acetilmanosamina y ácido N-acetilneuraminicoReacciones de transporte



PEP + manitol_[periplasma] = manitol-1-fosfato_[citoplasma] + piruvato

PEP + celobiosa_[periplasma] = celobiosa-6-fosfato_[citoplasma] + piruvato

PEP + galactitol_[periplasma] = galactitol-1-fosfato_[citoplasma] + piruvato

PEP + fructosa_[periplasma] = fructose-1-fosfato_[citoplasma] + piruvato

PEP + N-acetil-D-glucosamina_[periplasma] = N-acetil-D-glucosamina-6-fosfato_[citoplasma] +
piruvato

PEP + manosa_[periplasma] = manosa-6-fosfato_[citoplasma] + piruvato

PEP + sorbitol_[periplasma] = D-sorbitol 6-fosfato_[citoplasma] + piruvato

PEP + trehalosa_[periplasma] = trehalosa 6-fosfato_[citoplasma] + piruvato

REACCIONES EN LAS QUE SE CONSUME PIRUVATO

Metabolismo central

Fermentación

piruvato + coenzima A = formiato + acetyl-CoA

NADH + piruvato = NAD⁺ + D-lactato

piruvato + ubiquinona-8 + H₂O = acetato + CO₂ + ubiquinol-8

Gluconeogénesis

H₂O + piruvato + ATP = fosfato + PEP + AMP

piruvato dehidrogenasa

piruvato + AceF-lipoato = AceF-S-acetildihidrolipoato + CO₂

Biosíntesis

Biosíntesis de isopentenil difosfato

piruvato + D-gliceraldehido-3-fosfato = CO₂ + 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato

Biosíntesis de piridoxal 5'-fosfato

piruvato + D-gliceraldehido-3-fosfato = CO₂ + 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato

Biosíntesis de tiamina

piruvato + D-gliceraldehido-3-fosfato = CO₂ + 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato

Biosíntesis de aminoácidos

Biosíntesis de alanina

piruvato + L-valina = L-alanina + 2-ceto-isovalerato

L-glutamato + piruvato = α-cetoglutarato + L-alanina

Biosíntesis de isoleucina

piruvato + 2-oxobutanoato = 2-aceto-2-hidroxi-butirato + CO₂

Biosíntesis de lisina

piruvato + L-aspartato-semialdehido = 2 H₂O + L-2,3-dihidrodipicolinato

Biosíntesis de valina

2 piruvato = 2-aceto-lactato + CO₂

Degradación

Degradación del glioxilato

piruvato + coenzima A + NAD⁺ = acetil-CoA + CO₂ + NADH