



Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Autónoma de México

“Generación y caracterización de cepas de *Escherichia coli* productoras de antranilato y catecol”

T E S I S

Que para obtener el título de:

Bióloga

Presenta:

Andrea Sabido Ramos

Tutor: Dr. Guillermo Gosset Lagarda

Octubre, 2006



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 asesoría del Dr. Guillermo Gosset Lagarda en el departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para la realización del mismo se contó con el financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) a través del proyecto IN-205005-2 UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi máxima casa de estudios y por todas las satisfacciones y apoyos que me otorgó para la realización de mis estudios durante la carrera

A mi tutor el Dr. Guillermo Gosset Lagarda por haberme permitido ser parte de su grupo de laboratorio y sobre todo por creer en mí, por darme confianza y fuerza en lo que hacía, por impulsarme en cada momento de desesperación y frustración. A él le doy gracias por reafirmar en mí el amor a la Biología.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Adelfo Escalante, Dr. Alfonso Vilchis, Dr. Luis Gerardo Treviño y Dr. Víctor Valdés, por su tiempo, sugerencias y apreciables comentarios para la corrección de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio: Adris, César, Gerardo, José, Juan Carlos, Karla, Marina, Monse, Ramón, Silvia, Susi y Telma por hacerme parte de un grupo de laboratorio tan solidario y competente como ninguno. Gracias a todos y cada uno de ustedes, nunca los podré olvidar. En especial le quiero dar las gracias a Eugenio, Geo, Inés, Lidia, Mechita, Naty y Paty por su ayudado en la realización de este proyecto. A Eugenio por ser mi incondicional, a Geo por su apoyo técnico y enseñanza en las artes ocultas del HPLC, a Inés y a Naty por ser mis más grandes maestras de la teoría y la práctica, y por toda la ayuda permanente que me brindaron, a Lidia por sus enseñanzas, su bondad y por haber estado conmigo en las buenas y en las malas, a Mechita por su apoyo técnico y enormes ganas de ayudar y a Paty por encaminarme en la continuación de este proyecto.

A mis amigas del IBt: Daniela, Lore, Mariana y Martha, por su cariño y agradable compañía dentro y fuera del laboratorio, y a las chicas del grupo de danza árabe por hacer mi estancia aún más feliz y placentera con lo que más amo.

A mis amigos de la facultad: Adrián, Caro Montes, Caro Ureta, Cassandre, Humberto, Marco y Romy, por ser parte de mis mejores momentos durante la carrera.

A mi familia: Mi mamá, mi hermana, Emilio y Gabo por ser mi todo, por brindarme su amor incondicional a pesar de no haber podido estar con ellos todo lo que hubiera querido, y por darme fuerzas en mis momentos más difíciles.

Y finalmente pero no al último, a la persona que sólo comprendía que trabajaba con bichos y autoclaves pero que siempre estuvo a mi lado, y a pesar de lo que nos pasó, siempre te tendré en mi corazón como el primer y gran amor que fuimos.

I. Índice general	i
II. Abreviaciones	iv
1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Antecedentes	6
3.1 <u>Metabolismo central</u>	6
3.1.1 Transporte de glucosa en <i>Escherichia coli</i>	8
3.1.2 Sistema de fosfotransferasa.....	8
3.2 <u>Estrategias de ingeniería metabólica para incrementar la disponibilidad de los precursores E4P y PEP</u>	10
3.2.1 Incremento de PEP.....	10
3.2.2 Incremento de E4P.....	13
3.3 <u>Vía de síntesis de compuestos aromáticos</u>	13
3.3.1 Compuestos aromáticos con aplicaciones industriales.....	16
3.3.1.1 Antranilato y catecol.....	16
3.3.2 Estrategias para la producción de aminoácidos aromáticos en <i>E. coli</i>	17
3.3.2.1 Síntesis de antranilato en <i>E. coli</i>	18
3.3.2.2 Generación de cepas de <i>E. coli</i> modificadas para la producción de antranilato.....	19
3.3.2.3 Síntesis de catecol en cepas de <i>E. coli</i> a partir de glucosa.....	21
3.3.2.4 Síntesis de catecol a partir de antranilato.....	21
3.3.3 Toxicidad del antranilato y catecol.....	23
4. Justificación	25

5. Hipótesis	26
6. Objetivos	27
6.1 Objetivo general.....	27
6.2 Objetivos particulares.....	27
7. Materiales y métodos	28
7.1 Cepas y plásmidos.....	28
7.2 Técnicas genéticas y de DNA recombinante.....	30
7.2.1 Transformación de DNA.....	30
7.2.2 Purificación de DNA.....	30
7.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	30
7.2.4 Estrategia de clonación del gene <i>tktA</i> en un plásmido de bajo número de copias.....	31
7.2.5 Clonación de los genes <i>trpEGD</i> en el plásmido pCL1920.....	32
7.2.6 Generación de una cepa derivada PTS ⁻ Glc ⁺ a partir de <i>E. coli</i> W3110 <i>trpD9923</i>	33
7.3 Métodos analíticos.....	34
7.3.1 Evaluación de los metabolitos excretados mediante HPLC.....	34
7.3.2 Determinación de glucosa.....	34
7.4 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	34
7.4.1 Medios de cultivo.....	34
7.4.2 Condiciones de crecimiento.....	35
8. Resultados	36
8.1 Construcción y caracterización de un plásmido de bajo número de copias que contenga los genes <i>aroG^{br}</i> y <i>tktA</i>	36
8.2 Efecto de la inactivación de PTS y de sobreexpresar el gene <i>galP</i> en la cepa productora de antranilato W3110 <i>trpD9923</i>	40
8.3 Efecto de la introducción del plásmido pJLBaro <i>G^{br}tktA</i> en la	

cepa productora de antranilato W3110 <i>trpD9923</i> PTS ⁻ Glc ⁺	44
8.4 Efecto de la introducción del plásmido que contiene los genes <i>antABC</i> sobre la capacidad de producir catecol en las cepas: JM101 <i>trp</i> ⁻ /pCL <i>trpEG</i> , JM101 <i>trp</i> ⁻ /pCL <i>trpEG</i> /pJLBaro <i>G</i> ^{fbr} , PB12 <i>trp</i> ⁻ /pCL <i>trpEG</i> y PB12 <i>trp</i> ⁻ /pCL <i>trpEG</i> /pJLBaro <i>G</i> ^{fbr}	47
9. Discusión	51
9.1 Efecto de la sobreexpresión de los genes <i>aroG</i> ^{fbr} y <i>tktA</i> sobre la capacidad de producir antranilato en la cepa W3110 <i>trpD9923</i>	51
9.2 Reconstitución y caracterización del fenotipo Gluc ⁺ en la cepa W3110 <i>trpD9923</i> carente del Sistema de Fosfotrasferasa	52
9.3 Efecto de la introducción del plásmido pJLBaro <i>G</i> ^{fbr} <i>tktA</i> en la cepa productora de antranilato W3110 <i>trpD9923</i> PTS ⁻ Glc ⁺	55
9.4 Generación de cepas de <i>E. coli</i> modificadas para la producción de catecol	57
10. Conclusiones	59
11. Perspectivas	61
12. Bibliografía	62
13. Apéndice	66
13.1 Curvas de calibración	66
13.2 Determinación de parámetros cinéticos	67
13.2.1 Velocidad de crecimiento específica (μ)	67
13.2.2 Cálculo de la biomasa (X)	67
13.2.3 Rendimientos ($Y_{x/s}$) ($Y_{p/x}$) y ($Y_{p/s}$)	67
13.2.4 Rendimiento máximo teórico	67
13.2.5 Velocidad específica de consumo de azúcar (q_s) y de producción (q_p)	67

II. Abreviaciones básicas empleadas

Abreviatura	Nombre completo
Ant	Antranilato
Ap	Ampicilina
COR	Corismato
DAH _P	3-deoxi-D- <i>arabino</i> -heptulosonato 7-fosfato
DHQ	3-dehidroquinato
DHS	3-dehidrosiquimato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E4P	Eritrosa 4-fosfato
GalP	Permeasa de galactosa
Glk	Glucocinasa
Gluc/ Glc	Glucosa
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
IVM	Ingeniería de vías metabólicas
Km	Kanamicina
L-Fen	L-fenilalanina
L-Trp	L-triptofano
L-Tir	L-tirosina
Pck	PEP carboxicinas
PEP	Fosfoenolpiruvato
Ppc	PEP carboxilasa
PpsA	PEP sintasa A
PRA	Fosforibosil antranilato
PRPP	5-fosforibosil-α-pirofosfato
PTS	Sistema de fosfotransferasa
PykA y pykF	Piruvato cinasa
Pir	Piruvato
q _p	Velocidad específica de productividad
q _s	Velocidad específica de consumo de azúcar
SIQ	Siquimato
Spt	Espectinomicina
Tc	Tetraciclina
Trp ⁻	Auxotrofia a triptofano
Y	Rendimiento
^{max} Y	Rendimiento máximo teórico

1. Resumen

La vía de síntesis de los aminoácidos aromáticos o vía del ácido siquímico, es una fuente de compuestos de gran interés comercial (tales como saborizantes, aromatizantes, pigmentos, colorantes, protectores solares y fármacos) por sus aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria. Debido a esto, la capacidad de biosíntesis de aminoácidos aromáticos en *Escherichia coli* se ha modificado utilizando diferentes estrategias, principalmente de ingeniería de vías metabólicas, y alternativas tecnológicas sustentables y amigables con el ambiente. como la biotecnología, con la finalidad de obtener mejores cepas productoras de estos compuestos.

En este trabajo, se compararon diferentes cepas de *E. coli* que fueron modificadas mediante IVM con la finalidad de establecer el efecto de dichas alteraciones al metabolismo, sobre la capacidad de síntesis de antranilato y catecol. Para este fin se partió de la cepa silvestre W3110*trpD9923*, la cual presenta una mutación en el gene *trpD* que causa la inactivación de la enzima antranilato PRPP transferasa, lo cual ocasiona que el antranilato sintetizado no sea convertido en PRA y por lo tanto se acumula y secreta.

Con la finalidad de comprometer el flujo de carbono hacia la síntesis de antranilato, se inactivó en dicha cepa el transporte de glucosa por medio del sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS-PEP).

La cepa resultante W3110*trpD9923* PTS⁻ mostró un crecimiento limitado en glucosa con una tasa específica de crecimiento (μ) de 0.13 h⁻¹. Sin embargo logró un rendimiento ($Y_{ant/glu}$) de 31.53 mg ant/g gluc, el cual corresponde al 9% del máximo teórico (0.35 g/g). Posteriormente, se decidió sobreexpresar el gene *galP* que codifica para la enzima permeasa de galactosa, responsable de la internalización de la glucosa al citoplasma, la cepa W3110*trpD9923* ahora bajo un fondo genético PTS⁻Glc⁺ alcanzó un μ de 0.25 h⁻¹, lo que corresponde al 52% de la μ calculada para la cepa silvestre W3110*trpD9923* (0.48 h⁻¹). La cepa W3110*trpD9923* PTS⁻Glc⁺ contrario a lo que se esperaba obtuvo a penas un rendimiento de 15.95 mg ant/ g gluc, que corresponde al 4.5% del máximo teórico.

Este es el primer trabajo en el que cepas con fondo PTS⁻Glc⁻ poseen potencial para la síntesis de compuestos aromáticos.

Siguiendo con el objetivo de incrementar el flujo de carbono hacia la síntesis del compuesto antranilato, se decidió sobreexpresar en la cepa W3110*trpD9923* PTS⁻Glc⁺ los genes *aroG^{fb}* y *tktA* conjuntamente, los cuales codifican para una versión de la enzima DAHP sintasa insensible a inhibición alostérica por fenilalanina y para la enzima tranacetolasa encargada de la síntesis del precursor E4P respectivamente. Esta nueva cepa resultó ser la mejor productora de antranilato con un rendimiento de 42.36 mg ant/g gluc, el cual es un 34% mayor comparado con su contraparte PTS⁻. La nueva cepa W3110*TrpD9923* PTS⁻ Glc⁺/ pJLBaro*G^{fb}tktA* alcanzó un rendimiento máximo teórico del 12%.

Finalmente, se evaluó el efecto de introducir los genes *antABC* en cepas derivadas de JM101*trp⁻* y PB12*trp⁻* sobre la productividad y el rendimiento en la síntesis de catecol a partir de glucosa. Estas cepas se transformaron con tres plásmidos que portan los genes que codifican para la enzima antranilato sintasa, que cataliza la conversión de corismato a antranilato (*trpEGD*), la enzima DAHP sintasa insensible a inhibición alostérica por fenilalanina (*aroG^{fb}*), y la enzima antranilato dioxigenasa, que convierte el antranilato en catecol (*antABC*). Los experimentos mostraron que únicamente las cepas derivadas de JM101*trp⁻* sintetizaron catecol, lográndose un incremento en el rendimiento ($Y_{\text{cat/glu}}$) de este compuesto entre la cepa que expresa los genes *trpEGD* y *antABC*, y la cepa que expresa los tres genes (*trpEGD*, *aroG^{fb}* y *antABC*) de 3.31 a 32.85 mg cat/g gluc respectivamente. En estas cepas se logró producir catecol a partir de antranilato endógeno con rendimientos del 8 y 37.5% respectivamente.

2. Introducción

La biotecnología moderna es una actividad que se sustenta en el conocimiento y las metodologías de diferentes disciplinas, dentro de las que resalta la genética moderna, la bioquímica, la biología celular y molecular, entre otras. Su uso ha permitido el desarrollo de procesos de producción alternos a aquellos utilizados por la síntesis química.

Uno de los principales intereses de la biotecnología se centra en la sustitución de tecnologías que comprometen al ambiente por otras de carácter biológico que no generen subproductos tóxicos dañinos para éste. Es así como la biotecnología se caracteriza por el uso de materias primas constituidas por fuentes naturales renovables de carbono como la glucosa y otros azúcares, así como de organismos genéticamente modificados (OGM) que actúan como biocatalizadores, lo cual a su vez permite utilizar el agua como solvente y temperaturas de procesos no mayores a los 37°C (Frost & Draths, 1995; Gosset *et al.*, 1996).

La biotecnología, a través de la ingeniería de vías metabólicas y de proteínas, ha permitido desarrollar cepas bacterianas con el potencial para sintetizar moléculas útiles. El objetivo de la IVM es redirigir los flujos metabólicos para incrementar la producción de metabolitos que el organismo produce, lograr que sintetice otros nuevos, y/o ampliar el rango de los sustratos que utiliza. Mediante el desarrollo de tecnologías como la del DNA recombinante ha sido posible la modificación de las vías metabólicas y la generación de microorganismos sobreproductores de compuestos de interés industrial (Nielsen, 2001)

Uno de los ejemplos más claros de la aplicación de la IVM es sobre la vía de síntesis de compuestos aromáticos. Los compuestos aromáticos primarios incluyen a los aminoácidos aromáticos: triptofano (L-Trp), fenilalanina (L-Fen) y tirosina (L-Tir), así como también el ácido fólico, menaquinona y ubiquinona. Los aminoácidos aromáticos son de importancia económica por su uso en la industria alimenticia como aditivos, saborizantes y aromatizantes; como precursores en la síntesis de fármacos, y en la producción de cosméticos. Sin embargo, estos compuestos se han venido obteniendo a partir de procesos químicos dependientes de materias primas derivadas del petróleo, y al

ser éste un recurso natural no renovable así como uno de los principales conflictos entre naciones por su monopolio, su disponibilidad se verá limitada en el futuro. Por estos motivos, la industria química ha buscado alternativas tecnológicas que permitan producir compuestos aromáticos mediante procesos no contaminantes y que no dependan del petróleo. Una de las alternativas tecnológicas más promisorias es la biotecnología (Bongaerts *et al.*, 2001; Flores *et al.*, 1996; Gosset *et al.*, 1996).

Así pues, con el propósito de lograr la síntesis microbiana de este tipo de compuestos, se han diseñado mediante IVM cepas de *E. coli* que presentan versiones insensibles a inhibición alostérica de las enzimas claves de esta ruta, así como también un incremento en la disponibilidad de los precursores directos de los aminoácidos aromáticos, el PEP y la E4P, ya que tienen sobreexpresados los genes de las enzimas que los producen o inactivados aquellos que los consumen; lo anterior con la finalidad de redirigir el flujo de carbono hacia la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos (Flores *et al.*, 1996; Gosset *et al.*, 1996).

Un compuesto aromático con diversas aplicaciones industriales es el antranilato, de cuyos derivados se obtienen pigmentos, protectores solares, perfumes, productos farmacéuticos, entre otros. Actualmente, el antranilato se produce mediante síntesis química a partir de derivados del petróleo.

Este compuesto es un intermediario metabólico de la ruta terminal de biosíntesis del triptofano, cuya primera reacción consiste en la conversión de corismato y glutamina, a antranilato, glutamato y piruvato. La enzima que lleva a cabo esta reacción es la antranilato sintasa, la cual está formada por los polipéptidos específicos de los genes *trpEG* y *trpD* (Pittard, 1987).

En nuestro laboratorio se ha trabajado con una cepa de *E. coli* (W3110*trpD*9923) que presenta una mutación en el gene *trpD*, lo cual genera la inactivación de la enzima antranilato PRPP transferasa, ocasionando que el antranilato sintetizado no sea convertido en PRA y por lo tanto se acumula y secreta (Yanofsky *et al.*, 1971; Silva, 2005).

La clonación de los genes *trpEGD* provenientes de dicha cepa, generó la posibilidad de poder transferir la mutación a otras cepas de *E.coli* que no presentan esta capacidad de acumular antranilato (Silva, 2005). Así, la obtención de cepas de *E.coli* que acumulan antranilato, crea la posibilidad de sintetizar este compuesto a partir de azúcares como materia prima.

Por otra parte, se ha demostrado que mediante la expresión de los genes heterólogos *antABC* de *Pseudomonas aeruginosa*, que codifican para la enzima antranilato dioxigenasa en dicho organismo, es posible producir catecol a partir de antranilato en cepas de *E. coli* (Silva, 2005; Treviño datos no publicados).

En el presente trabajo, se comparan diferentes cepas de *E. coli* que fueron alteradas mediante ingeniería de vías metabólicas con la finalidad de establecer el efecto de ciertas modificaciones al metabolismo, sobre la capacidad de síntesis de antranilato y catecol. Los datos obtenidos en este estudio contribuirán al desarrollo de cepas para la producción industrial de antranilato y catecol.

3 ANTECEDENTES

3.1 Metabolismo central

Escherichia coli es uno de los microorganismos mejor estudiados. Se ha caracterizado el 80% de sus vías metabólicas por lo que comúnmente es utilizada en procesos biotecnológicos (Schaechter & Neidhardt, 1987).

El metabolismo es la suma de todas las transformaciones químicas que se dan en una célula u organismo y se llevan a cabo a través de una serie de reacciones catalizadas por enzimas, constituyendo de esta manera las llamadas vías metabólicas (Nelson & Cox, 2000).

El metabolismo central de *E. coli* forma una red que está constituida principalmente por el sistema de fosfotransferasa (PTS), la vía glicolítica Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), la vía de las pentosas fosfato (PP) y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, TCA (Fig. 1).

El sistema PTS participa en el transporte y fosforilación de diversos azúcares, entre ellos, la glucosa, la manosa y la fructosa. Por su parte, las vías mencionadas liberan energía química en forma de ATP, y transportadores electrónicos reducidos (NADH, NADPH y FADH₂), que serán utilizados en las rutas anabólicas. Así mismo, de la vía EMP se genera piruvato como producto final, la mayor parte de éste se oxida vía TCA. En el caso de la vía de las PP se genera el precursor E4P, necesario para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. A partir de esta última vía, se obtienen los aminoácidos aromáticos primarios: triptofano (L-Trp), fenilalanina (L-Fen) y tirosina (L-Tir).

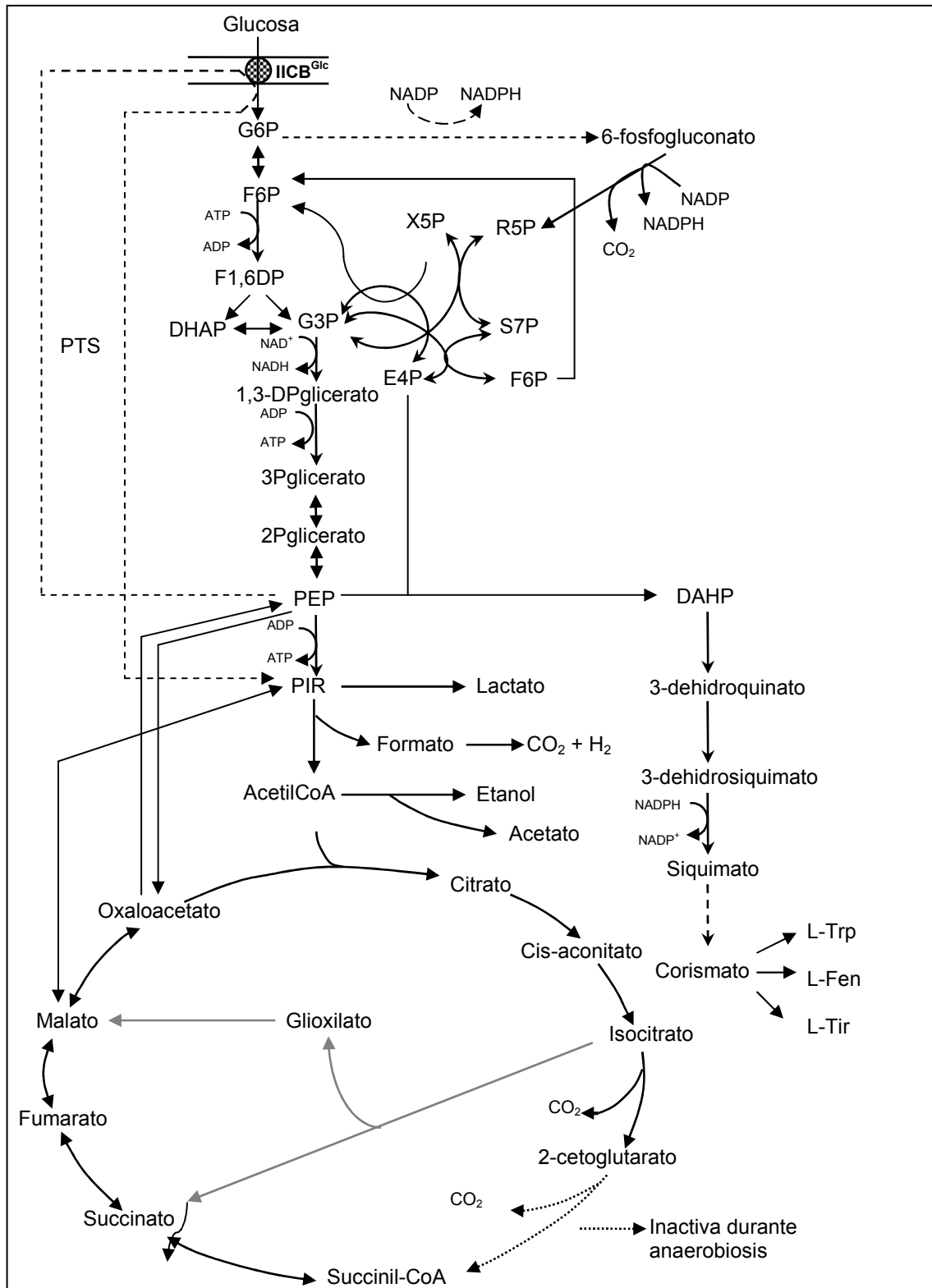


Fig. 1. Metabolismo central de *Escherichia coli* donde se representa la glucólisis, la vía de las pentosas fosfato, la vía de síntesis de los aminoácidos aromáticos y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Las abreviaciones usadas son: G6P, glucosa 6-fosfato; F6P, fructosa 6-fosfato; F1,6DP, fructosa 1,6-bifosfato; G3P, glucosa 3-fosfato; X5P, xilulosa 5-fosfato; R5P, ribosa 5-fosfato; S7P, sedoheptulosa 7-fosfato; E4P, eritrosa 4-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; PIR, piruvato; DAHP, 3-deoxi-D-arabino-heptulosa 7-fosfato; Trp, triptofano; Fen, fenilalanina; Tir, tirosina.

3.1.1 Transporte de glucosa en *Escherichia coli*

Una de las características morfológicas de *E. coli* y de otras bacterias Gram-negativas, es la presencia de dos membranas que rodean su citoplasma. El espacio entre ellas se conoce como periplasma. Ambas membranas controlan el paso de compuestos polares a través de proteínas embebidas en ellas (Fig. 2).

La membrana externa está formada por proteínas llamadas porinas, y constituyen la primera barrera a la entrada de carbohidratos. Las porinas más abundantes son la OmpC y OmpF, y por las cuales la glucosa es transportada de manera pasiva hasta el periplasma cuando este azúcar se encuentre a una concentración mayor de 0.2mM. Una vez en el periplasma, la glucosa es internalizada en el citoplasma mediante transporte activo, generalmente por el sistema de fosfotransferasa (Gosset, 2005).

3.1.2 Sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS-PEP)

El sistema de fosfotransferasa, es un translocador de grupo que participa en el transporte de varios azúcares en bacterias (Fig. 2). En este sistema, la translocación del carbohidrato a través de la membrana citoplasmática está acoplada a su fosforilación. El PTS está integrado por dos enzimas solubles: la enzima I (EI) y la proteína HPr codificadas por los genes *ptsH* y *ptsI* respectivamente, esta última estable al calor y rica en histidinas; y por el complejo enzimático II conformado por varios componentes diferentes que son específicos para cada carbohidrato. *E. coli* cuenta con 21 complejos enzimáticos II para el transporte de diferentes azúcares. Para el transporte de glucosa, se requiere del componente soluble IIA^{Glc} y la proteína integral de membrana IICB^{Glc} , codificadas por los genes *crr* y *ptsG* respectivamente. En *E. coli*, los genes que codifican para las enzimas I, HPr y IIA^{Glc} , forman el operón *ptsHIcrr*. Mientras que el gene *ptsG* se encuentra en un locus diferente (De Reuse *et al.*, 1984; Ernie, 2002; Gosset, 2005;).

El PEP inicia la cascada de fosforilación al donar su grupo fosfato a la enzima I, la cual a su vez lo transfiere a la enzima HPr. Una vez fosforilada, HPr-P cede su grupo fosfato directamente al componente II, que lleva a cabo la fosforilación de la glucosa entrante (Postma *et al.*, 1996).

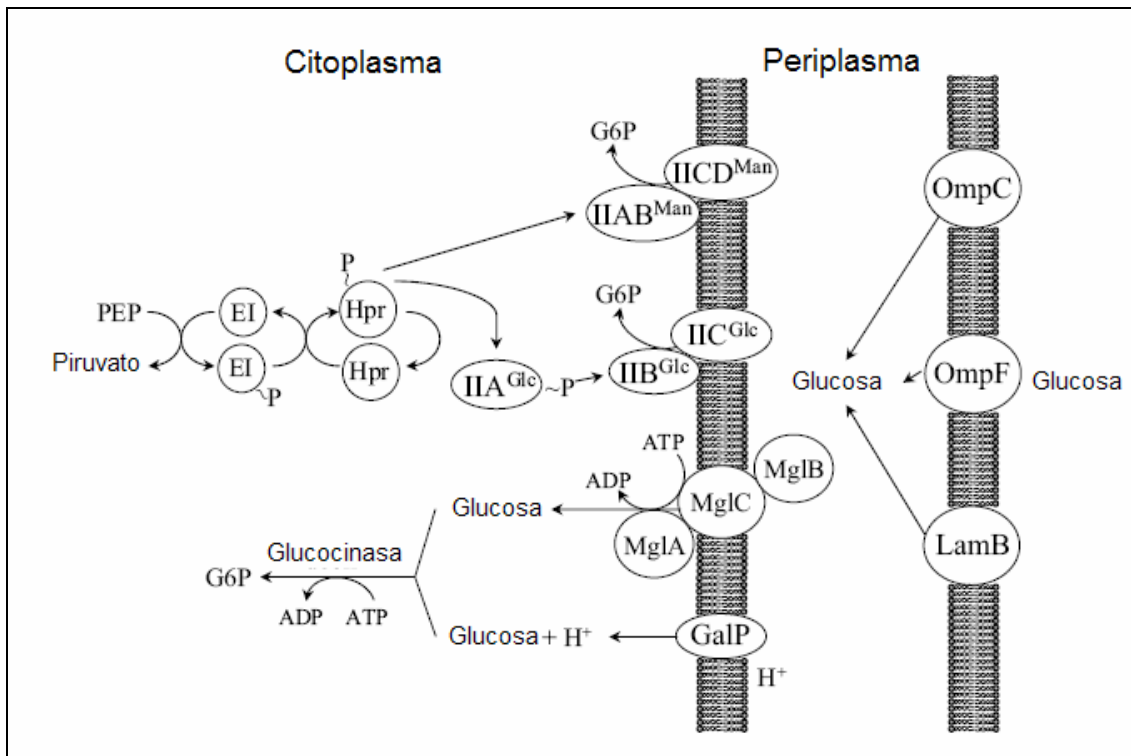


Fig. 2. Sistema de fosfotransferencia. Abreviaciones no señaladas en el texto: OmpC y F, principales porinas en el transporte de glucosa al interior del periplasma; LamB, glicoporina transportadora de diferentes carbohidratos incluida la glucosa en bajas concentraciones; MglA-C, sistema de proteínas de alta afinidad pertenecientes a la familia de transportadores ABC (*ATP-Binding Cassette*) inducido con concentraciones mínimas de glucosa; GalP, permeasa de galactosa. (Gosset, 2005).

Además de los componentes específicos para glucosa, este carbohidrato también puede transportarse por el sistema PTS de manosa (II^{Man}) (Gosset, 2005).

El PTS debido a su alta dependencia sobre el PEP para fosforilar a la glucosa entrante, constituye muchas veces una limitante para la producción de determinados compuestos con fines biotecnológicos en cepas donde este sistema es el principal transportador de glucosa, ya que el fosfoenolpiruvato resulta ser uno de los precursores del producto deseado (Fig. 1). Es por esto, que se han desarrollado cepas a las que se les ha deletado el PTS, por lo que en teoría tendrían dos moles de PEP disponibles y contarían con el potencial para dirigir un mayor flujo de carbono hacia la síntesis de algún compuesto deseado.

3.2 Estrategias de ingeniería metabólica para incrementar la disponibilidad de los precursores E4P y PEP

El fosfoenolpiruvato (PEP) y la D-eritrosa 4- fosfato (E4P), son los dos precursores de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. El primero es generado durante la glicólisis, mientras que la E4P proviene de la ruta no oxidativa de las pentosas fosfato (Fig. 1).

3.2.1 Incremento de PEP

El fosfoenolpiruvato es una molécula que participa en varias reacciones celulares: a) como precursor de aminoácidos, b) como donador de un grupo fosfato en el transporte de glucosa y c) en la generación de ATP (Gosset *et al.*, 1996).

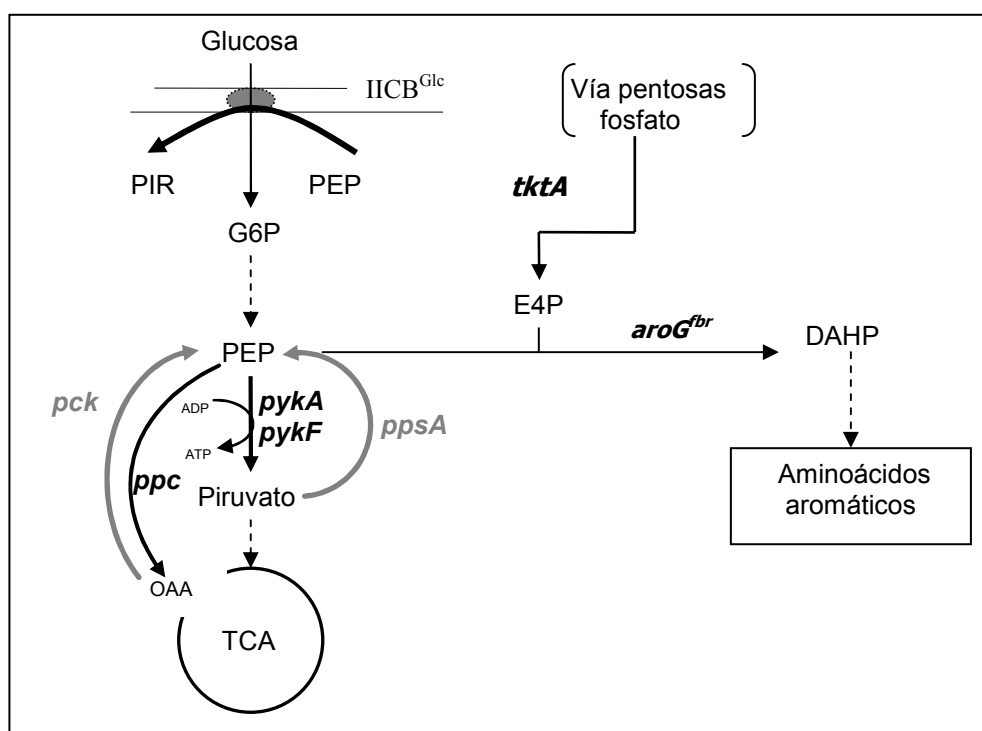


Fig. 3. Vías centrales del metabolismo de *E. coli* relacionadas con la formación y el consumo de PEP (Modificado de Gosset *et al.*, 1996).

En *E. coli* silvestre, el mayor consumidor de PEP es el sistema de fosfotransferasa (PTS), ya que por cada molécula de glucosa que es internalizada, el sistema consume una molécula de PEP, es decir, 50% del PEP total. Otras reacciones consumidoras de este precursor son las catalizadas por las enzimas piruvato cinasas (PykA y PykF), PEP carboxilasa (Ppc) y DAHP sintasa. Por otro lado, existen reacciones de formación de

PEP las cuales son llevadas a cabo por la enzima PEP sintasa A (PpsA), que cataliza la conversión de piruvato a PEP, y PEP carboxicinasa (Pck), que sintetiza este precursor a partir del oxalacetato (Gosset *et al.*, 1996) (Fig. 3).

Se ha determinado que el flujo de carbono que se distribuye a partir del nodo PEP, es el principal determinante en el rendimiento de la síntesis de compuestos aromáticos a partir de glucosa en *E. coli*. Los análisis estequiométricos de las vías metabólicas involucradas en la síntesis de aromáticos, indican que el rendimiento molar teórico máximo de DAHP a partir de glucosa (0.43mol/mol), podría duplicarse en una cepa que transporta este carbohidrato sin acoplar el proceso a la utilización de PEP o si cada piruvato formado durante la glucólisis fuera reciclado a dicho precursor. Es por esta razón, que se han explorado estrategias para desarrollar cepas de *E. coli* que puedan transportar la glucosa sin depender de la fosforilación por parte de PEP (Gosset, 2005). Con este fin, se construyó en nuestro laboratorio una cepa de *E. coli* que carece del operón *ptsHIcrr*. Para ello se transdujo a la cepa JM101 la delección $\Delta(ptsHIcrr)::Kan$ de la cepa TP2811 mediante el bacteriófago P1. Fue de esta manera que se obtuvo la cepa mutante PB11 $\Delta ptsHIcrr$. Sin embargo, la inactivación de PTS ocasiona que la cepa mutante no pueda transportar la glucosa eficientemente, por lo tanto, tiene una capacidad muy limitada para crecer en dicho carbohidrato como única fuente de carbono; a este fenotipo se le llama PTS^-Glc^- . A partir de esta mutante y por medio de cultivos continuos con glucosa como única fuente de carbono, se aislaron cepas con la capacidad de transportar este carbohidrato eficientemente (fenotipo PTS^-Glc^+). Estas cepas denominadas PB12 y PB13 utilizan la permeasa de galactosa (GalP) para transportar la glucosa y la enzima glucocinasa (Glk) para fosforilarla y convertirla en glucosa 6-fosfato (Flores *et al.*, 1996).

En estas nuevas cepas, la fosforilación de la glucosa depende del ATP y no del PEP como ocurre en una cepa PTS^+ (Fig. 4), por lo que es de esperarse que exista una mayor disponibilidad de dicho precursor en las cepas PB12 y PB13 que pueda ser canalizado hacia una mayor producción de compuestos aromáticos (Gosset *et al.*, 1996).

En una serie de trabajos donde se compara el efecto de inactivar o sobreexpresar los genes que codifican para las enzimas involucradas en el consumo y síntesis de PEP tanto en cepas PTS^+ como PTS^-Glc^+ , se ha visto que la inactivación de las 2 enzimas piruvato cinasas (PykA y PykF) tiene un efecto significativo sobre la síntesis de

DAHP¹, y cuando se sobreexpresa el gene *ppsA* el flujo de carbono es redirigido hacia la producción de este compuesto, pero este efecto es sólo significativo cuando conjuntamente se sobreexpresan los genes *aroG^{fb}* y *tkt*, sugiriendo que la concentración de E4P es el primer sustrato limitante para la DAHP sintasa seguido de PEP (Gosset *et al.*, 1996). En el trabajo anterior, se demostró que las mejores cepas productoras de DAHP son aquellas que combinan estas modificaciones.

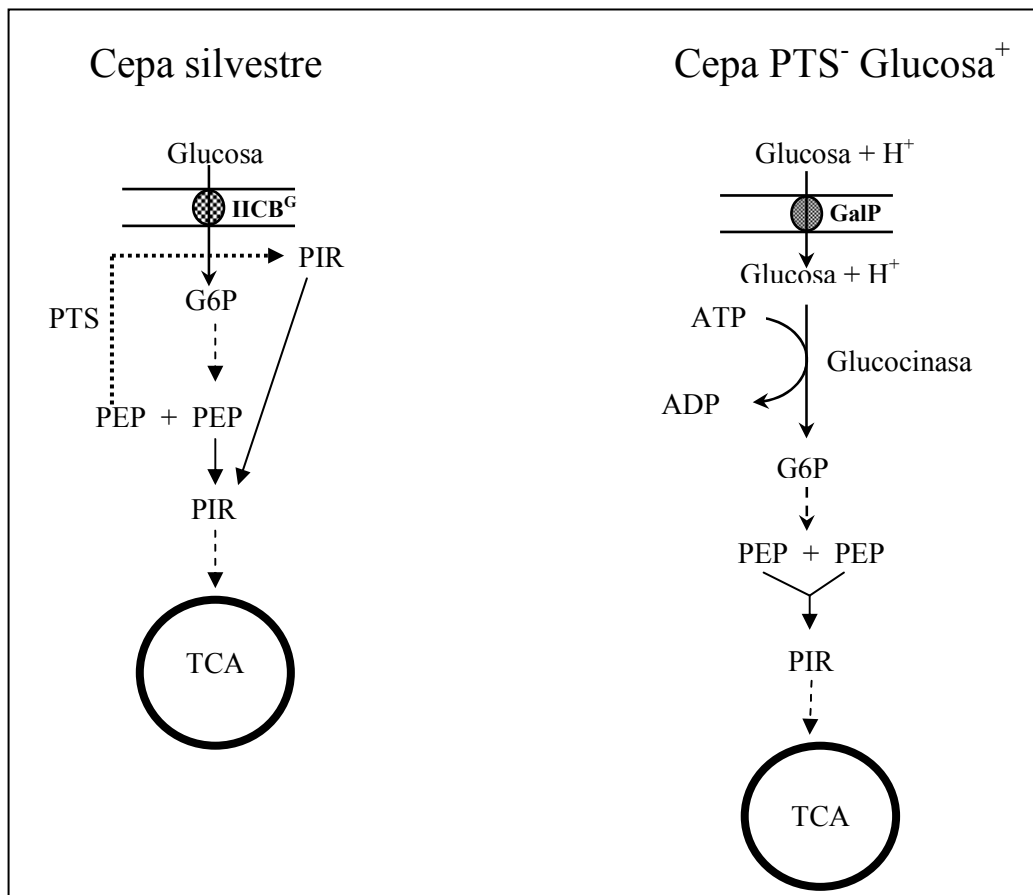


Fig. 4. Comparación del sistema de transporte de glucosa en una cepa silvestre (PTS⁺Glc⁺) y en una cepa mutante PTS⁻Glc⁺ (Modificado de Gosset *et al.*, 1996).

¹ Sin embargo, en el trabajo de Ponce y colaboradores (1995) se construyeron mutantes a partir de la cepas JM101 y PB12 (PTS⁻Glc⁺), y se observó que la doble mutante JM101 *pykAF*⁻ mostró una disminución en su crecimiento del 28% con respecto a la cepa silvestre JM101, mientras que la mutante PTS⁻Glc⁺ *pykAF*⁻ era incapaz de crecer en glucosa como única fuente de carbono.

3.2.2 Incremento de E4P

Al considerar a las enzimas que influyen la concentración *in vivo* de la E4P, es necesario considerar la vía de las pentosas fosfato. Esta vía puede dividirse en dos a su vez: la ruta oxidativa y la ruta no oxidativa de las pentosas fosfato. Es en esta última en la que se genera este precursor a partir de fructosa 6-fosfato; siendo las enzimas clave de dicha ruta, la transcetolasa (*tktA*) y la transaldolasa (*talB*) (Draths *et al.*, 1992).

Para incrementar la disponibilidad de E4P en *E. coli*, el gene *tktA* que codifica para la enzima transcetolasa fue sobreexpresado en una cepa de *E. coli* que acumula DAHP debido a una inactivación en el gene *aroB*, y sobreproduce la enzima DAHP sintasa por expresar una versión de la misma pero insensible a inhibición alostérica por fenilalanina (*aroG^{fbr}*). Fue así como se obtuvo para esta cepa un incremento adicional de 2 veces el flujo de carbono de glucosa hacia la biosíntesis de aromáticos (Draths & Frost, 1990; Draths *et al.*, 1992).

Por otro lado, en una serie de experimentos en donde se expresó a la Pps A combinada con *tktA* y *talB* respectivamente, se concluyó que la transcetolasa es más efectiva en dirigir el flujo de carbono hacia la vía de aromáticos que la transaldolasa (Liao *et al.*, 1996).

3.3 Vía de síntesis de compuestos aromáticos

También conocida como vía del ácido siquímico, se encuentra presente de manera natural en bacterias y plantas, y es una fuente de compuestos con aplicaciones comerciales que incluye a los aminoácidos aromáticos primarios: triptofano (L-Trp), tirosina (L-Tir) y fenilalanina (L-Fen).

La síntesis de compuestos aromáticos en bacterias inicia con la condensación entre el PEP y la E4P para formar el compuesto DAHP en una reacción irreversible catalizada por la enzima DAHP sintasa. Después de 6 pasos, se genera el intermediario COR a partir del cual inician las vías terminales de síntesis de los aminoácidos aromáticos: L-Trp, L-Tir y L-Fen (Fig. 5). Sin embargo, mediante la introducción de genes heterólogos en *E. coli* es posible extender el repertorio de compuestos de interés industrial de esta bacteria.

Por otro lado, la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos está modulada por la actividad catalítica de la primera enzima de la vía común DAHP sintasa, de la cual existen tres isoenzimas codificadas por los genes *aroG*, *aroF* y *aroH*; así como de cada enzima de las rutas terminales: antranilato sintasa (*trpE*, *trpD*) y corismato mutasa prefenato deshidrogenasa/deshidratasa (*tyrA/pheA*). En el caso de la DAHP sintasa, la isoenzima inhibida alostéricamente por tirosina (*aroF*) contribuye en un 20% sobre la actividad enzimática de la DAHP sintasa, mientras que la isoenzima inhibida por fenilalanina (*aroG*) contribuye en un 80%, mientras que la isoenzima inhibida por triptofano (*aroH*) tiene una contribución muy pobre sobre dicha actividad (Bongaerts *et al.*, 2001).

Al mismo tiempo, la actividad catalítica de estas enzimas está sujeta a regulación alostérica y transcripcional (Gosset *et al.*, 1996).

La inhibición alostérica de la actividad en estas enzimas, es un mecanismo de respuesta rápida que le permite detener a la célula la síntesis de los compuestos aromáticos cuando éstos se acumulan en su interior, en otras palabras, la enzima es inhibida de forma específica por algún intermediario o por el producto final de la ruta cuando éste excede las necesidades de la célula (Cox & Nelson, 2000), y se presenta en casos como el de la enzima siquimato deshidrogenasa inhibida por el intermediario siquimato, y en las enzimas que se encuentran al inicio de cada vía individual de la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos inhibidas por los productos finales de ésta (Dell & Frost, 1993; Pittard, 1996), (Fig. 5).

Por otro lado, la regulación transcripcional de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos depende de 2 proteínas: 1) la proteína represora de tirosina (TirR), y 2) la proteína represora de triptofano (TrpR). TirR se activa cuando se le une una molécula de tirosina. El complejo formado TirR-Tir, tiene la capacidad de unirse a las regiones promotoras de los genes *aroF*, *aroG*, *aroL* y *tyrB*, ocasionando con esto que la RNA polimerasa no pueda unirse al promotor e iniciar la transcripción de estos genes. De forma similar, TrpR se activa en presencia de una molécula de triptofano. El complejo formado TrpR-Trp se une a los promotores de los genes *aroH* y *trpE* reprimiendo su transcripción (Gosset *et al.*, 1996).

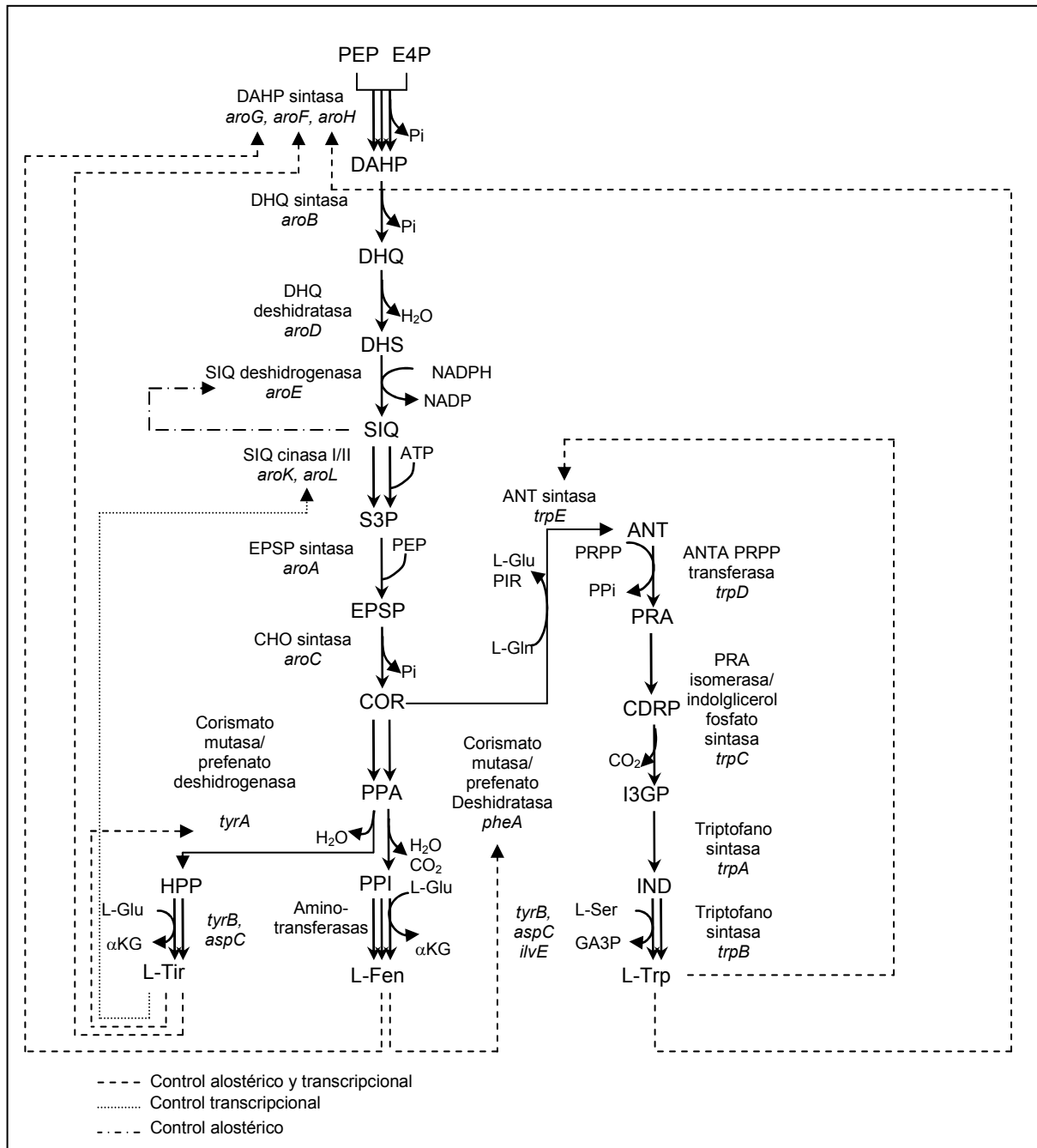


Fig. 5. Vía de síntesis de los aminoácidos aromáticos y su regulación en *E. coli*. Las abreviaciones usadas son: ANT, antranilato; αKG , α -cetoglutarato; CDRP, 1-(*o*-carboxifenilamino)-1-deoxirribulosa-5-fosfato; COR, corismato; DAHP, 3-deoxi-D-*arabino*-heptulosonato 7-fosfato; DHQ, 3-dehidroquinato; DHS, 3-dehidrosiquimato; EPSP, 5-*enol*piruvatosiquimato 3-fosfato; E4P, eritrosa 4-fosfato; GA3P; gliceraldehido 3-fosfato; HPP, 4-hidroxifenilpiruvato; I3GP, indol 3-glicerol-fosfato; IND, indol; L-Gln, L-glutamina; L-Glu, L-glutamato; L-Fen, L-fenilalanina; L-Ser, L-serina; L-Trp, L-triptofano; L-Tir, L-tirosina; PEP, fosfoenolpiruvato; PPA, prefenato; PPI, fenilpiruvato; PRA, fosforibosil antranilato; PRPP, 5-fosforibosil- α -pirofosfato; PIR, piruvato; SIQ, siquimato; S3P, siquimato 3-fosfato. (Bongaerts *et al.*, 2001).

3.3.1 Compuestos aromáticos con aplicaciones industriales

3.3.1.1 Antranilato y catecol

El antranilato y el catecol son compuestos aromáticos de los cuales se derivan productos químicos de interés industrial. En el caso de los compuestos derivados del antranilato, el ácido antranílico es usado para la producción de colorantes, pigmentos, solventes, protectores solares, perfumes, productos farmacéuticos, entre otros; el metil antranilato, otro de sus derivados, es usado en la industria de fragancias y como saborizante artificial.

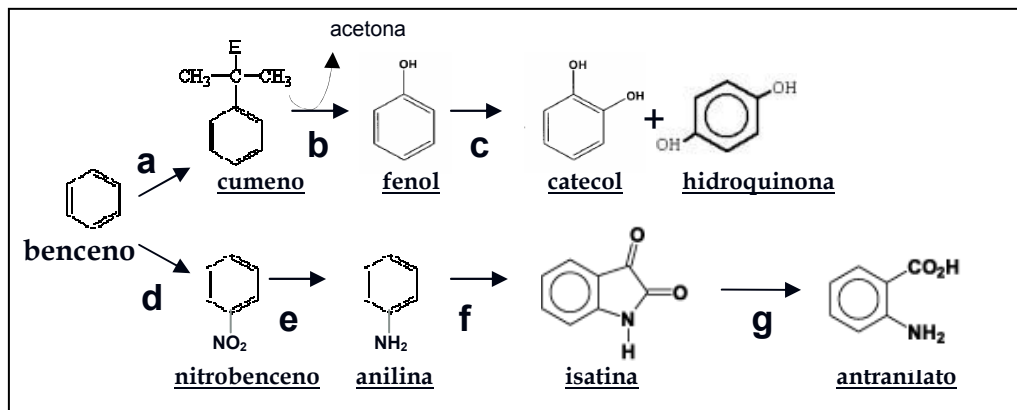
Por su parte, los productos derivados del catecol, incluyen igualmente colorantes, pigmentos, farmacéuticos como L-DOPA (utilizado para tratar el mal de Parkinson) y adrenalina; saborizantes como la vainilla, la cual en términos de volumen ocupa el segundo lugar con respecto al aspartame (Li & Frost, 1998; Draths & Frost, 1995), inhibidores de polimerización, antioxidantes y ácido adípico, este último utilizado para la manufactura del nylon cuya demanda anual es de 4×10^6 Tn (Draths & Frost, 1994 y 1995).

Por otro lado, las melaninas se forman a partir de la polimerización oxidativa de compuestos fenólicos como el catecol. Esta reacción es catalizada por la enzima tirosinasa y se ha visto que de entre la variedad de compuestos fenólicos utilizados, la tirosinasa muestra mayor actividad con el catecol como sustrato (Shivprasad, 1989; Seo *et al.*, 2003).

Hasta el momento, la producción de estos compuestos aromáticos se ha venido dando a partir de procesos químicos (Fig. 6) que involucran una serie de múltiples pasos, en los cuales se manejan presiones y temperaturas muy elevadas (70-260°C), al igual que solventes orgánicos. Así mismo, participan compuestos derivados de fuentes no renovables como el benceno; además dichos procesos involucran hidroxilaciones que generan productos alternos tóxicos como la anilina (en el caso del antranilato), el fenol y el mismo catecol. Finalmente y como último paso en la síntesis de ambos compuestos, se llevan a cabo oxidaciones mediante el uso de peróxido de hidrógeno, uno de los oxidantes más corrosivos (Draths & Frost, 1995).

Se estima que la producción anual global del catecol por síntesis química es de aproximadamente 2.5×10^4 Tn (Li *et al.*, 2005).

Fig. 6. Síntesis química del antranilato y catecol (modificado de Draths & Frost, 1995)



- Propileno, H_3PO_4 sólido, 200-260°C, 400-460 psi.
- O_2 , 80-130°C, después SO_2 , 60-100°C.
- 70% H_2O_2 , EDTA, Fe^{2+} (Co^{2+}), 70-80°C.
- H_2SO_4 , HNO_3 .
- Reducción con Fe, HCl 30%, calor (Cu_2O , 200°C, 60atm).
- $\text{Cl}_3\text{CCH}(\text{OH})_2$, $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, Na_2SO_4 , después $\text{H}_2\text{SO}_4, \text{H}_2\text{O}$.
- H_2O_2 , solución alcalina.

3.3.2 Estrategias para la producción de aminoácidos aromáticos en *E. coli*

La vía del ácido siquímico puede ser modificada para generar cepas productoras de aminoácidos aromáticos con aplicaciones industriales y medicinales. Para este fin, es necesario dirigir un alto porcentaje de la fuente de carbono (glucosa) hacia la síntesis de DAHP, para finalmente direccionar el flujo de carbono hacia la de cada uno de los aminoácidos aromáticos (Flores *et al.*, 1996; Gosset *et al.*, 1996).

La sobreexpresión de la enzima DAHP sintasa es sólo uno de los elementos necesarios para incrementar el flujo de carbono hacia la vía común de síntesis de aminoácidos aromáticos. Otro factor crítico es el control alostérico que existe sobre algunas de las enzimas de la vía, por lo que el uso de DAHP's sintasas insensibles a inhibición alostérica es una de las principales estrategias que se han seguido para la síntesis de forma comercial de algunos aminoácidos como la fenilalanina y el triptofano. La disponibilidad de los precursores E4P y PEP también es un factor importante que limita la actividad de la DAHP sintasa *in vivo* (Gosset *et al.*, 1996; Ikeda, 2006).

3.3.2.1 Síntesis de antranilato en *E.coli*

Uno de los intermediarios en la ruta de síntesis del aminoácido triptofano en *E. coli* es el antranilato. Este compuesto de interés industrial se utiliza para la preparación de perfumes, productos farmacéuticos y protectores solares. El ácido antranílico, uno de sus derivados, se usa como intermediario en la producción de colorantes, pigmentos, solventes, protectores solares, aromatizantes, entre otros.

La primera reacción de la ruta terminal de biosíntesis de triptofano involucra la conversión de corismato y glutamina, a antranilato, glutamato y piruvato. La enzima que lleva a cabo esta reacción es la antranilato sintasa, cuya actividad es estimulada por corismato e inhibida alostéricamente por el producto final de la ruta: el triptofano (Pittard, 1996).

La enzima antranilato sintasa está formada por los polipéptidos específicos de los genes *trpEG* y *trpD*. Los cuales son referidos como componente I y componente II respectivamente. El componente I cataliza la conversión de corismato a antranilato por la antranilato sintasa usando glutamina como fuente de nitrógeno, mientras que el componente II presenta dos actividades específicas: la primera es una actividad de glutamido transferasa, la cual se requiere para activar al componente I en la reacción de antranilato sintasa, por lo que sólo el agregado exhibe esta actividad; por otro lado, la segunda actividad convierte el antranilato en PRA por la antranilato PRPP transferasa (también llamada antranilato fosforibosil transferasa). Esta actividad es funcional en ausencia del componente I (*Idem*).

El triptofano inhibe tanto la actividad antranilato sintasa como la antranilato fosforibosil transferasa; la primera puede ser inhibida al 100%, mientras que la inhibición de la segunda no excede el 70% (*Idem*).

A diferencia de *Serratia marcescens*, en *E. coli* los genes *trpG* y *trpD* se encuentran fusionados, probablemente debido a una delección en la región intercistronica que hay entre ellos, junto con un número limitado de sustituciones que removieron el codón de paro de *trpG* y el sitio de unión a ribosoma de *trpD*. Esto permitió considerar que el gene *trpD* pudo haberse formado de una fusión involucrando a los genes separados *trpG* y *trpD* de alguna cepa ancestral (*Idem*).

3.3.2.2 Generación de cepas de *Escherichia coli* modificadas para la producción de antranilato

En nuestro laboratorio se ha trabajado con una cepa que de manera natural produce antranilato, esta cepa designada W3110*trpD*9923 (Yanofsky *et al.*, 1971) presenta una mutación que inactiva a la fosforibosil transferasa (*trpD*) pero no así la actividad de la antranilato sintasa (*trpEG*). En fase estacionaria esta cepa obtuvo rendimientos de casi el 10% (0.034g/g) con respecto al máximo teórico² (Silva, 2005).

Con la finalidad de identificar la mutación que había generado la inactivación de la enzima antranilato fosforibosil transferasa y como sólo se sabía que dicha cepa había sido mutagenizada al azar (Yanofski *et al.*, 1971), se secuenció la región comprendida desde *trpE* hasta *trpD*, y se observó que dicha mutación consistía en un cambio de base de una **G** por una **T** y en la inserción de una **A** al inicio de *trpD* generando la síntesis de una proteína TrpD trunca no funcional (Silva, 2005).

A partir de este punto, el trabajo anterior se enfocó en aumentar el flujo metabólico hacia la producción de dicho aromático mediante la aplicación de ingeniería de vías metabólicas, con la finalidad de obtener una mejor cepa productora de antranilato.

Como primer paso se sobreexpresó en la cepa 9923 el gene *aroG*^{fb} con el fin de aumentar el flujo de carbono hacia la síntesis de aminoácidos aromáticos y por lo tanto hacia la ruta truncada de producción de triptofano, lo cual llevaría a un aumento en la acumulación de antranilato. Posteriormente, se expresó en la cepa 9923/pJLBaro*G*^{fb} el gene *tktA* para incrementar la síntesis del precursor E4P.

Con la finalidad de generar una mayor cantidad de la enzima antranilato sintasa, se decidió clonar los genes *trpEGD* en el plásmido pTrc99A para generar el plásmido pTrc*trpEGD*. La cepa 9923 se transformó con este último, y a su vez con el plásmido pJLBaro*G*^{fb}. Sin embargo, los cultivos en medio mínimo con esta nueva cepa (9923/pTrc*trpEGD*/pJLBaro*G*^{fb}) no crecieron. Para determinar el origen de este efecto, se planteó deletar la ruta de síntesis de triptofano en las cepas JM101 y PB12. Así pues, se decidió sustituir la región comprendida desde *trpE* hasta *trpC* del operón de triptofano en el cromosoma de dichas cepas (*Idem*).

² El rendimiento máximo teórico de antranilato a partir de glucosa es de 46% mol/mol, es decir 0.35g/g (Silva, 2005).

Debido a problemas de crecimiento en las cepas que sobreexpresaban los genes que codifican para la antranilato sintasa, ocasionados tanto por la carga metabólica (generada por el plásmido pTrc99A de alto número de copias) como por la cantidad de transcrito y de la proteína producida (debido a que los genes *trpEGD* se encontraban bajo el promotor fuerte *trc*), lo cual ocasionaba un plegamiento incorrecto de la enzima, se decidió clonar los genes *trpEGD* bajo su propio promotor *trp* en el plásmido pCL1920 de bajo número de copias. Conjuntamente se sobreexpresó el gen *aroG^{br}*.

La disminución en el número de copias del plásmido que expresa los genes que codifican para la enzima antranilato sintasa, y su conjunta sobreexpresión con el gen *aroG^{br}* no causó ningún efecto negativo y además generó un aumento en la cantidad de antranilato producido (*Idem*).

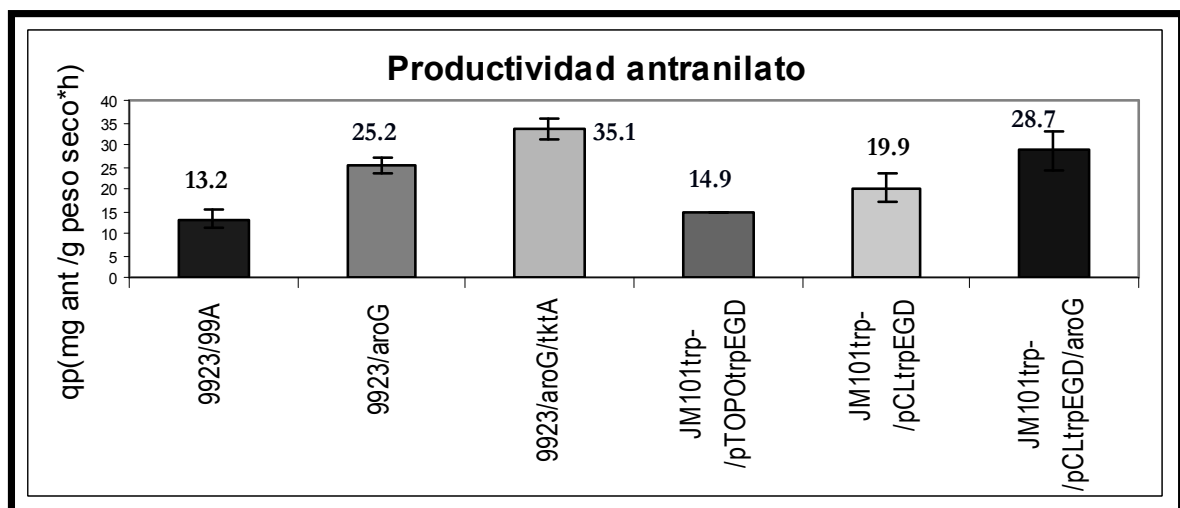


Fig. 7. Comparación de las q_{ant} alcanzadas por las diferentes cepas productoras de antranilato (Silva, 2005).

En la gráfica de la figura. 7 se compararon las productividades de antranilato alcanzadas por las diferentes cepas. Como se observa, la q_{ant} alcanzada por la cepa JM101trp⁻/pCLtrpEGD fue de aproximadamente 20 mg ant/g peso seco x h, en otras palabras, aumentó la productividad en un 50% comparada con la cepa 9923/pTrc99A. Mientras que la sobreexpresión conjunta del gene *aroG^{br}* en la cepa JM101trp⁻/pCLtrpEGD generó un aumento en la q_{ant} de 20 a 29 mg ant/g peso seco x h, lo que representa un 81% con respecto a la cepa 9923/pJLBaroG^{br}/pCLtktA (*Idem*).

3.3.2.3 Síntesis de catecol en cepas de *E. coli* a partir de glucosa

La generación de una cepa de *E. coli* capaz de sintetizar catecol a partir de D-glucosa fue reportada por el grupo de Draths y Frost (1995). En dicho proyecto, se requirió construir una vía en la que la glucosa fuera convertida en grandes cantidades a DHS, el cual después de 2 reacciones es convertido en catecol.

La cepa utilizada para la síntesis del compuesto DHS fue la de *E. coli* AB2834, la cual presenta una mutación en el locus *aroE* que inactiva a la enzima siquimato deshidrogenasa, de tal manera que el DHS que es sintetizado no es convertido a SIQ y queda disponible para la síntesis de catecol en lugar de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. Esta misma cepa fue transformada con los plásmidos: pKD136, el cual porta los genes *aroF*, *tkt* y *aroB* que codifican para las enzimas DAHP sintasa, tranacetolasa y DHQ sintasa respectivamente, lo cual aumentó en gran medida la síntesis de DHS, y con el plásmido pKD9.069A que porta los genes *aroZ* y *aroY* de *Klebsiella pneumoniae* que codifican respectivamente para las enzimas DHS deshidratasa y PCA descarboxilasa involucradas en la síntesis de catecol. Esta cepa (AB2834/pKD136/pKD9.069A) sintetizó 18.5 ± 2.0 mM de catecol a partir de 56mM de D-glucosa (Draths & Frost, 1995).

3.3.2.4 Síntesis de catecol a partir de antranilato

Un método alternativo para la producción de este compuesto está siendo desarrollado en el laboratorio de los doctores Bolívar-Gosset en el cual, se utilizó la enzima antranilato dioxigenasa (AntDO) de *Pseudomonas aeruginosa*, que transforma en este microorganismo el antranilato en catecol con (Fig. 8). La antranilato dioxigenasa esta constituida por tres subunidades: la dioxigenasa α , la dioxigenasa β , y una reductasa dependiente de NADH, codificadas respectivamente por los genes *antABC*.

Esta enzima únicamente ha sido caracterizada en la bacteria *Acinetobacter* sp. ADP1 aunque presenta una gran similitud filogenética con la AntDO de *Pseudomonas aeruginosa* (Bundy *et al.*, 1998; Eby *et al.*, 2001).

Para llevar a cabo la síntesis de catecol a partir de antranilato, en el laboratorio los genes *antABC* se subclonaron en el plásmido pTrc99A y posteriormente el plásmido resultante, pTrc-ant3, se transformó en la cepa de *E. coli* W3110. Para visualizar la

producción de catecol en esta cepa, se construyó el plásmido pACYC-*xylE'* (Fig. 9). El gene *xylE'* codifica para la enzima catecol 2,3-dioxigenasa que corta en posición *meta* el anillo aromático del catecol, esta reacción genera un compuesto de color amarillo (ácido *cis, cis*-mucónico- γ -semialdehído) indicativo de la presencia del catecol. Mientras que para los ensayos de producción, se utilizó el medio de cultivo M9 suplementado con glucosa 2%, Ap 200 μ g/ml, IPTG 0.1mM y antranilato 2.5mM, obteniéndose conversiones de entre el 60 y el 80% de antranilato exógeno a catecol para la cepa de *E. coli* W3110/pTrc-ant3 (Treviño, datos no publicados).

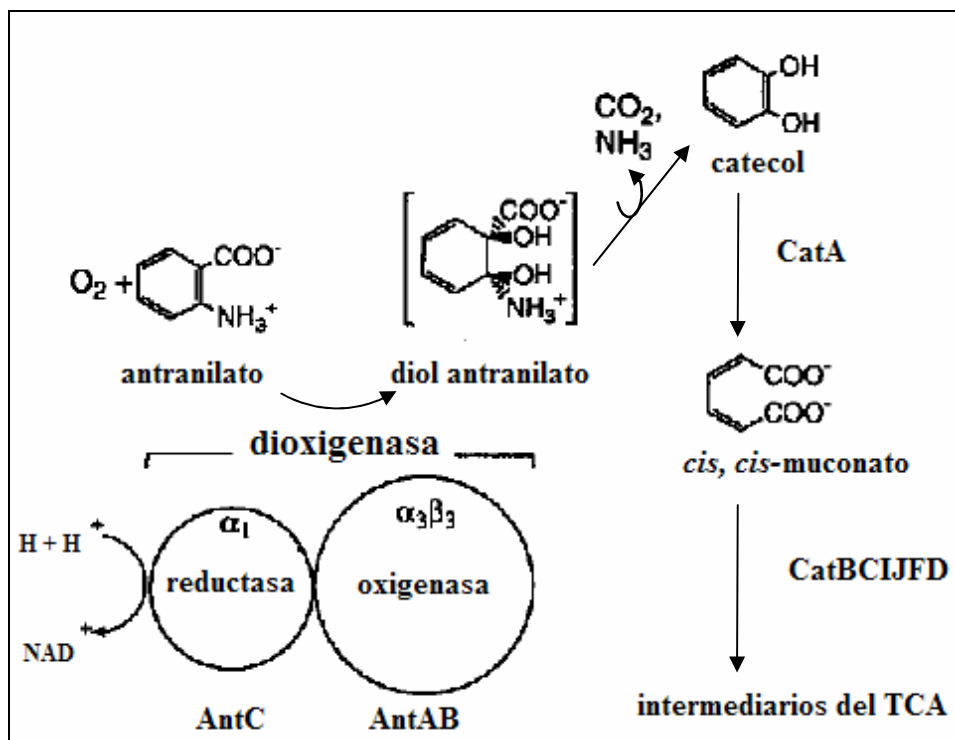


Fig. 8. Reacción catalizada por la enzima antranilato dioxigenasa de *Acinetobacter* sp. ADP1 (Modificado de Eby *et al.*, 2001).

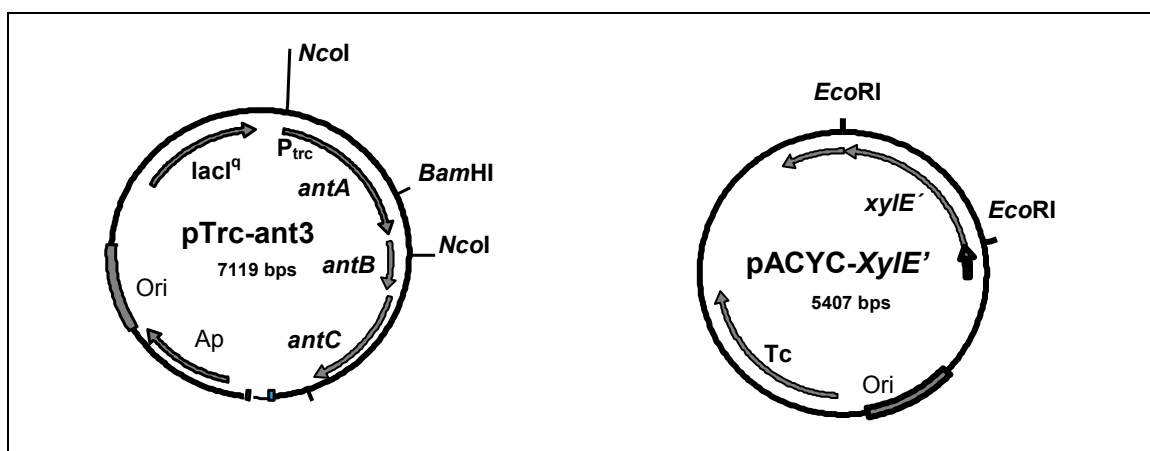


Fig. 9. Plásmidos utilizados para la producción (pTrc-ant3), visualización y cuantificación (pACYC-*XylE'*) de catecol respectivamente en *E. coli* W3110 (Treviño, datos no publicados).

3.3.3 Toxicidad del antranilato y catecol

La extrema toxicidad de muchos compuestos orgánicos impone un serio problema en la aplicación de éstos en procesos de producción biotecnológicos, ya que aparentemente limitan el rendimiento de los compuestos de interés. En el caso de la toxicidad de los productos aromáticos, resulta un reto importante tratar de elaborar técnicas de producción de estos compuestos libres de la síntesis por benceno (Li *et al.*, 2005).

El antranilato y el catecol se encuentran dentro de este grupo de compuestos, por lo que es indispensable conocer los límites de tolerancia de las cepas productoras, ya que ello marca los límites de crecimiento y producción. Así pues, se ha determinado que a concentraciones de 1g/L de catecol y de 2.5g/L de antranilato, el crecimiento bacteriano se ve drásticamente afectado. Esto indicó que el antranilato es un compuesto menos tóxico que el catecol para las cepas estudiadas (Silva, 2005).

A pesar de la toxicidad del catecol, los modos de acción de este compuestos aún no son completamente entendidos. Sin embargo, estudios realizados permiten comprender la manera en la que éste actúa en ciertos procesos celulares. A nivel molecular, el catecol combinado con metales pesados (Cu^{2+} , Fe^{3+}) y en presencia de oxígeno molecular (O_2), genera la formación de especies de oxígeno reactivas (ROS) que causan daño oxidativa en el ADN observándose en la ruptura de cadenas. No obstante, en *E. coli* lo anterior no es la razón de toxicidad del catecol, aunque no se debe excluir el potencial de este compuesto como un genotóxico que puede llegar a originar la acumulación de mutaciones en el ADN (Schweigert *et al.*, 2001).

En bacterias, la toxicidad del catecol se observa cuando una forma oxidada de este compuesto reacciona con los grupos sulfidrilos de una proteína, ocasionando la inactivación de ésta al unirse el catecol directamente sobre los grupos $-\text{SH}$. En *E. coli*, se propone que el catecol actúa como un narcótico que de manera pasiva destruye el potencial de membrana al desacoplar el transporte de electrones debido a una perturbación en la estructura de la bicapa lipídica (*Idem*). Esta modificación de la membrana es causada entre otras cosas, por la interacción con moléculas lipofílicas como es el caso del catecol, ya que al acumularse en la zona hidrofóbica de la membrana altera la interacción entre las cadenas de los fosfolípidos, ocasionando

cambios en la fluidez de la membrana y por lo tanto en su permeabilidad. Como resultado, se da un incremento en el flujo pasivo de protones (o iones) a través de la membrana, lo cual puede generar un decremento de la fuerza protón motriz perjudicando la transducción de energía durante el transporte de electrones. Así mismo, la interacción entre los compuestos lipofílicos y las proteínas de membrana puede generar conformaciones alteradas de éstas (Sikkema *et al.*, 1995).

El conocimiento de estos resultados permite diseñar estrategias de fermentación para la producción de ambos compuestos aromáticos. Debido a que los cultivos inician a concentraciones de 0 g/L para el caso de ambos compuestos y a densidades ópticas (A_{600}) iguales a 0.1, se sugieren dos posibilidades, la primera, que las cepas crecen hasta alcanzar la fase estacionaria y ahí comienzan a producir hasta alcanzar concentraciones que dañan su membrana celular, o bien, pueden producir al mismo tiempo que crecen y detener su crecimiento al llegar a dichas concentraciones (Silva, 2005).

4. Justificación

El antranilato y el catecol son dos compuestos aromáticos de gran interés industrial, ya que a partir de sus derivados se pueden obtener una gran variedad de compuestos comerciales, entre ellos, saborizantes, aromatizantes, pigmentos, colorantes, protectores solares, fármacos, entre otros. Actualmente estos compuestos se sintetizan mediante procesos químicos a partir de fenol derivado del petróleo. Debido a que en esta tecnología de producción se parte de materias primas no renovables a partir de las cuales se generan otros compuestos que contaminan al producto y al ambiente, es deseable contar con tecnologías alternas basadas en el uso de materias primas baratas, abundantes y renovables. Tal es el caso de la glucosa a partir de la cual se pueda lograr la síntesis de estos compuestos aromáticos. Es de esperarse que un proceso de producción basado en la transformación biológica de la glucosa en compuestos aromáticos, no genere compuestos contaminantes o tóxicos.

Con el propósito de lograr la síntesis de estos compuestos, en nuestro laboratorio se han diseñado mediante IVM cepas de *E. coli* que carecen del sistema PTS y que sobreexpresan el gene de la transcetolasa (*tktA*), con el objetivo de incrementar la disponibilidad de los precursores aromáticos PEP y E4P respectivamente. Así mismo, estas cepas presentan una versión insensible a inhibición alostérica de la enzima DAHP sintasa. Lo anterior, con la finalidad de sintetizar de manera concomitante el compuesto DAHP para posteriormente canalizar el flujo de carbono hacia la biosíntesis de los compuestos aromáticos. Así pues, en este trabajo pretendemos establecer el efecto de éstas y otras modificaciones sobre la capacidad de síntesis de antranilato y catecol.

Los datos obtenidos a partir de este trabajo, contribuirán al desarrollo de cepas para la producción industrial de estos dos compuestos aromáticos.

5. Hipótesis

Si a una cepa de *Escherichia coli* que posee una interrupción en la vía de síntesis de triptofano se le inactiva el sistema de fosfotransferasa (PTS) y se sobreexpresan enzimas claves involucradas en el transporte de glucosa, así como de la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos, entonces estas modificaciones podrían incrementar el flujo de carbono hacia la formación de antranilato (Fig. 10).

Si una cepa de *Escherichia coli* expresa los genes que codifican para la enzima antranilato dioxigenasa, será capaz de producir catecol a partir de glucosa como fuente de carbono (*Idem*).

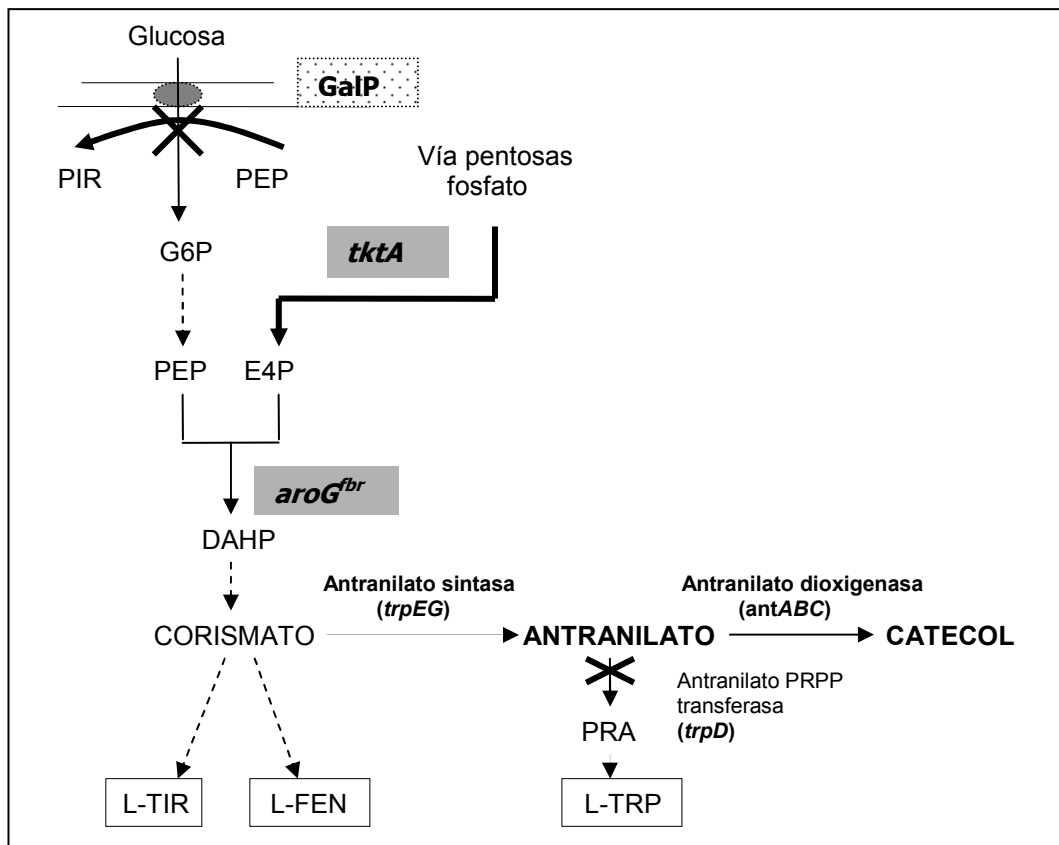


Fig. 10. Vías del metabolismo central y de síntesis de compuestos aromáticos en *E. coli*. Se indican las modificaciones planteadas en la hipótesis.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Generar y caracterizar cepas de *Escherichia coli* con la capacidad de producir antranilato y catecol a partir de glucosa.

6.2 Objetivos particulares

- Construcción de un plásmido en el cual se expresen simultáneamente los genes *aroG^{fbr}* y *tktA* que codifican para la DAHP sintasa insensible a inhibición alostérica por fenilalanina, y para la enzima transcetolasa respectivamente.
- Determinar el efecto de la inactivación de PTS mediante la introducción de $\Delta ptsHIcrr$ en la cepa productora de antranilato W3110- Determinar en la cepa W3110- el efecto de sobreexpresar el gene *galP* sobre la capacidad de consumo de glucosa, la productividad y el rendimiento en la síntesis de antranilato a partir de glucosa.
- Determinar el efecto de introducir los genes *antABC* en las cepas derivadas de JM101- y PB12- sobre la productividad y el rendimiento en la síntesis de catecol a partir de glucosa.
- Determinar el efecto de introducir los genes *aroG^{fbr}* y *tktA* en la cepa W3110- y PB12-.

7. Materiales y métodos

7.1 Cepas y plásmidos

Las cepas y plásmidos utilizados en este estudio se encuentran descritos en la Tabla I.

Las cepas W3110*trpD9923/pJLBaroG^{fbr}* y W3110*trpD9923/pJLBaroG^{fbr}/pCLtktA* (Silva, 2005), sirvieron como controles para la cepa W3110*trpD9923/pJLBaroG^{fbr}tktA*, la cual presenta tanto el gen *aroG^{fbr}* como el gen *tktA* en el mismo plásmido: pJLBaroG^{fbr} (Báez *et al.*, 2004).

Por otro lado, la cepa silvestre W3110*trpD9923* (Yanofsky, 1971) fue utilizada como microorganismo hospedero para la construcción de una cepa derivada PTS⁻Glc⁺, siendo sus controles positivo y negativo las cepas W3110*trpD9923* y W3110*trpD9923* PTS⁻ respectivamente.

Las cepas sobreproductoras de antranilato derivadas de JM101*trp⁻* y PB12*trp⁻* (Silva, 2005) fueron utilizadas para la construcción de las cepas productoras de catecol.

Cepas	Características	Referencia
W3110 <i>trpD9923</i>	<i>trpD⁻</i> , auxótrofa a triptofano debido a una mutagenización al azar por UV.	Yanofsky, 1971
W3110 <i>trpD9923/pJLBaroG^{fbr}</i>	<i>trpD⁻ trp⁻</i> , expresa el gene <i>aroG^{fbr}</i> que codifica para la DAHP sintasa insensible a inhibición alostérica por fenilalanina.	Silva, 2005
W3110 <i>trpD9923/pJLBaroG^{fbr}/pCLtktA</i>	<i>trpD⁻ trp⁻</i> , expresa el gene <i>aroG^{fbr}</i> y el gene <i>tktA</i> que codifica para la tranacetolasa.	Silva, 2005
W3110 <i>trpD9923/pJLBaroG^{fbr}tktA</i>	<i>trpD⁻ trp⁻</i> , expresa el gene <i>aroG^{fbr}</i> y el gene <i>tktA</i> en un mismo vector.	Este trabajo
W3110 <i>trpD9923ΔptsHIcrr::Km</i>	PTS ⁻ por la deleción del operón <i>ptsHIcrr</i> .	Este trabajo
W3110 <i>trpD9923ΔptsHIcrr::Km/pTrcGalP</i>	PTS ⁻ y Glc ⁺ por portar el plásmido pTrc-GalP que expresa el gene <i>galP</i> , el cual codifica para la enzima permeasa de galactosa.	Este trabajo
W3110 <i>trpD9923ΔptsHIcrr::Km/pTrcGalP / pJLBaroG^{fbr}tktA</i>	PTS ⁻ Glc ⁺ , expresa el gene <i>aroG^{fbr}</i> y el gene <i>tktA</i> en un mismo vector.	Este trabajo
JM101 <i>ΔtrpEDC::Km</i>	PTS ⁺ y <i>trp⁻</i> por la deleción de la región <i>trpEDC</i> del operón de triptofano.	Silva, 2005

JM101 Δ <i>trpEDC</i> ::Km /pCL <i>trpEGD</i>	PTS ⁺ <i>trp</i> ⁻ , expresa los genes <i>trpEGD</i> de la cepa 9923 que codifican para la enzima antranilato sintasa.	Silva, 2005
JM101 Δ <i>trpEDC</i> ::Km /pCL <i>trpEGD</i> /pTrc-ant3	PTS ⁺ <i>trp</i> ⁻ , expresa los genes <i>trpEGD</i> y los genes <i>antABC</i> que codifican para la antranilato dioxigenasa.	Este trabajo
JM101 Δ <i>trpEDC</i> ::Km /pCL <i>trpEGD</i> /pJLBaroG ^{fbr}	PTS ⁺ <i>trp</i> ⁻ , expresa los genes <i>trpEGD</i> y el gene <i>aroG</i> ^{fbr} que codifica para la DAHP sintasa insensible a inhibición alostérica.	Silva, 2005
JM101 Δ <i>trpEDC</i> ::Km /pCL <i>trpEGD</i> /pJLBaroG ^{fbr} /pTrc-ant3	PTS ⁺ <i>trp</i> ⁻ , expresa los genes <i>trpEGD</i> , <i>antABC</i> y el gene <i>aroG</i> ^{fbr} .	Este trabajo
PB12 Δ <i>trpEDC</i> ::Cat	PTS ⁻ Gluc ⁺ derivada de JM101 (Flores <i>et al.</i> , 1996), <i>trp</i> ⁻ por la delección de la región <i>trpEDC</i> del operón de triptofano.	Silva, 2005
PB12 Δ <i>trpEDC</i> ::Cat /pCL <i>trpEGD</i>	PTS ⁻ Gluc ⁺ <i>trp</i> ⁻ , expresa los genes <i>trpEGD</i> de la cepa 9923 que codifican para la enzima antranilato sintasa.	Silva, 2005
PB12 Δ <i>trpEDC</i> ::Cat /pCL <i>trpEGD</i> /pTrc-ant3	PTS ⁻ Gluc ⁺ <i>trp</i> ⁻ , expresa los genes <i>trpEGD</i> y los genes <i>antABC</i> que codifican para la antranilato dioxigenasa.	Este trabajo
PB12 Δ <i>trpEDC</i> ::Cat /pCL <i>trpEGD</i> /pJLBaroG ^{fbr}	PTS ⁻ Gluc ⁺ <i>trp</i> ⁻ , expresa los genes <i>trpEGD</i> y el gene <i>aroG</i> ^{fbr} que codifica para la DAHP sintasa insensible a inhibición alostérica.	Silva, 2005
PB12 Δ <i>trpEDC</i> ::Cat /pCL <i>trpEGD</i> /pJLBaroG ^{fbr} /pTrc-ant3	PTS ⁻ Gluc ⁺ <i>trp</i> ⁻ , expresa los genes <i>trpEGD</i> , <i>antABC</i> y el gene <i>aroG</i> ^{fbr} .	Este trabajo
Plásmidos	Características	Referencia
pJLBaroG ^{fbr}	Porta el gene <i>aroG</i> ^{fbr} (que codifica para la DAHP sintasa insensible a inhibición alostérica) bajo el control del promotor <i>lacUV5</i> , el gen <i>lacI^q</i> y los genes <i>tet</i> . Origen de replicación de pACYC184.	Báez <i>et al.</i> , 2004
pJLBaroG ^{fbr} <i>tktA</i>	Igual que el anterior y además porta el gen <i>tktA</i> que codifica para la tranacetilasa.	Este trabajo
pTrc-ant3	Porta los genes <i>antABC</i> , bajo el control del promotor <i>trc</i> , que codifican para la enzima antranilato sintasa. Resistente a ampicilina.	Treviño, datos no publicados.
pTrcGalP	Porta el gen <i>galP</i> , bajo el control del promotor <i>trc</i> , que codifica para la permeasa de galactosa. Resistente a carbenicilina	Hernández <i>et al.</i> , 2003

Tabla I. Cepas y plásmidos utilizados

7.2 Técnicas genéticas y de DNA recombinante

7.2.1 Transformación de DNA

El DNA se incorporó a *E. coli* por el método de electroporación utilizando un electroporador marca Eppendorf modelo 2510 a 2, 500 volts. Posteriormente, las células se recuperaron en medio SOC con glucosa al 0.2% a 37°C por 3 horas aproximadamente.

7.2.2 Purificación de DNA

Para el análisis de clonas recombinantes, el DNA plasmídico se extrajo por medio del método de lisis alcalina descrito por Rodríguez y Tait (1983). Por su parte, los vectores utilizados para transformar, se purificaron mediante el kit Miniprep System de GIBCOBRL como lo describen los fabricantes. En el caso del DNA cromosomal, éste se extrajo usando el kit marca MO BIO para aislamiento de DNA microbiano. Finalmente, para purificar productos de PCR, se utilizó el kit PCR purification marca Marligen BioScience, Inc.

7.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la reacción de PCR, se utilizó la Elongase enzyme mix (Invitrogen, Inc.), siendo el volumen final de la reacción 50 μ L. Las condiciones se describen en la siguiente tabla.

Componente	Concentración final
DNA templado	100 ng
dNTP's	0.2 mM
Primer <i>tktA</i> 5'	25 pmol/ μ L
Primer <i>tktA</i> 3'	25 pmol/ μ L
Buffer [Mg ²⁺]	2 mM
Elongase Enzyme Mix	1-2 unidades
Agua	50 μ L

Para el proceso de amplificación las mezclas se incubaron en un RoboCycler Gradient 96 marca Stratagene en 3 etapas:

1. Un ciclo de pre-desnaturalización a 95°C por 3 minutos.
2. 30 ciclos de amplificación, cada uno con un paso de desnaturalización (95°C por 30 segundos), alineamiento (58°C por 1 minuto) y polimerización (68°C por 3 minutos).
3. Un ciclo de extensión final a 68°C por 7 minutos.

7.2.4 Estrategia de clonación del gene *tktA* en un plásmido de bajo número de copias

Para la amplificación del gene *tktA* que codifica para la transacetolasa, se utilizaron oligos diseñados con sitios de corte *FspI* (Cabrera, datos no publicados):

oligo tktA5' 5'GCGCAGCGGACGGGCGAGTAGATTGCGCA 3' *FspI*

oligo tktA3' 3'GCGCTGCGCACGCCTTATCTATTGCTTGTC CGC 5'.

FspI

A partir del DNA cromosomal de la cepa silvestre W3110, los oligos se amplificaron por PCR usando la enzima elongasa, obteniéndose un producto de 2, 278 pb (Fig. 14a).

El producto de PCR se digirió con la enzima *FspI* (Fig. 14b), mientras que el vector pJLBaroG^{fb}r con la enzima *BstZ17I* (Fig. 13a y b). Posteriormente, éstos se ligaron con la enzima ligasa de Biolabs para generar el plásmido pJLBaroG^{fb}r*tktA* (Fig. 15a). La cepa *E. coli* XL1-Blue fue transformada con dicha construcción y se obtuvieron 34 transformantes, de las cuales se extrajo plásmido por lisis alcalina (Rodríguez y Tait, 1983) y se digirió con la enzima *KpnI*. Se seleccionaron 3 clonas y se digirieron esta vez con las enzimas *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII* y *XmaI*; de estas candidatas, sólo una presentaba el inserto (Fig. 15b). Finalmente, la cepa W3110*trpD9923* fue transformada con el nuevo plásmido.

7.2.5 Clonación de los genes *trpEGD* en el plásmido pCL1920

Esta construcción se realizó como parte del trabajo de tesis de maestría de Silva (2005). Para la cual, se llevó a cabo la purificación por kit (Miniprep System, GIBCOBRL) de los plásmidos pTOPO*trpEGD* (Silva, 2005) y pCL1920 (Lerner *et al.*, 1990), posteriormente se digirieron con la enzima *EcoRI* liberando 2 fragmentos para el pTOPO*trpEGD* y uno para el plásmido pCL1920 (Fig. 11). En el primer caso, se purificó de gel la banda correspondiente a los genes *trpEGD* de 2, 531 pares de base, mientras que de la digestión del pCL1920, se purificó la única banda correspondiente al plásmido digerido (4, 600 pb). Ambos plásmidos se purificaron del gel de agarosa mediante el kit Rapid Gel Extraction System (Marligen BioSciences, Inc.).

Los fragmentos fueron ligados utilizando la enzima ligasa de Biolabs durante 12 horas a temperatura ambiente. Finalmente, la ligación se transformó en cepas de *E. coli* XL1-Blue y las clonas obtenidas fueron digeridas con *EcoRI*.

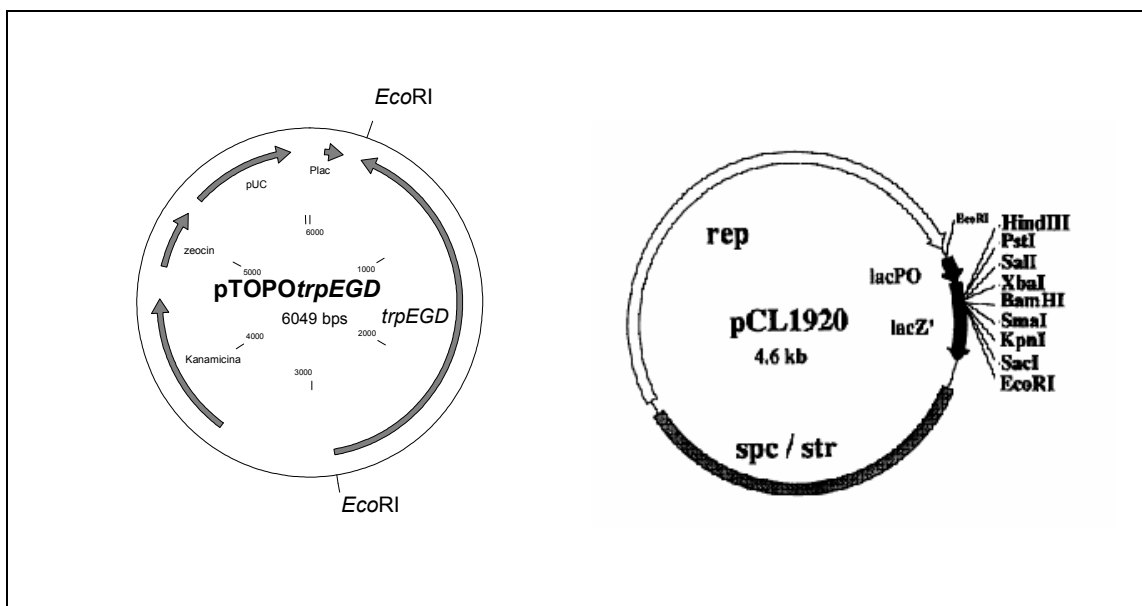


Fig. 11. Esquema de los plásmidos pTOPO*trpEGD* y pCL1920.

De las clonas obtenidas, dos presentaron el inserto correcto (Fig. 12b), la cepa JM101 trp^- se transformó con el plásmido pCL $trpEGD$ (Fig. 12a) y se decidió utilizar el proveniente de la clona 1 para realizar los estudios de producción de antranilato.

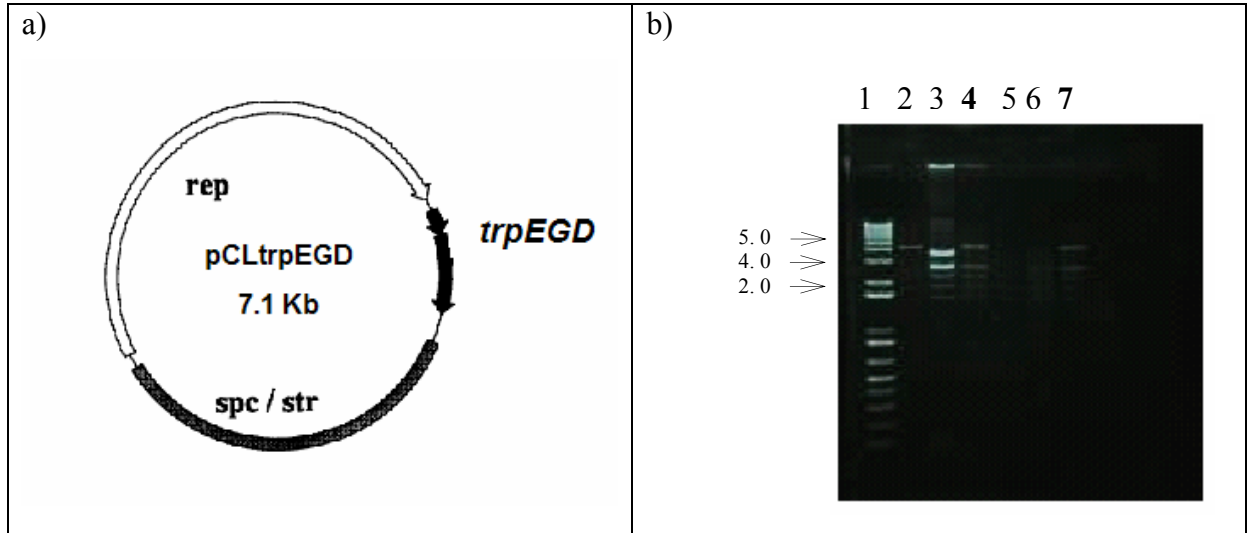


Fig. 12. a) Esquema del plásmido pCL $trpEGD$ y b) del patrón de restricción de las colonias candidatas a tener el plásmido con el inserto. Carriles: 1-marcador 1 Kb plus DNA, 2-pCL1920, 3-pTOPO $trpEGD$, 4 y 7: clonas con inserto.

7.2.6 Generación de una cepa derivada PTS $^-$ Glc $^+$ a partir de *E. coli* W3110 $trpD9923$

La mutación PTS $^-$ se obtuvo mediante transducción con el fago P1 utilizando a la cepa PB11 ($\Delta ptsH$, $ptsI$, $crr::Km^R$) como donadora. Una vez teniendo la cepa W3110 $trpD9923$ con el genotipo PTS $^-$, se transformó con el plásmido que porta el gene para la permeasa de galactosa (GalP); de las transformantes obtenidas se sembraron 100 clonas en cajas MacConkey con glucosa para verificar el genotipo PTS $^-$ Glc $^+$. Así mismo, se realizaron los cultivos celulares correspondientes para determinar la productividad de antranilato y el rendimiento a partir de glucosa.

7.3 Métodos analíticos

7.3.1 Evaluación de los metabolitos excretados mediante HPLC

Los metabolitos producidos por las cepas estudiadas, se determinaron de una muestra filtrada de 500 μL mediante cromatografía líquida de alta presión, por sus siglas en inglés HPLC.

Para la determinación de antranilato y catecol se utilizó una columna Supelco Discovery C18, utilizando como fase móvil metanol al 40% en ácido acético al 0.1%, a un flujo de 0.5 mL/min a 25°C.

El equipo HPLC Agilent modelo 1100, cuenta con un detector de UV de longitud de onda múltiple. La detección se hizo a 280 nm para el catecol y 330 nm para el antranilato.

7.3.2 Determinación de Glucosa

Para la determinación de glucosa se empleó un analizador bioquímico YSI modelo 2700. Este analizador presenta un electrodo enzimático que actúa como biosensor, acoplado la enzima glucosa oxidasa a un electrodo para oxígeno. La enzima oxida la glucosa y como consecuencia se produce un descenso en la concentración de oxígeno de la muestra (detectado por el electrodo) el cual, es directamente proporcional a la concentración de glucosa.

7.4 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

7.4.1 Medios de cultivo

A continuación se describen los medios de cultivo empleados:

- Medio Luria-Bertani (LB): 10g/L de triptona, 5g/L de extracto de levadura y 5g/L de NaCl.
- Medio mineral M9: 6g/L de Na_2HPO_4 , 0.5g/L de NaCl, 3g/L de KH_2HPO_4 , 1g/L de NH_4Cl , 246.5mg/L de MgSO_4 , 14.7mg/L de CaCl_2 y 10 $\mu\text{g/mL}$ de vitamina B1.
- Medio bajo en sales YENB: 7.5g/L de extracto de levadura y 8g/L de caldo nutritivo.
- Medio SOC: 20g/L de bacto-triptona, 5g/L de extracto de levadura, 2.5g/L de MgSO_4 , 2g/L de MgCl_2 , 0.58g/L NaCl, 93.18 mg/L de KCl.

7.4.2 Condiciones de crecimiento

Los cultivos para la determinación de antranilato y catecol se hicieron por duplicado. Los preinóculos se prepararon a partir de gliceroles creciendo una asada en cajas de LB con el antibiótico respectivo, se incubaron a 37°C por 12 horas para su recuperación. Las cepas crecidas se resembraron en cajas de medio mínimo M9 suplementado con glucosa 2g/L y 20 µg/mL de triptofano y se incubaron a 37°C por 12 horas más, de estas colonias adaptadas al medio mínimo, se tomó una porción y se resuspendió en 1 mL de medio M9, se determinó la DO_{600} y se calculó el volumen necesario para inocular un matraz con 50 mL de medio M9 a una DO de 0.1. Los cultivos se crecieron en matraces bafleados de 250 mL a 37°C y 300 rpm durante aproximadamente 24 horas adicionados con glucosa 2g/L para el caso de la cepa W3110 $trpD9923$ y sus derivadas, y 10g/L para el caso de las cepas derivadas de JM101 trp^- y PB12 trp^- ; 20 µg/mL de triptofano y 0.1mM de IPTG para inducir la expresión de los vectores que están bajo el control del promotor *lac*. A lo largo de este tiempo, se monitoreó su crecimiento hasta alcanzar la fase estacionaria midiendo la absorbancia a 600 nm. Una vez determinada la DO, se repitió la fermentación y se tomó muestra cada 2 horas, se centrifugaron a 12, 000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se almacenó a -20°C para su posterior análisis.

8. Resultados

8.1 Construcción y caracterización de un plásmido de bajo número de copias que contenga los genes *aroG^{fbr}* y *tktA*.

Para expresar los genes *aroG^{fbr}* y *tktA* en un mismo vector, se utilizó con este fin el plásmido pJLBaroG^{fbr} (Fig. 13a) digerido con la enzima *BstZ17I* (Fig. 13b), al cual se ligó el producto de PCR *tktA* digerido previamente con la enzima *FspI* (Fig. 14b); de las clonas obtenidas sólo una de ellas presentó el patrón de restricción correspondiente al nuevo plásmido pJLBaroG^{fbr}*tktA* (Fig. 15a y b).

El pJLBaroG^{fbr}*tktA* es un plásmido de bajo número de copias, aproximadamente 15 copias por célula, de un tamaño de alrededor 9,745 pares de bases, y su origen de replicación proviene del pACYC184.

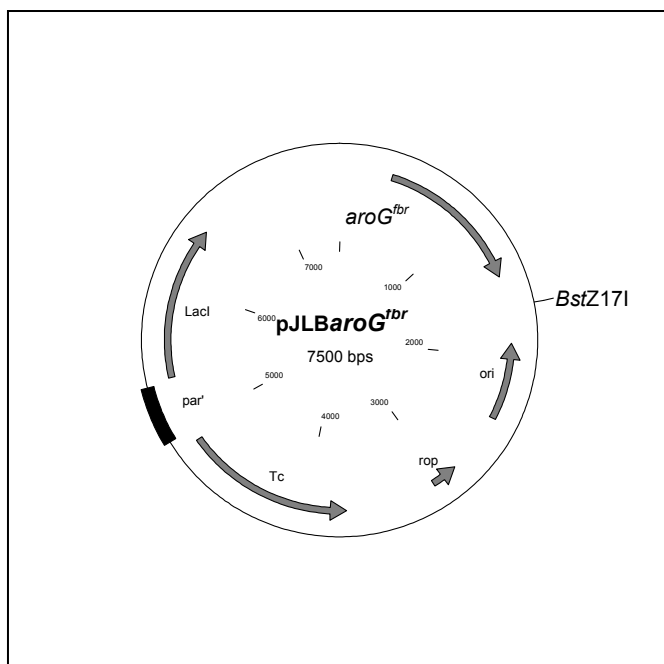


Fig. 13 a). Mapa del plásmido pJLBaroG^{fbr}. Se muestra únicamente el sitio de restricción de la enzima utilizada.

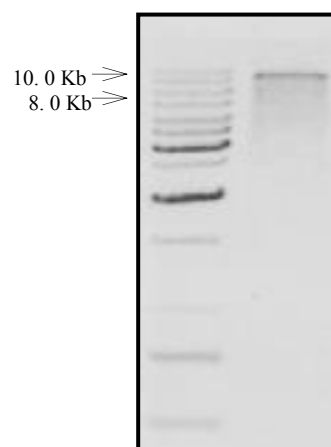


Fig. 13 b). Gel de agarosa donde se observa el plásmido pJLBaroG^{fbr} digerido con *BstZ17I*.

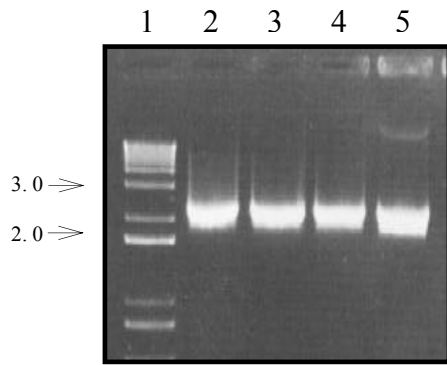


Fig 14 a). Productos de PCR.
Carriles 1: 1 Kb Plus DNA; 2- 4: productos PCR;
5: control pTOPO*tktA*;

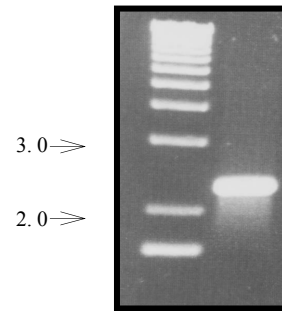


Fig. 14 b). Gel de agarosa donde se observa la digestión del gene *tktA* con la enzima *FspI*.

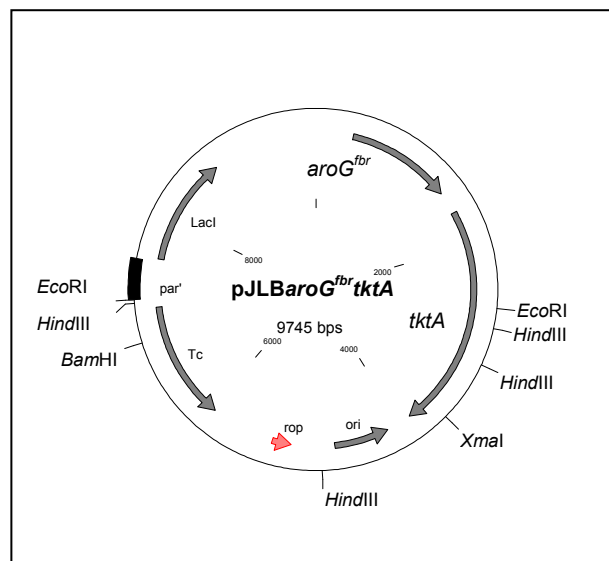


Fig. 15 a). Mapa del pJLBaro*G^{fbr}tktA*.
Se señalan los sitios de corte de las enzimas utilizadas.

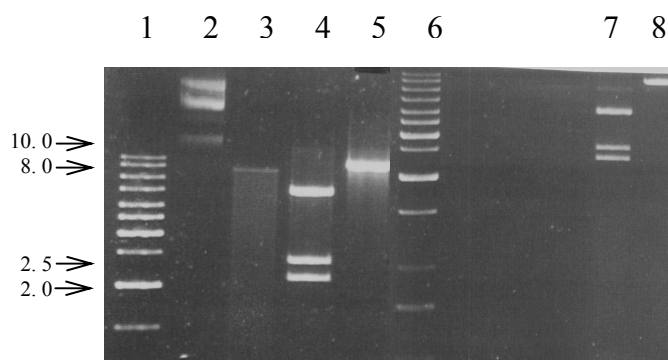


Fig. 15 b). Gel de agarosa donde se observa el perfil de restricción para la clona con inserto.
Carril 1 y 6: 1 Kb DNA; 2: DNA superenrollado de clona; 3: pJLBaro*G^{fbr}* digerido con *BstZ17I*;
4, 5, 7 y 8: clona digerida con *Hind III*, *BamHI*, *EcoRI* y *XmaI* respectivamente.

La expresión simultánea de los genes *aroG^{fbr}* y *tktA* en la cepa W3110*TrpD9923* generó una disminución sobre del crecimiento (Fig. 16A), sin embargo, el efecto

causado al sobreexpresar el gene *tktA* en el mismo plásmido, generó un aumento significativo sobre la producción de antranilato al compararlo con la cepa que sólo expresa *aroG^{fbr}* (Fig. 16B).

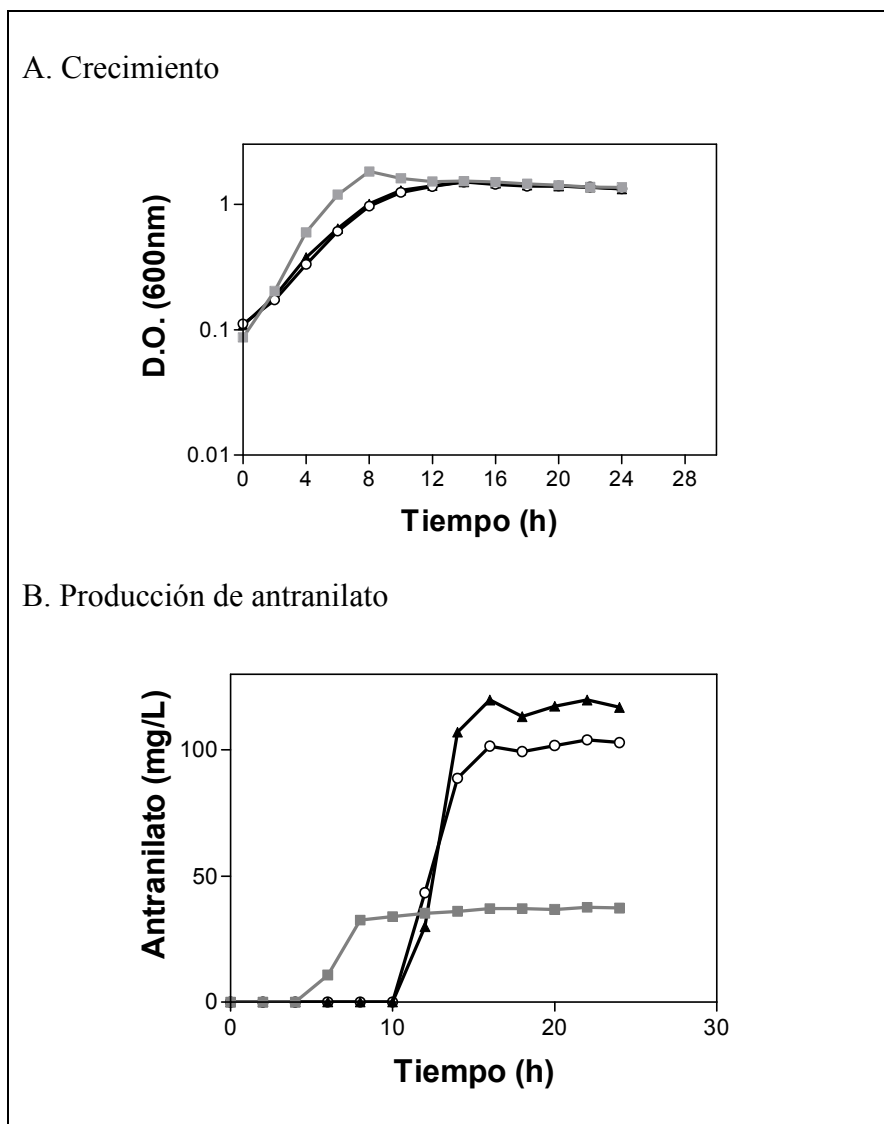


Fig. 16 A y B. Caracterización de la cepa que expresa los genes *aroG^{fbr}* y *tktA* en un plásmido de bajo número de copias (*pJLBaroG^{fbr}*).

Simbología: -■- W3110trpD9923/*pJLBaroG^{fbr}*; -▲- W3110trpD9923/*pJLBaroG^{fbr}*/*pCLtktA*; -○- W3110trpD9923/*pJLBaroG^{fbr}tktA*.

* Experimentos hechos por duplicado en medio M9 suplementado con 2g/L de glucosa, 20 µg/mL de triptofano y 0.1mM de IPTG.

Como se puede ver en la tabla II y, si comparamos las cepas 9923 pJLBaroG^{fbr}/pCLtktA y 9923 pJLBaroG^{fbr}tktA contra la cepa 9923pJLBaroG^{fbr} podemos determinar el efecto causado por la sola sobreexpresión del gene tktA. En el primer caso, la cepa acumuló 120 mg/L de antranilato, mientras que en el segundo caso la cepa 9923 pJLBaroG^{fbr}tktA produjo 104 mg/L, lo que corresponde en ambos casos aproximadamente a 3 veces con respecto a lo producido por la cepa 9923 pJLBaroG^{fbr}. Como consecuencia, la productividad (q_{ant}) aumentó en ambas cepas a 10 mg ant/g peso seco x h para la cepa pLBaroG^{fbr}/pCLtktA y a 8.08 mg ant/g peso seco x h para la cepa 9923 pJLBaroG^{fbr}tktA, es decir, 4 y 3 veces más respectivamente comparado con lo producido por la cepa 9923 pJLBaroG^{fbr} (Fig. 17).

Por otro lado, el consumo de glucosa (q_{gluc}) disminuyó en las cepas que simultáneamente expresan los genes *aroG^{fbr}* y *tktA*, en un 40% para la cepa 9923 pJLBaroG^{fbr}/pCLtktA y en un 50% para la cepa 9923 pJLBaroG^{fbr}tktA, dando como resultado un mayor incremento en el rendimiento ($Y_{ant/glu}$), el cual aumentó un poco más de 3 veces en ambas cepas en relación con la cepa silvestre (Tabla II).

	W3110TrpD9923 pJLBaroG ^{fbr} (1)	W3110TrpD9923 pJLBaroG ^{fbr} /pCLtktA (2)	W3110TrpD9923 pJLBaroG ^{fbr} tktA (3)	Relación (2)/(1)	Relación (3)/(1)
Antranilato acumulado (mg/L)	36.6 ± 0.84	119.88 ± 2.67	104.34 ± 11.35	3.27	2.85
μ (h ⁻¹)	0.5 ± 0.03	0.29 ± 0.01	0.297 ± 0.03	0.58	0.59
q_{gluc} (g gluc/g peso seco x h)	1.98 ± 0.2	0.82 ± 0.06	0.95 ± 0.14	0.41	0.48
q_{ant} (mg ant/g peso seco x h)	2.44 ± 0.16	9.9 ± 0.19	8.08 ± 0.61	4.05	3.31
$Y_{ant/glu}$ (mg ant/g gluc)	19.62 ± 0.51	60.41 ± 0.14	59.41 ± 0.51	3.07	3.03

Tabla II. Comparación de las cepas derivadas de W3110trpD9923.

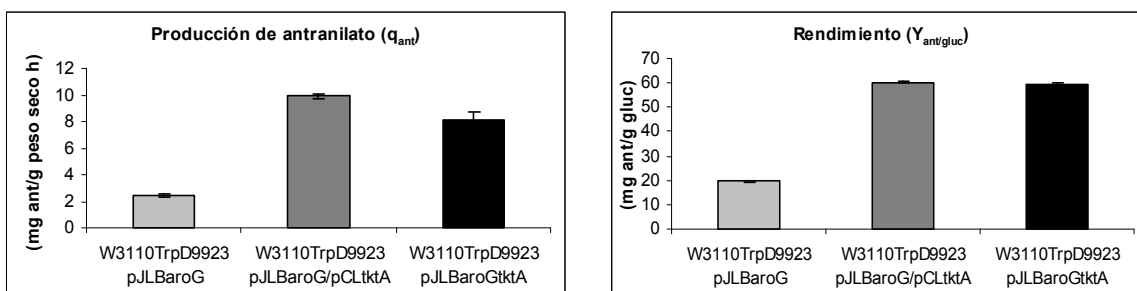


Fig. 17. Esquema de los efectos causados sobre la productividad y el rendimiento por la sobreexpresión de los genes *aroG^{fb}r* y *tktA* en la cepa productora de antranilato W3110TrpD9923.

Como se observa en las dos últimas columnas de la tabla II, las relaciones entre las cepas que simultáneamente expresan los genes *aroG^{fb}r* y *tktA* y la cepa que sólo expresa *aroG^{fb}r* son muy similares, lo que demuestra que ambos genes expresados tanto en diferentes vectores como en uno mismo (p.e. pJLBaroG^{fb}r) logran redirigir el flujo de carbono hacia la síntesis de antranilato. Por otra parte, aunque la productividad de antranilato (q_{ant}) de la cepa 9923 pJLBaroG^{fb}r/pCLtktA fue un 22% mayor comparada con la productividad de la cepa pJLBaroG^{fb}r/tktA, ambas cepas presentan los mismos rendimientos, lo cual hace favorable el uso de esta construcción para experimentos posteriores .

8.2 Efecto de la inactivación de PTS y de sobreexpresar el gene *galP* en la cepa productora de antranilato W3110trpD9923.

Con la finalidad de aumentar el flujo de carbono hacia la producción de antranilato, se decidió trabajar con la cepa W3110trpD9923 en fondos PTS⁻ y PTS⁻Glc⁺ ya que al eliminar el sistema de fosfotransferasa se esperaba un aumento en la disponibilidad de PEP, lo cual podría ocasionar un incremento en la síntesis del compuesto aromático antranilato.

La inactivación de PTS mediante la delección $\Delta ptsHIcrr$, ocasionó una disminución de aproximadamente el 70% en la tasa de crecimiento de la cepa W3110trpD9923PTS⁻ comparada con la cepa silvestre, sin embargo, en la cepa W3110TrpD9923 PTS⁻ Glc⁺, la cual fue transformada con el plásmido pTrc-GalP, se recuperó el fenotipo hasta en un 50% con respecto a la cepa silvestre (Fig. 18, tabla III).

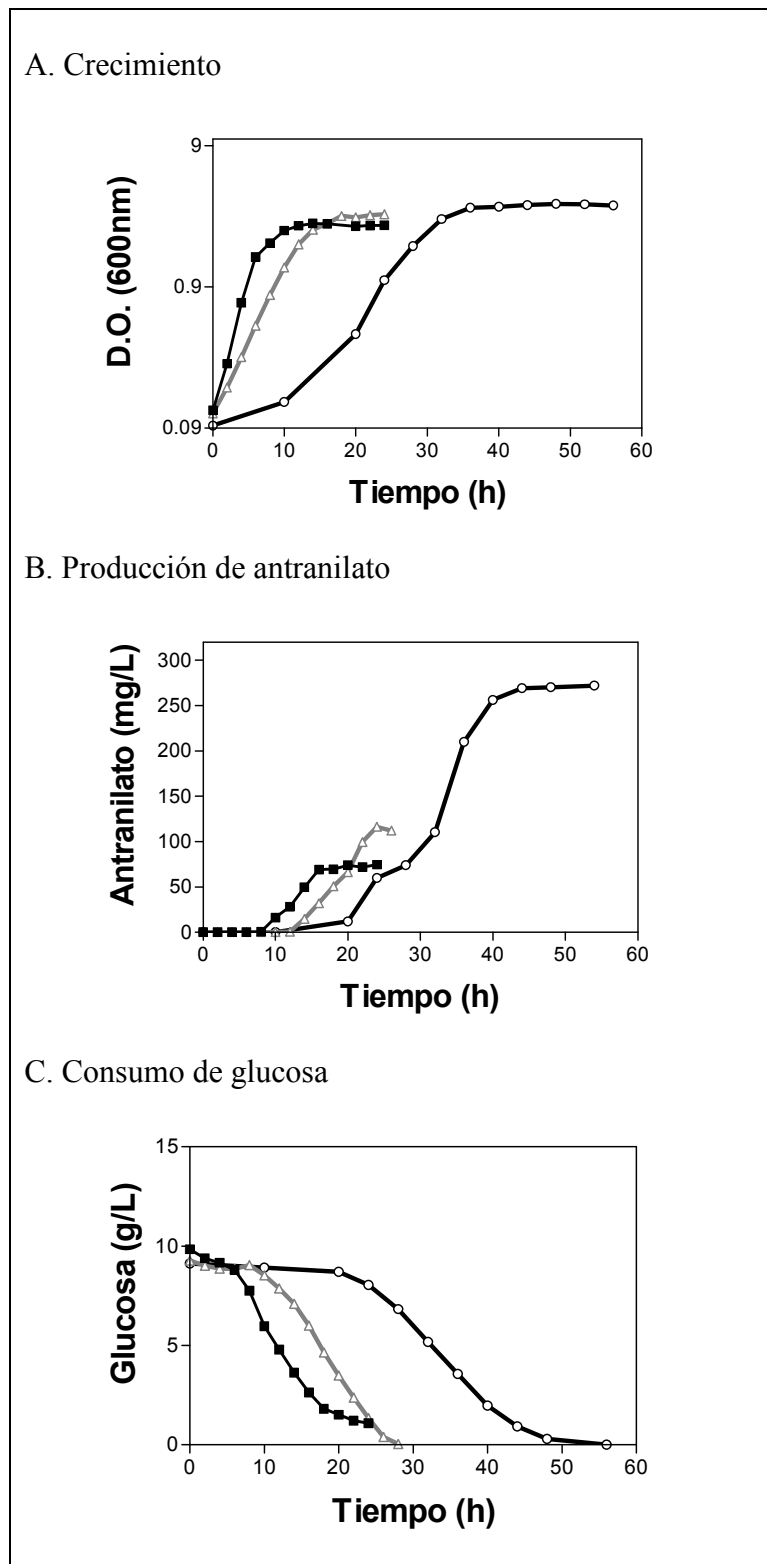


Fig. 18 A-C. Caracterización de las cepas $W3110TrpD9923\ PTS^-$ y $W3110TrpD9923\ PTS^- Glc^+$.
 Simbología: -■- $W3110TrpD9923$; -○- $W3110TrpD9923\ PTS^-$; -△- $W3110TrpD9923\ PTS^- Glc^+$.
 * Experimentos hechos por duplicado en medio M9 suplementado con 10g/L de glucosa, 20 μ g/mL de triptofano y 0.1mM de IPTG según fuera la cepa.

Con respecto a la producción de antranilato, la cepa W3110*trpD9923PTS*⁻ logró acumular 272 mg/L, en otras palabras, 4 veces más aproximadamente que la cepa silvestre (74.4 mg/L) y 2 veces más con respecto a la cepa W3110*TrpD9923 PTS*⁻ Glc⁺ (127.5 mg/L). Mientras que ésta última únicamente logró acumular el doble de antranilato comparada con la cepa silvestre. No obstante, la cepa W3110*trpD9923PTS*⁻ Glc⁺ obtuvo una tasa de productividad (q_{ant}) de 4.89 mg ant/g de peso seco x h, es decir, un 65% mayor que la productividad de la cepa W3110*trpD9923*. En el caso de la cepa W3110*TrpD9923 PTS*⁻ la productividad fue de 5.82 mg ant/g peso seco x h, en otras palabras, se dio un incremento del 96% comparado con la cepa silvestre.

Es importante mencionar que la cepa W3110*TrpD9923 PTS*⁻ Glc⁺ llega a la fase estacionaria aproximadamente a las 10 horas y a partir de este punto inicia la síntesis de antranilato, mientras que la cepa W3110*TrpD9923 PTS* alcanza la fase estacionaria hasta la hora 32, es decir, el triple de tiempo que la primera, por lo que esta diferencia en el tiempo está determinando que la tasa de productividad de antranilato de dicha cepa (5.82 mg ant/g pesos seco x h) sea tan sólo un 19% mayor que la tasa de W3110*TrpD9923 PTS*⁻ Glc⁺ (4.89 mg ant/g peso seco x h).

Por otra parte, la cepa silvestre es la que consume la glucosa más rápidamente (0.25 g gluc/g peso seco x h), mientras que en la cepa W3110*TrpD9923 PTS*⁻ la q_{gluc} es de 0.19 g gluc/g peso seco x h, lo que significa una disminución del 76% en el consumo de glucosa. En lo que respecta a la cepa W3110*TrpD9923 PTS*⁻ Glc⁺, el consumo de dicho carbohidrato se recuperó en un 24% comparado con la cepa W3110*TrpD9923*.

		W3110 <i>TrpD9923</i> (1)	W3110 <i>TrpD9923</i> PTS ⁻ (2)	W3110 <i>TrpD9923</i> PTS ⁻ Glc ⁺ (3)	Relación (2)/(1)	Relación (3)/(1)
Cepa	Antranilato acumulado (mg/L)	74.4	272.145 ± 28.63	127.545 ± 15.9	3.68	1.71
Fase exponencial	μ (h ⁻¹)	0.48 ± 0.027	0.13 ± 0.008	0.25 ± 0.0038	0.27	0.52
Fase estacionaria	q_{gluc} (g gluc/g peso seco x h)	0.25	0.19 ± 0.019	0.31 ± 0.017	0.76	1.24
	q_{ant} (mg ant/g peso seco x h)	2.97	5.82 ± 0.73	4.89 ± 0.87	1.96	1.65
	$Y_{ant/glu}$ (mg ant/g gluc)	11.95	31.53 ± 7.09	15.95 ± 1.96	2.64	1.33

Tabla III. Comparación de las cepas W3110*TrpD9923 PTS*⁻ y W3110*TrpD9923 PTS*⁻ Glc⁺.

Así pues, como se observa en la gráfica de rendimiento (Fig. 19), el aumento en el consumo de glucosa de la cepa *W3110TrpD9923 PTS⁻ Glc⁺* ocasionó una disminución en su rendimiento del 98% con respecto a *W3110TrpD9923 PTS⁻* y un aumento del 33% con respecto a la cepa *W3110TrpD9923*, mientras que en el caso de la cepa *W3110TrpD9923 PTS⁻*, se dio un aumento en el rendimiento de 11.95 (cepa silvestre) a 31.53 mg ant/g gluc, es decir, un incremento de 2.64 veces. El rendimiento obtenido por esta cepa corresponde al 9% del máximo teórico, y para el caso de *W3110TrpD9923 PTS⁻ Glc⁺* al 4.5%.

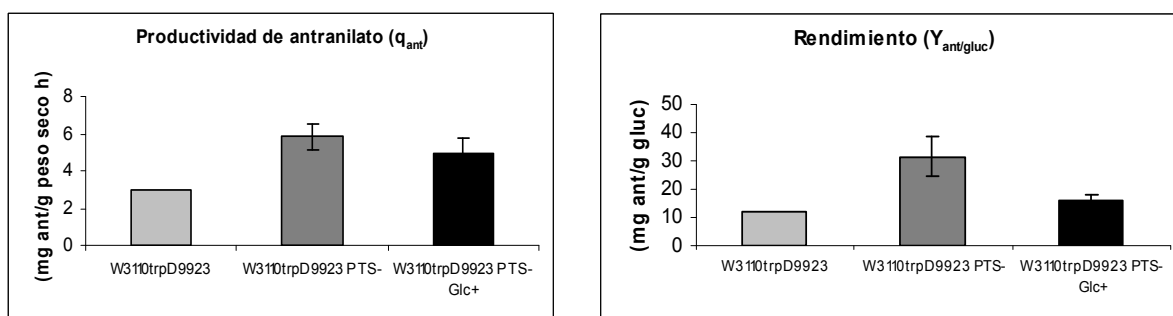


Fig. 19. Esquema del efecto causado al introducir $\Delta ptsHlcr$ y de sobreexpresar el gen *galP* en la cepa *W3110trpD9923* sobre la productividad y el rendimiento en la síntesis de antranilato.

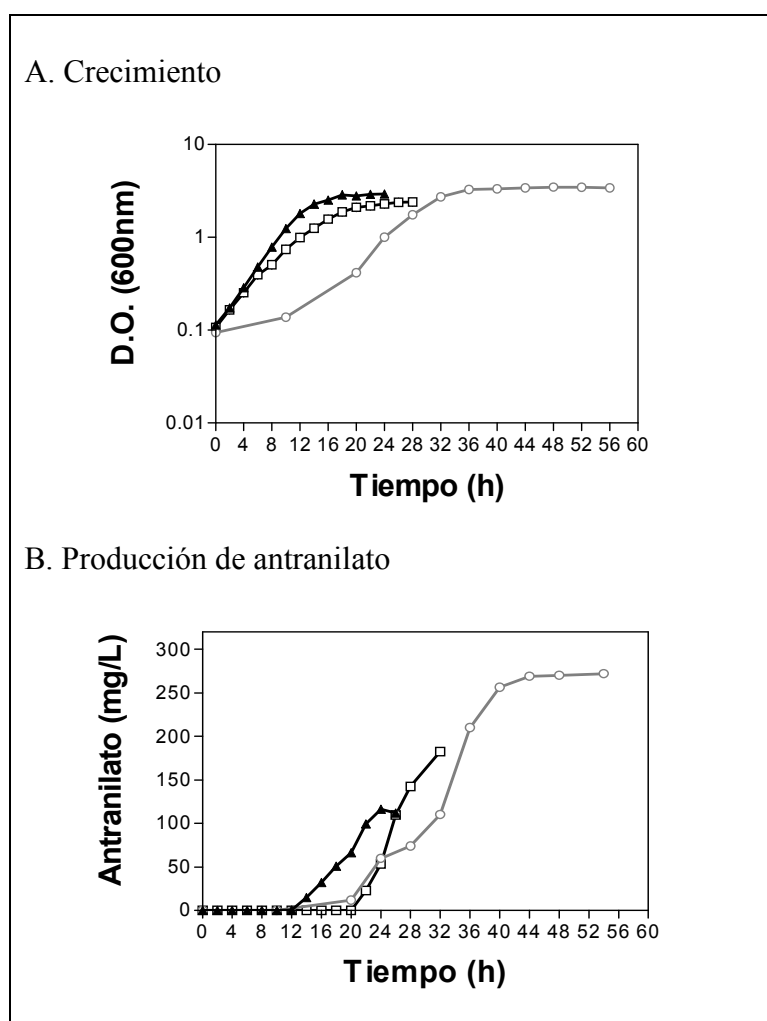
La tasa de crecimiento de la cepa *W3110TrpD9923 PTS⁻* se ve afectada drásticamente, debido a que al inactivar el PTS se está eliminando el principal sistema de transporte de glucosa, de tal manera que la cepa consume este carbohidrato muy lentamente repercutiendo así en la velocidad de crecimiento de la cepa. Esta cepa acumula mayores cantidades de antranilato que la cepa silvestre y que la cepa con fondo *PTS⁻ Glc⁺*, su productividad fue un 96% mayor que la tasa de la cepa silvestre y un 19% mayor que la de *W3110TrpD9923 PTS⁻ Glc⁺*. Por último, su rendimiento a partir de glucosa es mayor en un 98% comparado con el de esta última.

Por su parte, la cepa *W3110TrpD9923 PTS⁻/pTrc-GalP* adquirió el fenotipo *glucosa⁺* como consecuencia de la expresión del gene *galP*, logrando recuperar su tasa de consumo de glucosa en un 63% con respecto a la cepa *PTS⁻* y aumentando un 76% comparada con la cepa *W3110TrpD9923*. Así mismo, la expresión de dicho gene, permite a la cepa crecer a una tasa específica (μ) de 0.25 h^{-1} . Esta tasa de crecimiento representa el 52% de aquella calculada para la cepa *W3110TrpD9923*.

8.3 Efecto de la introducción del plásmido pJLBaroG^{fbr}tktA en la cepa productora de antranilato W3110trpD9923 PTS⁻Glc⁺

Una vez caracterizada la cepa silvestre W3110trpD9923 en un fondo PTS⁻Glc⁺, se sobreexpresaron conjuntamente en ésta los genes *aroG^{fbr}* y *tktA* con la finalidad de determinar el efecto de estos dos genes sobre la capacidad de síntesis de antranilato en la nueva cepa obtenida.

Como se observa en la figura 20A y en la tabla IV, la velocidad de crecimiento de la cepa W3110TrpD9923 PTS⁻Glc⁺/ pJLBaroG^{fbr}tktA aumentó 1.46 veces con respecto a la cepa PTS⁻, sin embargo, disminuyó a 0.19 h⁻¹ es decir, 0.76 veces comparada con la cepa PTS⁻Glc⁺ a consecuencia de la expresión del plásmido pJLBaroG^{fbr}tktA. En términos del antranilato producido (Fig. 20B), la cepa que porta el plásmido acumuló 182.59 mg/L, que comparado con la cepa PTS⁻ representa una disminución de 0.67 veces. No obstante, el efecto causado por la sobreexpresión de los genes *aroG^{fbr}* y *tktA* generó un aumento del 43% en comparación con la cepa PTS⁻Glc⁺.



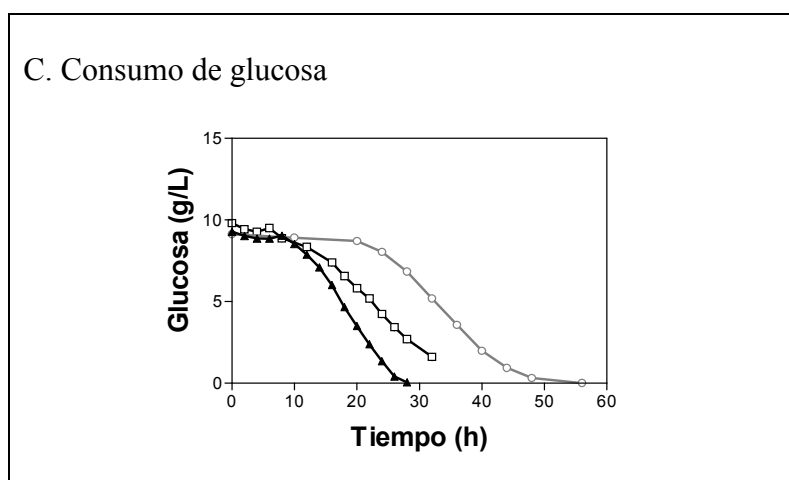


Fig. 20 A-C. Caracterización de la cepa W3110TrpD9923 PTS⁻ Glc⁺/ pJLBaroG^{fbr} tktA.

Simbología: -○- W3110TrpD9923 PTS⁻; -▲- W3110TrpD9923 PTS⁻ Glc⁺;

-□- W3110TrpD9923 PTS⁻ Glc⁺/ pJLBaroG^{fbr} tktA.

* Experimentos hechos por duplicado en medio M9 suplementado con 10g/L de glucosa, 20 µg/mL de triptofano y 0.1mM de IPTG según fuera la cepa.

		W3110TrpD9923 PTS ⁻ (1)	W3110TrpD9923 PTS ⁻ Glc ⁺ (2)	W3110TrpD9923 PTS ⁻ Glc ⁺ / pJLBaroG ^{fbr} tktA (3)	Relación (3)/(1)	Relación (3)/(2)
Cepa	Antranilato acumulado (mg/L)	272.14 ± 28.63	127.54 ± 15.9	182.59 ± 6.59	0.67	1.43
Fase exponencial	µ (h ⁻¹)	0.13 ± 0.008	0.25 ± 0.0038	0.19 ± 0.01	1.46	0.76
Fase estacionaria	q _{gluc} (g gluc/g peso seco x h)	0.19 ± 0.019	0.31 ± 0.017	0.35 ± 0.02	1.84	1.13
	q _{ant} (mg ant/g peso seco x h)	5.82 ± 0.73	4.89 ± 0.87	14.85 ± 0.11	2.55	3.04
	Y _{ant/glu} (mg ant/g gluc)	31.53 ± 7.09	15.95 ± 1.96	42.36 ± 2.85	1.34	2.66

Tabla IV. Comparación de parámetros cinéticos entre las diferentes cepas PTS⁻.

Es importante recalcar que la acumulación de antranilato en la cepa W3110TrpD9923 PTS⁻ Glc⁺/ pJLBaroG^{fbr} tktA no llega a fase estacionaria aún a las 32 horas, siendo posible que pueda continuar acumulando dicho aromático hasta acabarse la glucosa, pues como se observa en la figura 20C esta cepa todavía al final de la cinética realizada no ha consumido por completo la glucosa.

Por otro lado, la q_{gluc} de esta ultima cepa se vió incrementada significativamente de 0.19 a 0.35 g gluc/g peso seco x h con respecto a la cepa PTS^- . Mientras que no hubo una variación importante entre las q_s de la cepa $PTS^- Glc^+$ y la que porta el plásmido $pJLBaroG^{fbr} tktA$ (Tabla IV).

Ahora bien, como se observa en la figura 21 la cepa $W3110TrpD9923 PTS^- Glc^+ / pJLBaroG^{fbr} tktA$ alcanzó la q_{ant} y el $Y_{ant/gluc}$ más alto. Siendo la productividad de ésta 2.55 veces mayor que la q_{ant} de la cepa PTS^- , mientras que comparada con la PTS^-Glc^+ la productividad incrementó de 4.89 a 14.85 mg ant/g peso seco x h, es decir, aumentó 3 veces para la cepa que porta el plásmido.

En el caso del rendimiento de antranilato a partir de glucosa, éste incrementó de 31.53 (cepa PTS^-) a 42.36 mg ant/g gluc, lo que significa un aumento de 1.34 veces para la cepa que porta los genes $aroG^{fbr}$ y $tktA$. Aunque la mayor diferencia en rendimientos se vio entre las cepas $W3110TrpD9923 PTS^- Glc^+$ y aquella con el plásmido $pJLBaroG^{fbr} tktA$, siendo dicha variación aproximadamente 3 veces mayor para esta última cepa, logrando un $Y_{ant/glu}$ de 42.36 mg ant/g gluc.

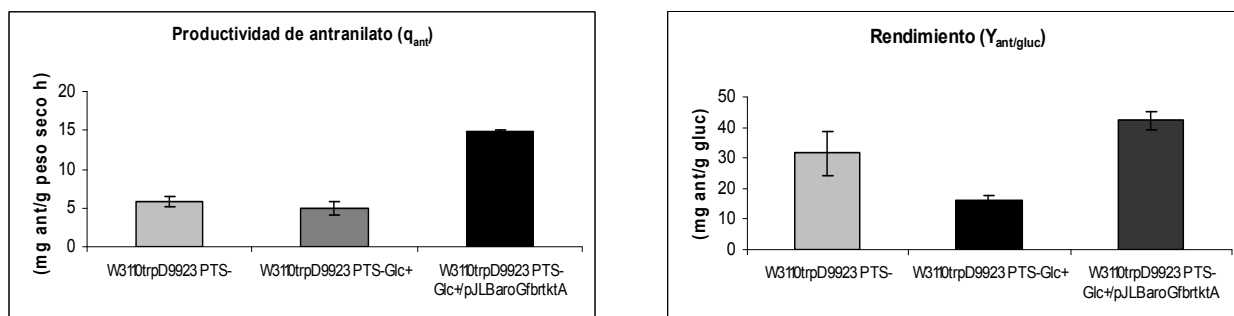


Fig. 21. Esquema del efecto causado al sobreexpresar conjuntamente los genes $aroG^{fbr}$ y $tktA$ en la cepa $W3110trpD9923 PTS^-Glc^+$ sobre la productividad y el rendimiento en la síntesis de antranilato.

La introducción del plásmido que permite la sobreexpresión conjunta de los genes $aroG^{fbr}$ y $tktA$ en la cepa $W3110TrpD9923 PTS^- Glc^+$, ocasionó un aumento en la acumulación de antranilato, así como en su q_{ant} y en el $Y_{ant/gluc}$, demostrando una vez más la importancia de ambos genes en el redireccionamiento del flujo de carbono hacia la síntesis de antranilato.

La cepa $W3110TrpD9923 PTS^- Glc^+ / pJLBaroG^{fbr} tktA$ alcanzó un rendimiento del 12% con respecto al máximo teórico, siendo mayor 1.33 veces con respecto al de la cepa $W3110TrpD9923 PTS^-$ ($^{max} Y_{ant/gluc} = 9\%$) y 2.66 veces mayor comparado con el $^{max} Y$ de la cepa $W3110TrpD9923 PTS^- Glc^+$ ($^{max} Y_{ant/gluc} = 4.5\%$).

8.4 Efecto de la introducción del plásmido que contiene los genes *antABC* sobre la capacidad de producir catecol en las cepas: JM101trp⁻/pCLtrpEG, JM101trp⁻/pCLtrpEG/pJLBaroG^{fb}r, PB12trp⁻/pCLtrpEG y PB12trp⁻/pCLtrpEG/pJLBaroG^{fb}r.

El plásmido pTrc-ant3 porta los genes que codifican para la enzima antranilato dioxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa*, la cual, cataliza la reacción de conversión de antranilato a catecol en este microorganismo, por lo que se esperaría convirtiera el antranilato endógeno producido por las cepas derivadas de JM101trp⁻ y PB12trp⁻ en catecol.

Como se observa en la gráfica A de la figura 22, la expresión de los genes *antABC* no afectó el crecimiento, no obstante sólo las cepas JM101trp⁻/pCLtrpEG/pTrc-ant3 y JM101trp⁻/pCLtrpEG/pJLBaroG^{fb}r/pTrc-ant3 produjeron catecol al mismo tiempo que acumularon antranilato; mientras que para las cepas derivadas de PB12trp⁻, hay una producción mínima de estos dos compuestos (Fig. 22 B y C).

En la tabla V y figura 23 se comparan las cepas que produjeron catecol, lográndose un incremento en la síntesis de este compuesto en la cepa JM101trp⁻/pCLtrpEG/pJLBaroG^{fb}r/pTrc-ant3 de 121 mg/L comparado con 20 mg/L de la cepa JM101trp⁻/pCLtrpEG/pTrc-ant3, lo que corresponde a un aumento de 6 veces. Como consecuencia la q_{cat} aumentó de 1 a 8.6 mg cat/g peso seco x h, esto es, 8 veces sobre la cepa JM101trp⁻/pCLtrpEG/pTrc-ant3. El consumo de glucosa no cambió significativamente, mientras que el $Y_{cat/gluc}$ en la cepa que expresa el gene *aroG^{fb}r* también aumentó de 3.31 a 32.85 mg cat/g gluc.

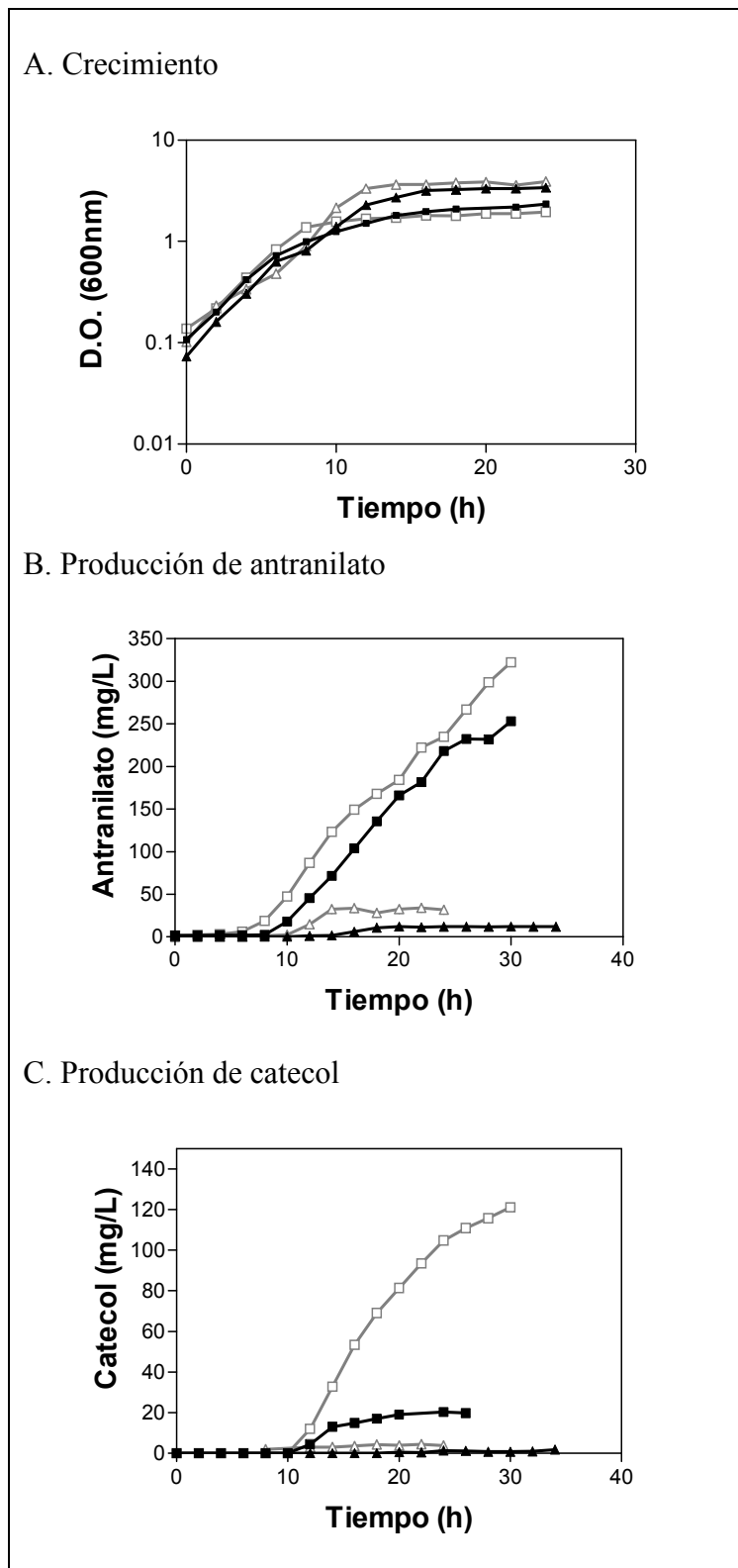


Fig. 22 A-C. Caracterización de las cepas: -■- JM101trp⁻/pCLtrpEG/pTrc-ant3, -□- JM101trp⁺/pCLtrpEG/pJLBaroG^{br}/pTrc-ant3, -▲- PB12trp⁻/pCLtrpEG/pTrc-ant3 y -△- PB12trp⁺/pCLtrpEG/pJLBaroG^{br}/pTrc-ant3.

* Experimentos hechos por duplicado en medio M9, 10g/L de glucosa, 20 µg/mL de triptofano y 0.1mM de IPTG.

		JM101trp ⁻ /pCLtrpEG/pTrc-ant3 (1)	JM101trp ⁻ /pCLtrpEG/pJLBaroG ^{fbr} /pTrc-ant3 (2)	Relación (2)/(1)
Cepa	Catecol acumulado (mg/L)	20.29	121.15	5.97
	Antranilato acumulado (mg/L)	253.06	322.71	1.28
	$Y \left(\frac{\text{mg/L cat}}{\text{mg/L ant}} \right)$	0.08	0.375	4.69
Fase exponencial	μ (h ⁻¹)	0.37	0.43	1.16
Fase estacionaria	q_{gluc} (g gluc/g peso seco x h)	0.31	0.26	0.84
	q_{cat} (mg cat/g peso seco x h)	1.02	8.59	8.42
	$Y_{\text{cat/glu}}$ (mg cat/g gluc)	3.31	32.85	9.92

Tabla V. Comparación de las cepas productoras de catecol: JM101trp⁻/pCLtrpEG/pTrc-ant3 y JM101trp⁻/pCLtrpEG/pJLBaroG^{fbr}/pTrc-ant3

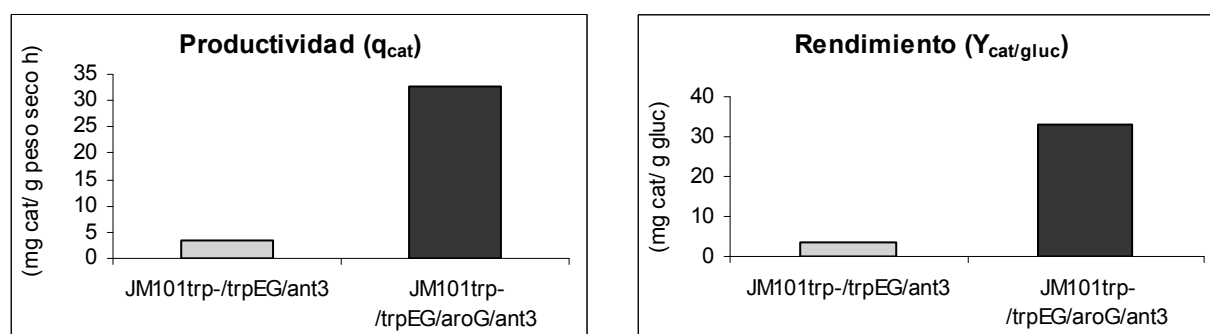
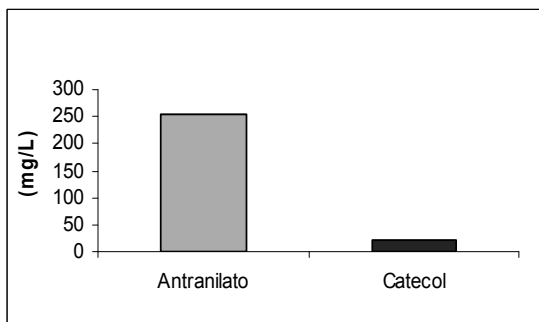


Fig. 23. Comparación de las productividad y rendimientos alcanzados por las cepas productoras de catecol.

El rendimiento teórico de catecol a partir de antranilato es de 1 mol/mol (0.80 g/g) (Silva, 2005). Tomando en cuenta que la cepa JM101trp⁻/pCLtrpEG/pJLBaroG^{fbr}/pTrc-ant3 acumuló 323 mg/L de antranilato al final del cultivo, y que produjo 121 mg/L de catecol, se puede decir que en estas condiciones, se tiene un rendimiento del 37.5% de catecol a partir de antranilato endógeno, el cual es 5 veces mayor que el $Y_{\text{ant/cat}}$ alcanzado por la cepa JM101trp⁻/pCLtrpEG/pTrc-ant3 (Fig. 24, tabla V).

a)



b)

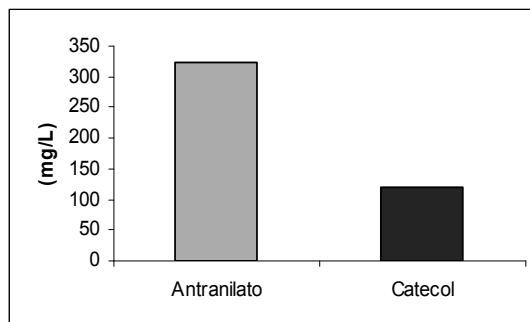


Fig. 24. Producción de antranilato y catecol en las cepas a) JM101trp⁻/pCLtrpEG/pTrc-ant3 y b) JM101trp⁻/pCLtrpEG/pJLBaroG^{fbr}/pTrc-ant3.

Al parecer, la sobreexpresión del gene *aroG^{fbr}* permite redirigir un mayor flujo de carbono hacia la síntesis de catecol a diferencia de la cepa que no lo presenta. Sin embargo, aún se siguen acumulando grandes cantidades de antranilato al final del cultivo.

9. Discusión

9.1 Efecto de la sobreexpresión de los genes *aroG^{fbr}* y *tktA* sobre la capacidad de producir antranilato en la cepa W3110*trpD9923*.

La cepa designada como W3110*trpD9923* (Yanofsky *et al.*, 1996; 1971) presenta una mutación que inactiva a la enzima fosforibosil transferasa (*trpD*) pero no la actividad de la antranilato sintasa (*trpEG*), por lo que todo el antranilato que es sintetizado se acumula en esta cepa y ya no es utilizado como sustrato de la siguiente reacción (Silva, 2005).

Con la finalidad de aumentar el flujo metabólico hacia la producción de dicho intermediario, se generó mediante ingeniería de vías metabólicas el plásmido pJLBaro*G^{fbr}tktA*, el cual, porta los genes *aroG^{fbr}* y *tktA* con origen de replicación del plásmido pACYC184. Ambos genes permiten redirigir el flujo de carbono hacia la vía de síntesis de los aminoácidos aromáticos, en el caso del gene *aroG^{fbr}*, éste codifica para una versión mutante de la enzima DAHP sintasa insensible a inhibición alostérica por fenilalina, por lo que el precursor PEP que queda disponible es rápidamente convertido en DAHP por dicha enzima. Mientras que en el caso del gene *tktA*, su sobreexpresión permite un incremento en la disponibilidad de E4P, otro de los precursores en la ruta de síntesis de los aminoácidos aromáticos (Fig. 25).

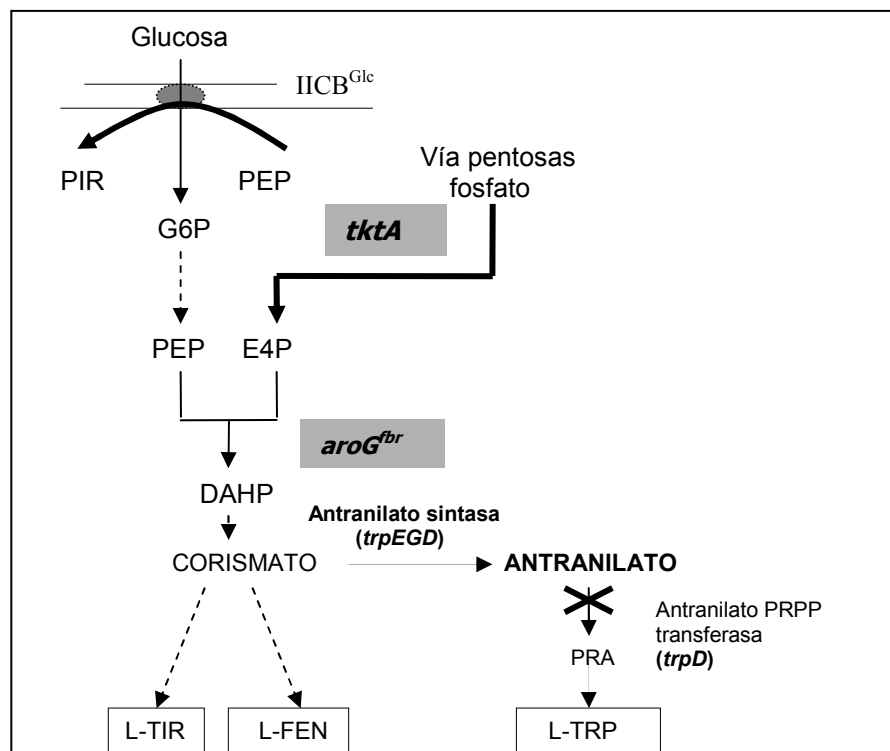


Fig. 25. Esquema del metabolismo de la cepa W3110*trpD9923*/pJLBaro*G^{fbr}tktA*.

El efecto causado por la sola expresión del gene *tktA*, generó un aumento en la acumulación de antranilato y en su tasa de productividad (q_{ant}) de 3 veces en la cepa W3110trpD9923/ pJLBaroG^{fbr}*tktA* con respecto a la cepa que únicamente porta el gene *aroG^{fbr}*. A pesar de que la cepa W3110trpD9923/ pJLBaroG^{fbr}*tktA* obtuvo una q_{ant} 0.82 veces menor que la cepa que porta los dos plásmidos (9923 pJLBaroG^{fbr}/pCL*tktA*), logró el mismo incremento ($Y_{ant/gluc}$) que esta última, 0.060 g/g, el cual corresponde al 17% con respecto al rendimiento máximo teórico.

Esta nueva construcción permite la expresión de dos genes diferentes bajo un mismo origen de replicación. Asimismo, genera la posibilidad de que plásmidos de diferentes familias, como el caso del pCL1920, puedan establecerse en la misma célula bacteriana sin problemas de compatibilidad de grupo. Esto abre la posibilidad de lograr la introducción de nuevos genes para la modificación de rutas metabólicas.

9.2 Reconstitución y caracterización del fenotipo Gluc⁺ en la cepa W3110trpD9923 carente del sistema de fosfotrasferasa.

Se ha demostrado que cepas con el fenotipo PTS⁻ Glc⁺ poseen características importantes para su uso en aplicaciones biotecnológicas, ya que el flujo de carbono hacia aromáticos y el rendimiento a partir de glucosa incrementa como resultado de la inactivación de el PTS (Flores *et al.*, 1996; Gosset *et al.*, 1996).

A pesar de que el método de selección mediante cultivo continuo para aislar mutantes glucosa⁺ ha sido exitoso en algunas cepas de *E. coli*, para otras no ha sido posible obtener una mutante PTS⁻ Glc⁺ usando este proceso. Así mismo, se ha encontrado que dichas mutantes aisladas por el proceso de cultivo continuo, pueden tener características metabólicas diferentes³ (Flores *et al.*, 2002) Es por esto, que se ha desarrollado un método alternativo para generar cepas con la capacidad de transportar y/o fosforilar la glucosa eficientemente mediante la expresión individual o combinada de la permeasa de galactosa (GalP) y la glucocinasa (Glk) respectivamente en cepas *E. coli* PTS⁻ (Hernández *et al.*, 2003).

³ Por ejemplo en la cepa PB12 la síntesis de ribosa 5-fosfato se obtiene tanto de la ruta oxidativa como de la no oxidativa de la vía de las pentosas fosfato, mientras que en la cepa PB13 esta misma pentosa se sintetiza únicamente a través de la ruta oxidativa; los flujos de carbono hacia la síntesis de productos de fermentación como el ácido acético, también muestran diferencias de un 48% y 67% para PB12 y PB13 respectivamente (Flores *et al.*, 2002).

Así pues, con la información anterior, en este proyecto se decidió trabajar con la cepa productora de antranilato W3110*TrpD9923* en un fondo PTS⁻ y PTS⁻Glc⁺ (Fig. 26).

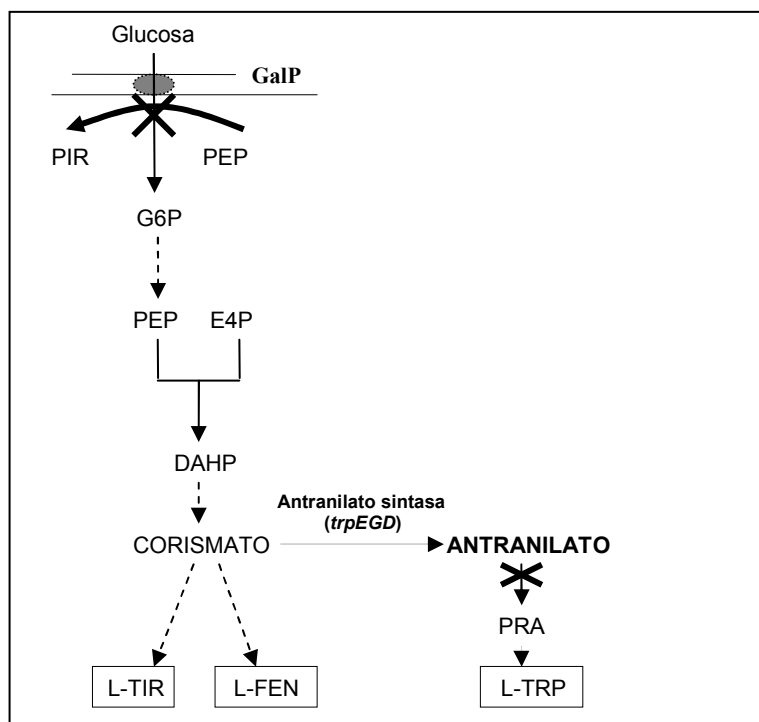


Fig. 26. Modificaciones sobre el metabolismo central y en la vía de síntesis de compuestos aromáticos realizadas en la cepa W3110*TrpD9923*.

Una mutante PTS⁻ no puede asimilar rápidamente la glucosa, por lo que su tasa de crecimiento es muy lenta cuando utiliza dicho carbohidrato como fuente de carbono (Flores *et al.*, 1996). Tal es el caso de la cepa W3110*TrpD9923* PTS⁻ cuya μ durante fase estacionaria fue de 0.13 h^{-1} . Sin embargo, cuando esta misma cepa es transformada con el plásmido pTrc-GalP, la tasa de crecimiento aumenta a 0.25 h^{-1} . Esta tasa representa un aumento del 92% con respecto a la cepa PTS⁻.

A modo de comparación, en el trabajo de Hernández y colaboradores (2003), la expresión individual de *galP* correspondió al 89% de la μ de la cepa silvestre (tabla VI). Esta tasa de 0.55 h^{-1} equivale aproximadamente al doble de la obtenida por la cepa W3110*TrpD9923* PTS⁻/pTrc-GalP.

Cepa	Descripción	μ (h^{-1})	q_s ($\text{g gluc g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$)
W3110	Cepa silvestre	0.62	1.5
VH32	W3110 PTS ⁻	0.03	ND
VH32/pCLGalP	W3110 PTS ⁻ Glc ⁺	0.55	1.32
VH32/pCLGlcGalP	W3110 PTS ⁻ Glc ⁺	0.59	1.4

Tabla VI. Determinación de la tasa específica de crecimiento y de consumo de glucosa para las cepas silvestre y PTS⁻ (Modificado de Hernández *et al.*, 2003). ND: No determinado.

Es importante mencionar que en el trabajo anterior el gene *galP* se clonó en el plásmido pCL1920 bajo un promotor *trc* mutado de gran fuerza. Por lo que estas diferencias deben tomarse en cuenta al momento de hacer comparaciones.

Como es de esperarse, debido a la tasa de crecimiento tan alta de la cepa VH32/pCLGalP, su consumo de glucosa es igualmente alto (tabla VI). Mientras que para la cepa W3110*TrpD9923* PTS⁻/pTrc-GalP, la q_s durante fase exponencial es de apenas 0.44 g gluc $g_x^{-1} h^{-1}$, en otras palabras, esta cepa consume 33% menos glucosa que la cepa VH32/pCLGalP en fase exponencial.

Ahora bien, al comparar la cepa W3110*TrpD9923* PTS⁻/pTrc-GalP contra la cepa W3110*TrpD9923* PTS⁻, la primera logra recuperar su tasa de consumo de glucosa en un 63% y comparada con la silvestre la q_s aumenta un 24% (tabla III). Por lo que podemos decir que la cepa W3110*TrpD9923* PTS⁻ Glc⁺ adquirió el fenotipo glucosa⁺ como consecuencia de la expresión del gene *galP*.

Comparando con el trabajo de Hernández y colaboradores (2003), la cepa VH32 alcanzó una μ de 0.03 h^{-1} , mientras que por su parte la cepa W3110*TrpD9923* PTS⁻ obtuvo una tasa de 0.13 h^{-1} , lo que representa un incremento de 4.3 veces con respecto a la cepa VH32. Aunque ambas cepas tienen deletado el sistema de fosfotransferasa (PTS) y no pueden asimilar rápidamente la glucosa, la tasa de crecimiento de la cepa VH32 comparada con la μ de la cepa W3110*TrpD9923* PTS⁻ es mucho más lenta cuando utiliza dicho carbohidrato como fuente de carbono.

Por otro lado, la cepa W3110*TrpD9923* PTS⁻ contrario a lo que se esperaba, fue la cepa en acumular la mayor cantidad de antranilato, siendo su productividad un 96% mayor que la tasa de la cepa silvestre y un 19% mayor que la de W3110*TrpD9923* PTS⁻ Glc⁺. Mientras que su rendimiento de antranilato a partir de glucosa fue mayor en un 98% comparado con el de esta última.

Por los resultados obtenidos, queda demostrado en este proyecto por primera vez que cepas con fondo PTS⁻Glc⁻ poseen potencial para la síntesis de compuestos aromáticos, sin embargo, no son deseables en cuestiones biotecnológicas ya que una de sus desventajas es el tiempo que tardan en crecer en presencia de glucosa, en el caso de la cepa W3110*TrpD9923* PTS⁻ la producción de antranilato se da alrededor de las 30 horas de un tiempo total de 60 horas.

9.3 Efecto de la introducción del plásmido pJLBaroG^{fbr}tktA en la cepa productora de antranilato W3110trpD9923 PTS⁻Glc⁺.

Una vez generada y caracterizada la cepa W3110trpD9923 PTS⁻Glc⁺, se decidió transformarla con el plásmido obtenido durante este estudio (pJLBaroG^{fbr}tktA) el cual, sobreexpresa conjuntamente los genes *aroG^{fbr}* y *tktA* en la cepa silvestre W3110trpD9923, y los cuales permitieron un aumento significativo del flujo de carbono hacia la síntesis de antranilato, obteniéndose un incremento en el rendimiento ($Y_{ant/glu}$) de 3 veces (mismo que se obtuvo para la cepa que porta ambos genes en distintos plásmidos) comparado con la cepa que únicamente presentaba el gene *aroG^{fbr}* (tabla II).

Así pues, una vez estudiado este plásmido consideramos estudiar su efecto pero en esta ocasión bajo un fondo PTS⁻Glc⁺ (Fig. 26).

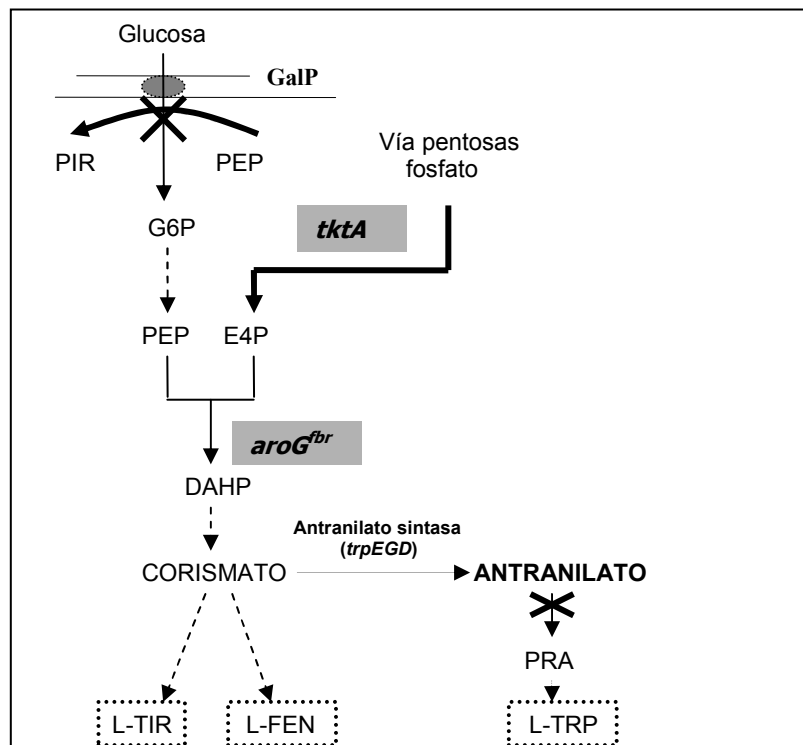


Fig.27. Esquema del metabolismo de la cepa W3110trpD9923 PTS⁻Glc⁺/pJLBaroG^{fbr}tktA.

Lo que se observó fue un aumento en la acumulación de antranilato del 43% con respecto a la cepa con el mismo fondo pero sin el plásmido, confirmando una vez más el papel de los genes *aroG^{fbr}* y *tktA* en la síntesis de dicho compuesto, ya que por un lado el primero de ellos codifica para una DAHP sintasa insensible a inhibición alostérica por lo que el PEP que queda disponible gracias a la eliminación del sistema de fosfotransferasa es rápidamente convertido en el compuesto DAHP. Mientras que en el caso del gene *tktA*, su sobreexpresión permite un incremento en la disponibilidad de E4P, el cual junto con el PEP se condensan para formar concomitantemente DAHP. La

formación de este compuesto permite posteriormente a partir del compuesto corismato el redireccionamiento del flujo de carbono hacia la vía trunca de síntesis de triptofano para formar antranilato (Fig. 27).

Como se observa en el inciso a de la figura 28, la productividad de antranilato en general fue aumentando desde la cepa silvestre hasta la cepa W3110*trpD9923* PTS⁻ Glc⁺/pJLBaro*G^{br}tktA*, llegando ésta a obtener una q_{ant} de aproximadamente 15 mg ant/g peso seco * h. Mientras que en el caso del rendimiento (inciso b) aunque éste no es gradual, se observa de nuevo para la cepa W3110*trpD9923* PTS⁻ Glc⁺/pJLBaro*G^{br}tktA* el mayor $Y_{ant/gluc}$, siendo éste de 42 mg ant/g gluc, que comparado con el rendimiento máximo teórico es del 12%

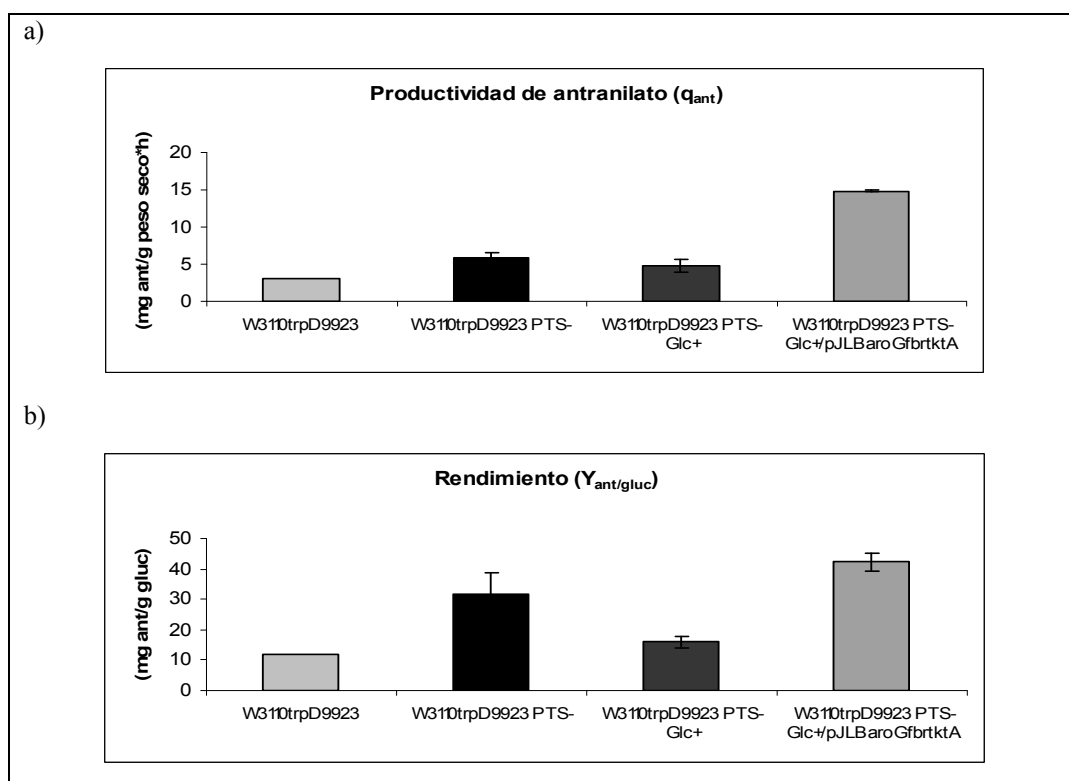


Fig. 28. a) Comparación de las productividades de antranilato y b) los rendimientos a partir de glucosa, entre cepas con fondos genéticos diferentes.

La cepa W3110*trpD9923* PTS⁻ Glc⁺/pJLBaro*G^{br}tktA* comparada incluso con su contraparte PTS⁻, que obtuvo los niveles más altos de acumulación de antranilato, resultó ser entre las diferentes cepas estudiadas (Fig. 28), la mejor productora del compuesto aromático antranilato.

9.4 Generación de cepas de *E. coli* modificadas para la producción de catecol.

La maquinaria enzimática para la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos está presente en *E. coli*. Sin embargo, en una cepa silvestre, bajo condiciones normales de crecimiento, el flujo de carbono dirigido hacia la vía del siquimato es relativamente muy pequeño, el cual corresponde al 1.5% de la tasa de glucosa entrante (Flores *et al.*, 2002). Por lo tanto, para incrementar el potencial de una cepa de *E. coli* hacia la producción de compuestos aromáticos, es necesario llevar a cabo ciertas modificaciones clave sobre el metabolismo de ésta. Es por esto, que se decidió utilizar como microorganismos huéspedes para la sobreexpresión de los genes *antABC*, a las mejores cepas desarrolladas mediante IVM para la producción de antranilato (Silva, 2005). En el trabajo de Silva, las cepas productoras de antranilato fueron denominadas: JM101trp⁻/pCLtrpEG y JM101trp⁻/pCLtrpEG/pJLBaroG^{fbr}. Debido a que la cepa W3110TrpD9923 había sido utilizada previamente por Silva para la generación de catecol, decidimos trabajar con las derivadas JM101trp⁻ con el mismo fin.

Igualmente se decidió utilizar las cepas PB12trp⁻/pCLtrpEG y PB12trp⁻/pCLtrpEG/pJLBaroG^{fbr}. Sin embargo, se observó que estas cepas PTS⁻Glc⁺ tenían problemas para sintetizar antranilato. No obstante, en el presente proyecto se decidió intentar trabajar con ellas debido a la importancia que representa la inactivación de el PTS sobre el incremento en el rendimiento de la síntesis de los compuestos aromáticos (Flores *et al.*, 1996; Gosset *et al.*, 1996; Báez *et al.*, 2004). Sin embargo, contrario a lo esperado y reafirmando de nuevo lo obtenido por los resultados de Silva (2005), las cepas derivadas de PB12trp⁻ transformadas con el plásmido que porta los genes *antABC* sintetizaron poco antranilato y no produjeron catecol. Al parecer, los genes *trpEG*, *aroG^{fbr}* y *antABC* no se pueden expresar en las cepas PB12trp⁻ (PTS⁻Glc⁺) como lo hacen en las JM101trp⁻ (PTS⁺), ya que hay que considerar que la cepa PB12 a diferencia de la cepa parental tiene deletado el operón *ptsHI, crr*.

Por otra parte, las cepas JM101trp⁻/pCLtrpEG/pTrc-ant3 y JM101trp⁻/pCLtrpEG/pJLBaroG^{fbr}/pTrc-ant3 sí lograron producir catecol aunque al mismo tiempo acumularon antranilato. La primera de ellas sólo logró producir 20 mg/L de catecol y llegó a acumular 253 mg/L de antranilato, es decir, un rendimiento del 8% de catecol a partir de antranilato. La segunda cepa por su parte, produjo 6 veces más catecol que la primera y acumuló un 28% más de antranilato, en otras palabras, el $Y_{cat/ant}$ de la cepa JM101trp⁻/pCLtrpEG/pJLBaroG^{fbr}/pTrc-ant3 fue de 37.5%. Como consecuencia, la q_{cat} y el $Y_{cat/gluc}$ de esta cepa aumentaron 8 y 10 veces respectivamente

en comparación con la cepa JM101trp⁻/pCLtrpEG/pTrc-ant3. Al parecer, la sobreexpresión de *aroG^{fb}* en la mejor cepa productora de catecol permite redirigir un mayor flujo de carbono hacia la síntesis de catecol a diferencia de la cepa que no expresa este gene. Sin embargo, aún se siguen acumulando grandes cantidades de antranilato al final del cultivo, lo cual está limitando en gran medida el rendimiento en la síntesis de catecol a partir de glucosa en ambas cepas.

La toxicidad del catecol puede ser una limitante en el $Y_{cat/gluc}$ de estas cepas, ya que se pueden alcanzar concentraciones que tienen un impacto tóxico sobre la actividad enzimática de ciertas proteínas (Schweigert *et al.*, 2001). Así pues, la enzima antranilato dioxigenasa podría ser inhibida por su producto final al llegar éste a concentraciones tóxicas (p.e. 1g/L), de tal manera, que el flujo de antranilato hacia la síntesis de catecol se ve afectado y como resultado se observa una gran acumulación del primer compuesto, repercutiendo de esta manera en el $Y_{cat/gluc}$ de las cepas JM101trp⁻.

A diferencia de la cepa derivada de W3110TrpD9923 utilizada para la producción de catecol (Silva, 2005), que tiene en su cromosoma los genes *trpEGD* de la enzima antranilato sintasa, las cepas derivadas de JM101trp⁻ y PB12trp⁻ portan el plásmido pCLtrpEGD, por lo que la carga metabólica de éste junto con el resto de los plásmidos utilizados, representó otra limitante en el redireccionamiento del flujo de carbono hacia la producción de catecol.

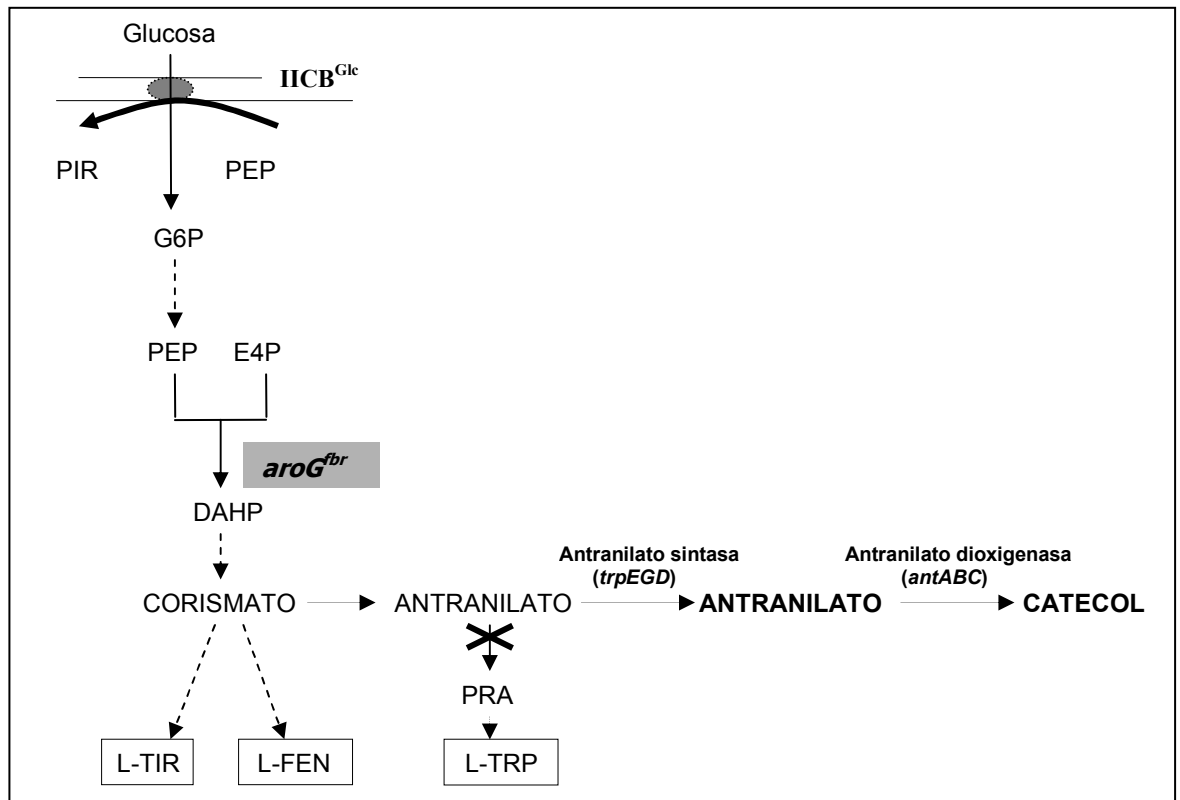


Fig. 29. Esquema del metabolismo de la cepa JM101trp⁻/pCLtrpEG/pJLBaroG^{fb}/pTrc-ant3.

10. Conclusiones

- a) La sobreexpresión simultánea de los genes *aroG^{fbr}* y *tktA* incrementa significativamente el flujo de carbono hacia la síntesis de antranilato, generando un aumento de 3 veces tanto en la productividad como en el rendimiento a partir de glucosa comparado con la cepa que sólo presenta el gene *aroG^{fbr}*.
- b) Como resultado de la inactivación del sistema de fosfotransferencia en la cepa W3110*trpD9923*, la q_{ant} aumentó de 2.97 a 5.82 mg ant/g peso seco x h, mientras que el $Y_{ant/gluc}$ incrementó de 11.95 a 31.53 mg ant/g gluc, en ambos casos con respecto a la cepa silvestre.
- c) La cepa W3110*trpD9923* PTS⁻/pTrc-GalP adquirió el fenotipo glucosa⁺ como consecuencia de la expresión del gene *galP*, permitiendo a la cepa crecer a una tasa específica de 0.25 h⁻¹, la cual corresponde al 52% de aquella para la cepa silvestre W3110*TrpD9923*.
- d) De las cepas productoras de antranilato generadas y caracterizadas en este estudio, la W3110*TrpD9923* PTS⁻ fue la que acumuló la mayor cantidad de antranilato (272.145 mg/L), logrando un aumento de casi 4 veces en comparación con la cepa silvestre W3110*TrpD9923*. Por otra parte, su rendimiento de antranilato a partir de glucosa fue mayor en un 98% comparado con el de la cepa W3110*trpD9923* PTS⁻Glc⁺.
- e) En este trabajo por primera vez queda demostrado que cepas con fondo PTS⁻Glc⁻ poseen potencial para la síntesis de compuestos aromáticos, sin embargo, no resultan deseables para procesos biotecnológicos ya que el transporte de glucosa representa una limitante en dicho proceso. Siendo la q_s de esta cepa igual a 0.19 g gluc/g peso seco x h, lo que representa una disminución del 61% comparado con la q_s de su contraparte PTS⁻Glc⁺, sin embargo con respecto a la cepa VH32 de fenotipo W3110 PTS⁻ (Hernández *et al.*, 2003), el transporte de glucosa de la cepa PTS⁻Glc⁻ aumentó 4.3 veces.
- f) La cepa W3110*trpD9923* PTS⁻Glc⁺/pJLBaro*G^{fbr}tktA*, logró ser la mejor cepa productora de antranilato ya que obtuvo los valores más altos de q_{ant} como de $Y_{ant/gluc}$, siendo estos de 15 mg ant/g peso seco x h y de 42 mg ant/g gluc respectivamente. Éste último representa el 12% del $^{max} Y$.

- g) Con respecto a las cepas generadas para la síntesis de catecol, la cepa JM101trp⁻/pCLtrpEG/pJLBaroG^{fbr}/pTrc-ant3, logró producir la mayor cantidad de dicho compuesto (121 mg/L), sin embargo acumula antranilato en grandes cantidades, por lo que el rendimiento de catecol a partir de antranilato en esta cepa es de 37.5%.
- h) Al parecer, la sobreexpresión del gene *aroG^{fbr}* en la cepa anterior, permitió redirigir un mayor flujo de carbono hacia la síntesis de catecol a diferencia de la cepa JM101trp⁻ que no expresa este gene. Sin embargo, aún se siguen acumulando grandes cantidades de antranilato al final del cultivo, lo cual está limitando en gran medida el rendimiento en la síntesis de catecol a partir de glucosa en ambas cepas.
- i) Por su parte, las cepas derivadas de PB12trp⁻ no lograron producir significativamente ninguno de los dos compuestos aromáticos. Al parecer, el efecto de la expresión de los genes que codifican para las enzimas antranilato sintasa (*trpEG*), y antranilato dioxigenasa (*antABC*) bajo las condiciones empleadas, es mínima en cepas con fondo PTS⁻Glc⁺.

11. Perspectivas

- Sobreexpresar en la cepa W3110*TrpD9923* PTS⁻ Glc⁺ el gene *pgi* que codifica para la enzima glucocinasa, ya que se ha observado que en cuestiones de producción de compuestos aromáticos, este gene incrementa significativamente la productividad y el rendimiento de las cepas correspondientes (Hernández *et al.*, 2003).
- Realizar cultivos de las cepas W3110*TrpD9923* PTS⁻ y W3110*TrpD9923* PTS⁻ Glc⁺ a nivel de fermentador y determinar los parámetros cinéticos de estas cepas bajo dicha condición.
- Caracterizar la cepa W3110*TrpD9923* PTS⁻ /pJLBaro*G^{fbr}tktA* y evaluar su capacidad para producir antranilato.
- Determinar si existen intermediarios en la vía de síntesis de los compuestos aromáticos que estén actuando como posibles puntos de control que limitan el flujo hacia la producción de catecol.

12. Bibliografía

1. Báez JL, Osuna J, Hernández G, Soberón X, Bolívar F, Gosset G. (2004). **Metabolic Engineering and Protein Directed Evolution Increase the Yield of L-Phenylalanine Synthesized From Glucose in *Escherichia Coli***. *Biotechnology and Bioengineering* 87 (4): 516-524.
2. Bongaerts J, Krämer M, Müller U, Raeven L, Wubbolts M. (2001). **Metabolic Engineering for Microbial Production of Aromatic Amino Acids and Derived Compounds**. *Metabolic Engineering* 3: 289-300.
3. Bundy B, Campbell A, Neidle E. (1998). **Similarities between the *antABC*-Encoded Anthranilate Dioxygenase and the *benABC*-Encoded Benzoate Dioxygenase of *Acinetobacter sp.* Strain ADP1**. *Journal of Bacteriology* 180 (17): 4466-4474.
4. De Reuse H, Huttner E, Danchín A. (1984). **Analysis of the *ptsH-ptsI-crr* region in *Escherichia coli* K-12: evidence for the existence of a single transcriptional unit**. *Gene* 32:31-40
5. Dell K, Frost J. (1993). **Identification and Removal of Impediments to Biocatalytic Synthesis of Aromatics from D-Glucose: Rate-Limiting Enzymes in the Common Pathway of Aromatic Amino Acid Biosynthesis**. *Journal of the American Chemical Society* 115 (24): 11581-11589
6. Draths K, Frost J. (1994). **Environmentally Compatible Synthesis of Adipic Acid from D-Glucose**. *Idem* 116 (1): 399-400.
7. Draths K, Frost J. (1995). **Environmentally Compatible Synthesis of Catechol from D-Glucose**. *Idem* 117 (9): 2395-2400.
8. Draths K, Frost J. (1998). **Use of Microbes as Environmentally-Benign Synthetic Catalysts**. En <http://www.epa.gov/greenchemistry/aa98b.html>.
9. Draths K, Pompliano D, Conley D, Frost J, Berry A, Disbrow G, Staversky R, Lievens J. (1992). **Biocatalytic Synthesis of Aromatics from D-Glucose: The Role of Transketolase**. *Journal of the American Chemical Society* 114 (10): 3956-3962.
10. Eby D, Beharry Z, Coulter E, Kurtz D, Neidle E. (2001). **Characterization and Evolution of Anthranilate 1,2-Dioxygenase from *Acinetobacter sp.* Strain ADP1**. *Journal of Bacteriology* 183 (1): 109-118.

11. Erni B. (2002). **Glucose Transport by the Bacterial Phosphotransferase System (PTS). An Interface between Energy- and Signal Transduction.** En *Microbial Transports Systems*. Editado por: G. Winkelmann Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 115-136 pp.
12. Flores N, Xiao J, Berry A, Bolívar F, Valle F. (1996). **Pathway Engineering for the Production of Aromatic Compounds in *Escherichia coli*.** *Nature Biotechnology* 14: 620-623.
13. Flores S, Gosset G, Flores N, de Graaf A, Bolívar F. (2002). **Analysis of Carbon Metabolism in *Escherichia coli* Strains with an Inactive Phosphotransferase System by ^{13}C Labeling and NMR Spectroscopy.** *Metabolic Engineering* 4: 124-137.
14. Frost J, Draths K. (1995). **Biocatalytic Synthesis of Aromatics from D-Glucose: Renewable Microbial Sources of Aromatic Compounds.** *Annual Review of Microbiology* 49: 557-579.
15. Gosset G, Yong-Xiao J, Berry A. (1996). **A Direct Comparison of Approaches for Increasing Carbon Flow to Aromatic Biosynthesis in *Escherichia coli*.** *Journal of Industrial Microbiology* 17:47-52.
16. Gosset G. (2005). **Improvement of *Escherichia coli* Production Strains by Modification of the Phosphoenolpyruvate:sugar Phosphotransferase System.** *Microbial Cell Factories* 4:14.
17. Hernández V, Martínez A, Hernández G, Bolívar F, Valle F, Gosset G. (2003). **Expression of *galP* and *glk* in a *Escherichia coli* PTS Mutant Restores Glucose Transport and Increases Glycolytic Flux to Fermentation Products.** *Biotechnology and Bioengineering* 83 (6): 687-694.
18. Ikeda M. (2006). **Towards Bacterial Strain Overproducing L-Tryptophan and other Aromatics by Metabolic Engineering.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 69: 615-626.
19. Lerner C, Inouye M. (1990). **Low Copy Number Plasmids for Regulated Low-Level Expression of Cloned Genes in *Escherichia coli* with Blue/White Insert Screening Capability.** *Nucleic Acids Research* 18(15): 4631p.
20. Liao JC, Hou SY, Chao YP. (1996). **Pathway Analysis, Engineering and Physiological Considerations for Redirecting Central Metabolism.** *Biotechnology and Bioengineering* 52: 129-140.

21. Li K, Frost J. (1998). **Synthesis of Vanillin from Glucose**. *Journal of the American Chemical Society* 120 (40): 10545-10546.
22. Li W, Xie D, Frost J. (2005). **Benzene-Free Synthesis of Catechol: Interfacing Microbial and Chemical Catalysis**. *Idem* 127 (9): 2874-2882.
23. Lu JL, Liao JC. (1997). **Metabolic Engineering and Control Analysis for Production of Aromatics: Role of Transaldolase**. *Idem* 53: 132-138.
24. Nelson D, Cox M. (2001). **Bioenergética y Metabolismo**. En *Lehninger Principios de Bioquímica*. Editado por: Omega. Barcelona, España. 485-489 pp.
25. Nielsen J. (2001). **Metabolic Engineering**. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55:263-283.
26. Pittard AJ. (1996). **Biosynthesis of the Aromatic Amino Acids**. En *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology*. Editado por: Neidhardt FC. Washington, DC: American Society for Microbiology 1:458-483.
27. Postma PW, Lengeler JW, Jacobson GR. (1996). **Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate Phosphotransferase Systems**. En *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology. Idem* 2: 1149-1174.
28. Quintero R. (1981). **Cinética de Fermentaciones**. En *Ingeniería Bioquímica: Teoría y Aplicaciones*. Editado por: Alhambra Mexicana, México. 39-55 pp.
29. Schaechter M, Neidhardt F. (1996). **Introduction**. En *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology*. Editado por: Neidhardt FC. Washington, DC: American Society for Microbiology 1:1-2.
30. Schweigert N, Zehnder A, Eggen R. (2001). **Chemical Properties of Catechols and their Molecular Modes of Toxic Action in Cells, from Microorganisms to Mammals**. *Environmental Microbiology* 3 (2): 81-91.
31. Seo SY, Sharma V, Sharma N. (2002). **Mushroom Tyrosinase: Recent Reports**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. A-Q pp.
32. Shivprasad S, Page W. (1989). **Catechol Formation and Melanization by Na⁺ - Dependent *Azotobacter chroococcum*: a Protective Mechanism for Aeroadaptation?** *Applied and Environmental Microbiology* 55(7): 1811-1817.
33. Sikkema J, Bont J, Poolman B. (1995). **Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons**. *Microbiological Reviews* 59 (2): 201-222.
34. Silva P. (2005). **Desarrollo y Caracterización de Cepas de *Escherichia coli* Diseñadas para la Producción de Antranilato y Catecol**. Tesis de maestría. IBT-UNAM. 1-58 pp.

35. Sprenger G, Siewe R, Sahm H, Karutz M, Sonke T. (1998). **Microbial Preparation of Substances from Aromatic Metabolism/II**. Patente W09, 818, 937.
36. Treviño LG. **Expresión de los genes antABC (Antranilato dioxigenasa) de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 en *E. coli***. Comunicación personal.
37. Yanofsky C, Horn V, Bonner M, Stasiowski S. (1971). **Polarity and Enzyme Functions in Mutants of the First Three Genes of the Tryptophan Operon of *Escherichia coli***. Genetics 69: 409-433.

13. Apéndice

13.1 Curvas de Calibración

Para la determinación de metabolitos excretados por HPLC se inyectaron estándares de antranilato (tiempo de elusión: 4.85 ± 0.04 minutos) y catecol (tiempo de elusión: 3.25 ± 0.06 minutos) de los cuales se generaron las curvas de calibración respectivas (Fig. 30 a-b).

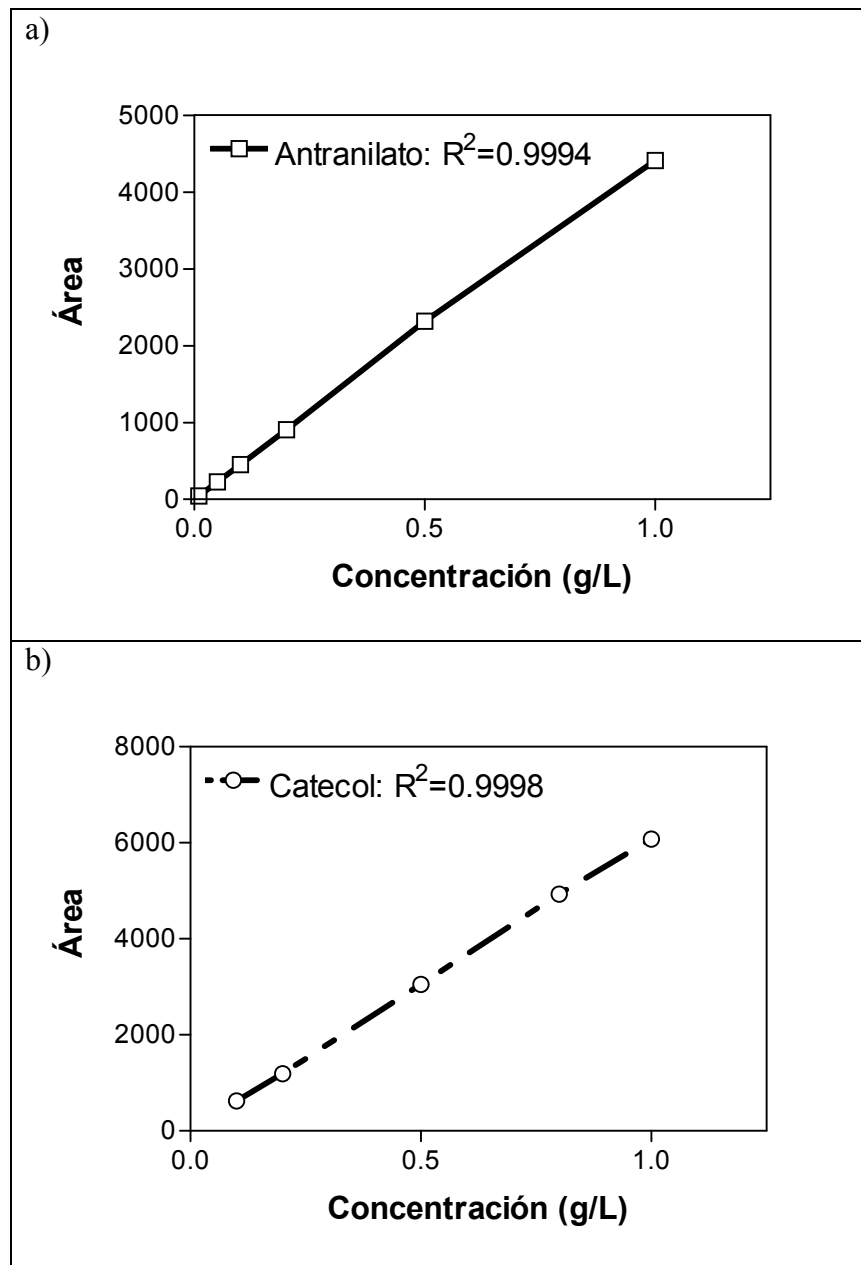


Fig. 30. a) Curva de calibración de antranilato y b) catecol por el detector de arreglo de UV a 330 y 280 nm respectivamente..

13.2 Determinación de parámetros cinéticos

13.2.1 Velocidad de crecimiento específica (μ)

La determinación de las velocidades de crecimiento, se realizó a través del software GraphPad Prism 3.0. graficando el logaritmo de la densidad óptica (DO_{600}) de los cultivos contra el tiempo. La velocidad de crecimiento se obtiene a partir de los datos correspondientes a la fase de crecimiento exponencial mediante el cálculo de una regresión no lineal utilizando la ecuación de crecimiento exponencial ($X=X_0\exp^{\mu t}$) por el método de mínimos cuadrados, obteniéndose en todos los casos analizados correlaciones mayores a 0.99.

13.2.2 Cálculo de la biomasa (X)

La biomasa se calculó como la densidad óptica a 600nm utilizando un espectofotómetro (Beckman DU-70), convertida a peso seco mediante la relación $1 DO_{600}=0.45$ g/L de peso seco de células (Báez *et al.*, 2004).

13.2.3 Rendimientos ($Y_{x/s}$) ($Y_{p/x}$) y ($Y_{p/s}$)

La determinación de estos rendimientos durante la fase de crecimiento estacionaria, se calculó de la siguiente manera:

Fórmula	Unidades	
$Y_{x/s} = \frac{\text{g de } X_{(\text{promedio})}}{\text{g de } \Delta S}$	$Y_{x/s} [=] \frac{\text{g célula}}{\text{g glucosa}}$	X= biomasa S= azúcar consumida p= producto Δ = diferencia
$Y_{p/x} = \frac{\text{mg } \Delta p}{\text{g } X_{(\text{promedio})}}$	$Y_{p/x} [=] \frac{\text{mg producto}}{\text{g célula} \cdot \text{h}}$	
$Y_{p/s} = \frac{\text{mg } \Delta p}{\text{g } \Delta S}$	$Y_{p/s} [=] \frac{\text{mg producto}}{\text{g glucosa}}$	

13.2.4 Rendimiento máximo teórico

Este rendimiento se calculó de la siguiente manera:

$${}^{max} Y_{\text{esperado}} = (Y_{p/s} / {}^{max} Y_{\text{observado}}) * 100$$

13.2.5 Velocidad específica de consumo de azúcar (q_s) y de producción (q_p)

La determinación de q_s y q_p durante la fase estacionario, se realizó a través del siguiente cálculo:

Fórmula	Unidades	
$q_s = (1/ Y_{x/s})(1/\Delta t)$	$q_s [=] \frac{\text{g glucosa}}{\text{g célula} \cdot \text{h}}$	t= tiempo
$q_p = (Y_{p/x})(1/\Delta t)$	$q_p [=] \frac{\text{mg producto}}{\text{g célula} \cdot \text{h}}$	