



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

INGENIERÍA METABÓLICA EN ESCHERICHIA COLI PARA LA  
CONVERSIÓN DE GLUCOSA EN ÁCIDO CUMÁRICO MEDIANTE  
LA EXPRESIÓN DEL GENE PAL DE RHODOTORULA GLUTINIS  
QUE CODIFICA PARA LA ENZIMA TIROSINA AMONIO LIASA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGA**

P R E S E N T A :

**SONIA ELIZABETH HERNÁNDEZ NAVIA**

TUTOR  
DR.GUILLERMO GOSSET LAGARDA

2015

Ciudad Universitaria, D. F.



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

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 apoyo económico del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) a través del proyecto IN202611.



*Comienza por lo que debes hacer,  
sigue con lo que puedes hacer y  
cuando te des cuenta estarás  
haciendo lo imposible.*



## **AGRADECIMIENTOS**

A mi madre por su cariño y ser ejemplo de fortaleza y determinación; gracias por darme las herramientas para valerme por mi misma y fortalecer mis alas.

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

Al Dr. Guillermo Gosset por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación; su asesoría, paciencia y apoyo durante todo el desarrollo de este estudio y en los nuevos proyectos.

A los miembros del jurado por participación, sugerencias y apreciables comentarios para la corrección de esta tesis:

- Dr. Guillermo Gosset Lagarda
- Dr. Adelfo Escalante Lozada
- Dr. Saúl Cano Colín
- Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky
- Dr. José Luis Puente García

A los técnicos y académicos del Laboratorio, Q.I. Luz María Martínez, Mtra. Georgina Hernández-Chávez, Mtro. Ramón de Anda y Dr. Adelfo Escalante por su asesoría técnica y logística. A la Sra. Mercedes Enzaldo y a la Sra. Aurelia Gonzales por su apoyo técnico.

A mis compañeros de laboratorio por toda su ayuda, enseñanzas, guía, paciencia, y amistad; ustedes son mi inspiración. Particularmente a Andrea, Grecia, Hanna, Miguel, Cesar y Rene.

A Miguel Atl Silva Magaña por enseñarme que la vida se puede disfrutar en cualquier parte del mundo.

A mi familia, porque pese a que no me entiendan siempre han estado a mi lado apoyándome y llenándome de alegría.

A mis amigas y amigos al otro lado del océano, por ser fuerza, ayuda, alegría, esperanza, consuelo y compañía en todo momento y sobre todo por su amistad.

A Ady, Dianita, Isbo, Mafer, Mario y Neko, por todas las aventuras, charlas, enredos y desenredos vividos en estos años; amigos toda una vida.

# Índice

---

<b>1. Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Introducción</b> .....	<b>2</b>
<b>3. Antecedentes</b> .....	<b>4</b>
3.1 Producción de compuestos aromáticos en bacterias.....	4
3.2 Estrategias de generación y mejora de cepas de producción.....	4
3.3 Expresión de genes heterólogos para la producción de aromáticos .....	5
3.3.1 Plásmidos para expresión de genes heterólogos.....	5
3.3.1.1 <i>El plásmido y la carga metabólica</i> .....	5
3.3.2 Sistemas de integración cromosomal .....	6
3.3.2.1 Recombinación sitio-específica.....	6
3.3.2.2 Inactivación cromosomal por transducción con el bacteriófago P1 vir.....	7
3.3.2.3 Inactivación cromosomal por productos de PCR .....	8
3.3.2.4 Vector de expresión pLoxGentrc .....	9
3.3.2.5 Sitios de inserción cromosómica.....	10
3.4 Producción de compuestos derivados de la ruta biosintética de L-fenilalanina y L-tirosina. .....	11
3.4.1 Biosíntesis de compuestos aromáticos: La ruta metabólica del ácido shikimico .....	11
3.5 Fenilalanina amonio liasa: entrada a la ruta de los fenilpropanoides .....	12
3.5.1 Fenilalanina amonio liasa de <i>Rhodotorula glutinis</i> .....	14
<b>4. Justificación</b> .....	<b>14</b>
<b>5. Hipótesis</b> .....	<b>15</b>
<b>6. Objetivos</b> .....	<b>15</b>
6.1 Objetivo general .....	15
6.2 Objetivos particulares.....	15
<b>7. Metodología</b> .....	<b>15</b>
7.1 Cepas y plásmidos.....	15
7.2 Técnicas genéticas y de DNA recombinante.....	18
7.2.1 Transformación bacteriana.....	18
7.2.2 Purificación del DNA.....	18
7.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	18
7.2.4 Generación de productos de PCR e integración cromosomal .....	19
7.2.5 Escisión del marcador de resistencia <i>aacCI</i> .....	20

7.2.6	Transducción generalizada con el fago P1 vir. en para la interrupción del gen <i>pheA</i> en <i>E. coli</i> .....	20
7.2.6.1	Comprobación de la inactivación de <i>pheA</i> .....	21
7.3	Medios de cultivo y condiciones de crecimiento .....	21
7.3.1	Medios de cultivo .....	21
7.3.2	Condiciones de los cultivos de crecimiento .....	21
7.3.3	Determinación del crecimiento bacteriano y la síntesis de ácido cumárico y cinámico.....	22
<b>8.</b>	<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>23</b>
8.1	Construcción del plásmido pLoxGentrcPAL <sub>Rg</sub> .....	23
8.2	Integración del gen heterólogo <i>pal</i> en los genes cromosomales <i>lacZ</i> , <i>xylAB</i> y <i>malEFG</i> de <i>E. coli</i> .....	24
8.2.1	Integración de <i>pal</i> en el gen cromosomal <i>lacZ</i> de la cepa W3110 de <i>E. coli</i> (monocopia) .....	24
8.2.2	Integración de <i>pal</i> en los loci <i>xylAB</i> y <i>malEFG</i> de la cepa W3110/ <i>lacZ</i> ::P <sub>trc</sub> Pal <sub>Rg</sub> , <i>loxP</i> de <i>E. coli</i> (bicopia).....	25
8.2.3	Integración de <i>pal</i> en el locus <i>malEFG</i> de la cepa W3110/ <i>LacZ</i> ::Pal <sub>Rg</sub> , <i>LacZ</i> :: <i>XylAB</i> , <i>loxP</i> de <i>E.coli</i> (tricopia).....	27
8.3	Sustitución del gen <i>pheA</i> por el casete de resistencia a kanamicina en las cepas con W3110/ <i>lacZ</i> ::P <sub>trc</sub> Pal <sub>Rg</sub> , <i>loxP</i> , W3110/ <i>LacZ</i> ::Pal <sub>Rg</sub> , <i>LacZ</i> :: <i>malEFG</i> , <i>loxP</i> , W3110/ <i>LacZ</i> ::Pal <sub>Rg</sub> , <i>LacZ</i> :: <i>xylAB</i> , <i>loxP</i> y W3110/ <i>LacZ</i> ::Pal <sub>Rg</sub> , <i>LacZ</i> :: <i>XylAB</i> , <i>LacZ</i> :: <i>malEFG</i> , <i>loxP</i> .....	29
8.4	Efecto de la expresión monocopia, dicopia y tricopia del gen heterólogo <i>pal</i> en el cromosoma de la cepa silvestre W3110 de <i>E. coli</i> sobre su capacidad de sintetizar ácido cumárico y cinámico .....	30
<b>9.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>37</b>
<b>10.</b>	<b>Perspectivas .....</b>	<b>38</b>
<b>11.</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>38</b>

## Índice de figuras

---

Figura 1. Secuencia nucleotídica de un sitio <i>loxP</i> .....	7
Figura 2. Recomendación entre dos sitios <i>loxP</i> orientados en la misma dirección.....	7
Figura 3. Esquema de la transducción generalizada con el bacteriófago P1 vir. ....	8
Figura 4. Estrategia de interrupción de genes cromosomales. ....	9
Figura 5. Estrategia para llevar a cabo la inactivación y expresión de genes en el cromosoma de <i>E. coli</i> . ....	10
Figura 6. Ruta de biosíntesis de aromáticos y síntesis de ácido <i>p</i> -cinámico e hidroxycinámico. ....	13
Figura 7. Digestiones de los plásmidos pLoxGentrc y pTrcpal. ....	23
Figura 8. Construcción del plásmido templado pLoxGentrcPAL <sub>Rg</sub> . ....	23
Figura 9. Esquema de la estrategia para llevar a cabo la inactivación y expresión de genes en el cromosoma de <i>E. coli</i> .....	25
Figura 10. Esquema de la estrategia para llevar a cabo la inactivación de los genes <i>xylAB</i> y expresión del gen <i>pal</i> en el cromosoma de <i>E. coli</i> . ....	27
Figura 11. Esquema de la estrategia para llevar a cabo la inactivación de los genes <i>xylAB</i> y expresión del gen <i>pal</i> en el cromosoma de <i>E. coli</i> .....	29
Figura 12. Caracterización del a) crecimiento, b) producción de pHCA, c) producción de CA y d) producción de pHCA+CA en las cepas que expresan el gen heterólogo <i>pal</i> <sub>Rg</sub> .....	32



## Índice de tablas

---

Tabla A. Cepas y plásmidos utilizados y construidos. ....	16
Tabla B. Volúmenes utilizados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	18
Tabla C. Condiciones utilizadas en los ciclos de PCR. Para la integración y comprobación de integración del gen <i>pal</i> se utilizaron las mismas condiciones. ....	18
Tabla D. Secuencia de los diferentes oligonucleótidos utilizados en este estudio. ....	19
Tabla E. Comparación de parámetros cinéticos entre las diferentes cepas generadas en este estudio.. .....	34
Tabla F. Tabla de diferencias significativas prueba de Bonferroni tomando la cepa W3110/pLoxGentrcPALRg. ....	36

## 1. Resumen

---

Con la tecnología del DNA recombinante se han aislado, caracterizado y expresado un gran número de genes en diferentes células hospedero. Generalmente, los plásmidos han sido las herramientas moleculares utilizadas por excelencia para expresar genes heterólogos, de manera extracromosomal en microorganismos como *Escherichia coli*. No obstante, se han desarrollado nuevas metodologías que permiten integrar y modificar genes a nivel cromosomal; estos sistemas conocidos como de integración y delección, permiten de manera sencilla y rápida la inserción de genes en un determinado locus del cromosoma bacteriano (Le Borgne *et al.*, 1998; Datsenko & Wanner, 2000; Kolisnychenko *et al.*, 2002; Fukiya *et al.*, 2004). Sin embargo, si el interés es obtener una gran cantidad de una proteína en particular, entonces resultaría ideal el uso de vectores de expresión en multicopia. Por esta razón, es adecuado realizar la caracterización molecular y fisiológica de cepas mutantes con varias copias de un mismo gen al cromosoma bacteriano para tener un mejor entendimiento de cómo reacciona el metabolismo bacteriano ante inserciones multicopia. En el presente trabajo se utilizó al gen heterólogo *pal* de *Rhodotorula glutinis*, el cual codifica para la enzima fenilalanina amonio liasa/tirosina amonio liasa involucrada en la síntesis de ácido cinámico (CA) y *p*-hidroxicinámico (pHCA). Se estudió el efecto de expresar dicho gen en el crecimiento del hospedero y la producción de los compuestos previamente mencionados, comparando con las cepas que expresan *pal* en plásmido (multicopia), así como una vez integrado en el cromosoma, en monocopia, dicopia y tricopia en los genes cromosomales *lacZ*, *xylAB* y *malEFG* de la cepa silvestre W3110 de *E. coli*. Asimismo, se estudió el efecto de la inactivación del gen *pheA* sobre el flujo de carbono hacia la producción de tirosina para ser finalmente transformada en ácido cumárico. Tras analizar la cantidad de compuesto acumulado de manera individual, las cepas W3110/ *lacZ::pal<sub>Rg</sub>*, *malEFG::pal<sub>Rg</sub>*, *loxP-aacCI-loxP*, W3110/ *lacZ::pal<sub>Rg</sub>*, *xylAB::pal<sub>Rg</sub>*, *loxP-aacCI-loxP* y W3110/ *lacZ::pal<sub>Rg</sub>*, *xylAB::pal<sub>Rg</sub>*, *malEFG::pal<sub>Rg</sub>*, *loxP-aacCI-loxP* mostraron un valor de pHCA acumulado similar a la cepa W3110/pLoxGentrcpal<sub>Rg</sub>, lo que sugiere que basta con dos copias del mismo gen integradas al cromosoma para obtener una cantidad similar de pHCA a la obtenida con el plásmido pLoxGentrcpal. Sin embargo, al ser usada la cepa W3110/ *lacZ::pal<sub>Rg</sub>*, *xylAB::pal<sub>Rg</sub>*, *loxP-aacCI-loxP* como cepa de referencia de pHCA de máximo acumulado, la única cepa con valores similares es la W3110/pLoxGentrcpal, lo que indica que la doble integración cromosomal en los loci *lacZ* y *xylAB* es la mejor estrategia para incrementar la producción de ácido cumárico bajo las condiciones empleadas en este estudio.

## 2. Introducción

---

A través del desarrollo de tecnologías como la del DNA recombinante ha sido posible la generación de microorganismos con la capacidad de sobreproducir compuestos de interés industrial (Nielsen, 2001). La bacteria *Escherichia coli* se ha utilizado en procesos biotecnológicos, como cepa hospedero para la expresión de genes propios, y heterólogos con el objetivo de producir proteínas y metabolitos específicos. Usualmente, es necesario un alto nivel de expresión de los genes de interés para producir grandes cantidades de la proteína requerida, para lo cual se hace uso de plásmidos en los que se introduce el DNA foráneo. Una vez expresado el gen de interés en la célula, la proteína resultante provee al hospedero de nuevas capacidades metabólicas, como son la capacidad de producir nuevos metabolitos o bien sobreproducir compuestos nativos.

Los plásmidos usualmente son moléculas circulares de DNA, que se replican de manera autónoma al DNA cromosomal bacteriano. Generalmente, se encuentran en múltiples copias dentro de la célula hospedero y a pesar de su versatilidad y utilidad como vectores de clonación, la presencia de múltiples copias de un plásmido y la expresión del DNA que contiene, representan una “carga metabólica” al organismo hospedero, que frecuentemente ocasiona cambios adversos en su fisiología. La carga metabólica se refiere a los recursos de la bacteria, ya sea en la forma de energía o de moléculas precursoras, que se requieren para mantener y expresar el DNA de interés en la célula. Uno de los cambios más comúnmente observados por la carga metabólica es una disminución en la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) de la bacteria (Glick, 1995). Si el interés es obtener una gran cantidad de una proteína en particular, entonces resulta ideal el uso de vectores de expresión en multicopia, sin dejar de lado otros aspectos a considerar sobre los plásmidos como: la inestabilidad segregacional que se refiere a la pérdida del plásmido, lo cual puede evitarse hasta cierto grado si se emplea algún tipo de presión selectiva como sería la adición de antibióticos cuya resistencia se encuentre codificada por un gen presente en el plásmido. Sin embargo, en la mayoría de los casos no es deseable el empleo de antibióticos, ya que es necesario removerlos del medio de cultivo en procesos industriales, representando un gasto extra.

Para *E. coli*, se han desarrollado diversos métodos para la modificación del DNA cromosomal bacteriano basados en la recombinación mediada por el sistema de recombinasa  $\lambda$ -Red. Existen métodos actuales de reemplazo alélico que permiten, a través del uso de productos de PCR, insertar genes en cualquier locus del cromosoma bacteriano (Datsenko & Wanner, 2000; Kolisnychenko *et al.*, 2002; Fukiya *et al.*, 2004). En estos sistemas, la integración génica ya no está restringida a un determinado sitio en el cromosoma. Además de esta delección específica de genes, estos sistemas de recombinasas han sido utilizados, entre otros, para la integración de genes heterólogos (“knockin”) en *E. coli*. (Sabido A. L., 2012). Sin embargo, estas metodologías han sido utilizadas únicamente

para la integración monocopia de un gen; si el interés es obtener una gran cantidad de una proteína en particular, entonces resultaría ideal el uso de vectores de expresión en multicopia pese a los problemas que estos conllevan. Por esta razón, es adecuado estudiar el efecto de introducir varias copias de un mismo gen al cromosoma bacteriano con el fin de contar con cepas estables, robustas, libres de marcadores, capaces de generar una cantidad elevada de una proteína y/o compuesto de interés.

En nuestro laboratorio se han construido un conjunto de vectores, muchos de ellos derivados de pBR322, que permiten introducir en la bacteria el DNA clonado y estabilizarlo de forma extracromosómica (Bolívar *et al.*, 1977). Entre estos derivados, destaca el plásmido pLoxGentrc que además permite integrar material genético en un locus cromosomal de *E. coli*, reduciendo de esta manera el problema de la carga metabólica en la célula (debida al mantenimiento del número de copias del plásmido y a la expresión del gen de interés), así como la inestabilidad segregacional (Le Borgne *et al.*, 1998 y 2001), además de poseer el casete de resistencia a gentamicina flanqueado por dos sitios *Loxp* con el objetivo de eliminar los genes de resistencia a antibióticos del cromosoma bacteriano, lo cual permite incrementar el repertorio de marcadores de selección disponibles para su uso en *E. coli* y otras bacterias (Palmeros *et al.*, 2000). De esta manera se puede lograr la permanencia estable y libre de marcadores de genes recombinantes mediante la integración de los mismos al replicón del cromosoma de un hospedero.

Tomando en cuenta lo anterior, en este proyecto se utilizó un método para la integración y la expresión de genes en el cromosoma de *E. coli*, basado en el uso de un plásmido de expresión como templado para la generación de un producto de PCR (Sabido A. L., 2012). Se utilizó al gen heterólogo *pal* de *Rhodotorula glutinis*, el cual codifica para una enzima fenilalanina amonio liasa/tirosina amonio liasa involucrada en la síntesis de ácido cumárico y cinámico. Se estudió el efecto de expresar dicho gen en el crecimiento y la producción de los compuestos previamente mencionados, comparativamente entre las cepas que expresan *pal* en plásmido (multicopia), así como una vez integrado en el cromosoma, en monocopia, dicopia y tricopia y la inactivación del gen *pheA* para aumentar el flujo de carbono hacia la producción de tirosina para ser finalmente transformada en pHCA.

### **3. Antecedentes**

---

Ante la creciente demanda de compuestos de interés comercial, los avances en la ingeniería genética han permitido desarrollar cepas modificadas genéticamente con características favorables para la síntesis de dichos productos. La estrategia más deseable para la generación de cepas de producción estables, consiste en lograr la expresión cromosomal de los genes de interés. En este trabajo se buscó ampliar el conocimiento respecto a los efectos en la producción de compuestos no nativos de la integración de un gen particular en este caso en monocopia, dicopia y tricopia.

#### **3.1 Producción de compuestos aromáticos en bacterias**

Los compuestos aromáticos son un grupo diverso de químicos usados como solventes orgánicos, tintes y precursores para la síntesis de numerosos productos empleados en alimentos, farmacia e industrias químicas. Actualmente la mayor parte de los compuestos aromáticos son manufacturados empleando petróleo como materia prima, sin embargo su naturaleza no renovable del petróleo así como la contaminación generada de los procesos de manufactura de los compuestos aromáticos han llevado a buscar el desarrollo de métodos de producción alternos y sustentables (Gosset , 2009).

Existe una gran tradición del uso de bacterias como medio de producción de diferentes químicos mediante procesos fermentativos industriales, por lo que la mayoría de los acercamientos a la generación de cepas microbianas para la producción de compuestos aromáticos se han realizado en especies bacterianas(Gosset, 2009).

#### **3.2 Estrategias de generación y mejora de cepas de producción**

Una bacteria debe ser modificada genéticamente para que pueda secretar un nivel elevado de un compuesto aromático en particular. Las estrategias clásicas para la generación de cepas de producción estaban basadas en mutagénesis aleatoria y selección. Mediante este método se consiguieron cepas para la producción de aminoácidos como la L-tirosina (L-Tir), L-fenilalanina (L-Fen) y L-triptófano (L-Trp), sin embargo estas cepas han mostrado parámetros de producción poco óptimos (Bongaerts, *et al.* 2001).

Recientemente el creciente conocimiento en bioquímica y en mecanismos de regulación de enzimas y genes de las rutas metabólicas relacionadas con las rutas involucradas en la biosíntesis de compuestos aromáticos, ha permitido la generación racional de cepas. Esto ha dado lugar a un gran progreso en la construcción de cepas de producción, al aplicar estrategias basadas en la modificación directa de enzimas, transporte y actividades regulatorias (ingeniería metabólica). El objetivo de estas modificaciones es redirigir el flujo de carbono del metabolismo central hacia la ruta biosintética deseada, manteniendo suficiente suministro de energía y reduciendo el poder para

la biosíntesis y el crecimiento celular. Además, la expresión de genes heterólogos (provenientes de diferentes especies) permite la síntesis de compuestos no nativos de la bacteria (Ikeda, 2006).

Las cepas bacterianas utilizadas para la producción de compuestos aromáticos a partir de fuentes de carbono simples como materia prima han sido generadas aplicando ingeniería metabólica y diversas estrategias para modificar el metabolismo central, las vías biosintéticas de aromáticos, transporte y funciones regulatorias. Estas estrategias se complementan con la expresión de genes heterólogos e ingeniería de proteínas.

### **3.3 Expresión de genes heterólogos para la producción de aromáticos**

#### **3.3.1 Plásmidos para expresión de genes heterólogos**

Los plásmidos usualmente son moléculas circulares de DNA, que se replican de manera autónoma al DNA cromosomal bacteriano. Los plásmidos se utilizan de manera habitual en los laboratorios de biología molecular desde que se descubrió que pueden ser una buena herramienta de manipulación, transferencia y modificación de la información genética.

##### ***3.3.1.1 El plásmido y la carga metabólica***

Los plásmidos generalmente se encuentran en múltiples copias dentro de la célula hospedero y a pesar de su versatilidad y utilidad como vectores de clonación, es sabido que la presencia de múltiples copias de un plásmido y la expresión del DNA que contiene, representan una “carga metabólica” al organismo hospedero, que frecuentemente ocasiona cambios adversos en su metabolismo. Las células que llevan un plásmido requieren de energía y de precursores adicionales para el mantenimiento, replicación y en algunos casos, la expresión del gen de interés (Roskov *et al.*, 2004; Ow *et al.*, 2006). Esta demanda se conoce como carga metabólica. Un plásmido representa un problema energético para el metabolismo de la bacteria cuando la función es independiente al microorganismo, esto es, cuando el plásmido no representa ningún beneficio para la bacteria.

Para un hospedero bacteriano, un plásmido representa una carga metabólica que conduce a la reducción en la capacidad de crecimiento y de la viabilidad celular. Esto se puede traducir en la pérdida del plásmido y por lo tanto en la reducción de la productividad (Kumar *et al.*, 1991). Por esta razón, se necesita de una presión de selección para que las bacterias que pierden el plásmido, no sean capaces de crecer más rápidamente que las que aún lo poseen, y de esta manera, no se desplace el cultivo hacia las bacterias que no portan al plásmido o no puedan sintetizar el producto de interés.

El uso de un antibiótico como presión de selección en medios de cultivo de *E. coli* con plásmidos conteniendo genes de resistencia a los mismos es muy común. Lo que se espera, es que todas las células lleven el plásmido de interés. Aquellas células que lo han perdido, deberían morir, pues no serán capaces de producir a la enzima involucrada con la resistencia al antibiótico.

### **3.3.2 Sistemas de integración cromosomal**

La integración de genes recombinantes en el replicón cromosomal ha permitido la permanencia estable y libre de marcadores de selección de dichos genes en un hospedero bacteriano, además de disminuir la carga metabólica al no ser necesario el uso de plásmidos para la expresión de los mismos. En *E. coli*, se han desarrollado diversos métodos para la modificación de DNA cromosomal bacteriano, basados en la recombinación mediada por el sistema de recombinasa  $\lambda$ -Red o el *recET*. Estas metodologías han sido utilizadas principalmente para la interrupción de genes cromosomales (“knockout”), para el reemplazo de promotores cromosomales y para la integración de genes heterólogos (“knockin”).

En nuestro laboratorio, se ha diseñado un sistema derivado del plásmido pBR322, que además de permitir clonar DNA foráneo en la bacteria *E. coli* (Bolívar *et al.*, 1977), posibilita la integración de material genético en su cromosoma.

#### **3.3.2.1 Recombinación sitio-específica**

Este tipo de recombinación ocurre en sitios muy específicos entre las moléculas de DNA que tienen una región pequeña de secuencia idéntica. En este tipo de recombinación participan proteínas específicas para cada sistema llamadas recombinasas sitio-específicas, las cuales llevan a cabo el intercambio genético y la unión de las hebras por una ruptura precisa en los sitios blanco. Como resultado se genera un cointegrado, el cual está flanqueado por dos sitios nuevos de inserción, que son reconocidos por la misma enzima para llevar a cabo la escisión del DNA. Sólo algunos sistemas de recombinación sitio-específica se utilizan extensamente en la modificación del genoma de diversos organismos (incluyendo bacterias, plantas, moscas y mamíferos), la familia  $\lambda$  integrasa está formada por dos de ellos: el sistema *loxP*/Cre del fago P1 y el sistema *frt*/Flp de *Saccharomyces cerevisiae*.

##### **3.3.2.1.1 Sistema *loxP*/Cre del fago P1**

Durante el ciclo de replicación del fago P1, la recombinasa Cre es la responsable de resolver los dímeros que se forman durante la duplicación de su genoma; además de esta enzima, el sistema está conformado por dos sitios de recombinación llamados *loxP*, cada uno de los cuales consiste de una secuencia de 34 pares de bases, compuesta por dos secuencias invertidas repetidas de 13 pares de bases separadas por una región de 8 nucleótidos (Figura 1).

ATAACTTCGTATA GCATACAT TATACGAAGTTAT  
TATTGAAGCATAT CGTATGTA ATATGCTTCAATA



Figura 1. Secuencia nucleotídica de un sitio *loxP*. Se señala la región de entrecruzamiento (• • •).

Después de que un dímero de Cre se une a un sitio *loxP*, otro dímero localiza y se une a un segundo sitio *loxP*, la recombinasa corta el DNA en la región espaciadora y después de llevar a cabo el intercambio de las hebras, vuelve a unir el DNA. La recombinación entre dos sitios *loxP* dispuestos en la misma dirección, provoca que el fragmento de DNA entre ellos se escinda como molécula circular (Figura 2); los productos de esta recombinación llevan un sitio *loxP* completo cada uno. En cambio, el evento de recombinación entre dos sitios *loxP* dispuestos en orientación contraria provoca que el fragmento de DNA entre ellos se invierta (Sternberg y Hamilton, 1981). Este mecanismo de recombinación sitio-específica, permite eliminar marcadores de resistencia del cromosoma, mientras estén flanqueados por sitios *loxP* (Palmeros *et al.*, 2000).

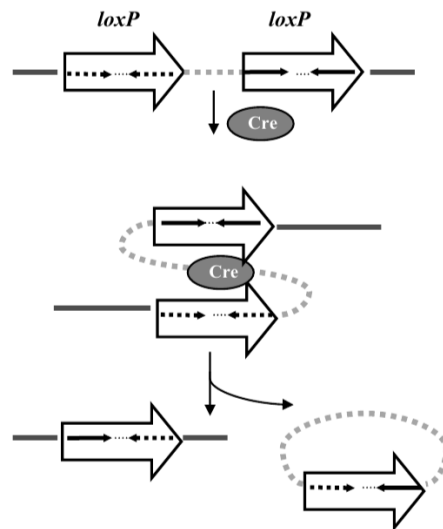


Figura 2. Recombinación entre dos sitios *loxP* orientados en la misma dirección.

### 3.3.2.2 Inactivación cromosomal por transducción con el bacteriófago P1 vir

La transducción es el método de recombinación genética por el cual se introduce DNA exógeno en una célula por medio de un vector viral. Esta técnica parte de la idea de contar previamente con una cepa que tenga la mutación deseada y de este modo pasarla a otra cepa mediante el fago P1 vir. El bacteriófago P1 HT int4 (Schmiege, 1972) se utilizó en este trabajo para introducir mutaciones en las cepas por recombinación homóloga. Este fago P1 presenta dos mutaciones, HT e int, que le



confiere respectivamente una elevada frecuencia de transducción y una deficiencia en la integración del DNA del bacteriófago en el cromosoma de la cepa receptora, evitando así la lisogenia. Previo a la transducción, se debe contar tanto con un lisado de fagos P1-, como de una cepa donadora y una cepa receptora de la inactivación (cepa a la que se le introducirá la mutación). La técnica se puede dividir en dos etapas:

1. Obtención de lisado viral. El fago P1- con ayuda de  $\text{CaCl}_2$  (para la adsorción de fago), infecta a la cepa donadora (se llama así, porque en vez de contener el gen correspondiente al locus, se encuentra un casete de resistencia, flanqueado por regiones homólogas al gen nativo), quedando después de la infección, una cepa que contiene tanto fragmentos de DNA viral como fragmentos de DNA bacteriano. Posterior a esto, se empaqueta el material genético dentro de la cápside del virus y entonces, se degrada a la membrana de la célula, obteniendo un lisado que entre otros fragmentos, contiene el fragmento deseado (sólo unos pocos fagos pueden transferir la resistencia).
2. Transducción del gen de resistencia al gen blanco. Una vez que se obtiene el lisado, se transduce a la cepa receptora, resultando en una recombinación homóloga ya que los extremos del gen donado son homólogos con el gen que se desea inactivar. Posteriormente, se seleccionan las colonias de interés por el marcador de resistencia, que en todos los casos fue kanamicina.

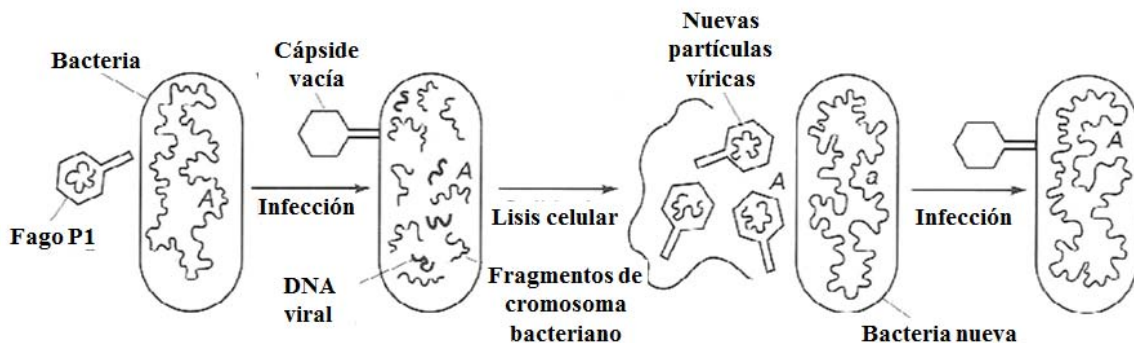
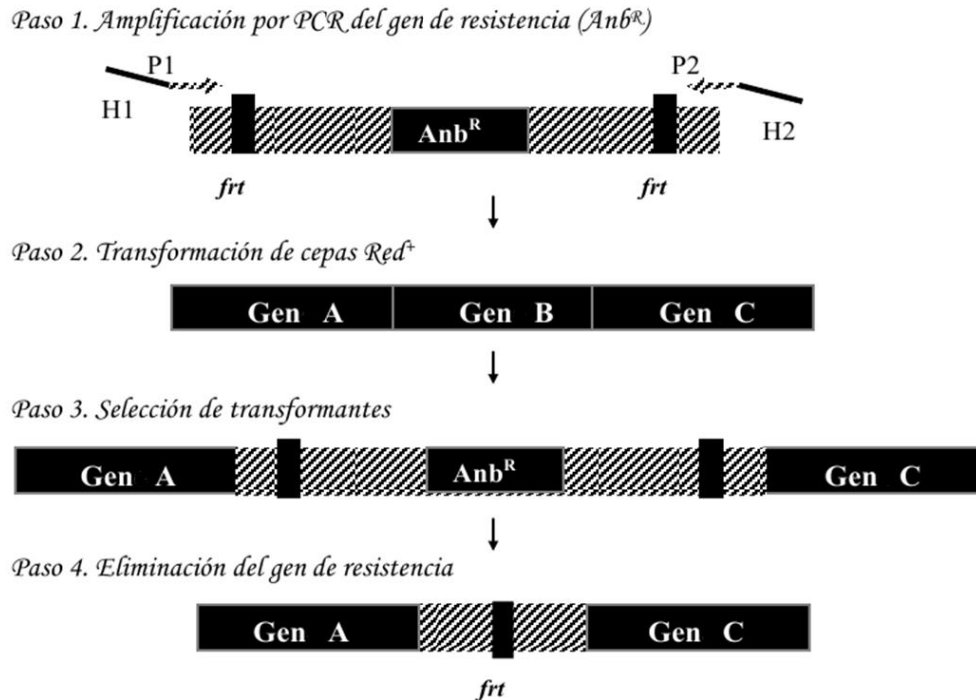


Figura 3. Esquema de la transducción generalizada con el bacteriófago P1 vir.

### 3.3.2.3 Inactivación cromosomal por productos de PCR

A pesar de que existen numerosos métodos de reemplazo alélico para integrar genes en el cromosoma bacteriano, todos requieren que la modificación deseada se genere *in vitro* en el vector antes de que recombine en el cromosoma, restringiendo de esta manera la integración génica a un determinado locus. Un sistema alternativo para evitar lo anterior, es a través de la amplificación por PCR de genes de resistencia (Figura 4). La estrategia básica consiste en reemplazar una secuencia cromosomal con un gen selectivo de resistencia a un antibiótico, el cual se genera por PCR

flanqueado por secuencias que llevan en su extremo 5', de 36 a 50 nucleótidos de identidad con el gen a interrumpir (H1 y H2), y 20 pb en su extremo 3' idénticas con el plásmido templado (P1 y P2) que expresa el gen selectivo. La recombinasa Red del fago  $\lambda$  lleva a cabo la doble recombinación entre las secuencias H1 y H2 del producto de PCR con las del gen a interrumpir.



**Figura 4. Estrategia de interrupción de genes cromosomales.** H1 y H2 se refieren a las secuencias de identidad con el gen B. P1 y P2 representan las secuencias de identidad con el plásmido templado. Modificado de Datsenko y Wanner, 2000; tomado de la tesis de maestría de A. Sabido.

Una vez interrumpido el gen blanco y después de la selección, el casete de resistencia puede ser escindido del cromosoma usando un plásmido que expresa la recombinasa FLP, la cual lleva a cabo la recombinación sitio-específica entre los sitios *frt* que flanquean el gen de resistencia que se insertó. Los plásmidos que expresan las recombinasas Red y FLP, poseen orígenes de replicación termosensible que fácilmente pueden ser eliminados si las células se crecen a 37°C (Datsenko y Wanner, 2000).

#### 3.3.2.4 Vector de expresión pLoxGentrc

En nuestro laboratorio se generó un vector de integración cromosomal, el plásmido pLoxGentrc (GenBank: JF934954.1). Es un vector de alrededor de 20 copias por célula que posee un tamaño de 6295 pb y un origen de replicación proveniente del pBR322. Además, contiene el promotor *trc* ( $P_{trc}$ ), un sitio de clonación múltiple (MCS), las secuencias de término T1 y T2 *rrnB*, el gen *lacI<sup>q</sup>* y el gen *aacC1* el cual confiere resistencia a gentamicina, flanqueado por dos sitios *loxP*, lo que permite la escisión de dicho casete de resistencia. El plásmido pLoxGentrc también fue diseñado

para funcionar como templado de PCR, el cual puede usarse para lograr la integración y expresión de genes en el cromosoma de *E. coli* utilizando la metodología de Datsenko y Wanner (2000) mediante cuatro pasos: 1) Clonación del gen de interés en el MCS del plásmido pLoxGentrc, 2) generación del producto de PCR, 3) transformación de la cepa hospedero y recombinación homóloga mediada por el sistema  $\lambda$ -Red, entre el producto de PCR y el gen blanco a inactivar en el cromosoma y 4) Selección de las transformantes por su resistencia a gentamicina (*aacC1*) (Sabido, 2013).

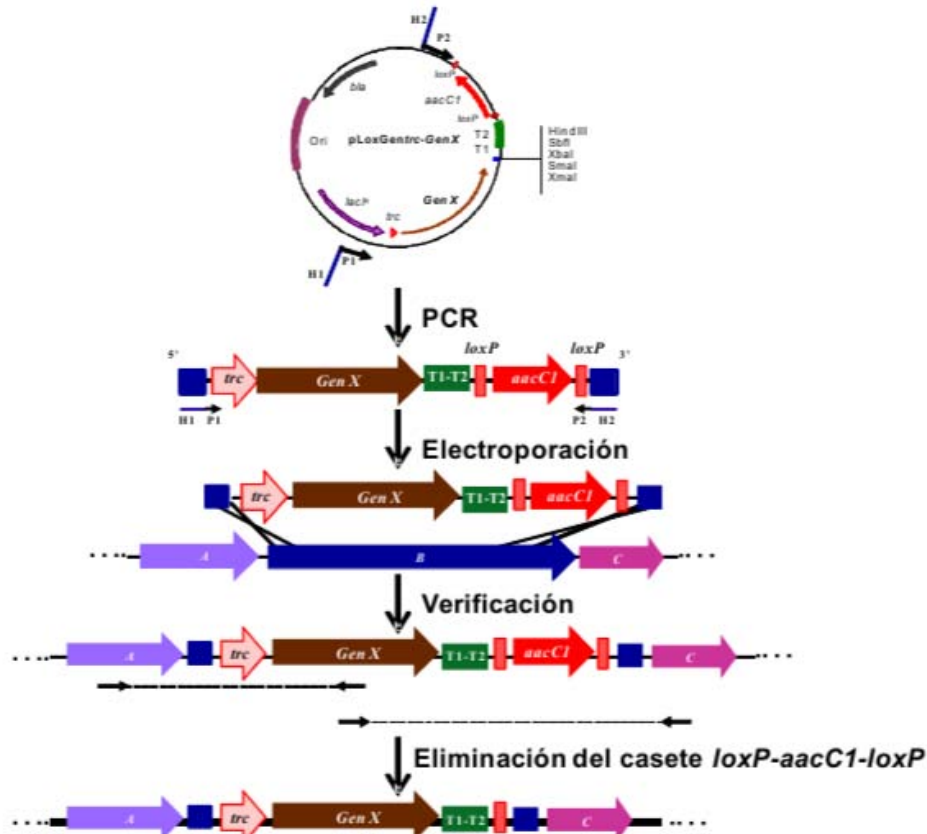


Figura 5. Estrategia para llevar a cabo la inactivación y expresión de genes en el cromosoma de *E. coli*. Modificado de la tesis de maestría de A. Sabido.

### 3.3.2.5 Sitios de inserción cromosómica

Las técnicas de recombinación permiten la inserción de genes homólogos o heterólogos en cualquier posición del cromosoma, a menos que sea letal para el organismo; tanto el reemplazo de genes como la inserción en regiones intercistónicas son posibles. Sin embargo, es idóneo que los genes sean integrados de manera directa y con el mínimo efecto fisiológico a la cepa hospedero. En *E. coli* se han usado genes dispensables tales como los genes para la degradación de azúcares poco comunes como sitios ideales para el reemplazo de genes (*E. coli* cuenta con más de 20 opciones disponibles), ya que su interrupción no tiene efectos adversos primarios para las aplicaciones biotecnológicas. Más aun, la pérdida de estos genes de degradación de azúcar junto con la inserción

de un fragmento de DNA recombinante puede ser seleccionada de manera precisa utilizando un medio de cultivo con un indicador de pH, por ejemplo el agar MacConkey, suplementado con la azúcar respectiva (Albermann, *et al.*, 2010).

### **3.4 Producción de compuestos derivados de la ruta biosintética de L-fenilalanina y L-tirosina.**

Los aminoácidos y sus derivados son un ejemplo importante de productos químicos que pueden ser producidos por microorganismos usando materias primas renovables como la D-glucosa. Ejemplo de esto son los aminoácidos L-tirosina (L-Tir) y L-fenilalanina (L- Fen) que tienen diversas aplicaciones comerciales en la industria farmacéutica y alimentaria. Las cepas para la producción de L- Fen han sido desarrolladas mediante modificaciones genéricas en enzimas claves, provocando un incremento en el flujo de carbono en su ruta de síntesis (Ikeda, 2006).

Un grupo de los compuestos derivados de L- Fen y L- Tir son los fenilpropanoides, la cual es una familia muy grande de metabolitos sintetizados principalmente por plantas, entre los que se encuentran compuestos con potencial farmacéutico.

#### **3.4.1 Biosíntesis de compuestos aromáticos: La ruta metabólica del ácido shikímico**

Las rutas metabólicas de aromáticos de bacterias y plantas han demostrado ser una fuente de estos compuestos con valor comercial. Las plantas y casi todas las especies bacterianas tienen la capacidad metabólica de sintetizar diversos compuestos aromáticos. Estos metabolitos se originan de una ruta metabólica de aromáticos común, conocida también como la ruta del ácido shikímico o shikimato (SHIK), la cual es una fuente de compuestos aromáticos y no aromáticos de uso comercial. Las bacterias gastan más del 90% de su energía metabólica total en la biosíntesis de proteínas, como consecuencia el metabolismo del shikimato sirve casi exclusivamente para la síntesis de aminoácidos (Herrmann, 1995). La síntesis de los compuestos aromáticos en bacterias puede ser dividida en dos partes: la ruta del shikimato desde la condensación de fosfoenolpiruvato (PEP) y D-eritrosa 4 fosfato (E4P) a corismato (COR), la cual es común para la síntesis de L-Fen, L-Tir y L- triptófano (L-Trp) y las tres rutas terminales específicas que usan el COR como sustrato.

Como se mencionó anteriormente, la síntesis de aromáticos se inicia con la condensación entre el intermediario glucolítico fosfoenolpiruvato y la E4P para formar el 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato 7-fosfato (DAHP) en una reacción catalizada por la enzima DAHP sintasa (DAHPS). En el segundo paso, el anillo de oxígeno es cambiado por el C7 exocíclico de DAHP para formar 3-dihidroquinato (DHQ), esta reacción es llevada a cabo por la enzima DHQ sintasa (DHQS). La tercera reacción es llevada a cabo por la enzima 3-dihidroquinato deshidratasa dando lugar a 3-

dihidrosikimato (DHS), el cual es convertido en shikimato (SHIK) por la shikimato 5-dihidrogenasa (reacción 4); seguido de una reacción de fosforilación por parte de la Shikimato cinasa para formar shikimato 3-fosfato (S3P). En el paso seis se forma 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato (EPSP) en una reacción catalizada por la enzima EPSP sintasa. Posteriormente se forma corismato (COR) por acción de la COR sintasa (Figura 6-A).

Después de seis reacciones enzimáticas, se produce el intermediario COR, a partir del cual se sintetizan los aminoácidos aromáticos L-Tir, L-Fen y L-Trp. La enzima bifuncional corismato mutasa-prefenato deshidrogenasa (CM-PDH), codificada por el gen *tyrA*, interviene en la etapa final de la biosíntesis de L- Tir. La reacción inicial involucra la conversión del COR en prefenato (PPA) por la enzima corismato mutasa (CM). Posteriormente, el PPA es sustrato de la enzima prefenato deshidrogenasa (PDH), la cual descarboxila y oxida al PPA en 4-hidroxifenilpiruvato (HPP) empleando  $\text{NAD}^+$ . La conversión del HPP en L- Tir la cataliza la enzima aminotransferasa de L - Tir, codificada por el gen *tyrB* (Figura 6-B). La L- Tir controla su vía terminal de síntesis inhibiendo la actividad de la CM-PDH, de igual forma regula la entrada de carbono a la vía común de síntesis de compuestos aromáticos inhibiendo la actividad de una de las tres isoenzimas de DAHPS (Chávez *et al.*, 2005).

En el caso de la síntesis de L- Fen interviene también una enzima bifuncional; la corismato mutasa-prefenato deshidratasa codificada por el gen *pheA* (Figura 6-B). En la reacción inicial, el COR nuevamente se convierte en PPA por la enzima CM. Posteriormente, el PPA es sustrato de la enzima prefenato deshidratasa convirtiéndolo en fenilpiruvato (PPY). La conversión del PPY en L- Fen la cataliza la enzima aminotransferasa de L- Fen, codificada por el gen *tyrB* (Bongaerts, 2001).

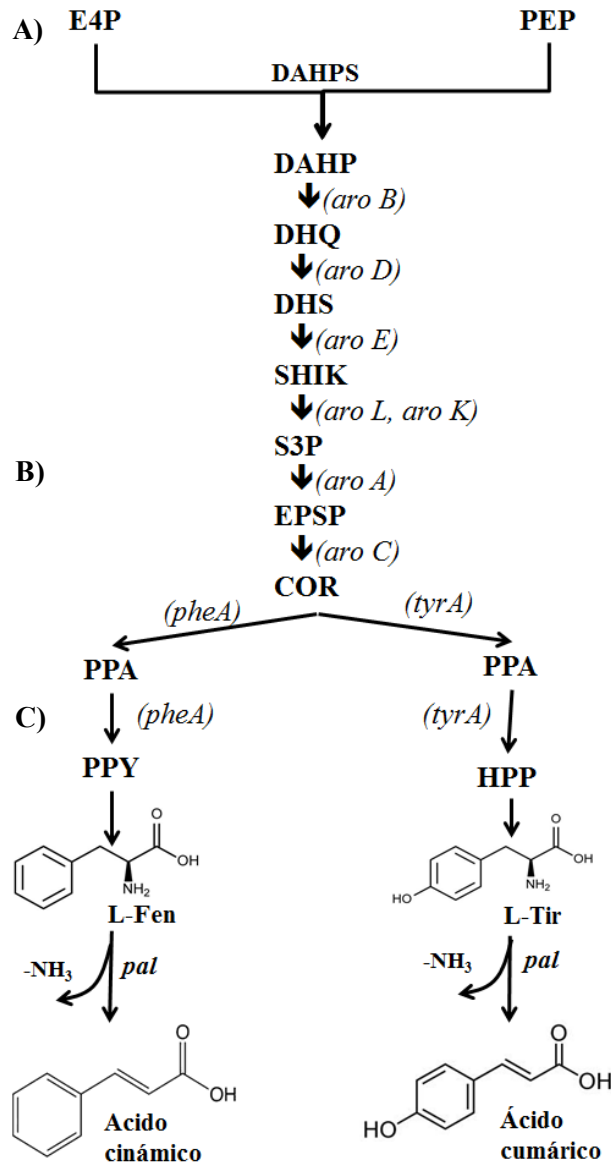
### **3.5 Fenilalanina amonio liasa: entrada a la ruta de los fenilpropanoides**

Los fenilpropanoides son un grupo de compuestos derivados de L- Fen. Esta es una familia muy grande de metabolitos sintetizados principalmente por plantas, levaduras y bacterias (Kyndt, *et al.*, 2002) entre los que se encuentran compuestos con potencial farmacéutico, por ejemplo el ácido cumárico, también conocido como ácido p-hidroxicinámico (pHCA), precursor de compuestos como: cumarinas, fenilpropenos, ácidos, aldehídos, alcoholes cinámicos, ácidos truxílicos, lignanos y ligninas, neolignanos y benzaldehídos.

La fenilalanina amonio liasa (PAL) es la enzima encargada de la primera reacción de la ruta de biosíntesis de los fenilpropanoides. La PAL cataliza la desaminación no oxidativa de L-Fen a ácido *trans*cinámico (CA). Asimismo se ha demostrado la reversibilidad de la reacción de PAL; es decir

la producción de L- Fen a partir de CA, con una constante de equilibrio de 4.7 mol/L (Colquhoun, 2012).

Empleando las herramientas de la ingeniería genética es posible transferir genes de vías de fenilpropanoides de plantas a una cepa bacteriana productora de CA y así extender la vía hacia la síntesis de un metabolito no nativo para la bacteria (Figura 6-C).



**Figura 6. Ruta de biosíntesis de aromáticos y síntesis de ácido *p*-cinámico e hidroxicinámico.** A) Ruta del shikimato. B) Rutas terminales específicas para la síntesis de L-Fen y L-Tir C) Primer paso de la ruta de síntesis de los fenilpropanoides; actividad de la PAL/TAL de *Rhodotorula glutinis*. Abreviaciones usadas: DAHP, 3-deoxi-D-arabino-heptulosonato7-fosfato; DAHPS, 3-deoxi-D-arabino-heptulosonato7-fosfato sintasa; DHQ, 3-dehidroquinato; DHS, 3-dehidroshikimato; SHIK, shikimato; S3P, shikimato 3-fosfato; EPSP, 5 *enol*piruvilshikimato; COR, corismato; PPA, prefenato; PPY, fenilpiruvato; L- Fen, L-fenilalanina; HPP, 4-hidroxifenilpiruvato; L-Tir, L-tirosina; *aroB*, gen de 3-dehidroquinatosintasa; *aroD*, gen de 3-dehidroquinato deshidratasa; *aroE*, gen de shikimato deshidrogenasa isozima; *aroK*, gen de shikimato cinasa I; *aroA*, gen de 3-fosfoshikimato-1-carboxiviniltransferasa; *aroC*, gen de corismato sintasa; *pheA*, gen de corismato mutasa/prefenato deshidrogenasa; *tyrA*, gen de corismato mutasa/prefenato deshidrogenasa; *pal*; gen de fenilalanina amonio liasa.

### 3.5.1 Fenilalanina amonio liasa de *Rhodotorula glutinis*

La enzima fenilalanina amonio liasa de *Rhodotorula glutinis* ( $PAL_{Rg}$ ) es un polipéptido de 706 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 75.5 kDa, codificada por el gen *pal* de 2,121pb. La cual lleva a cabo la conversión de L- Fen a CA teniendo una actividad máxima de  $4.3 \text{ U mg}^{-1}$  a  $50^\circ\text{C}$  y una  $K_m$  de 1.3mM. Además de la conversión de L- Fen, la  $PAL_{Rg}$  cataliza la conversión de L-Tir a ácido pHCA. Su  $K_m$  para L- Tir es de 0.56mM, es decir, exhibe una mayor afinidad hacia la L- Tir, comparado con L- Fen (Zhu, *et al.*, 2013). A pesar de que  $PAL_{Rg}$  exhibe una mayor afinidad a L- Tir con una  $K_m$  menor, su actividad catalítica hacia la L-Fen es mayor que hacia la L-Tir.

Se ha reportado que esta enzima es inhibida por el CA y sus derivados naturales; la inhibición por ácidos *p*-hidroxiaromáticos es característica de PAL de levaduras con actividad tirosina amonio liasa. En un estudio realizado por Sato, *et al.* se determinó que la actividad inhibitoria de CA y PHCA fue del 87% y 85% respectivamente a una concentración de 1mM para sustrato e inhibidores (Sato, *et al.*, 1982).

## 4. Justificación

Uno de los objetivos de nuestro laboratorio es avanzar en la comprensión del funcionamiento celular mediante el estudio y la modificación de la fisiología bacteriana con el fin de poder aplicar este conocimiento hacia la generación de cepas de producción. En este proyecto planteamos el uso de un sistema molecular que permite integrar y expresar genes en el cromosoma de *E. coli*, de manera regulable y sin dejar marcadores de resistencia a antibióticos en las cepas modificadas (Sabido A. L., 2012) basado en una metodología similar a la desarrollada por Datsenko y Wanner (2000), para la integración múltiple de un mismo gen heterólogo en distintos sitios dispensables del cromosoma bacteriano (Albermann, 2010). Al integrar genes en el cromosoma, se puede lograr evitar la pérdida de éstos como consecuencia de la segregación de los plásmidos; además, se evita el efecto multicopia, se reduce la carga metabólica y la demanda en precursores y energía ocasionada por la expresión de algunos de los genes presentes en el plásmido, con lo cual se puede mejorar la viabilidad en algunas de las cepas modificadas. No obstante también existen desventajas al expresar un gen en el cromosoma como el bajo nivel de expresión de copias, lo que es perjudicial cuando se requieren niveles de expresión altos de los genes de interés para producir grandes cantidades de la proteína requerida. Es deseable ampliar el conocimiento de los efectos en la producción de compuestos no nativos de la integración de un gen particular. Por lo tanto, tomando en cuenta lo anterior, las aportaciones de este proyecto son: generación de cepas de producción de compuestos aromáticos con inserciones múltiples a cromosoma; caracterización molecular y fisiológica de las

cepas mutantes generadas y un mejor entendimiento de cómo reacciona el metabolismo bacteriano ante inserciones multicopia.

## 5. Hipótesis

---

La expresión del gen *pal* de *Rhodotorula glutinis* en el cromosoma de *Escherichia coli* permitirá la conversión de glucosa en ácido cumárico.

## 6. Objetivos

---

### 6.1 Objetivo general

Generar cepas de *Escherichia coli* donde se integre al cromosoma el gen *pal* de *Rhodotorula glutinis*.

### 6.2 Objetivos particulares

- Generación de un derivado del plásmido pLoxGentrc que contenga al gen *pal* de *R. glutinis* (*ploxGentrcpal<sub>Rg</sub>*)
- Utilizar el plásmido *pLoxGentrcpal<sub>Rg</sub>* como templado para la amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos productos serán utilizados para determinar la factibilidad de efectuar integraciones múltiples al cromosoma de la bacteria *E. coli*.
- Generación de cepas mutantes con inserciones múltiples del gen *pal<sub>Rg</sub>*.
- Interrupción del gen *pheA* en las cepas mutantes con inserciones múltiples del gen *pal<sub>Rg</sub>*.
- Caracterización molecular y fisiológica de las cepas mutantes generadas.

## 7. Metodología

---

### 7.1 Cepas y plásmidos

Las cepas de *E. coli*, los plásmidos utilizados y construidos en este trabajo se describen en la

Tabla A. Las cepas utilizadas en este estudio fueron *Escherichia coli* W3110 y DH5 $\alpha$ . La cepa DH5 $\alpha$  se utilizó para la construcción y clonación del plásmido *ploxGentrcpal<sub>Rg</sub>*. La cepa W3110 se utilizó como hospedera para la integración del gen *pal* proveniente de la levadura *Rhodotorula glutinis* (*pal<sub>Rg</sub>*).



**Tabla A. Cepas y plásmidos utilizados y construidos.**

Cepas	Características	Referencia
<b>W3110</b>	F <sup>-</sup> , λ <sup>-</sup> , INV ( <i>rnnD-rnnE</i> )1, RecA <sup>+</sup> , Lac <sup>+</sup>	ATCC27325
<b>W3110/pJLBaroG<sup>fbr</sup>tktA</b>	W3110 transformada con el plásmido derivado de pJLBaroG <sup>fbr</sup> el cual expresa el gen <i>tktA</i> con su promotor nativo.	(Balderas-Hernández, 2009)
<b>W3110/pTrcPal</b>	W3110 transformada con el plásmido derivado de pTrc99A, que expresa al gen <i>pal<sub>Rg</sub></i> bajo la regulación del P <sub>trc</sub> .	(Vargas, <i>et al.</i> , 2015)
<b>W3110/pLoxGentrc</b>	F <sup>-</sup> , λ <sup>-</sup> , INV ( <i>rnnD-rnnE</i> )1, RecA <sup>+</sup> , Lac <sup>+</sup> , Trp <sup>+</sup> , Gm <sup>R</sup> , y transformada con un plásmido de expresión en el que es posible clonar cualquier gen bajo regulación del P <sub>trc</sub> .	(Sabido A. L., 2012)
<b>W3110/pLoxGentrcpal<sub>Rg</sub></b>	Igual que la cepa anterior y productora de ácido cumárico y cinámico debido a la clonación del gen <i>pal</i> .	Este trabajo.
<b>W3110/ lacZ::<i>pal<sub>Rg</sub></i>, loxP-aacC1-loxP</b>	Gm <sup>R</sup> cepa derivada de W3110 con P <sub>trc</sub> - <i>pal<sub>Rg</sub>-rrnBT1T2-loxP-aacC1-loxP</i> insertado en el gen <i>LacZ</i> .	Este trabajo.
<b>W3110/ lacZ::<i>pal<sub>Rg</sub></i>, loxP</b>	cepa derivada de W3110 con P <sub>trc</sub> - <i>pal<sub>Rg</sub>-rrnBT1T2-loxP</i> insertado en el gen <i>LacZ</i> .	Este trabajo.
<b>W3110 pts<sup>-</sup></b>	F <sup>-</sup> , λ <sup>-</sup> , INV ( <i>rnnD-rnnE</i> )1, RecA <sup>+</sup> , Lac <sup>+</sup> , Pts <sup>-</sup> por transducción generalizada con el fago P1.	(Fuentes, <i>et al.</i> , 2013)
<b>W3110 pheA<sup>-</sup></b>	F <sup>-</sup> , λ <sup>-</sup> , INV ( <i>rnnD-rnnE</i> )1, RecA <sup>+</sup> , Lac <sup>+</sup> , <i>pheA<sup>-</sup></i> por transducción generalizada con el fago P1.	(Fuentes, <i>et al.</i> , 2013)
<b>W3110/ LacZ::<i>pal<sub>Rg</sub></i> ::pts<sup>-</sup>, loxP</b>	cepa derivada de W3110 con P <sub>trc</sub> - <i>pal<sub>Rg</sub>-rrnBT1T2-loxP</i> insertado en el gen <i>LacZ</i> , Pts <sup>-</sup> por transducción generalizada con el fago P1.	Este trabajo.
<b>W3110/ LacZ::<i>pal<sub>Rg</sub></i> kn::<i>pheA</i>, loxP</b>	cepa derivada de W3110 con P <sub>trc</sub> - <i>pal<sub>Rg</sub> -rrnBT1T2-loxP</i> insertado en el gen <i>LacZ</i> , <i>pheA<sup>-</sup></i> por transducción generalizada con el fago P1.	Este trabajo.
<b>W3110/LacZ::<i>pal<sub>Rg</sub></i> xylAB::<i>pal<sub>Rg</sub></i>, loxP-aacC1-loxP</b>	cepa derivada de W3110 con P <sub>trc</sub> - <i>pal<sub>Rg</sub> -rrnBT1T2-loxP</i> insertado en el gen <i>LacZ</i> y con P <sub>trc</sub> - <i>Pal-rrnB-T1T2-loxP-aacC1-loxP</i> insertado en los genes <i>xylAB</i> .	Este trabajo.
<b>W3110/ LacZ::<i>pal<sub>Rg</sub></i>, xylAB::<i>pal<sub>Rg</sub></i>, loxP</b>	cepa derivada de W3110 con P <sub>trc</sub> - <i>pal<sub>Rg</sub>-rrnBT1T2-loxP</i> insertado en los genes <i>LacZ</i> y <i>xylAB</i> .	Este trabajo.
<b>W3110/ LacZ::<i>pal<sub>Rg</sub></i>, xylAB::<i>pal<sub>Rg</sub></i>, kn::<i>pheA</i>, loxP</b>	cepa derivada de W3110 con P <sub>trc</sub> - <i>pal<sub>Rg</sub>-rrnBT1T2-loxP</i> insertado en los genes <i>LacZ</i> y <i>XylAB</i> . <i>pheA<sup>-</sup></i> por transducción generalizada con el fago P1.	Este trabajo.
<b>W3110/LacZ::<i>pal<sub>Rg</sub></i> ,</b>	cepa derivada de W3110 con P <sub>trc</sub> - <i>pal<sub>Rg</sub>-rrnBT1T2-loxP</i>	Este trabajo.

<b><i>malEFG::pal<sub>Rg</sub>, loxP-aacC1-loxP</i></b>	T1T2- <i>loxP</i> insertado en el gen <i>LacZ</i> y con <i>P<sub>trc</sub>-Pal-rrnB-T1T2-loxP-aacC1-loxP</i> insertado en los genes <i>malEFG</i> .	
<b>W3110/<i>LacZ::pal<sub>Rg</sub>, malEFG::pal<sub>Rg</sub>, loxP</i></b>	cepa derivada de W3110 con <i>P<sub>trc</sub>-pal<sub>Rg</sub>-rrnB</i> T1T2- <i>loxP</i> insertado en los genes <i>LacZ</i> y <i>malEFG</i> .	Este trabajo.
<b>W3110/<i>LacZ::pal<sub>Rg</sub>, malEFG::pal<sub>Rg</sub>, kn::pheA, loxP</i></b>	cepa derivada de W3110 con <i>P<sub>trc</sub>-pal<sub>Rg</sub>-rrnB</i> T1T2- <i>loxP</i> insertado en los genes <i>LacZ</i> y <i>malEFG</i> . <i>pheA</i> <sup>-</sup> por transducción generalizada con el fago P1.	Este trabajo.
<b>W3110/<i>LacZ::Pal<sub>Rg</sub>, xylAB::pal<sub>Rg</sub>, malEFG::pal<sub>Rg</sub>, loxP-aacC1-loxP</i></b>	cepa derivada de W3110 con <i>P<sub>trc</sub>-pal<sub>Rg</sub>-rrnB</i> T1T2- <i>loxP</i> insertado en los genes <i>LacZ</i> y <i>xylAB</i> y con <i>P<sub>trc</sub>-Pal-rrnB-T1T2-loxP-aacC1-loxP</i> insertado en los genes <i>malEFG</i> .	Este trabajo.
<b>W3110/<i>LacZ::Pal<sub>Rg</sub>, xylAB::pal<sub>Rg</sub>, malEFG::pal<sub>Rg</sub>, loxP</i></b>	cepa derivada de W3110 con <i>P<sub>trc</sub>-pal<sub>Rg</sub>-rrnB</i> T1T2- <i>loxP</i> insertado en los genes <i>LacZ</i> , <i>xylAB</i> y <i>malEFG</i> .	Este trabajo.
<b>W3110/<i>LacZ::Pal<sub>Rg</sub>, xylAB::pal<sub>Rg</sub>, malEFG::pal<sub>Rg</sub>, kn::pheA, loxP</i></b>	cepa derivada de W3110 con <i>P<sub>trc</sub>-pal<sub>Rg</sub>-rrnB</i> T1T2- <i>loxP</i> insertado en los genes <i>LacZ</i> , <i>xylAB</i> y <i>malEFG</i> . <i>pheA</i> <sup>-</sup> por transducción generalizada con el fago P1.	Este trabajo.
Plásmidos	Características	Referencia
<b>pJLBaroG<sup>br</sup>tktA</b>	Expresa <i>aroG<sup>br</sup></i> del promotor <i>lacUVS</i> , los genes <i>lacI<sup>q</sup></i> y <i>tet</i> , resistencia a tetraciclina, origen de replicación pACYC184, contiene el gen <i>tktA</i> con su promotor nativo.	(Balderas-Hernández, 2009)
<b>pTrcPal</b>	Derivado del pTrc99A, el gen <i>pal</i> silvestre de <i>R. glutinis</i> se insertó en el sitio múltiple de clonación (MSC).	(Vargas, <i>et al.</i> , 2015)
<b>pLoxGentrc</b>	Derivado de pLoxGen4Δ <i>Hind</i> III con la inserción de un fragmento proveniente de pTrc99A, el cual lleva al gen que codifica para el represor <i>lacI</i> , la secuencia de <i>p<sub>trc</sub></i> , el MCS y los terminadores <i>rrnB</i> .	(Sabido A. L., 2012)
<b>ploxGentrcpal<sub>Rg</sub></b>	Derivado de pLoxGentrc y además tiene clonado al gen <i>pal</i> que codifica para la fenilalanina amonio liasa de <i>Rhodotorula glutinis</i> .	Este trabajo.
<b>pJW168</b>	AmpR, porta al gen <i>cre</i> bajo regulación de PlacUV5 y con las funciones de replicación termosensibles del plásmido pSC101. Las cepas transformadas con este plásmido se deben crecer a 30°C (temperatura a la cual se lleva a cabo la replicación de este plásmido).	Palmeros <i>et al.</i> , 2000.
<b>pKD46</b>	AmpR, porta los genes $\gamma$ , $\beta$ y <i>exo</i> de la recombinasa Red del fago $\lambda$ bajo regulación de ParaB y con las funciones de replicación termosensibles del plásmido pSC101.	Datsenko y Wanner, 2000.

## 7.2 Técnicas genéticas y de DNA recombinante

### 7.2.1 Transformación bacteriana

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 a 37°C por 3 horas aproximadamente.

### 7.2.2 Purificación del DNA

Los vectores utilizados para transformar se purificaron por la técnica de miniprep de lisis alcalina (Bimboim, 1979). El DNA cromosomal se extrajo por el método de ebullición el cual es un protocolo modificado del kit PrepMan Ultra de Applied Biosystems No. de parte 4367554. El kit utiliza para lisar el reactivo PrepMan Ultra No. de parte 4322547 de composición no revelada, la modificación consiste en sustituir este reactivo por agua MQ. Para purificar productos de PCR, se utilizó el kit *High Pure PCR Product Purification* marca Roche.

### 7.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la reacción de PCR se utilizó la “Long PCR Enzyme Mix” (Fermentas). En un volumen final de 50µL. Las condiciones se describen en las Tabla B y Tabla C(se utilizaron los mismos volúmenes para la comprobación de la integración del gen *pal<sub>Rg</sub>* y para la comprobación de la interrupción del gen *pheA*).

**Tabla B. Volúmenes utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa**

Componente	Volumen por reacción de 50 µL	Concentración final
<b>DNA templado</b>	Variable (50-100 ng)	---
<b>10 mM dNTP's</b>	2 µL	0.2 mM
<b>Primer Fwd 5'</b>	1µL	50 pmol/µL
<b>Primer Rv 3'</b>	1µL	50 pmol/µL
<b>Long PCR Enzyme Mix</b>	1.25 µL	---
<b>Buffer</b>	5 µL	2mM
<b>Agua</b>	Hasta 50 µL	---

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

**Tabla C. Condiciones utilizadas en los ciclos de PCR.** Para la integración y comprobación de integración del gen *pal* se utilizaron las mismas condiciones.

Ciclo	Integración del gen <i>pal</i>		Interrupción del gen <i>pheA</i>	
	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
<b>Pre-desnaturalización</b>	94	2	94	5
<b>Amplificación (25 ciclos)</b>	<b>Desnaturalización</b>	94	94	1
	<b>Alineamiento</b>	62	56	1.5
	<b>Polimerización</b>	68	72	1
<b>Extensión final</b>	68	10	72	10

Los oligonucleótidos utilizados para amplificar mediante PCR el DNA cromosomal, plasmídico, así como para realizar las comprobaciones de integraciones en cromosoma e interrupciones de los genes, se describen en la Tabla D.

**Tabla D. Secuencia de los diferentes oligonucleótidos utilizados en este estudio.**

Oligonucleótido	Secuencia nucleotídica
<b>Integración cromosomal</b>	
tremelA/lacZfwd *	5' <u>GAGTGCGATCTTCCTGAGGCCGATACTGTCGTCGTC</u> CCCCTCAAACGCTTATCATCGACTGCACGG 3'
tremelA/lacZrvs *	5' <u>GACATGGCCTGCCCGGTTATTATTATTTTTGACACCAGACCAACT</u> GCACAGATGCGTAAGGAGAA 3'
malEFGloxgentr-fw	5' <u>CCAAAATCGAAGAAGGTAAACTGGTAATCTGGATTAACGGCGAT</u> GCTTATCATCGACTGCACGG 3'
malEFGloxgentr-rv	5' <u>TGATCGGTAATGCAGACATCACGGCAGCGGCCGCAAAGTCACCG</u> CACAGATGCGTAAGGAGAA 3'
xylABloxgentr-fw	5' <u>CACTACAATCCCGACGA</u> ACTGGTGTGGGTAAGCGTATGGAAGAGGCTTATCATCGACTGCACGG3'
xylABloxgentr-rv	5' <u>AGCGATTAAGCTGGGACATTGCTCAGGCCGGT</u> TAATTTTCGCGGCCGCACAGATGCGTAAGGAGAA3'
<b>Comprobación de la integración cromosomal</b>	
LacZ::tremelAfw	5' GTGGAAGCTGCCTGCACTAA 3'
LacZ::tremelArvs	5' GTGGCGAACGATGAGCCAAT 3'
MalEFG:palfw	5' CGCCAGCCGTCAGTATTCAG 3'
MalEFG:palArv	5' GCAGCTCCACCTGCACTTGA 3'
XylAB:palAfw	5' AAGGCCGGTGAATAGGTTGA 3'
XylAB:palArv	5' CCTGGCCGGAGATTGCTACT 3'
Pal700R	5' TGATGGCCGCTGCAATGTAG 3'
Pal600F	5' CTCCTCAACCACGGCATCA 3'
pheAFwdC	5' CGTCGAGCACGATCAGAATA 3'
pheARvc	5' CGTCGAGCACGATCAGAATA 3'
Fwd: cysK1	5' CGATGTGGCGGTAACAATCT 3'
Rv: cysK2	5' TCCGACAGGCTGAATCAATG 3'
Fwd: pdxK1	5' CCGCTTCATAGCAGGTATGT 3'
Rv: pdxK2	5' TGTTTCGTCCTCGGTATC 3'

\*Las secuencias con identidad con los genes *LacZ*, *malEFG* y *xylAB* en estos primers se encuentra subrayada.

## 7.2.4 Generación de productos de PCR e integración cromosomal

Mediante una estrategia metodológica similar al sistema de inactivación cromosomal de genes reportada por Datsenko y Wanner (2000), se utilizó como templado el plásmido *ploxGentrcpal<sub>Rg</sub>* para obtener un producto de PCR de 4267 pb, que contiene al gen *pal<sub>Rg</sub>* bajo control de  $P_{trc}$  y al gen que codifica para el casete de resistencia a gentamicina (*aacC1*) flanqueado por sitios *loxP*. Este producto está flanqueado en su extremo 3' por 20 pb idénticas al *ploxGentrcpal<sub>Rg</sub>*, las cuales hibridan de la posición 493 a la 512, es decir, 182 pb corriente arriba del inicio del MCS; y de la 4235 a la 4254, que corresponden a las 10 últimas pb corriente arriba del último codón del promotor

tre y 10 pb corriente abajo del mismo respectivamente. Por su parte, en el extremo 5' dicho DNA lineal presenta 45 pb idénticas al gen cromosomal *lacZ* (oligos *trcmelA/lacZ fwd* y *trcmelA/lacZ rvs*) que se desea inactivar. Se utilizó la misma estrategia para los genes *xylA* y *xylB* del operón *xylAB* y los genes *malE*, *malF* y *malG* del operón *malEFG*. Las condiciones, así como los componentes para la amplificación se detallan en la sección anterior. El producto de PCR resultante se digirió con la enzima *DpnI*, cuyos sitios de restricción contienen N6-metiladenina, esto con el objetivo de eliminar DNA plasmídico. Finalmente la cepa W3110 de *E. coli* que expresaba previamente el plásmido pKD46 (Datsenko & Wanner, 2000), se transformó con 2.5 µL del producto de PCR, dejándose recuperar en medio SOC por aproximadamente 3 horas a 30°C y 300 rpm, para luego sembrar la transformación en cajas de LB sólido con gentamicina a 37°C por 18 horas aproximadamente.

### **7.2.5 Escisión del marcador de resistencia *aacCI***

El gen *aacCI* utilizado para seleccionar a las candidatas con inserción cromosomal fue removido por recombinación específica mediada por la Cre recombinasa como se describió previamente (Palmeros *et al.*, 2000). La cepa W3110/ *lacZ::pal<sub>Rg</sub>*, *loxP-aacCI-loxP* se transformó con el plásmido pJW168, el cual lleva al gen *cre* bajo el control del promotor *Plac<sub>UV5</sub>* y también lleva el marcador de resistencia a carbenicilina (Cb). Las células transformadas se crecieron en medio LB sólido con IPTG para inducir la producción de Cre a 30°C. La escisión del gen *aacCI* fue confirmada por la pérdida del fenotipo Gm<sup>R</sup> y por análisis de PCR utilizando los primers Pal600F y LacZ::*trcmelArvs*.

### **7.2.6 Transducción generalizada con el fago P1 en para la interrupción del gen *pheA* en *E. coli***

Para obtener el lisado viral, se incubó el fago P1 con CaCl<sub>2</sub> (para la adsorción de fago) y la cepa W3110 *pheA*<sup>-</sup> (cepa donadora conteniendo al casete de resistencia a kanamicina flanqueado por regiones homólogas al gen *pheA*<sup>-</sup> en vez de contener el gen correspondiente) durante 45 minutos a temperatura ambiente, quedando después de la infección, una cepa que contiene tanto fragmentos de DNA viral como fragmentos de DNA bacteriano. Posterior a esto se creció dicha cepa en medio LB a 37°C durante la noche, tiempo en el cual se empaqueta el material genético dentro de la cápside del virus y entonces, se degrada a la membrana de la célula, obteniendo un lisado que entre otros fragmentos, contiene el fragmento deseado (soló unos pocos fagos pueden transferir la resistencia). Una vez que se obtuvo el lisado de la cepa donadora con la mutación deseada, se transdujo a la cepa receptora incubando el lisado con la cepa receptora (en este caso las cepas previamente transformadas con el gen *pal* en monocopia, dicopia o tricopia) durante 45 minutos a

temperatura ambiente, resultando en una recombinación homóloga (este tipo de recombinación ocurre entre secuencias muy similares o idénticas de al menos 500 pares de bases, puede llevarse a cabo en cualquier punto a lo largo del cromosoma y es conservativa, es decir, no hay pérdida o ganancia de bases (Nelson y Cox, 2000)) ya que los extremos del gen donado son homólogos con el gen que se desea inactivar. Posteriormente se sembró en una caja con medio LB<sub>Kn30</sub> y se incubó durante toda la noche a 37°C. Después de este tiempo se seleccionaron las colonias de interés por el marcador de resistencia, que en todos los casos fue kanamicina.

#### **7.2.6.1 Comprobación de la inactivación de *pheA***

En las Tabla C y Tabla D se enlistan las condiciones y los oligonucleótidos (oligos) respectivamente, empleados para la comprobación de las mutantes obtenidas por transducción. Para esto, se verificó que el tamaño del producto fuera de 2039 pb para el control negativo (gen *pheA*) y de 2378 pb para el gen que se inactivó (casete de resistencia a kanamicina).

### **7.3 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento**

#### **7.3.1 Medios de cultivo**

A continuación se describen los medios de cultivo empleados:

- Medio “Lysogeny Broth” (LB): 10g/L de triptona, 5g/L de extracto de levadura y 5g/L de NaCl.
- Medio mineral M9: 6g/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5g/L de NaCl, 3g/L de KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1g/L de NH<sub>4</sub>Cl, 246.5mg/L de MgSO<sub>4</sub>, 14.7mg/L de CaCl<sub>2</sub>, 10µg/mL de vitamina B1 y 2 g/L de C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> al 20%.
- Medio bajo en sales YENB: 7.5g/L de extracto de levadura y 8g/L de caldo nutritivo.
- Medio SOC: 20g/L de bactotriptona, 5g/L de extracto de levadura, 2.5g/L de MgSO<sub>4</sub>, 2g/L de MgCl<sub>2</sub>, 0.58g/L NaCl, 93.18 mg/L de KCl.
- Medio McConkey: 17 g/L de peptona, 3 g/L peptona de proteosa, 1 g/L de sales biliares, 1 g/L de NaCl, 13 g/L de agar, 0.03 rojo neutro, 0.001 g/L cristal violeta.

#### **7.3.2 Condiciones de los cultivos de crecimiento**

Las cepas utilizadas en este trabajo se mantienen y crecen rutinariamente en medio Luria-Bertani líquido o sólido. Para seleccionar las construcciones deseadas o asegurar la presencia de un plásmido en *E. coli*, se utilizaron las siguientes concentraciones de antibióticos: cb, 100 µg/mL y gentamicina (*aacCI*), 10 µg/mL, para seleccionar las cepas con los genes de resistencia a

antibiótico en multicopia. Todas las cepas se crecieron a 37°C, excepto cuando se transformaron con plásmidos que tienen orígenes de replicación termo-sensibles, donde los crecimientos se hacen a 30°C.

Para seleccionar las clonas con el gen *lacZ* interrumpido en el cromosoma, además de verificar la resistencia al antibiótico dada por el casete escindible (*loxP*-Gm-*loxP*) que se utilizó durante las interrupciones *in vitro*, se determinaron los fenotipos β-Gal en placas de LB sólido con 33 µg/mL de Xgal + IPTG 100 µM.

Para seleccionar las clonas con los genes *xylA* y *xylB* del operón *xylAB* y los genes *malE*, *malF* y *malG* del operón *malEFG* interrumpidos en el cromosoma, aparte de verificar la resistencia a gentamicina que se utilizó durante las interrupciones *in vitro*, se determinaron los fenotipos pálidos en placas de agar McConkey sólido con 1% de xilosa y maltosa respectivamente correspondientes con los genes responsables de la degradación de dicho azúcar (Albermann, 2010).

La selección de las clonas transducidas con el casete de resistencia a kanamicina se llevó a cabo sembrándolas en medio LB adicionado con este antibiótico, de manera que solo se obtuvieran colonias de bacterias con el casete de resistencia a kanamicina.

Para determinar los parámetros cinéticos de la producción de CA y pHCA, se realizaron medios de cultivo de 50 mL en matraces bafleados de 250 mL con medio mineral M9 suplementado con 0.1 mM IPTG, 10 g/L glucosa y 250mg/L de L-Fen en los cultivos con fenotipo *pheA*<sup>-</sup>, gentamicina 10 µg/mL, tetraciclina 30 µg/mL y kanamicina 30 µg/mL (según se indique), a 37°C, 300 rpm y pH=7

### **7.3.3 Determinación del crecimiento bacteriano y la síntesis de ácido cumárico y cinámico.**

El crecimiento bacteriano se cuantificó en función de la turbidez, midiendo la absorbancia de los cultivos a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-70 a las horas 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 y 24. La absorbancia resultante se convirtió a peso seco mediante la siguiente relación  $1 \text{ DO}_{600\text{nm}} = 0.37 \text{ gDCW/L}$  (DCW = peso seco de células; Hernández-Montalvo *et al.*, 2001).

Las concentraciones de ácido cinámico, ácido cumárico, L-fenilalanina, L-tirosina, D-glucosa y ácido acético de las muestras tomadas a las 0, 2, 4, 8, 12, 16 y 24 horas se determinaron utilizando un sistema de HPLC equipado con detectores de índice de refracción (IR) y de fotoarreglo de diodos (UV), utilizando una columna de Aminex HPX 87H (BioRad). Como fase móvil, se utilizó una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM a un flujo de 0.5 mL/min y a una temperatura de 50°C.

## 8. Resultados y discusión

### 8.1 Construcción del plásmido *ploxGentrcpal<sub>Rg</sub>*

El gen *pal* de la levadura *Rhodotorula glutinis* (*pal<sub>Rg</sub>*) se insertó en el MCS<sub>trc</sub> del plásmido de expresión *pLoxGentrc*. Dicho gen se obtuvo mediante digestión del plásmido *pTrcPal* (Vargas, *et al.* 2015). Ambos plásmidos se digirieron con las enzimas *EcoRI* y *KpnI*, liberando un fragmento en el caso del *pLoxGentrc* y dos fragmentos para *pTrcPal* (Figura 17, carriles 1 y 3); en este último caso, se purificó de gel de agarosa la banda correspondiente al gen *pal* (2,149 pb). Ambos fragmentos se ligaron utilizando la enzima ligasa T4.

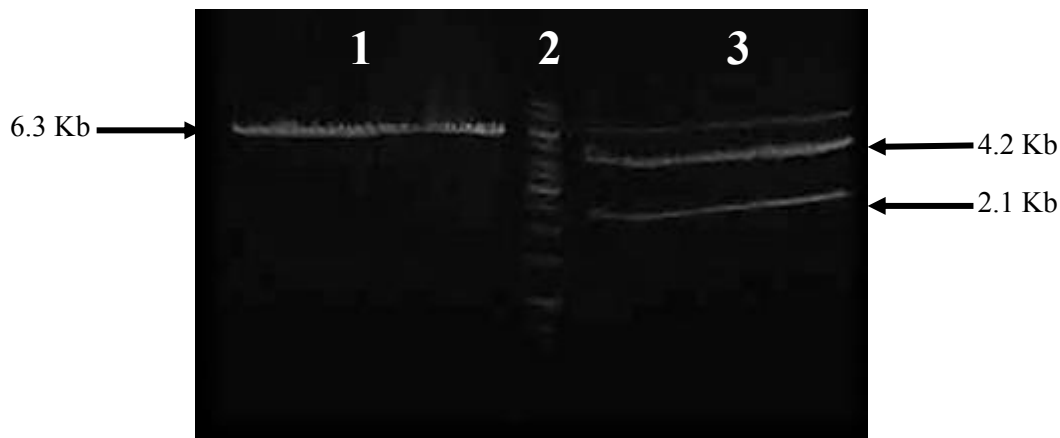


Figura 7. Digestiones de los plásmidos *pLoxGentrc* y *pTrcPal*. Carril 1: *pLoxGentrc* digerido con *EcoRI* y *KpnI*, 2: Marcador 1Kb, 3: *pTrcPal* digerido con *EcoRI* y *KpnI*.

El plásmido generado tiene un tamaño de 8523 pb y se nombró *ploxGentrcpal<sub>Rg</sub>* (Figura 8). Posteriormente se transformó la cepa W3110 de *E. coli* con la ligación y se obtuvieron menos de doscientas transformantes, de las que se seleccionaron 10 candidatas que se crecieron en medio LB para a continuación obtener DNA plasmídico, el cual se digirió con *EcoRI*, *KpnI* y *BamHI* obteniendo dos fragmentos de 6.3 y 2.1 Kb (vector e inserto) respectivamente con lo cual se corroboró la ligación del gen heterólogo *pal<sub>Rg</sub>* al plásmido de expresión *pLoxGentrc*.

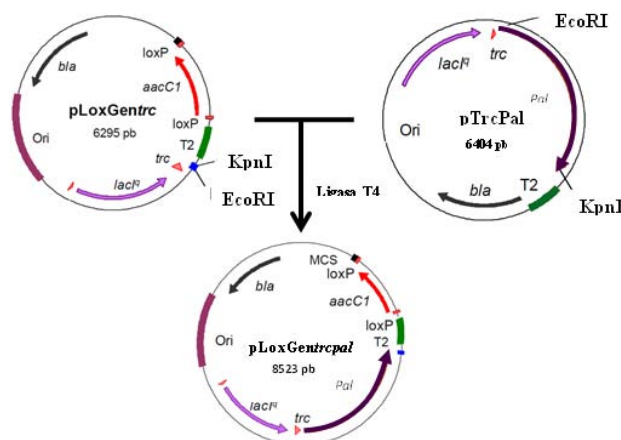


Figura 8. Construcción del plásmido templado *ploxGentrcPAL<sub>Rg</sub>*. Modificado de Sabido A. *et al.*, 2012.

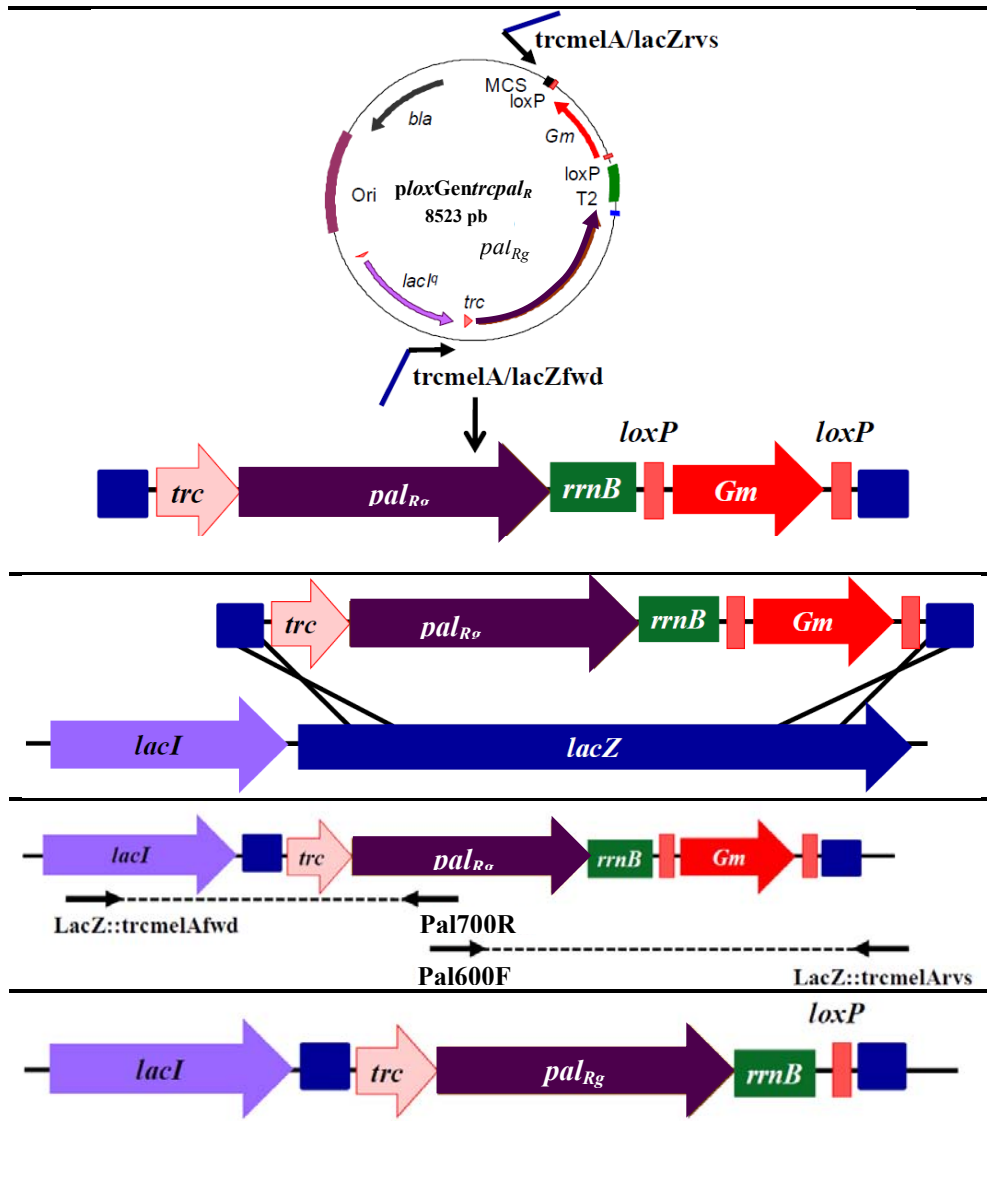


## 8.2 Integración del gen heterólogo *pal<sub>Rg</sub>* en los genes cromosomales *lacZ*, *xylAB* y *malEFG* de *E. coli*.

Usando una metodología similar a la reportada por Datsenko y Wanner (2000), el plásmido *ploxGentrcpal<sub>Rg</sub>* se utilizó como templado para la generación de un producto de PCR, empleando primers de 65 nucleótidos (nt), que incluyen 45 nt de identidad con el gen a inactivar y 20 nt que hibridan con el plásmido templado. El tamaño del producto de PCR fue de 4,267 pb, y contiene el gen que codifica para el casete de resistencia a gentamicina (*aacCI*) flanqueado por sitios *loxP* y el gen *pal<sub>Rg</sub>* bajo control de *P<sub>irc</sub>*. Dicho DNA lineal se introdujo en la cepa W3110 por electroporación. Se decidió interrumpir los genes *lacZ*, *xylAB* y *malEFG* ya que su eliminación no compromete la supervivencia de la bacteria en un medio con glucosa. Además de que las clonas donde hubo integración exitosa pueden ser seleccionadas fácilmente en medio sólido diferencial aprovechando la diferencia de colores entre las clonas mutantes y las no-mutantes.

### 8.2.1 Integración de *pal<sub>Rg</sub>* en el gen cromosomal *lacZ* de la cepa W3110 de *E. coli* (monocopia).

Como ya se ha mencionado, el plásmido *ploxGentrcpal<sub>Rg</sub>* se utilizó como templado para la generación de un producto de PCR con homología con el gen *lacZ* el cual se introdujo a la cepa W3110 para interrumpir dicho gen. El genotipo *lacZ* se seleccionó fácilmente en placas conteniendo X-Gal e IPTG, en las cuales las mutantes muestran colonias color blanco, en tanto que las no mutantes presentan colonias color azul. De las transformantes con el producto de PCR mencionado, se seleccionaron colonias “blancas” y resistentes al antibiótico gentamicina. Se obtuvieron 120 colonias totales de las cuales 80 mostraron fenotipo “blanco”, Gm<sup>R</sup>. Finalmente, la integración del casete de resistencia a gentamicina (*aacCI*) flanqueado por sitios *loxP* y del gen *pal<sub>Rg</sub>* bajo control de *P<sub>irc</sub>*, se confirmó mediante amplificación por PCR a partir del DNA aislado de 10 colonias con los fenotipos previamente identificados. Con dicho fin, se utilizaron los siguientes dos pares de oligos: 1) **trcmelA/lacZrvs –pal600F** que hibridan en las posiciones 6806 y 2486 respectivamente, y 2) **trcmelA/lacZfwd – pal700R** que hibridan en las posiciones 558 y 2586 respectivamente. El análisis del PCR de las candidatas donde se llevó a cabo el evento de intercambio alélico, resultó en 7 transformantes presentando los fragmentos esperados de aproximadamente 2 Kb y 4.3 Kb que corresponden con la interrupción *lacZ::pal<sub>Rg</sub>*, *loxP- aacCI-loxP* (Sabido, Martínez, de Anda, & Martínez, 2012). Las colonias derivadas de W3110 con la integración cromosomal verificada se nombraron W3110/*lacZ::pal<sub>Rg</sub>*, *loxP-aacCI-loxP*.



Paso 1. Generación del producto de PCR a partir del *ploxGentrcpal<sub>Rg</sub>*, los primers utilizados para la amplificación llevan identidad con *lacZ* y con el plásmido templado (*trcmelA/lacZfwd* y *trcmelA/lacZrvs*).

Paso 2. Recombinación homóloga entre el DNA lineal y el gen cromosomal *lacZ* mediada por el sistema  $\lambda$ -Red.

Paso 3. Selección de los transformantes por su resistencia a gentamicina (*Gm*) y fenotipo *Pal*<sup>+</sup>. Confirmación por PCR.

Paso 4. Eliminación del casete de resistencia a *Gm* por recombinação sitio específica entre los sitios *loxP*, mediada por la enzima Cre recombinasa.

Figura 9. Esquema de la estrategia para llevar a cabo la inactivación y expresión de genes en el cromosoma de *E. coli*. La figura muestra el protocolo general utilizado para el gen *pal<sub>Rg</sub>*, inactivando el gen *lacZ*. Modificado de Sabido A. et al., 2012.

### 8.2.2 Integración de *pal* en los loci *xylAB* y *malEFG* de la cepa W3110/ *lacZ::P<sub>trc</sub>Pal<sub>Rg</sub>*, *loxP* de *E. coli* (bicopia)

Nuevamente se utilizó el plásmido *pLoxGentrcpal* como templado para la generación de dos productos de PCR, uno con identidad con los genes *xylA* y *xylB* del operón *xylAB* y los genes *malE*, *malF* y *malG* del operón *malEFG*. Estos fueron introducidos a la cepa W3110/ *lacZ::pal<sub>Rg</sub>*, *loxP* de *E. coli* de manera individual con el fin de interrumpir dichos genes y generar las cepas con doble integración cromosomal (*lacZ*, *xylAB*<sup>-</sup> y *lacZ malEFG*<sup>-</sup>). La selección de los genotipos *xylAB*<sup>-</sup> y *malEFG*<sup>-</sup> se realiza de manera sencilla utilizando placas de agar MacConkey, el cual contiene un

indicador de pH, adicionado con gentamicina y el 1% del azúcar correspondiente a los genes blanco que codifican a enzimas responsables de la degradación de dicho azúcar, en este caso xilosa y maltosa respectivamente, en las cuales las mutantes en dichos genes muestran colonias pálidas, mientras que las no mutantes presentan colonias de tono rosa brillante (Albermann, 2010). De las transformantes con el producto de PCR con identidad con *malEFG* se seleccionaron colonias “pálidas” y resistentes al antibiótico gentamicina. Se obtuvieron 180 colonias totales de las cuales 100 mostraron fenotipo “pálido”, Gm<sup>R</sup>. En cuanto a las transformantes con el producto de PCR con homología con *xylAB* se obtuvieron más de doscientas colonias totales de las cuales 70 mostraron fenotipo “pálido”, Gm<sup>R</sup>. La integración del casete de resistencia a gentamicina (*aacCI*) flanqueado por sitios *loxP* y del gen *pal<sub>Rg</sub>* bajo control de *P<sub>trc</sub>*, en la región *xylAB* se corroboró mediante amplificación por PCR a partir del DNA aislado de 10 colonias con los fenotipos previamente identificados. Con ese propósito, se utilizaron los siguientes dos pares de oligos: 1) **XylAB:palArv –pal600F** que hibridan en las posiciones 6523 y 2063 respectivamente, y 2) **XylAB:palAfw –pal700R** que hibridan en las posiciones 16 y 2163 respectivamente. Se realizó el mismo procedimiento de comprobación de la integración en la región *malEFG* mediante amplificación por PCR a partir de 10 colonias con fenotipos identificados anteriormente utilizando los siguientes dos pares de oligos: 1) **MalEFG:palArv –pal600F** que hibridan en las posiciones 7114 y 2654 respectivamente, y 2) **MalEFG:palfwd –pal700R** que hibridan en las posiciones 580 y 2754 respectivamente. El análisis del PCR de las candidatas donde se llevó a cabo el evento de intercambio alélico en ambos loci, resultó como se esperaba, en fragmentos de aproximadamente 2 Kb y 4.4 Kb que corresponden con la interrupción *xylAB::pal<sub>Rg</sub>, loxP- aacCI-loxP* y *malEFG::pal<sub>Rg</sub>, loxP- aacCI-loxP*. Las colonias derivadas de W3110 con la integración cromosomal en *xylAB* verificada se nombraron W3110/*LacZ::pal<sub>Rg</sub> xylAB::pal<sub>Rg</sub>, loxP-aacCI-loxP*; mientras que las comprobadas con integración cromosomal en *malEFG* se nombraron W3110/*LacZ::pal<sub>Rg</sub>, malEFG::pal<sub>Rg</sub>, loxP-aacCI-loxP*.

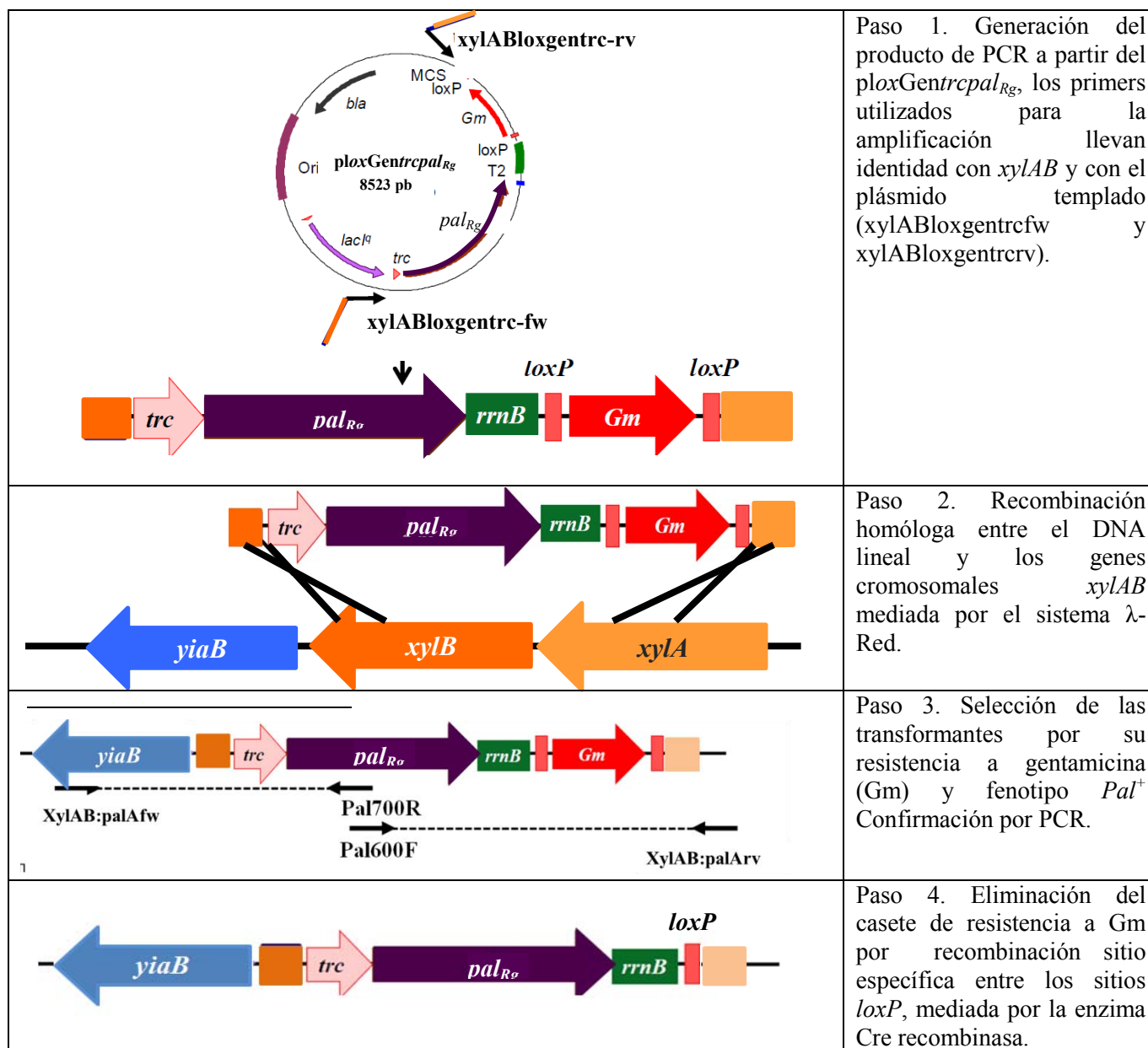
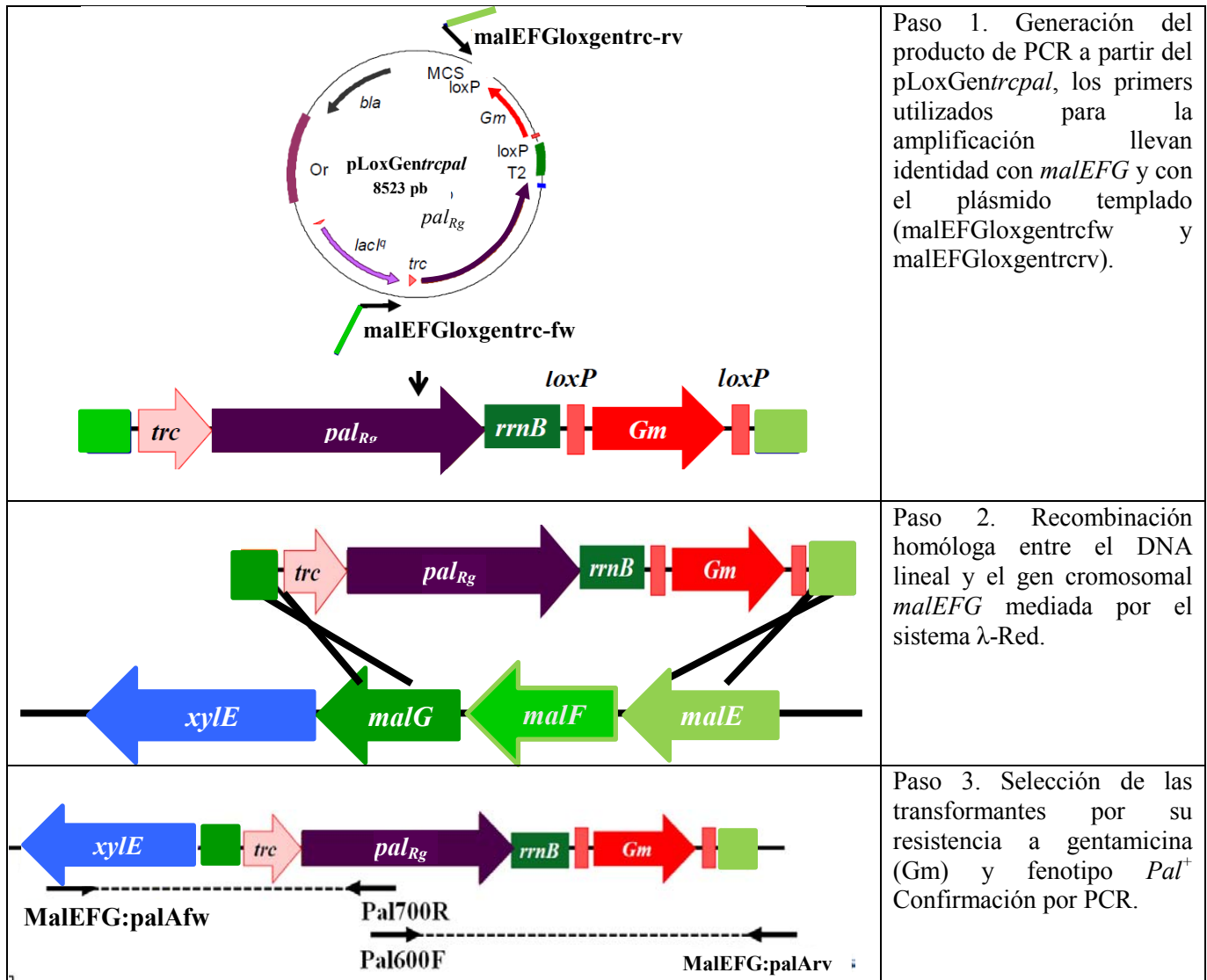


Figura 10. Esquema de la estrategia para llevar a cabo la inactivación de los genes *xylAB* y expresión del gen *pal<sub>Rg</sub>* en el cromosoma de *E. coli*. Modificado de Sabido A. *et al.*, 2012.

### 8.2.3 Integración de *pal* en el locus *malEFG* de la cepa W3110/*LacZ::pal<sub>Rg</sub>*, *xylAB::pal<sub>Rg</sub>*, *loxP* de *E. coli* (tricopia)

De nuevo se utilizó producto de PCR con identidad con la región *malEFG*. Este fue introducido a la cepa W3110/*LacZ::pal<sub>Rg</sub>*, *xylAB::pal<sub>Rg</sub>*, *loxP* de *E. coli* para interrumpir dichos genes y generar la cepa con triple integración cromosomal (*lacZ*, *xylAB*, *malEFG*). El genotipo *malEFG* se seleccionó utilizando placas de agar MacConkey, adicionado con gentamicina y el 1% de maltosa; de acuerdo a los genes blanco que codifican a enzimas responsables de la degradación de dicho azúcar. De las transformantes con el producto de PCR con identidad con *malEFG* se seleccionaron colonias “pálidas” y resistentes al antibiótico gentamicina. Se obtuvieron 60 colonias totales de las

cuales 15 mostraron fenotipo “pálido”, Gm<sup>R</sup>. La integración del casete de resistencia a gentamicina (*aacCI*) flanqueado por sitios *loxP* y del gen *pal<sub>Rg</sub>* bajo control de P<sub>trc</sub>, en la región *malEFG* se comprobó mediante amplificación por PCR a partir de 10 colonias con fenotipos identificados anteriormente utilizando los siguientes dos pares de oligos: 1) **MalEFG:palArv –pal700F** que hibridan en las posiciones 7114 y 2654 respectivamente, y 2) **MalEFG:pal fwd – pal600R** que hibridan en las posiciones 580 y 2754 respectivamente. El análisis del PCR de las candidatas donde se llevó a cabo el evento de intercambio alélico en ambos loci, resultó como se esperaba en fragmentos de aproximadamente 2 Kb y 4.2 Kb, que corresponden con la interrupción *xylAB::pal<sub>Rg</sub>*, *loxP* y *malEFG::pal<sub>Rg</sub>*, *loxP-aacCI-loxP*. Las colonias derivadas de W3110 con la integración cromosomal en *xylAB* y *malEFG* verificada se nombraron W3110/*lacZ::pal<sub>Rg</sub>*, *xylAB::pal<sub>Rg</sub>*, *malEFG::pal<sub>Rg</sub>*, *loxP-aacCI-loxP*.



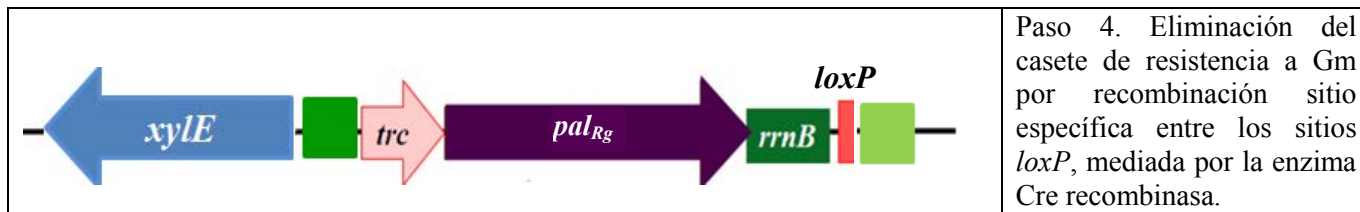


Figura 11. Esquema de la estrategia para llevar a cabo la inactivación de los genes *xylAB* y expresión del gen *pal<sub>Rg</sub>* en el cromosoma de *E. coli*. Modificado de Sabido A. *et al.*, 2012.

### 8.3 Sustitución del gen *pheA* por el casete de resistencia a kanamicina en las cepas con W3110/ *lacZ::pal<sub>Rg</sub>*, *loxP*, W3110/ *lacZ::pal<sub>Rg</sub>*, *malEFG::pal<sub>Rg</sub>*, *loxP*, W3110/ *lacZ::pal<sub>Rg</sub>*, *xylAB::pal<sub>Rg</sub>*, *loxP* y W3110/*lacZ::pal<sub>Rg</sub>* , *xylAB::pal<sub>Rg</sub>*, *malEFG::pal<sub>Rg</sub>*, *loxP*

Se realizó la sustitución del gen *pheA* por el casete de resistencia a kanamicina utilizando la técnica de transducción generalizada con el fago P1 como se describió previamente. En este trabajo la cepa donadora fue una mutante creada en el fondo genético W3110 en la que se sustituyó el gen *pheA* por el casete de resistencia a kanamicina mientras que como cepa receptora se utilizaron las cepas previamente transformadas con el gen *pal<sub>Rg</sub>* y *aacCI* escindido (sensibles a gentamicina). De las transducidas con el lisado de la cepa donadora se seleccionaron colonias resistentes al antibiótico kanamicina.

Los resultados muestran que de la transducción a la cepa donadora W3110/ *lacZ::pal<sub>Rg</sub>*, *loxP* se consiguieron 12 clonas candidatas con fenotipo Kn. Se obtuvieron 11 colonias totales mostrando el fenotipo Kn<sup>R</sup> de las transducidas a la cepa receptora W3110/ *lacZ::pal<sub>Rg</sub>*, *malEFG::pal<sub>Rg</sub>*, *loxP*. De las transducidas a la cepa receptora W3110/ *lacZ::pal<sub>Rg</sub>*, *xylAB::pal<sub>Rg</sub>*, *loxP* se obtuvieron 13 colonias mostrando el fenotipo esperado. Finalmente, se obtuvieron 45 colonias totales mostrando el fenotipo Kn<sup>R</sup> de las transducidas a la cepa receptora W3110/*lacZ::pal<sub>Rg</sub>* , *xylAB::pal<sub>Rg</sub>*, *malEFG::pal<sub>Rg</sub>*, *loxP*.

En todos los casos la integración del casete de resistencia a kanamicina se confirmó mediante amplificación por PCR a partir del DNA aislado de 10 colonias con los fenotipos previamente identificados. Con dicho fin, se utilizó el siguiente par de oligos: 1) **pheAFwdC-pheARevC**. Tras el análisis del PCR de las candidatas donde se llevó a cabo el evento de integración del casete de resistencia a Kn, se seleccionaron a las candidatas presentando el fragmento esperado de aproximadamente 2.4 Kb que corresponden con la interrupción de *pheA*. Las candidatas derivadas de las cepas receptoras W3110/ *lacZ::pal<sub>Rg</sub>*, *loxP-aacCI-loxP* (1), W3110/ *lacZ::pal<sub>Rg</sub>*, *malEFG::pal<sub>Rg</sub>*, *loxP-aacCI-loxP* (2), W3110/ *lacZ::pal<sub>Rg</sub>*, *xylAB::pal<sub>Rg</sub>*, *loxP-aacCI-loxP* (3) y W3110/ *lacZ::pal<sub>Rg</sub>*, *xylAB::pal<sub>Rg</sub>*, *malEFG::pal<sub>Rg</sub>*, *loxP-aacCI-loxP* (4) que presentaron resistencia

a Kn e interrupción verificada se nombraron: W3110/ *lacZ::pal<sub>Rg</sub>, kn::pheA, loxP* (5), W3110/ *lacZ::pal<sub>Rg</sub>, malEFG::pal<sub>Rg</sub>, kn::pheA, loxP* (6), W3110/ *lacZ::pal<sub>Rg</sub>, xylAB::pal<sub>Rg</sub>, kn::pheA, loxP*(7) y W3110/ *lacZ::pal<sub>Rg</sub>, xylAB::pal<sub>Rg</sub>, malEFG::pal<sub>Rg</sub>, kn::pheA, loxP*(8) respectivamente.

#### **8.4 Efecto de la expresión monocopia, dicopia y tricopia del gen heterólogo *pal<sub>Rg</sub>* en el cromosoma de la cepa silvestre W3110 de *E. coli* sobre su capacidad de sintetizar CA y pHCA**

En este trabajo, se estudió el efecto que tiene la inserción multicopia (monocopia, dicopia y tricopia) del gen *pal<sub>Rg</sub>* sobre la producción de pHCA y CA en varias cepas derivadas W3110 con integración simple o múltiple. En las cepas generadas W3110 con inserción del gen *pal<sub>Rg</sub>*, se inactivó por remoción al gen *pheA*. Se caracterizó en las mutantes generadas, la cinética de crecimiento, la producción de CA y pHCA y la estequiometría del consumo de la glucosa.

Una vez generadas, se llevó a cabo la caracterización de la cepas 1-8, las cuales expresan a nivel monocopia, dicopia y tricopia, el gen *pal<sub>Rg</sub>*, bajo el control del promotor fuerte  $P_{trc}$ ; y en el caso de las cepas 5, 6, 7 y 8 el gen *pheA* interrumpido por el casete de resistencia a kanamicina. Todas las cepas generadas en este trabajo contaban con el plásmido pJLBaroG<sup>fbr</sup>*tktA* el cual contiene el gen *aroG<sup>fbr</sup>* que codifica una versión mutante insensible a inhibición alostérica (fbr, por las siglas en inglés “feedback resistant”) de la isoenzima AroG de DAHPS); y el gen *tktA* el cual codifica para la enzima transcetolasa, cuya sobreexpresión incrementa la disponibilidad del precursor aromático E4P (Baez *et al.*, 2001).

La presencia del gen silvestre *lacI* en el cromosoma de *E. coli*, regula de manera negativa a *trc* y por lo tanto la expresión de *pal<sub>Rg</sub>*, por lo que es necesaria la adición al medio de cultivo del inductor gratuito IPTG. Asimismo, se caracterizaron la cepa W3110/*ptrcpal*, la cual expresa el gen *pal<sub>Rg</sub>* en multicopia así como el promotor *trc* y la cepa W3110/*pLoxGentrcpal*, expresando el gen *pal<sub>Rg</sub>* en multicopia, en este caso el plásmido posee tanto la versión mutante del represor LacI, así como la versión cromosomal silvestre de LacI, lo que hace la expresión del gen de interés igualmente regulable.

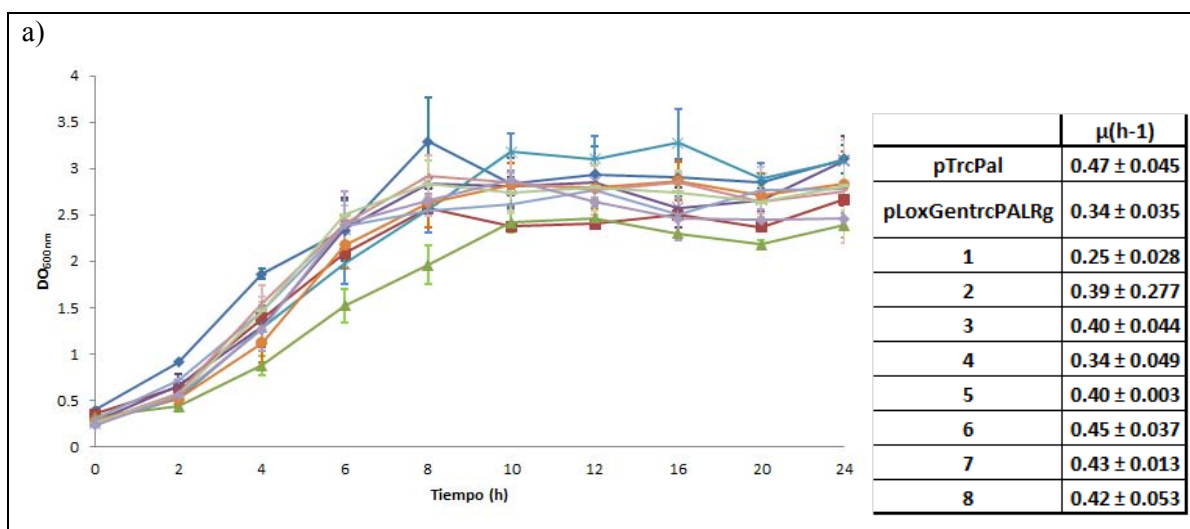
Como se observa en la gráfica de crecimiento (Figura 12-a), la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) más alta pertenece a la cepa W3110 /*pTrcPal*; cuando la cepa W3110 se transforma con el plásmido *pLoxGentrcpal<sub>Rg</sub>* la  $\mu$  disminuye en un 28% respecto a la cepa con el plásmido *pTrcPal*. Lo anterior es resultado del efecto de carga metabólica impuesta por la replicación y expresión de genes en el plásmido. Respecto a las cepas con integración monocopia, dicopia y tricopia y monocopia, dicopia

y tricopia con el gen *pheA* interrumpido, se puede observar que en ambos casos las cepas con integración, monocopia y monocopia *pheA*-, son las que presentan una  $\mu$  menor en relación con el resto de las cepas con multicopia y multicopia *pheA*-. Al comparar ambos grupos (con y sin interrupción de *pheA*) se observa que las cepas pertenecientes al grupo *pheA*- tienen una  $\mu$  mayor comparada con las que no lo tienen. Esto debido probablemente a los antibióticos utilizados durante las cinéticas de crecimiento, para las cepas 5, 6, 7 y 8 se utilizó kanamicina, mientras que para las 1, 2, 3 y 4 se utilizó el gentamicina, el cual es un antibiótico más fuerte.

Comparando las cepas 1, 2, 3, y 4 con las cepas con el gen *pal<sub>Rg</sub>* en el plásmido pTrcPal se observa que a partir de la segunda integración la  $\mu$  de las cepas 2, 3 y 4 se recupera en un 83%, 85% y 72% respectivamente en relación con la cepa W3110/pTrcPal, esto debido a que la célula ya no tiene que contender con la carga metabólica. En el caso de la cepa 1, es probable que su  $\mu$  se haya visto disminuida debido a que al ser integración monocopia solo cuenta con una copia del gen *aaaC* la cual no es suficiente para producir la gentamicin acetiltransferasa necesaria para contender con la concentración de gentamicina utilizada en este ensayo sin reducir su tasa de crecimiento.

Por otro lado, las cepas 5, 6, 7 y 8 presentan tasas de crecimiento mayores a la cepa W3110/*ploxGentrcpal<sub>Rg</sub>* y a las cepas *pheA*+ esto debido a que la carga metabólica es menor que para la cepa W3110/*ploxGentrcpal<sub>Rg</sub>*, y que fueron crecidas en medio de cultivo con kanamicina en lugar de gentamicina.

En cuanto a la producción de pHCA y CA, se producen durante la fase exponencial lo que indica que la enzima PAL/TAL se produce durante esta fase y son excretados al medio.





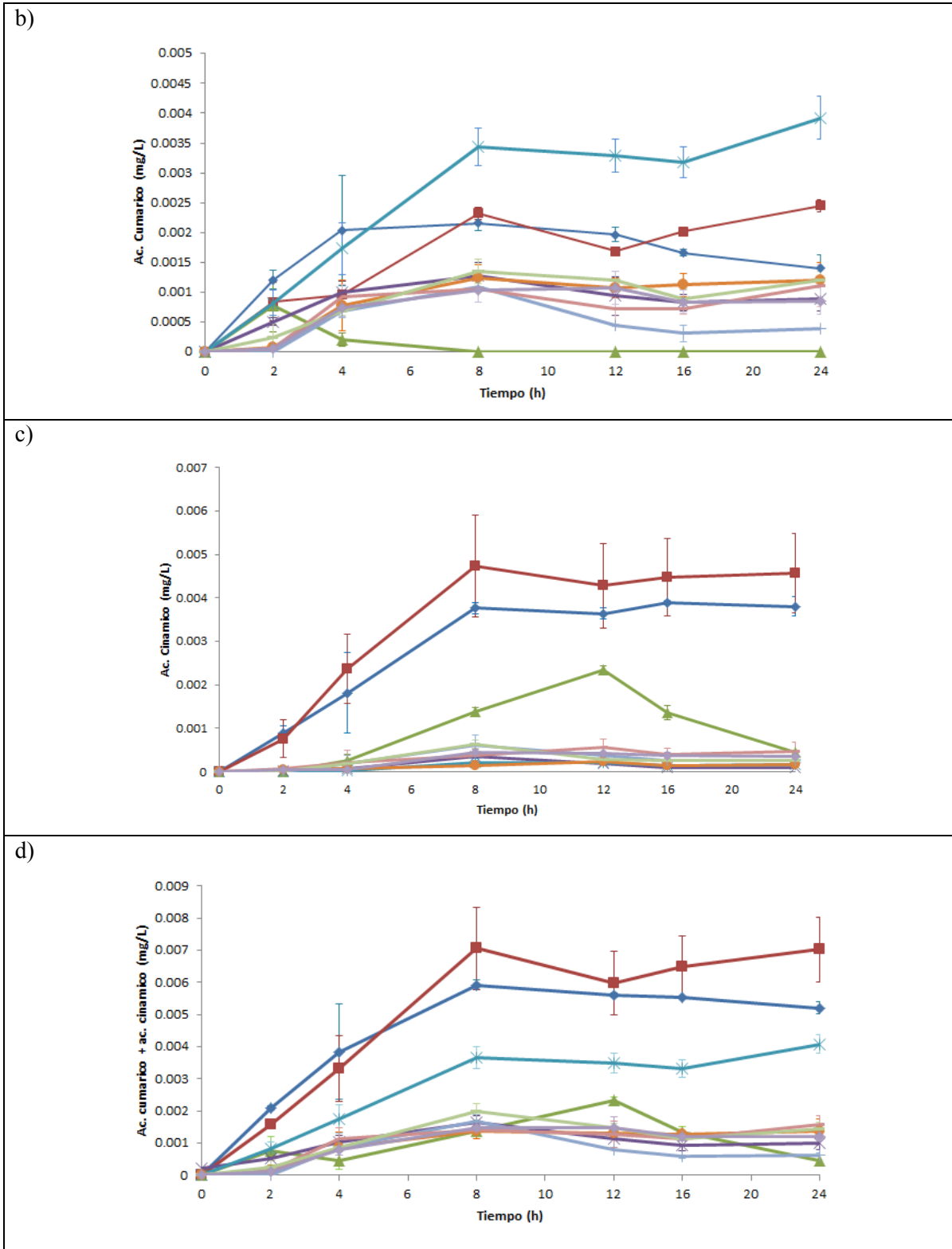





Figura 12. Caracterización de a) crecimiento, b) producción de pHCA, c) producción de CA y d) producción de pHCA+CA en las cepas que expresan el gen heterólogo *pal<sub>Rg</sub>* a nivel multicopia  $\blacklozenge$  W3110/pTrcPal y  $\blacksquare$  W3110/pLoxGentrcpal<sub>Rg</sub>, monocopia  $\blacktriangle$  W3110/lacZ::pal<sub>Rg</sub>, loxP-aacCI-loxP, dicopia  $\blacklozenge$  W3110/lacZ::pal<sub>Rg</sub>, malEFG::pal<sub>Rg</sub>, loxP-aacCI-loxP,  $\blacktriangle$  W3110/lacZ::pal<sub>Rg</sub>, xylAB::pal<sub>Rg</sub>, loxP-aacCI-loxP y tricopia  $\blacklozenge$  W3110/lacZ::pal<sub>Rg</sub>, xylAB::pal<sub>Rg</sub>, malEFG::pal<sub>Rg</sub>, loxP-aacCI-loxP y *pheA*; monocopia  $\blacktriangle$  W3110/lacZ::pal<sub>Rg</sub>

kn::*pheA*, *loxP*, dicopia  W3110/ *lacZ*::*pal*<sub>Rg</sub>, *malEFG*::*pal*<sub>Rg</sub>, kn::*pheA*, *loxP*,  W3110/ *lacZ*::*pal*<sub>Rg</sub>, *xylAB*::*pal*<sub>Rg</sub>, kn::*pheA*, *loxP* y tricopia  W3110/ *lacZ*::*pal*<sub>Rg</sub>, *xylAB*::*pal*<sub>Rg</sub>, *malEFG*::*pal*<sub>Rg</sub>, kn::*pheA*, *loxP*(8). Experimentos hechos por duplicado en medio mineral M9 suplementado con 10 g/L de glucosa, 0.1 mM IPTG y 40 µg/ml CuSO<sub>4</sub>.

Por su parte, todas las cepas generadas entran en fase estacionaria alrededor de la hora 8 (Figura 12-a), tiempo en el cual también se consigue la máxima cantidad de pHCA y CA (se toman en cuenta ambos valores debido a la actividad PAL/TAL de la enzima). La velocidad específica de producción de ácido cumárico ( $q_{pHCA}$ ) en la cepa W3110/ *lacZ*::*pal*<sub>Rg</sub> *LacZ*::*xylAB*, *loxP-aacCI-loxP*, incrementa en un 32% con respecto a la cepa W3110/pLoxGentrcpal<sub>Rg</sub> (Tabla E).

Respecto a la producción de CA, la cepa con integración cromosomal con mayor producción fue la 1, acumulando 0.61 µg/L de CA a la hora 8 de cultivo lo cual corresponde a un decremento del 70% comparado con la cepa W3110/pLoxGentrcpal. La velocidad específica de producción de CA ( $q_{CA}$ ) en la cepa decremента en un 43% (tabla E).

Tabla E. Comparación de parámetros cinéticos entre las diferentes cepas generadas en este estudio. DW: peso seco. Siendo W3110/ lacZ::palRg, loxP-aacC1-loxP (1), W3110/ lacZ::palRg, malEFG::palRg, loxP-aacC1-loxP (2), W3110/ lacZ::palRg, xylAB::palRg, loxP-aacC1-loxP (3) y W3110/ lacZ::palRg, xylAB::palRg, malEFG::palRg, loxP-aacC1-loxP (4), W3110/ lacZ::palRg, kn::pheA, loxP (5), W3110/ lacZ::palRg, malEFG::palRg, kn::pheA, loxP (6), W3110/ lacZ::palRg, xylAB::palRg, kn::pheA, loxP(7) y W3110/ lacZ::palRg, xylAB::palRg, malEFG::palRg, kn::pheA, loxP(8).

		W3110/ pTrcPal	W3110/ pLoxGentrc <i>pal<sub>Rg</sub></i>	1	2	3	4	5	6	7	8
Fase exponencial	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.47 ± 0.045	0.34 ± 0.035	0.25 ± 0.028	0.39 ± 0.277	0.40 ± 0.044	0.34 ± 0.049	0.40 ± 0.003	0.45 ± 0.037	0.43 ± 0.013	0.42 ± 0.053
Fase estacionaria	pHCA ( $\mu$ g/L)	2.16 ± 0.161	2.32 ± 0.167	0.00143 ± 0.001	1.28 ± 0.208	3.44x ± 0.306	1.23 ± 0.222	1.08 ± 0.003	1.04 ± 0.053	1.34 ± 0.207	1.03 ± 0.198
	Q <sub>pHCA</sub> (mg pHCA/g DW x h)	2.22 x10 <sup>-4</sup> ± 1.086 x10 <sup>-4</sup>	3.06 x10 <sup>-4</sup> ± 0.249 x10 <sup>-4</sup>	0.00026 x10 <sup>-4</sup> ± 0.001 x10 <sup>-4</sup>	1.52x10 <sup>-4</sup> ± 0.281 x10 <sup>-4</sup>	4.52 x10 <sup>-4</sup> ± 0.044 x10 <sup>-4</sup>	1.58 x10 <sup>-4</sup> ± 0.325 x10 <sup>-4</sup>	1.43 x10 <sup>-4</sup> ± 0.020 x10 <sup>-4</sup>	1.21 x10 <sup>-4</sup> ± 0.015 x10 <sup>-4</sup>	1.60 x10 <sup>-4</sup> ± 0.302 x10 <sup>-4</sup>	1.31 x10 <sup>-4</sup> ± 0.287 x10 <sup>-4</sup>
	Y <sub>pHCA/glu</sub>	4.85 x10 <sup>-4</sup> ± 0.005 x10 <sup>-4</sup>	6.31 x10 <sup>-4</sup> ± 0.831 x10 <sup>-4</sup>	0.006 x10 <sup>-4</sup> ± 0.005 x10 <sup>-4</sup>	1.93094 x10 <sup>-4</sup> ± 0.831 x10 <sup>-4</sup>	8.46 x10 <sup>-4</sup> ± 1.662 x10 <sup>-4</sup>	2.67x10 <sup>-4</sup> ± 0.681 x10 <sup>-4</sup>	2.05 x10 <sup>-4</sup> ± 0.290 x10 <sup>-4</sup>	1.88 x10 <sup>-4</sup> ± 0.355 x10 <sup>-4</sup>	2.09 x10 <sup>-4</sup> ± 0.842 x10 <sup>-4</sup>	1.82x10 <sup>-4</sup> ± 0.463 x10 <sup>-4</sup>
	CA ( $\mu$ g/L)	3.76 ± 0.014	4.73 ± 2.029	1.39 ± 0.139	0.36 ± 0.023	0.22 ± 0.078	0.15 ± 0.041	0.61 ± 0.019	0.38 ± 0.061	0.63 ± 0.093	0.44 ± 0.88
	Q <sub>CA</sub> (mg CA/g DW x h)	3.87 x10 <sup>-4</sup> ± 0.127	6.22 x10 <sup>-4</sup> ± 2.789 x10 <sup>-4</sup>	3.53 x10 <sup>-4</sup> ± 1.617 x10 <sup>-4</sup>	0.43 x10 <sup>-4</sup> ± 0.019 x10 <sup>-4</sup>	0.28 x10 <sup>-4</sup> ± 0.087	0.19 x10 <sup>-4</sup> ± 0.022 x10 <sup>-4</sup>	0.80 x10 <sup>-4</sup> ± 0.365 x10 <sup>-4</sup>	0.43 x10 <sup>-4</sup> ± 0.012 x10 <sup>-4</sup>	0.75 x10 <sup>-4</sup> ± 0.299 x10 <sup>-4</sup>	0.56 x10 <sup>-4</sup> ± 0.110 x10 <sup>-4</sup>
	Y <sub>CA/glu</sub>	8.45 x10 <sup>-4</sup> ± 0.934	12.88 x10 <sup>-4</sup> ± 6.44 x10 <sup>-4</sup>	5.16 x10 <sup>-4</sup> ± 0.092 x10 <sup>-4</sup>	0.75 x10 <sup>-4</sup> ± 0.138 x10 <sup>-4</sup>	0.53 x10 <sup>-4</sup> ± 0.231 x10 <sup>-4</sup>	0.32 x10 <sup>-4</sup> ± 0.081 x10 <sup>-4</sup>	1.15 x10 <sup>-4</sup> ± 0.129 x10 <sup>-4</sup>	0.69 x10 <sup>-4</sup> ± 0.044 x10 <sup>-4</sup>	0.98 x10 <sup>-4</sup> ± 0.351 x10 <sup>-4</sup>	0.78 x10 <sup>-4</sup> ± 0.187 x10 <sup>-4</sup>
	pHCA+CA( $\mu$ g/L)	5.92 ± 0.182	7.05 ± 2.195	1.39 ± 0.318	1.64 ± 0.196	3.65 ± 0.275	1.38 ± 0.227	1.69 ± 0.023	1.45 ± 0.032	1.97 ± 0.252	1.47 ± 0.132
	Q <sub>pHCA+CA</sub> (mg Cum+cin/g DW x h)	6.08 x10 <sup>-4</sup> ± 0.001	9.28 x10 <sup>-4</sup> ± 3.039 x10 <sup>-4</sup>	3.53 x10 <sup>-4</sup> ± 0.275 x10 <sup>-4</sup>	1.95 x10 <sup>-4</sup> ± 0.274 x10 <sup>-4</sup>	4.81 x10 <sup>-4</sup> ± 0.102 x10 <sup>-4</sup>	1.78 x10 <sup>-4</sup> ± 0.307 x10 <sup>-4</sup>	1.07 x10 <sup>-4</sup> ± 0.05 x10 <sup>-4</sup>	1.65 x10 <sup>-4</sup> ± 0.114 x10 <sup>-4</sup>	5.05 x10 <sup>-4</sup> ± 0.346 x10 <sup>-4</sup>	1.87 x10 <sup>-4</sup> ± 0.220 x10 <sup>-4</sup>
	Y <sub>pHCA+CA</sub> (%)	13.3 x10 <sup>-4</sup> ± 0.934 x10 <sup>-4</sup>	19.19 x10 <sup>-4</sup> ± 7.3456 x10 <sup>-4</sup>	5.163 x10 <sup>-4</sup> ± 1.479 x10 <sup>-4</sup>	3.39 x10 <sup>-4</sup> ± 0.934 x10 <sup>-4</sup>	8.99 x10 <sup>-4</sup> ± 1.761 x10 <sup>-4</sup>	2.99 x10 <sup>-4</sup> ± 0.652 x10 <sup>-4</sup>	3.19 x10 <sup>-4</sup> ± 0.419 x10 <sup>-4</sup>	2.56 x10 <sup>-4</sup> ± 0.390 x10 <sup>-4</sup>	3.07 x10 <sup>-4</sup> ± 1.184 x10 <sup>-4</sup>	2.59 x10 <sup>-4</sup> ± .367 x10 <sup>-4</sup>

El análisis de ANOVA y Welch llevado a cabo con el programa IBM SPSS Statistics 20 permitió discernir cuáles fueron las inserciones que tienen un efecto estadísticamente significativo en la producción de pHCA, CA y la suma de ambos (CA+pHCA) en las cepas 1-10. Este análisis se hizo comparando la cepa de referencia W3110/pLoxGentrcpal<sub>Rg</sub> contra cada una de las mutantes generadas.

Al comparar la cepa de referencia W3110/pLoxGentrcpal<sub>Rg</sub> con el resto de las cepas con inserción cromosomal (1, 2, 3, 4 y 5, 6, 7, 8), estas mutantes mostraron diferencias significativas en los parámetros evaluados, excepto en los valores de tasa de crecimiento ( $\mu$ ). Para saber en qué grupos son estadísticamente significativas las diferencias se realizó la prueba de Bonferroni (Tabla F).

Comparando la cantidad de CA+pHCA acumulado usando como referencia la cepa W3110/pLoxGentrcpal, se obtiene que todas las cepas tienen diferencia significativa con la misma. Realizando el análisis comparativo utilizando a las cepas con integración cromosomal como cepa de referencia, se encontró que las cepas (monocopia, dicopia, tricopia y *pheA*-) tienen un máximo acumulado de CA+pHCA similar en todos los casos, siendo la cepa con plásmido la única cepa con diferencia significativa, lo que indica que hasta la integración tricopia no se genera suficiente de CA y pHCA para igualar o superar la producción total de productos de la reacción enzimática de la PAL<sub>Rg</sub> en la cepa W3110/pLoxGentrcpal<sub>Rg</sub> bajo las condiciones de este estudio. Lo anterior podría explicarse debido a que generalmente es necesario un nivel de expresión alto de los genes de interés para producir grandes cantidades de la proteína requerida (en este caso PAL<sub>Rg</sub>); el plásmido pLoxGentrcpal es un plásmido de alto número de copias (20 copias (Sabido, 2009)), lo que significa que se tiene el gen *pal* en multicopia, por lo que es lógico pensar que se alcanza un nivel de expresión alto, en cambio las integraciones a cromosoma al ser monocopia, dicopia y tricopia es un número bajo de copias por lo que su nivel de expresión no es suficiente para producir las cantidades de PAL/TAL requerida para llevar a cabo las reacciones de bioconversión y obtener una cantidad de producto acumulado similar o superior al de las cepas con el gen en plásmido.

Analizando la cantidad de compuesto acumulado de manera individual, las cepas 2, 3, 4, 5 y 7 mostraron un valor de pHCA acumulado similar a la cepa W3110/pLoxGentrcpal, lo que sugiere que basta con dos copias del mismo gen integradas a cromosoma para obtener una cantidad similar de pHCA a la obtenida con el plásmido pLoxGentrcpal. Sin embargo al ser usada la cepa 3 como cepa de referencia de pHCA de máximo acumulado, la única cepa con valores parecidos es la W3110/pLoxGentrcpal (datos no mostrados), lo que indica que la doble integración cromosomal en los loci *lacZ* y *xylAB* es la mejor estrategia para incrementar la producción de ácido cumárico bajo las condiciones en este estudio.

Respecto al máximo acumulado de ácido cinámico utilizando como referencia a la cepa W3110/pLoxGentrcpal<sub>Rg</sub> se encontró que todas las cepas tienen diferencia significativa con la misma. Realizando el análisis comparado usando las cepas con integración cromosomal como cepa de referencia se encontró que las cepas (monocopia, dicopia, tricopia y *pheA*-) tienen un máximo acumulado de CA similar en todos los casos, siendo la cepa con plásmido la única con diferencia significativa, lo que indica que hasta la integración tricopia no se genera suficiente CA para igualar o superar la producción de ácido cinámico bajo las condiciones de este estudio.

Es interesante resaltar que pese a que el CA acumulado es estadísticamente similar, se observan valores mayores en las cepas *pheA*-, las cuales se esperaba fueran menores que las cepas con el gen *pheA* silvestre debido a que esta inactivación impide la síntesis de fenilalanina y por tanto de CA, aumentando el flujo de carbono hacia la síntesis de tirosina. Sin embargo, al ser la L- Fen un aminoácido esencial fue necesario suplementar el cultivo con 0.25 g/L de este compuesto. Sabiendo que la actividad catalítica hacia L- Fen es mayor que hacia L-Tir, y que la actividad de PAL<sub>Rg</sub> disminuye rápidamente durante el proceso de bioconversión (Macdonald, 2007) es lógico pensar que la PAL/TAL tomo como sustrato la L- Fen suplementada llevando a cabo su bioconversión a CA, lo que disminuyó su actividad catalítica dando como resultado una mayor cantidad de CA con respecto al ácido cumárico.

**Tabla F. Tabla de diferencias significativas, prueba de Bonferroni tomando la cepa W3110/pLoxGentrcpalRg como referencia. El símbolo \* marca los parámetros con diferencias significativas respecto a, W3110/pLoxGentrcpalRg — marca los parámetros que no muestran diferencias significativas respecto a W3110/pLoxGentrcpalRg.**

		W3110/pLox Gentrcpal <sub>Rg</sub>	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Fase exponencial</b>	$\mu$ (h-1)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<b>Fase estacionaria</b>	pHCA ( $\mu$ g/L)	—	*	—	—	—	—	*	—	*
	$Q_{pHCA}$ (mg pHCA/g DW x h)	—	*	—	—	*	*	*	*	*
	$Y_{pHCA/glu}$	—	*	—	—	—	—	*	—	—
	CA ( $\mu$ g/L)	—	*	*	*	*	*	*	*	*
	$Q_{CA}$ (mg CA/g DW x h)	—	—	*	*	*	*	*	*	*
	$Y_{CA/glu}$	—	*	—	—	—	—	—	—	—
	pHCA+CA( $\mu$ g/L)	—	*	*	*	*	*	*	*	*
	$Q_{pHCA+CA}$ (mg Cum+cin/g DW x h)	—	*	*	*	*	*	*	*	*
	$Y_{pHCA+CA}$ (%)	—	*	*	*	*	*	*	*	*

El hecho de que existan diferencias significativas en la producción de CA parece indicar que la diferencia en el producto total acumulado de la reacción catalítica de PAL/TAL entre la cepa W3110/pLoxGentrcpal y las cepas con integración a cromosoma radica en la cantidad de ácido cinámico acumulado en las diferentes cepas.

La integración en cromosoma parece ser una estrategia viable para la producción de pHCA en comparación con la expresión en plásmido, además de superar problemas como la segregación y la carga metabólica.

## 9. Conclusiones

---

- Se construyó el plásmido de expresión pLoxGentrcpal<sub>Rg</sub>, el cual se utilizó como templado de PCR, para lograr la integración y expresión del gen *pal*<sub>Rg</sub> en el cromosoma de *E. coli*.
- El uso del plásmido pLoxGentrcpal<sub>Rg</sub>, permitió expresar el gen *pal*<sub>Rg</sub> tanto a nivel multicopia (en plásmido) como en monocopia, dicopia y tricopia.
- Se lograron integrar 3 copias simultáneas de *pal*<sub>Rg</sub> en el cromosoma de *E. coli* en los loci *lacZ*, *xylAB* y *malEFG* generando cepas productoras de pHCA y CA con la capacidad de crecer y sintetizar estos metabolitos.
- La concentración de CA + pHCA se redujo en aproximadamente 1/3 contra plásmido al integrar una copia.
- La integración a cromosoma de dos copias del gen heterólogo *pal*<sub>Rg</sub> bajo el control del promotor P<sub>trc</sub> en los loci *lacZ* y *xylAB* resultó ser la mejor estrategia para la producción de pHCA, lográndose un título 32% mayor que el alcanzado en la cepa W3110/pLoxGentrcpal<sub>Rg</sub>.
- La q<sub>pHCA</sub> en la cepa W3110/*LacZ::Pal*<sub>Rg</sub> *LacZ::xylAB*, *loxP-aacCI-loxP*, incrementó un 33% comparada con la cepa pLoxGentrcpal<sub>Rg</sub>, que expresa *pal*<sub>Rg</sub> en plásmido.
- Pese a que la cepa W3110/*LacZ::pal*<sub>Rg</sub> *xylAB::pal*<sub>Rg</sub>, *loxP-aacCI-loxP* tiene la mayor producción de pHCA de todas las cepas evaluadas bajo estas condiciones no se observa un incremento significativo en el nivel total de producción de productos de la reacción de PAL<sub>Rg</sub> (CA+pHCA) al integrar 1, 2 o 3 copias de gen *pal*<sub>Rg</sub> en comparación con las cepas que expresan este gen en plásmido.

- Al inactivar *pheA* no se observó un incremento en la relación pHCA/CA, pero se encuentra una mayor cantidad de CA con respecto a pHCA.

## 10. Perspectivas

---

- Realizar Western blot, Northern blot y qRT-PCR para medir la expresión del gen *pal* en las diferentes integraciones.
- Realizar más integraciones cromosomales del gen *pal<sub>Rg</sub>* para determinar el número de copias necesario para alcanzar una producción similar de CA+pHCA a la cepa con la expresión del gen en plásmido multicopia (W3110/pLoxGentrcpal<sub>Rg</sub>).
- Realizar modificaciones para mejorar estas cepas, como por ejemplo: *pts-* (El sistema de fosfotransferasa transporta y fosforila a la glucosa, además de otros azúcares específicos. En *E. coli*, la glucosa se transporta al citoplasma y se fosforila, por sistema de fosfotransferasa (PTS)).
- Con la finalidad de incrementar la productividad y el rendimiento en las cepas pLoxGentrcpal<sub>Rg</sub> y W3110/*LacZ::pal<sub>Rg</sub>*, *xylAB::pal<sub>Rg</sub>*, *loxP-aacCI-loxP*, evaluar a nivel fermentador la síntesis de pHCA, bajo condiciones reguladas de oxígeno y de pH.

## 11. Bibliografía

---

1. Albermann, C., Trachtmann, N., and Sprenger, G.A. A simple and reliable method to conduct and monitor expression cassette integration into the *Escherichia coli* chromosome. *Biotechnology journal* 5, 1 (2010), 32–38.
2. Báez-Viveros, J.L., Osuna, J., Hernández-Chávez, G., Soberón, X., Bolívar, F., and Gosset, G. Metabolic engineering and protein directed evolution increase the yield of L-phenylalanine synthesized from glucose in *Escherichia coli*. *Biotechnology and bioengineering* 87, 4 (2004), 516–524.
3. Balderas-Hernández, V.E., Sabido-Ramos, A., Silva, P., et al. Metabolic engineering for improving anthranilate synthesis from glucose in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 8, (2009), 19.
4. Bimboim, H. a. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, (1979), 1513-1523.

5. Bongaerts, J., Krämer, M., Müller, U., Raeven, L., and Wubbolts, M. Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds. *Metabolic engineering* 3, 4 (2001), 289–300.
6. Brown, M., Collier, P., and Gilbert, P. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: modification of the cell envelope and batch and continuous culture studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34, 9 (1990), 1623.
7. Chávez-Béjar, M.I., Lara, A.R., López, H., *et al.* Metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-tyrosine production by expression of genes coding for the chorismate mutase domain of the native chorismate mutase-prephenate dehydratase and a cyclohexadienyl dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. *Applied and environmental microbiology* 74, 10 (2008), 3284–3290.
8. Colquhoun, T.A. Delineating compartmentalized control of phenylpropanoid metabolism. *Journal of chemical ecology* 38, 3 (2012), 230–230.
9. Evans, C.T., Hanna, K., Conrad, D., Peterson, W., and Misawa, M. Production of phenylalanine ammonia-lyase (PAL): isolation and evaluation of yeast strains suitable for commercial production of L-phenylalanine. *Applied microbiology and biotechnology* 25, 5 (1987), 406–414.
10. Fuentes, L.G., Lara, A.R., Martínez, L.M., *et al.* Modification of glucose import capacity in *Escherichia coli*: physiologic consequences and utility for improving DNA vaccine production. *Microbial cell factories* 12, 1 (2013), 42.
11. Fukiya, S., Mizoguchi, H., and Mori, H. An improved method for deleting large regions of *Escherichia coli* K-12 chromosome using a combination of Cre/loxP and lambda Red. *FEMS microbiology letters* 234, 2 (2006), 325–331.
12. Glick, B.R. Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnology advances* 13, 2 (1995), 247–261.
13. Gosset, G. Production of aromatic compounds in bacteria. *Current opinion in biotechnology* 20, 6 (2009), 651–658.
14. Hayashi, K., Morooka, N., Yamamoto, Y., *et al.* Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Molecular systems biology* 2, 1 (2006).
15. Herrmann, K.M. The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The Plant Cell* 7, 7 (1995), 907.
16. Ikeda, M. Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering. *Applied microbiology and biotechnology* 69, 6 (2006), 615–626.



17. Kolisnychenko, V., Plunkett, G., Herring, C.D., et al. Engineering a reduced *Escherichia coli* genome. *Genome research* 12, 4 (2002), 640–647.
18. Kyndt, J., Meyer, T., Cusanovich, M., and Van Beeumen, J. Characterization of a bacterial tyrosine ammonia lyase, a biosynthetic enzyme for the photoactive yellow protein. *FEBS letters* 512, 1 (2002), 240–244.
19. Le Borgne, S., Palmeros, B., Valle, F., Bolivar, F., and Gosset, G. pBRINT-T s: a plasmid family with a temperature-sensitive replicon, designed for chromosomal integration into the lacZ gene of *Escherichia coli*. *Gene* 223, 1 (1998), 213–219.
20. MacDonald, M.J. and D’Cunha, G.B. A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochemistry and Cell Biology* 85, 3 (2007), 273–282.
21. Muñoz, A.J., Hernández-Chávez, G., de Anda, R., Martínez, A., Bolívar, F., and Gosset, G. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for improving L-3, 4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) synthesis from glucose. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 38, 11 (2011), 1845–1852.
22. Nielsen, J. Metabolic engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55, 3 (2001), 263–283.
23. Orencio-Trejo, M., Utrilla, J., Fernández-Sandoval, M., Huerta-Beristain, G., Gosset, G., and Martinez, A. Engineering the *Escherichia coli* fermentative metabolism. In *Biosystems Engineering II*. Springer, 2010, 71–107.
24. Palmeros, B., Wild, J., Szybalski, W., et al. A family of removable cassettes designed to obtain antibiotic-resistance-free genomic modifications of *Escherichia coli* and other bacteria. *Gene* 247, 1 (2000), 255–264.
25. Sabido, A., Martínez, L.M., de Anda, R., Martínez, A., Bolívar, F., and Gosset, G. A novel plasmid vector designed for chromosomal gene integration and expression: Use for developing a genetically stable *Escherichia coli* melanin production strain. *Plasmid* 69, 1 (2013), 16–23.
26. Sato, T., Kiuchi, F., and Sankawa, U. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase by cinnamic acid derivatives and related compounds. *Phytochemistry* 21, 4 (1982), 845–850.
27. Tomoya Baba, T. A. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*.
28. Vannelli, T., Wei Qi, W., Sweigard, J., Gatenby, A.A., and Sariaslani, F.S. Production of p-hydroxycinnamic acid from glucose in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* by expression of heterologous genes from plants and fungi. *Metabolic engineering* 9, 2 (2007), 142–151.

29. Vargas-Tah, A., Martínez, L.M., Hernández-Chávez, G., *et al.* Production of cinnamic and p-hydroxycinnamic acid from sugar mixtures with engineered *Escherichia coli*. *Microbial cell factories*, 1 (2015), 6.
30. Xue, Z., McCluskey, M., Cantera, K., Ben-Bassat, A., Sariaslani, F.S., and Huang, L. Improved production of p-hydroxycinnamic acid from tyrosine using a novel thermostable phenylalanine/tyrosine ammonia lyase enzyme. *Enzyme and Microbial Technology* 42, 1 (2007), 58–64.
31. Zhu, L., Cui, W., Fang, Y., Liu, Y., Gao, X., and Zhou, Z. Cloning, expression and characterization of phenylalanine ammonia-lyase from *Rhodotorula glutinis*. *Biotechnology letters* 35, 5 (2013), 751–756.