



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudio del Efecto de la Inactivación del
Sistema AaeXAB de *Escherichia coli* Sobre la
Capacidad de Síntesis de Ácido Cafeico**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

RAÚL ALEJANDRO CALZADA HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. GUILLERMO GOSSET LAGARDA

Ciudad Universitaria, CDMX, 2023





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos académicos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Ciencias y al Instituto de Biotecnología, por ser los pilares esenciales en mi formación académica.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT /UNAM a través del proyecto IT200217.

Al Dr. Guillermo Gosset Lagarda por aceptarme en su grupo de investigación y guiarme en el desarrollo de este proyecto con sus valiosas y objetivas observaciones.

Al Dr. José Luis Puente García por su invaluable apoyo y orientación en el Taller: La Biología a partir de las biomoléculas; nuevos paradigmas y aplicaciones, coordinado en Facultad de Ciencias y el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

A la Dra. Alejandra Vargas-Tah por su guía en los métodos de evaluación de bioprocesos.

A la Q.I Luz María Martínez Mejía por su apoyo técnico en los protocolos de Biología Molecular desarrollados en el laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólica del Instituto de Biotecnología.

A la M. en C. Georgina Teresa Hernández Chávez por su apoyo técnico en HPLC del laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas del Instituto de Biotecnología.

Al Dr. Alfredo Martínez Jiménez y al Dr. Adelfo Escalante Lozada por sus opiniones en este proyecto de investigación.

A la Dra. Dulce Catalina Díaz Quiroz por sus comentarios sobre este proyecto en la presentación del mismo en los seminarios de grupo.

Al Lic. Eduardo Brito Alarcón por su apoyo en el manejo de programas de computadora para el análisis de secuencias de ADN.

Al Lic. César Alberto González Guzmán, al Dr. Juan Carlos Fragoso, al Dr. Juan Andrés Martínez, al IBQ. Rodrigo Barrios y al IBQ. Dante Néstor Pérez por su apoyo en el análisis de los parámetros cinéticos.

A los miembros de la Unidad de Cómputo del Instituto de Biotecnología por su apoyo técnico.

Al Biol. Manuel Saucedo, técnico laboratorista del laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas.

A la Sra. Aurelia González Guzmán auxiliar de laboratorio por su invaluable trabajo en el mantenimiento del espacio de trabajo.

Agradecimientos personales

A mi mamá, papá y hermana, por su cariño y cuidado, manifestaciones de amor puro.

A mis tías Graciela y Elvia y a mi tío Rafael.

A mis abuelos, cimientos de la familia con quienes he aprendido tanto.

A Dante, Luxun, Misael y Jorge Sánchez por todo su apoyo académico y personal.

A mi profesora Aurora, Edith, Armando, Natalia Vázquez Alarcón por ser parte esencial en mi formación académica.

A Tere, Ariel Edith, Daniel y Memo Zappa por los primeros semestres de la carrera de Biología en Facultad de Ciencias.

A Enrique Velázquez Chargoy y Eckhart Tolle, por sus valiosas palabras, bálsamo en los momentos de oscuridad.

A Emilio, Alfredo, Arihel, Raque, Juan-Jo, Abraham, Pao, Jesús, Uriel Thompson y Danny por su grata compañía en “La Ciudad de la Eterna Primavera.”

A Luis Alberto-C, Rubén Shinryuken y Alonso Ulises, he aprendido mucho de ustedes amigos.

A Isaac Castro. ¡De buena voluntad, primo! *Cured*

A Johannes Arias von Angelus, a tu memoria amigo mío.

Y ti querido lector, por tomarte un tiempo para leer (aunque sea parcialmente) esta tesis 😊

*“An nochipa tlaltikpak
san achika ya nikan”*

Nezahualcóyotl

Índice

1	Introducción	8
1.1.1	Marco teórico	8
1.1.2	Antecedentes	22
1.2	Justificación	41
2	Hipótesis.....	42
3	Objetivos	42
3.1	General.....	42
3.2	Particulares.....	42
4	Materiales y Métodos	43
5	Resultados y Discusión	47
5.1	Evaluación de la sensibilidad al ácido <i>p</i> -cumárico y ácido cafeico de distintas cepas <i>E. coli</i>	47
6	Conclusiones.....	69
7	Perspectivas.	70
8	Referencias.....	71

Índice de figuras y cuadros.

Figuras:

Figura 1. Theodor Escherich.....	8
Figura 2. <i>Escherichia coli</i> , microscopía electrónica.	8
Figura 3. Esquema general de las propiedades y aplicaciones de la tecnología del DNA recombinante	9
Figura 4. Estructura química de: <i>a)</i> 1,6 alolactosa y <i>b)</i> isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.....	10
Figura 5. Ciclo funcional de la Ingeniería de Vías Metabólicas.....	11
Figura 6. Esquema de la estructura química del benceno.....	14
Figura 7. Esquema simplificado de la vía del ácido shikímico.....	15
Figura 8. Esquema de los principales metabolitos derivados de la vía del ácido shikímico.....	16
Figura 9. Esquema de la síntesis de L-tirosina (L-Tyr) y L-fenilalanina (L-Phe) a partir de corismato.....	17
Figura 10. Esquema de la síntesis de L-triptófano (L-Trp) a partir de corismato	18
Figura 11. Esquema general del metabolismo central.....	21
Figura 12. Principales ácidos hidroxicinámicos.....	24
Figura 13. Estructura química del ácido cafeico y sus derivados.....	25
Figura 14. Esquema de representación de la biosíntesis de ácido cafeico.....	29
Figura 15. Principales estudios de síntesis biotecnológica de ácido cafeico.....	31
Figura 16. Biosíntesis de ácido cafeico.....	32
Figura 17. Representación del operón <i>hpaBC</i> y <i>hpaGEDFHI</i> en <i>E. coli</i> W.....	34
Figura 18. Metabolismo del ácido 4-hidroxifenilacético y 3-hidroxifenilacético en <i>E. coli</i>	34
Figura 19. Esquema general del mecanismo de las proteínas transportadoras.....	37
Figura 20. Esquema que representa de manera general los cuatro tipos de estrategias en bacterias para contender con la toxicidad generada por antibióticos.....	37
Figura 21. Esquema que representa la regulación transcripcional dependiente de proteínas del tipo LysR. 38	38
Figura 22. Ruta biosintética de la ubiquinona a partir de ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico.....	38
Figura 23. Modelo del funcionamiento del sistema AaeXAB basado experimentos de cultivos de <i>E. coli</i> tratados con ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico (pHBA).....	39
Figura 24. Sistema de excreción tipo I en <i>E. coli</i> . Este esquema representa la secreción de α -hemolisina del citoplasma al medio extracelular.....	40
Figura 25. Estructuras cristalográficas generales de TolC y de otras proteínas de membrana externa de <i>E. coli</i>	41
Figura 26. Representación diagramática de <i>tolC</i> formando parte de un operón que codifica a un sistema de excreción de tetraciclina en <i>E. coli</i> y estructura cristalográfica de TolC.....	50
Figura 27. Sustratos aromáticos con afinidad al sistema de eflujo AaeXAB.....	51
Figura 28. Comparación de la estructura general de la pared celular entre bacterias Gram-positivas y bacterias Gram-negativas.....	53
Figura 29. Gráfica comparativa de los parámetros cinéticos de los cultivos de producción de ácido cafeico con las cepas <i>E. coli</i> W3110/pTrchpaBC y <i>E. coli</i> W3110 Δ aaeXAB/pTrchpaBC.....	58
Figura 30. Crecimiento bacteriano de las cepas <i>E. coli</i> W3110/pTrchpaBC y <i>E. coli</i> W3110 Δ aaeXAB/pTrchpaBC durante los cultivos de producción de ácido cafeico a partir de ácido <i>p</i> -cumárico.....	59

Figura 31. Consumo de glicerol y producción de ácido acético en la cepa <i>E. coli</i> W3110/pTrchpaBC.....	60
Figura 32. Consumo de glicerol y producción de ácido acético en la cepa <i>E. coli</i> Δ <i>aaeXAB</i> /pTrchpaBC.....	61
Figura 33. Consumo de ácido <i>p</i> -cumárico y producción de ácido cafeico en la cepa <i>E. coli</i> W3110/pTrchpaBC.....	63
Figura 34. Hidroxilación de ácidos hidroxicinámicos mediada por la enzima 4HPA3H de <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> cepa PAO1.....	64
Figura 35. Consumo de ácido <i>p</i> -cumárico y producción de ácido cafeico en la cepa <i>E. coli</i> W3110Δ <i>aaeXAB</i> /pTrchpaBC.....	64

Cuadros:

Cuadro 1. Estrategias generales de desarrollo en el campo de la Ingeniería de Vías Metabólicas.....	13
Cuadro 2. Descripción general de cada una de las reacciones de la vía del ácido shikímico.....	15
Cuadro 3. Reacciones enzimáticas de la síntesis de L-tirosina a partir de corismato.....	17
Cuadro 4. Reacciones enzimáticas de la síntesis de L-fenilalanina a partir de corismato.....	18
Cuadro 5. Reacciones enzimáticas de la síntesis de L-triptófano a partir de corismato.....	19
Cuadro 6. Principales usos industriales de los aminoácidos aromáticos: L-Trp, L-Phe y L-Tyr.....	20
Cuadro 7. Diversidad de polifenoles y estructura química.....	23
Cuadro 8. Principales fuentes vegetales para la extracción de ácido cafeico.....	26
Cuadro 9. Principales fuentes alimentarias de ácido cafeico.....	28
Cuadro 10. Capacidad de degradación de varios ácidos fenólicos por distintas especies de <i>E. coli</i>	33
Cuadro 11. Ejemplos de proteínas transportadoras y sus sustratos.....	36
Cuadro 12. Descripción general de las cepas <i>E. coli</i> utilizadas en este proyecto.....	43
Cuadro 13. Descripción general de los plásmidos utilizados en este proyecto.....	44
Cuadro 14. Resultados de las pruebas de sensibilidad al ácido <i>p</i> -cumárico y al ácido cafeico sobre el crecimiento de distintas cepas <i>E. coli</i>	48
Cuadro 15. Parámetros cinéticos de las fermentaciones de ácido <i>p</i> -cumárico a ácido cafeico con las cepas <i>E.</i> <i>coli</i> W3110/pTrchpaBC y <i>E. coli</i> W3110Δ <i>aaeXAB</i> /pTrchpaBC.....	58

1 Introducción

1.1.1 Marco teórico

Escherichia coli es un modelo biotecnológico

Desde su descubrimiento en 1884 por el pediatra austroalemán Theodor Escherich (figura 1), el bacilo gram negativo *Bacterium coli commune* (Bacteria común del colon), nombrado posteriormente en 1958 *Escherichia coli* (figura 2) en honor a su descubridor ¹ se ha vuelto un organismo modelo en el estudio de los mecanismos esenciales de la bioquímica, la fisiología microbiana y la genética molecular. El hecho de que este bacilo anaerobio facultativo haya sido desde entonces ampliamente utilizado en diversas investigaciones científicas se debe fundamentalmente a varios aspectos: Los sencillos requerimientos de su mantenimiento, su rápido crecimiento, su relativa simplicidad biológica (si se compara a la de otros organismos), su capacidad de crecer utilizando distintos sustratos como fuentes de carbono y la disponibilidad de técnicas para realizar modificaciones genéticas ². Cabe mencionar que gracias a los estudios realizados en este organismo se pudieron dilucidar los mecanismos moleculares esenciales de la vida tales como la replicación, la transcripción y la traducción del material genético ³. La abundante investigación científica sobre esta bacteria ha generado un amplio conjunto de datos experimentales tanto cuantitativos como cualitativos acerca de su fisiología, metabolismo y regulación ⁴. Es por esta razón que *E. coli* mantiene su estatus como organismo modelo y que sigue contribuyendo en la generación de datos en las ahora denominadas disciplinas “ómicas” que incluyen a la genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica y fluxómica.



Figura 1. Theodor Escherich.

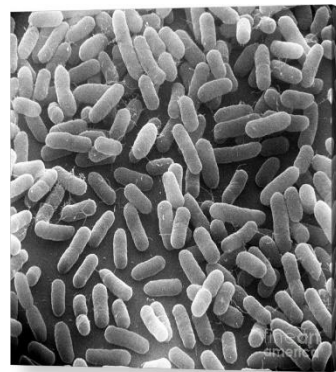
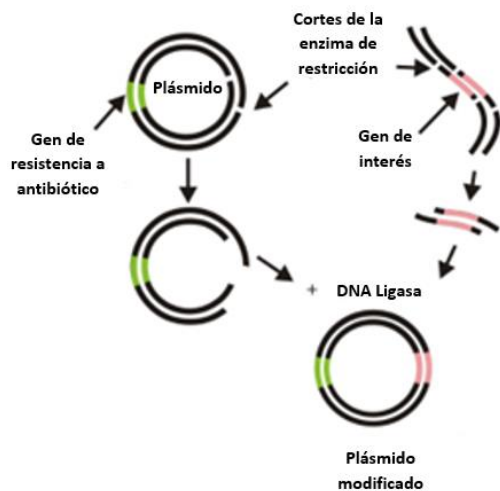


Figura 2. Escherichia coli.
Microscopía electrónica.

El descubrimiento de las enzimas de restricción, también llamadas endonucleasas (enzimas que tienen la propiedad de fragmentar moléculas de DNA a través de cortes en secuencias específicas de nucleótidos) y de las ligasas (enzimas que unen los extremos 5'-PO₄ y 3'-OH de las cadenas polinucleotídicas) marcó un hito en el campo biotecnológico ya que trajeron consigo la capacidad de poder manipular el DNA con relativa eficacia, lo que condujo al desarrollo de construcciones *in vitro* de secuencias nucleotídicas que no existían en la naturaleza. Estas nuevas moléculas de DNA se denominan DNA recombinante (rDNA) y esencialmente consisten en un vector (una unidad funcional de replicación que usualmente codifica a un marcador de selección basado en la resistencia a algún antibiótico) y un inserto (porción de DNA seleccionado para su expresión el cual puede tratarse de genes aislados u operones completos). Las aplicaciones para esta tecnología respecto a la expresión de genes y sus productos son casi infinitas ya que estas técnicas se pueden utilizar en el campo de la investigación biotecnológica o la investigación biomédica. Por ejemplo, la expresión de proteínas o anticuerpos con fines terapéuticos o el estudio del comportamiento de alguna proteína y sus mutantes. Un ejemplo fundamental en la aplicación biomédica de esta tecnología es el siguiente: la primera molécula de DNA recombinante fue generada en el año de 1973 por Paul Berg, Herbert Boyer, Annie Chang y Stanley Cohen de la Universidad de Standford y la Universidad de San Francisco en Estados Unidos de América ⁵, y cinco años después, en 1978 la primera molécula de rDNA capaz de expresar insulina humana en cepas de *E. coli* K-12 fue generada por David Goeddel y colaboradores en la empresa biotecnológica *Genetech* (San Francisco, California)⁶.

La estructura general del DNA recombinante (figura 3) consta de un vector y un inserto. Los vectores basados en plásmidos constan de un origen de replicación, un marcador de selección (usualmente resistencia a algún antibiótico) y un sitio múltiple de clonación. Vectores con estas características son capaces de poder multiplicarse en cualquier célula hospedadora con la maquinaria enzimática de replicación. Por otra parte, el inserto puede tratarse de un gen u operón proveniente del mismo organismo hospedador (por ejemplo, cuando se trata de la sobreexpresión de genes propios de las bacterias) o de otros organismos como plantas, animales u otras bacterias, en cuyo caso se denominarán transgenes.



Principales aplicaciones de la tecnología del DNA recombinante	
<p>Productos terapéuticos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Vacunas - Hormona de crecimiento - Anticuerpos - Vectores de expresión - Proteínas recombinantes - Medicamentos contra el cáncer 	<p>Productos genéticamente modificados</p> <ul style="list-style-type: none"> - Frutas - Vegetales - Cultivos - Microorganismos - Animales
<p>Diagnosis</p> <ul style="list-style-type: none"> - Terapia génica - CRISPR - Estrategias terapéuticas 	<p>Aplicaciones energéticas</p> <ul style="list-style-type: none"> - Biohidrógeno - Bioetanol - Biometanol - Biobutanol

Figura 3. Esquema general de las propiedades y aplicaciones de la tecnología del DNA recombinante.

Otra gran ventaja de las construcciones de rDNA a través de plásmidos es la propiedad de poder controlar el momento de la expresión del gen. El control sobre el momento de la expresión génica está basado en el sistema de regulación del operón *lac* constituido por los genes *lacZ*, *lacY* y *lacA*, uno de los que codifica para la enzima β -galactosidasa la cual cataliza la hidrólisis de la lactosa generando como productos de reacción la glucosa y la galactosa y que a su vez también es la enzima encargada de la producción de alolactosa (el inductor natural del operón *lac*) a través de la transglucosilación de la D-glucosa y la D-galactosa⁷. De manera natural *E. coli* puede utilizar lactosa como fuente de carbono cuando la glucosa (fuente preferencial de carbono) no está disponible en el medio, sin embargo, esta propiedad metabólica de consumo de lactosa no está siempre activa en la célula ya que la proteína represora LacI evita la transcripción del operón. La alolactosa, que es el inductor natural, tiene la capacidad de unirse al represor, generar un cambio conformacional en este y permitir la transcripción del operón *lac*. El conocimiento de esta regulación propició el desarrollo de moléculas análogas a la alolactosa como el Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) [figura 4] que indujeran sintéticamente la expresión del inserto en el vector.

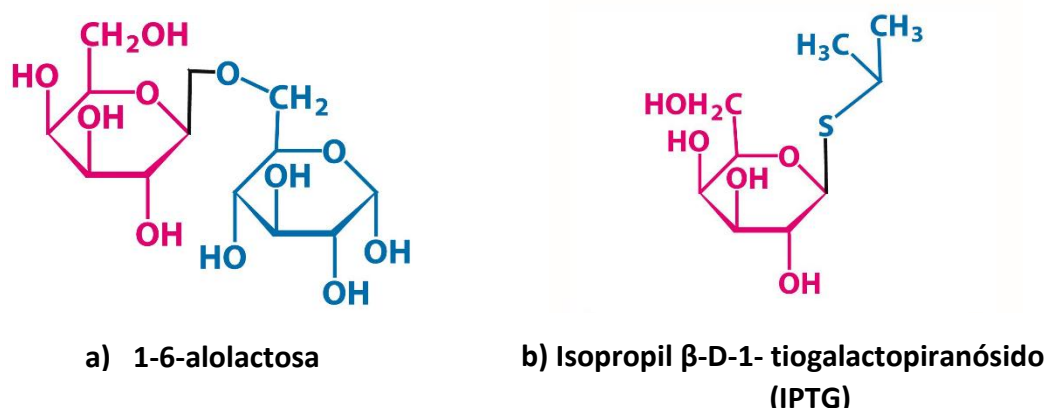


Figura 4. Estructura química de: a) 1,6-alolactosa y b) Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.

En general la capacidad de manipular el DNA, aislar fragmentos de interés, generar construcciones estables a través de plásmidos que permitan la replicación y expresión de uno o varios genes, aunado a la ventaja que permite el propio sistema de inducir la expresión contribuyó a la creación de un nuevo campo de conocimiento biotecnológico denominado Ingeniería de Vías Metabólicas (IVM). Los inicios de esta disciplina se remontan al año de 1973 cuando Cohen, Chang y colaboradores reportaron la primera *E. coli* genéticamente modificada resistente a estreptomycin y sulfonamida⁸ y es definida como el mejoramiento de las actividades celulares a través de la manipulación de las funciones enzimáticas, de transporte y regulatorias con el uso de la tecnología del DNA recombinante⁹. En un principio, estas técnicas de biología molecular aplicada a un organismo modelo como *E. coli* permitieron evaluar el impacto que representaban las modificaciones genéticas sobre la fisiología microbiana, por ejemplo, el efecto sobre la velocidad de crecimiento del cultivo, la producción total de proteínas, la expresión de la proteína de interés, la presencia o ausencia de toxicidad; además de la evaluación de los parámetros cinéticos asociados a los bioprocesos como la productividad volumétrica, el rendimiento y la velocidad específica de consumo de sustrato y formación de producto. La acumulación de estos nuevos conocimientos propició que los enfoques respecto a la manipulación genética de la célula se integraran de manera

cíclica en el desarrollo de estrategias racionales que permitieran dirigir las funciones celulares hacia objetivos como: la producción heteróloga de proteínas, la extensión de uso de sustrato, la implementación de vías metabólicas que sinteticen compuestos de interés, el diseño de vías que permitan la degradación de agentes xenobióticos, el mejoramiento de aspectos fisiológicos de la célula, la eliminación o reducción de subproductos de fermentación o el mejoramiento de los valores de rendimiento o productividad de los bioprocesos ¹⁰.

Jens Nielsen, reconocido investigador en el campo de la ingeniería metabólica ha propuesto que el ciclo funcional del desarrollo de esta disciplina (figura 5) consiste en tres pasos fundamentales: síntesis, análisis y diseño; así como se muestra en el esquema siguiente:

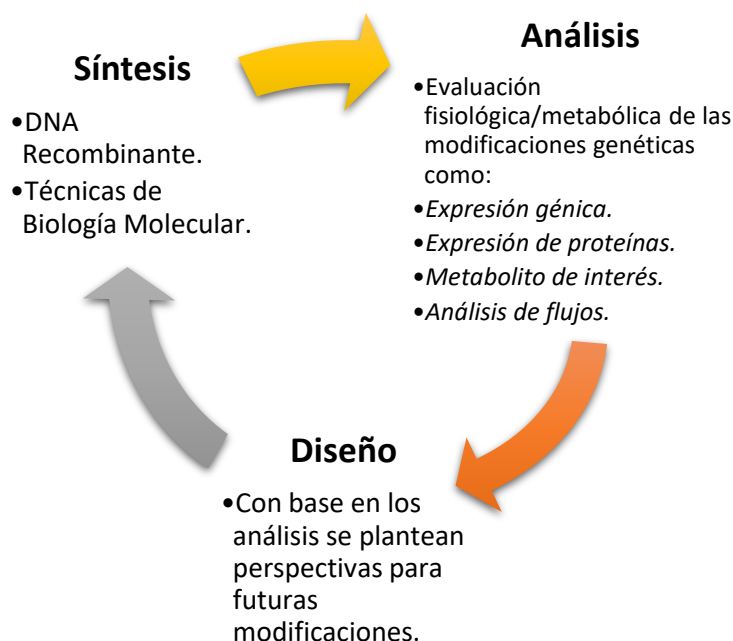


Figura 5. Ciclo funcional de la Ingeniería de Vías Metabólicas.

Este esquema de trabajo (figura 5) proporciona versatilidad respecto a los distintos enfoques y objetivos de la ingeniería metabólica; por ejemplo, si se desea sintetizar un compuesto químico *de novo* es necesario expresar las enzimas que catalicen las reacciones involucradas en su síntesis, en estos casos usualmente la expresión es heteróloga. Si el organismo es un productor nativo del compuesto de interés el enfoque de estudio inicial sería el análisis de la vía metabólica que lo sintetiza, lo que puede involucrar el tipo de sustrato preferencial, el análisis del flujo de carbono, la posibilidad de inhibición de crecimiento o de actividad enzimática por concentración de sustrato o formación de producto, la disponibilidad de cofactores enzimáticos, o la formación de subproductos de fermentación. Finalmente, después del análisis de datos, en la parte de diseño se integran las perspectivas de los proyectos a través de enfoques racionales para futuras modificaciones genéticas.

En Ingeniería de Vías Metabólicas existen distintas estrategias de producción de compuestos de interés

Debido a que en un bioproceso están involucradas distintas variables fisiológicas dentro de la misma célula que van desde: el tipo de fuente de carbono utilizado, la toxicidad de los sustratos o de los compuestos sintetizados, la formación de subproductos de metabolismo, la disponibilidad de transportadores que faciliten el movimiento de los metabolitos, el comportamiento de las enzimas involucradas en la vía de síntesis o la disponibilidad de cofactores, existen distintas estrategias que abordan los esquemas de trabajo en este campo, estas estrategias se describen de manera general en el siguiente cuadro:

<i>Estrategia</i>	<i>Descripción</i>	<i>Limitaciones</i>
Producción heteróloga de proteínas	Producción de compuestos de interés como anticuerpos, hormonas	Algunas proteínas pueden ser tóxicas para el hospedador o pueden estar sujetas a modificaciones postraduccionales o formar cuerpos de inclusión.
Uso de sustrato	<p>Modificaciones sobre el uso de las fuentes de carbono, esto puede constar de:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Implementación de sistemas de transporte alternativo o expresión heteróloga de transportadores de fuentes de carbono baratas. 2. Diseño de co-cultivos en medios con distintas fuentes de carbono. 3. Modificaciones genéticas sobre los sistemas de regulación metabólica como el fenómeno de represión catabólica. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. La expresión funcional de transportadores heterólogos suele ser complicada¹¹. 2. Es necesario hacer el balance del crecimiento de las distintas cepas las cuales pueden crecer a distintas velocidades específicas. 3. Muchas veces las modificaciones genéticas sobre los sistemas de regulación conllevan a una disminución en el valor de la velocidad específica de crecimiento.
Implementación de nuevas vías de síntesis de compuestos de interés.	El diseño de nuevas vías de síntesis generalmente se lleva a cabo expresando enzimas heterólogas de manera simultánea.	La expresión funcional de las enzimas puede ser una limitante si los genes no están optimizados en términos de uso de codones preferenciales por el hospedador. Adicionalmente se pueden presentar efectos tipo “cuellos de botella” en el flujo de carbono si la actividad de las enzimas involucradas en la vía difiere significativamente.

Reducción de subproductos de fermentación.	En algunos bioprocesos puede estar involucrada la formación de subproductos de fermentación, fenómeno que en primera instancia desvía el flujo de carbono hacia compuestos no deseados, estos subproductos pueden llegar a ser tóxicos. Generalmente la inactivación de las enzimas responsables de la síntesis de estos productos logra solucionar este fenómeno.	En ocasiones la presencia de subproductos puede ser esencial en la fisiología general de la célula y eliminar su síntesis puede tener implicaciones negativas sobre las funciones celulares.
Ingeniería de transportadores	Generalmente consta de la sobreexpresión de exportadores de producto aunada a la eliminación de los importadores de este.	Las modificaciones de este tipo pueden acarrear fenotipos cuya membrana celular se vea afectada ¹¹ .
Mejoramiento del rendimiento o productividad	Para este objetivo lo que comúnmente se hace es incrementar la actividad de las enzimas involucradas en la vía de síntesis a través del incremento de las copias de los genes.	Esto puede generar un fenómeno llamado carga metabólica que frecuentemente ocasiona cambios adversos en el metabolismo del hospedador.
Aumento en la disponibilidad de cofactores enzimáticos	Suprimir la actividad de enzimas no esenciales dependientes de NADH o NADPH. Redireccionar el flujo de carbono hacia las vías de las pentosas fosfato para incrementar la disponibilidad de NADPH.	Podría tener implicaciones negativas sobre la fisiología general de la célula, por ejemplo, impacto negativo sobre la velocidad específica de crecimiento.
Evolución metabólica	Estrategia de cultivo continuo en donde se varían las condiciones de fermentación con la finalidad de lograr los fenotipos deseados.	Experimentos de este estilo suelen ser tardados y requieren de gran cantidad de recursos para mantener fermentaciones continuas.

Cuadro 1. Estrategias generales de desarrollo en el campo de la Ingeniería de Vías Metabólicas.

Como se describe en el **Cuadro 1**, en IVM se puede abordar una o varias estrategias de acuerdo con los objetivos de trabajo planteados. Generar datos experimentales en cada uno de estos rubros permite a su vez diseñar estrategias racionales a través de experimentos combinatorios en donde se podría evaluar diversos parámetros, por ejemplo: el rendimiento o productividad en la producción de cierta proteína recombinante usando distintas fuentes de carbono o una mezcla de varias, la disponibilidad de cofactores enzimáticos en una cepa modificada genéticamente y el efecto que tiene sobre la producción del metabolito de interés, conocer si la eliminación de la actividad de enzimas asociadas a la síntesis de subproductos de fermentación tiene un efecto positivo en el flujo de carbono destinado a la formación de los metabolitos deseados, estudiar si el número de copias de uno o varios genes tiene efecto en la productividad o rendimiento de la

fermentación o si un experimento de evolución adaptativa genera una cepa con fenotipo deseado con la capacidad de consumir una fuente de carbono alternativa o resistente a la toxicidad de algún compuesto específico. Todos los enfoques en el campo de la IVM ofrecen perspectivas de estudio casi infinitas y conforme esta disciplina se desarrolla los esquemas definidos de ciencia básica y ciencia aplicada se vuelven cada vez más difusos pues cada enfoque retroalimenta al otro, es decir mientras más se sabe sobre los efectos de las modificaciones genéticas en la fisiología de la célula, más se puede aprovechar ese conocimiento en la construcción de cepas de producción de compuestos de interés.

La Ingeniería Metabólica ha sido una alternativa para la producción de compuestos aromáticos: La vía del ácido shikímico.

Se entiende como compuesto aromático a aquella molécula que consta de las siguientes características químicas: es una molécula plana, cíclica, cuya estructura debe de contener sólo hibridación sp^2 de tal manera que se forme un sistema deslocalizado de orbitales tipo π . Comúnmente la mayoría de los compuestos aromáticos están constituidos por un anillo de benceno o estructuras asociadas.

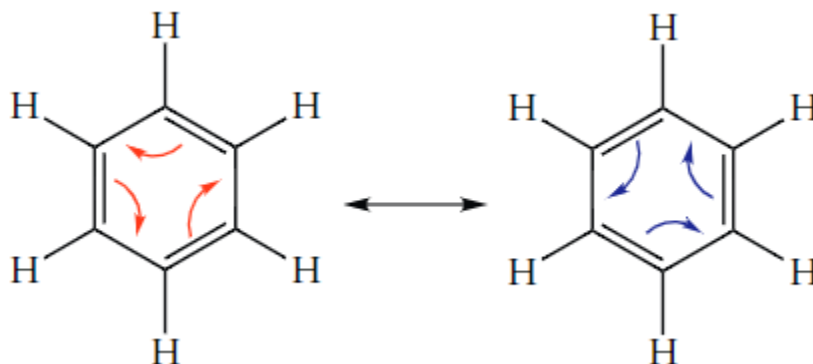


Figura 6. Esquema de la estructura química del benceno.

En la figura 6 están representadas las disposiciones posibles de la hibridación sp^2 en el anillo bencénico. El flujo de electrones que se genera a través de los átomos de carbono da como resultado el fenómeno de resonancia química, lo cual contribuye ampliamente a la estabilidad de la molécula. La estructura química del anillo bencénico es la base de una gran variedad de compuestos denominados aromáticos.

Se sabe que el metabolismo de *E. coli* es capaz de sintetizar los tres aminoácidos aromáticos: la L-Fenilalanina (Phe), L-Tirosina (Tyr) y L-Triptófano (Trp) a través de la denominada vía común de síntesis de los aminoácidos aromáticos, también llamada vía del shikimato, la cual está ampliamente distribuida en plantas, levaduras, bacterias y algunos parásitos del filo apicomplexa ¹² y que se constituye por siete reacciones enzimáticas que comienzan con la condensación del fosfoenol piruvato (PEP), proveniente de la glucólisis y la eritrosa 4 fosfato (E4P) proveniente de la vía de las pentosas y termina con la síntesis de corismato (CHO), precursor común de los aminoácidos antes mencionados. En la siguiente figura se detallan las reacciones enzimáticas de esta vía.

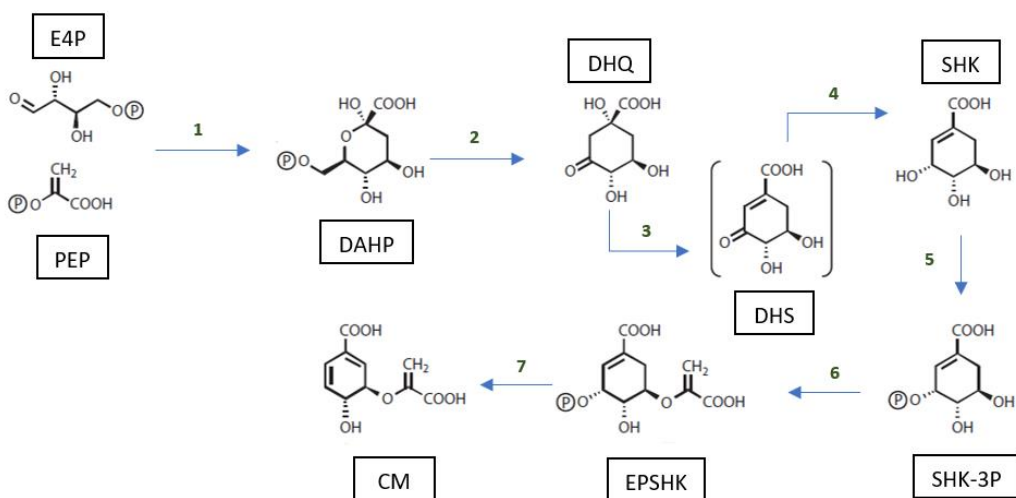


Figura 7. Esquema simplificado de la vía del ácido shikímico. (Modificado de Maeda, 2012).

Reacción	Sustrato	Gen	Enzima	Cofactores	Producto
1	Fosfoenolpiruvato (PEP) & Eritrosa 4-fosfato (E4P)	<i>aroF</i> <i>aroG</i> <i>aroH</i>	3-desoxi-D-arabino-heptulosa-7-fosfato sintasa. (DAHP sintasa)	Co^{2+} , Mg^{2+} o Mn^{2+}	3-desoxi-D-arabino-heptulosa-7-fosfato (DAHP) + Pi
2	DAHP	<i>aroB</i>	3-desidroquinato sintasa	Co^{2+} & NAD^+	3-desidroquinato + Pi (DHQ) + Pa
3	DHQ	<i>aroD</i>	3-desidroquinato deshidratasa	-	3-desidroshikimato + H_2O (DHS) + H_2O
4	DHS	<i>aroE</i>	Shikimato deshidrogenasa	NADPH	Shikimato + NADP^+ (SHK) + NADP^+
5	SHK	<i>aroL</i> <i>aroK</i>	Shikimato cinasa	ATP , Mg^{2+} o Mn^{2+}	Shikimato-3-fosfato + ADP (SHK-3P) + ADP
6	SHK-3P	<i>aroA</i>	5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa	-	5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato + Pi (EPSHK) + Pi
7	EPSHK	<i>aroC</i>	Corismato sintasa	FMNH_2	Corismato + Pi (CM) + Pi

Cuadro 2. Descripción general de cada una de las reacciones de la vía del ácido shikímico.

Abreviaciones: Pi, fosfato; NAD^+ , nicotinamida adenina dinucleótido oxidado; NADPH , nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido; NADP^+ , nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado; FMNH_2 , flavín mononucleótido reducido; ADP, adenosín difosfato; ATP, adenosín trifosfato.

En plantas, la vía del shikimato (**Cuadro 2**) es de particular importancia ya que además de generar los aminoácidos aromáticos necesarios en la síntesis de proteínas, la vía también sirve como fuente de precursores químicos en la síntesis de lignina destinada a formar parte de la pared celular vegetal y en la síntesis de metabolitos secundarios, es decir, metabolitos no esenciales pero relevantes en las interacciones ecológicas de la planta y su entorno como: alcaloides, terpenoides y fenilpropanoides, principalmente, los cuales le confieren propiedades de defensa contra depredadores o protección contra agentes bióticos (virus o microorganismos patogénicos) y abióticos (luz ultravioleta, ozono o sequías)¹³. Cabe mencionar que además de su función natural en plantas, los metabolitos secundarios también tienen propiedades interesantes en el campo industrial y farmacéutico, principalmente.

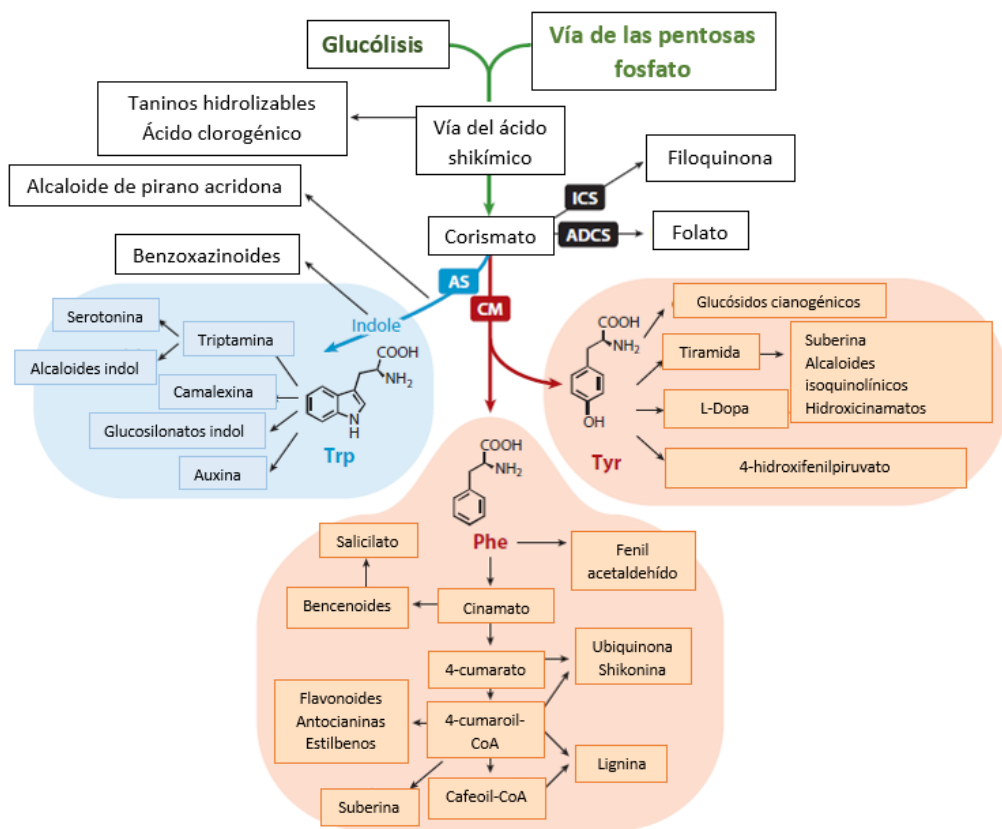


Figura 8. Esquema de los principales metabolitos derivados de la vía del ácido shikímico.

Descripción de la diversidad de compuestos naturales derivados de la vía del ácido shikímico en plantas. La vía tiene como precursores al fosfoenolpiruvato proveniente de la glucólisis y a la eritrosa-4-fosfato, proveniente de la vía de las pentosas fosfato. El corismato, además de ser el precursor común del L-Triptófano, la L-Tirosina y la L-Fenilalanina también es precursor en la síntesis de filoquinona (vitamina K) y el folato (vitamina B₉), las cuales son sintetizadas a través de la acción de la ICS: isocorismato sintasa y de la ADCS: aminodesoxicorismato sintasa, respectivamente.

Los aminoácidos aromáticos: Biosíntesis en *E. coli* y sus aplicaciones.

Como se ha mencionado anteriormente, se sabe que el metabolismo de *E. coli* también es capaz de sintetizar los aminoácidos aromáticos a través de la vía del shikimato, sin embargo, es importante señalar que a diferencia de las plantas en donde esta vía sirve como punto de partida en la biosíntesis de metabolitos secundarios, en el metabolismo bacteriano esta vía sirve esencialmente en la producción de los tres aminoácidos aromáticos a partir del precursor común, el corismato (CM).

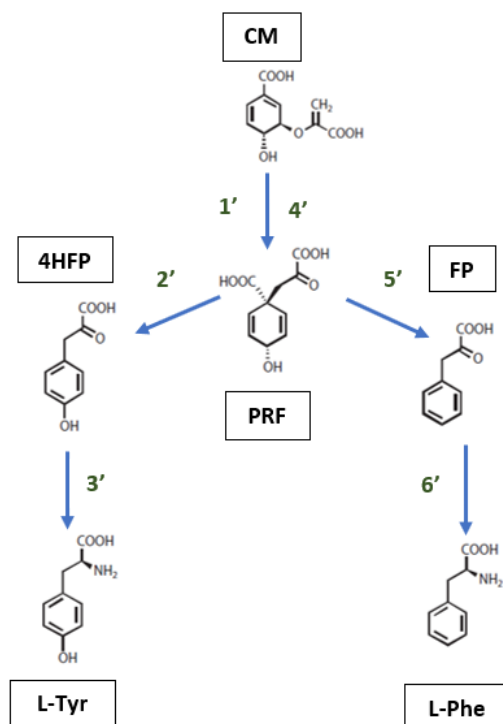


Figura 9. Esquema de la síntesis de L-tirosina (L-Tyr) y L-fenilalanina (L-Phe) a partir de corismato. Abreviaciones: **CM**, corismato; **PRF**, prefrenato; **4HFP**, 4-hidroxifenilpiruvato; **FP**, Fenilpiruvato.

Síntesis de L-Tirosina

Reacción	Sustrato	Gen	Enzima	Cofactores	Producto
1'	Corismato (CM)	<i>aroQ</i> <i>PheAⁱ</i> <i>TyrAⁱ</i>	Corismato mutasa	-	Prefrenato (PRF)
2'	PRF	<i>TyrAⁱ</i>	Prefrenato deshidrogenasa	NADP ⁺	4-hidroxifenilpiruvato (4HFP)
3'	4HFP	<i>TyrB</i>	4-hidroxifenilpiruvato aminotransferasa	-	L-Tyr

Cuadro 3. Reacciones enzimáticas de la síntesis de L-tirosina a partir de corismato.

ⁱLa enzima corismato mutasa (CM) está fusionada con la enzima prefrenato deshidratasa (PDT) o con la prefrenato deshidrogenasa (PDH) las cuales constituyen las formas CM-PDT en la enzima PheA o CM-PDH en la enzima TyrA en *E. coli*.

Síntesis de L-Fenilalanina					
Reacción	Sustrato	Gen	Enzima	Cofactores	Producto
4'	Corismato (CM)	<i>aroQ</i> <i>PheAⁱ</i> <i>TyrAⁱ</i>	Corismato mutasa	-	PRF
5'	PRF	<i>PheAⁱ</i>	Prefrenato deshidratasa	-	Fenilpiruvato (FP)
6'	FP	<i>TyrB</i> <i>AspC</i> <i>IlvE</i>	Fenilpiruvato aminotransferasa	Piridoxal-5'-fosfato (PLP)	L-Phe

Cuadro 4. Reacciones enzimáticas de la síntesis de L-fenilalanina a partir de corismato.

ⁱ La enzima corismato mutasa (CM) está fusionada con la enzima prefrenato deshidratasa (PDT) o con la prefrenato deshidrogenasa (PDH) las cuales constituyen las formas CM-PDT en la enzima *PheA* o CM-PDH en la enzima *TyrA* en *E. coli*.

La síntesis de triptófano tiene una vía ligeramente distinta, aunque el corismato sigue siendo el precursor común.

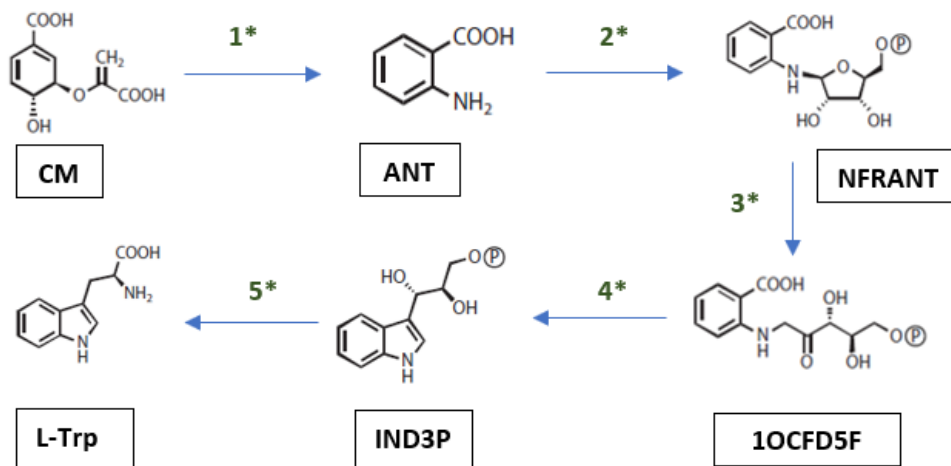


Figura10. Esquema de la síntesis de L-triptófano (L-Trp) a partir de corismato.

Síntesis de L-Triptófano					
Reacción	Sustrato	Gen	Enzima	Cofactores	Producto
1*	CM	<i>TrpE</i>	Antranilato sintasa	-	Antranilato

		<i>TrpG</i>		(ANT)
2*	ANT	<i>TrpD</i>	Antranilato-5'-fosforibosil-1-pirofosfatofosforibosil transferasa	N-(5'-fosforibosil)-antranilato (NFRANT)
3*	NFRANT	<i>TrpF</i>	N-(5'-fosforibosil)-antranilato isomerasa	1-(o-carboxifenilamino)-1-desoxiribulosa-5-fosfato (1OCFD5F)
4*	(1OCFD5F)	<i>TrpC</i>	Indolilglicerol fosfato sintasa	Indolil-3-glicerol-fosfato (IND3P)
5*	IND3P	<i>TrpA</i> <i>TrpB</i>	Triptófano sintasa	Triptófano L-Trp

Cuadro 5. Reacciones enzimáticas de la síntesis de L-triptófano a partir de corismato.

Relevancia bioquímica de los aminoácidos aromáticos

Los aminoácidos aromáticos son componentes esenciales en la dieta humana, así como compuestos de interés farmacéutico y alimentario dadas sus múltiples aplicaciones, por ejemplo: el L-triptófano es usado como aditivo alimentario, la L-fenilalanina es empleada en la producción de aspartamo, un poderoso endulzante de bajo índice calórico, mientras que la L-tirosina es empleada como un suplemento esencial en la dieta de personas que padecen fenilcetonuria, enfermedad congénita caracterizada por la ausencia de la enzima fenilalanina hidroxilasa, lo cual hace que el individuo sea incapaz de sintetizar L-tirosina a partir de la L-fenilalanina, lo que representa también una incapacidad en sintetizar melanina, que es el pigmento natural de la piel, el cabello y el iris del ojo^{14,15}. La relevancia que representa la producción de estos aminoácidos, como se describe en la siguiente tabla, ha hecho que se centren esfuerzos para aumentar su producción bacteriana a través de enfoques de ingeniería de vías metabólicas y en ese sentido, ejemplos exitosos de aumento de la capacidad de síntesis de estos aminoácidos en *E. coli* se obtienen a través de distintas estrategias empleando como principio general el desvío del flujo de carbono hacia la síntesis de los aminoácidos aromáticos; una de estas estrategias está basada en el aumento en la disponibilidad de los dos precursores de la vía del ácido shikímico, el PEP y la E4P; es sabido que la condensación de estos dos metabolitos genera el compuesto DAHP, el cual es el segundo intermediario en la vía del shikimato. Para favorecer una mayor condensación del PEP y la E4P a DAHP y por consiguiente un aumento del flujo de carbono dirigido a la síntesis de aminoácidos aromáticos es necesario alterar la regulación de las enzimas DAHP sintasa codificadas por los genes *aroF*, *aroG* y *aroH*, puesto que cada una se encuentra regulada por la concentración intracelular de L-tirosina, L-fenilalanina y L-triptófano respectivamente¹⁶, es decir que cuando la enzima censa cierta concentración de estos aminoácidos, está ya no sintetiza más DAHP, y por lo tanto disminuye el flujo de carbono hacia la vía del shikimato. De las DAHP sintasas involucradas en el metabolismo de *E. coli*, se sabe que la enzima AroG es la que contribuye en un 70% con la actividad de sintasa¹⁷, es por ello que se han realizado investigaciones con esta enzima en su versión resistente a inhibición AroG^{fbr} (*feedback-inhibition-resistant*) y se ha visto que sobreexpresar esta enzima modificada y la transcetolasa TktA

involucrada en la síntesis de E4P aumenta dos veces la disponibilidad de DAHP para la síntesis de los aminoácidos aromáticos respecto a las cepas silvestres ^{18,19}.

Aminoácido	Uso	Cantidades de producción al año (Toneladas por año)
<i>L-triptofano</i>	Aditivo alimentario, precursor del inductor del sueño (4-hidroxitriptófano serotonina), agente de terapia nutricional, antidepresivo.	500-600
<i>L-fenilalanina</i>	Precursor del aspartamo (endulzante), intermediario en la síntesis de inhibidores de la renina, fármacos antiinflamatorios o inhibidores de proteasas codificadas por el virus del VIH.	11000-12000
<i>L-tirosina</i>	Precursor en la producción de L-Dopa, suplemento alimenticio.	150+

Cuadro 6. Principales usos industriales de los aminoácidos aromáticos: *L-triptófano*, *L-fenilalanina* y *L-tirosina*.

Otra estrategia ampliamente usada es aprovechar la disponibilidad de PEP que no se utiliza en el proceso de internalización de glucosa en cepas *E. coli* con fenotipo PTS⁻, fenotipo que se caracteriza por tener inactivado este sistema de fosfotransferasa de carbohidrato de fosfoenolpiruvato, mecanismo responsable de la fosforilación y transporte de carbohidratos como la glucosa, fuente de carbono preferencial de *E. coli*; en una cepa con sistema PTS activo en un medio que contiene glucosa, la proteína portadora de histidina y la Enzima I, componentes del sistema, se encargan de transferir el grupo fosforilo del PEP a EIIA^{Glc} y EIIB^{Glc} proteínas de membrana encargadas de la internalización y transporte de glucosa ²⁰.

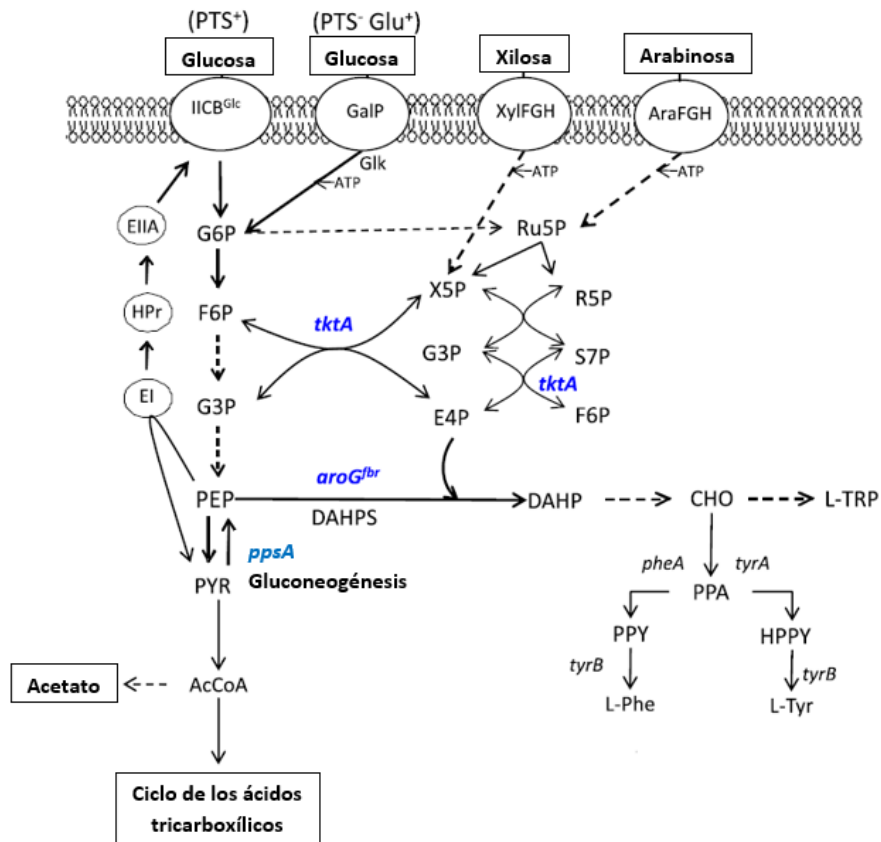


Figura 11. Esquema general del metabolismo central.

Generalidades del metabolismo central, se representan los transportadores de algunas fuentes de carbono (glucosa, xilosa y arabinosa) en fenotipos de E. coli PTS⁺ y PTS⁻, así como las estrategias más comunes de desvío de flujo de carbono hacia la síntesis de los aminoácidos aromáticos. Abreviaciones: IICB^{Glc}: Permeasa de glucosa integral de membrana; GalP: Permeasa de galactosa; XylFGH: Proteínas transportadoras de xilosa; AraFGH: Proteínas transportadoras de arabinosa; Glk: Glucosa cinasa; G6P: Glucosa-6-fosfato; F6P: Fructosa-6-fosfato; G3P: Gliceraldehído-3-fosfato; PEP: Fosfoenolpiruvato; PYR: Piruvato; AcCoA: Acetil-Coenzima A; Ru5P: Ribulosa-5-fosfato; X5P: Xilulosa-5-fosfato; S7P: Sedoheptulosa-7-fosfato; R5P: Ribulosa-5-fosfato; F6P: Fructosa-6-fosfato; E4P: Eritrosa-4-fosfato; DAHPS: 3-desoxi-D-arabino-heptulosa-7-fosfato sintasa; DAHP: 3-desoxi-D-arabino-heptulosa-7-fosfato; CHO: Corismato; PPA: Prefrenato; PPY: Fenilpiruvato; HPPY: 4-hidroxifenilpiruvato; tktA: Transcetolasa; aroG^{br}: versión resistente a inhibición de la DAHPS; pheA & tyrA: Corismato mutasa; tyrB: Fenilpiruvato aminotransferasa.

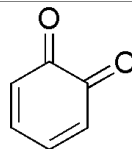
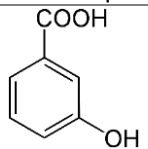
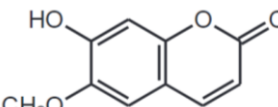
La relevancia de estos aminoácidos en el campo farmacéutico y alimentario es claro, y en ese sentido la ingeniería de vías metabólicas en bacterias con metabolismo relativamente conocido y manipulable como lo es *E. coli*, ofrece una opción bastante atractiva como fuente de estos metabolitos de interés, sin embargo, a pesar de que ya se ha demostrado que es posible producir este tipo de compuestos, los estudios en este campo continúan con la finalidad de optimizar este tipo de bioprocesos, ahondando en el estudio de cuestiones asociadas con la regulación y fisiología

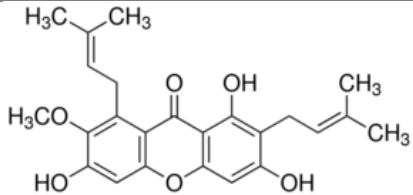
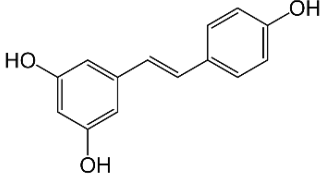
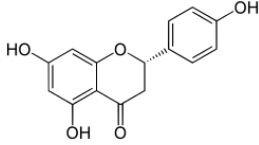
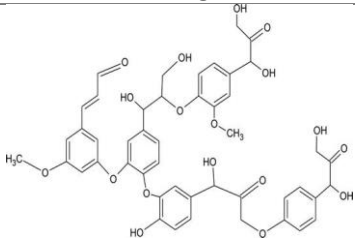
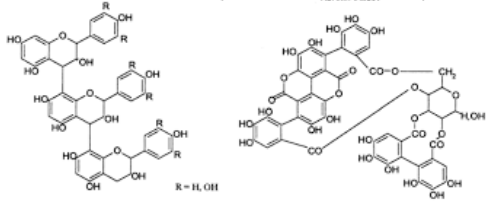
bacteriana ahora con los modernos enfoques que ofrecen los campos de la bioinformática, la biología de sistemas y biología sintética de la mano de las ciencias “ómicas”.

1.1.2 ANTECEDENTES

Los polifenoles son un grupo diverso de antioxidantes.

El hecho de que se comparta la vía del ácido shikímico tanto en plantas como en bacterias trae consigo una gran ventaja *per se* ya que como se ha visto anteriormente, una gran variedad de metabolitos secundarios muy valiosos además de los aminoácidos aromáticos parten de esta vía, y si esta vía es compartida con bacterias como *E. coli* en la cual su metabolismo y regulación es relativamente conocido, aunado a las herramientas ya existentes de manipulación genética con implicaciones directas sobre su metabolismo, es posible que la síntesis de algún compuesto en particular sea exitosa. En ese sentido los polifenoles representan otro gran grupo de compuestos sintetizados por prácticamente todas las plantas ampliamente valorados debido a lo esenciales que resultan en la nutrición humana, además de sus propiedades antiinflamatorias, antialérgicas, antitrombóticas, cardioprotectoras y vasodilatadoras que en última instancia están relacionadas con la actividad antioxidante dada por el anillo bencénico y los grupos hidroxilos asociados a estas moléculas ²¹. Cabe mencionar que la mayor parte de los antioxidantes provenientes de una dieta rica en frutas y verduras son polifenoles ²². Esta gran clase de compuestos se clasifica a su vez en distintos subgrupos de acuerdo con su estructura, a continuación, se presenta el **Cuadro 7** en donde se describen las clases de polifenoles en términos de su número de carbonos.

Clase de polifenol	Estructura en términos de número de átomos de carbonos	Estructura química
Benzoquinonas	C ₆	 o-benzoquinona
Ácidos hidroxibenzóicos	C ₆ -C ₁	 Ácido 3-hidroxibenzóico
Fenilpropanoides & ácidos hidroxicinámicos	C ₆ -C ₃	 Cumarina

Xantonas	$C_6-C_1-C_6$	 α -mangostina
Estilbenos	$C_6-C_2-C_6$	 <i>trans</i> -resveratrol
Flavonoides e Isoflavonoides	$C_6-C_3-C_6$	 Naringenina
Ligninas	$(C_6-C_3)_n$	 Lignina
Taninos condensados	$(C_6-C_3-C_6)_n$	 Taninos condensados

Cuadro 7. Diversidad de polifenoles y estructura química.

Como se ha mencionado anteriormente, la mayoría de las propiedades farmacéuticas asociadas a los compuestos fenólicos están dadas por su actividad antioxidante, la cual en este tipo de moléculas es definida por la presencia de los sustituyentes hidroxilos en el anillo aromático, los cuales tienen capacidades reductoras a través de la donación de H^+ o electrones y por ende la propiedad de estabilizar radicales libres químicos, moléculas o fragmentos moleculares que tienen desapareado un electrón en un orbital atómico lo cual hace que sean especies químicas altamente reactivas, los radicales libres comúnmente conocidos son las especies reactivas de nitrógeno (RNS) y las especies reactivas de oxígeno (ROS), particularmente estas últimas como el anión superóxido: O_2^- ; peróxido de hidrógeno: H_2O_2 o el radical hidroxilo: OH^* que se generan por eventos como la fosforilación mitocondrial oxidativa, procesos inflamatorios, fagocitosis o por la exposición a agentes medioambientales como la luz ultravioleta, el ozono o los contaminantes industriales, resultan de gran relevancia puesto que en altas concentraciones causan un desbalance en el equilibrio óxido-redox de los sistemas biológicos generando una serie de implicaciones negativas en biomoléculas fundamentales como los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, fenómeno conocido como estrés

oxidativo; y aunque el propio metabolismo celular humano es capaz de sintetizar algunas moléculas antioxidantes como el glutatión, ubiquinol y ácido úrico, otra gran fuente de antioxidantes son lo que se obtienen a través de la dieta, y en ese sentido los polifenoles, particularmente los ácidos hidroxicinámicos representan el mayor aporte de estos compuestos en la dieta ²³.

El ácido cafeico es un polifenol perteneciente a la familia de los ácidos hidroxicinámicos

Los ácidos hidroxicinámicos representan el mayor subgrupo dentro de los compuestos fenólicos ²⁴, son de distribución amplia encontrándose prácticamente en todas las plantas como ésteres de ácidos orgánicos, especies glicosiladas, compuestos asociados a proteínas o como componentes estructurales como parte de los polímeros de la pared celular ²⁵. Este gran grupo tiene como precursores comunes a la L-fenilalanina y a la L-tirosina, están compuestos en una estructura de nueve carbonos (C₆-C₃) en donde el C₆ representa al anillo aromático y el C₃ representa a la cadena de fenilpropano cuyo doble enlace puede estar orientado en posición *cis* o *trans* ²⁶. El gran grupo de los ácidos hidroxicinámicos está conformado principalmente por el ácido: cinámico, ferúlico, *p*-cumárico, cafeico, clorogénico y rosmarínico; pueden observarse sus estructuras en la figura 12:

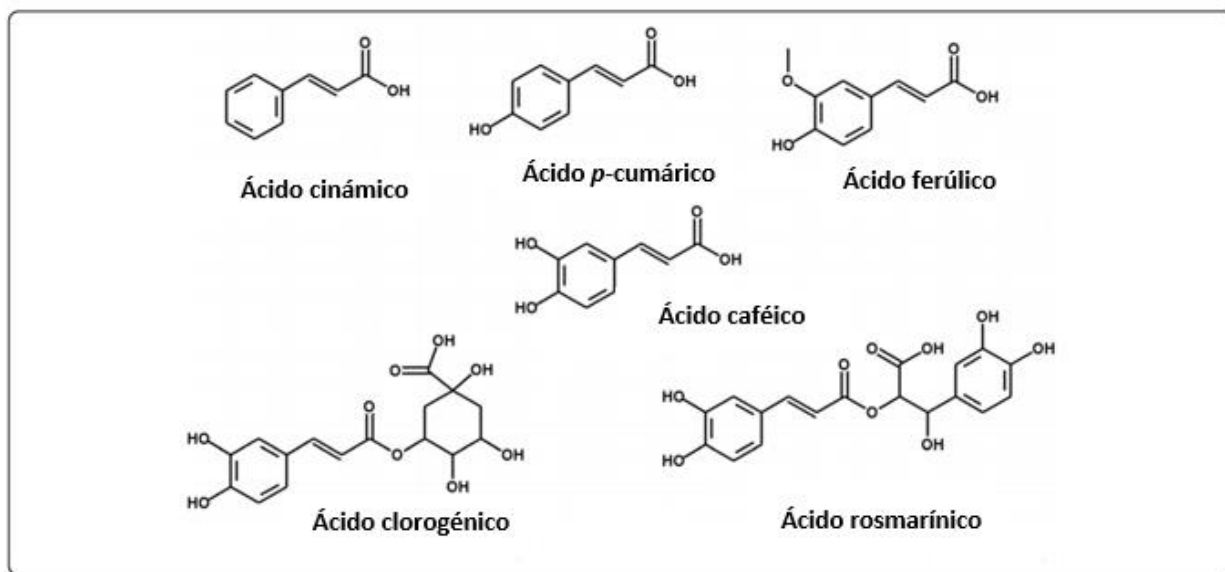


Figura 12. Principales ácidos hidroxicinámicos. (Modificado de: Alam, et al. 2016.)

Dentro de toda esta gran gama de ácidos hidroxicinámicos, el ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinámico), representa un compuesto particularmente interesante. Diversos estudios han comprobado su alta efectividad respecto a otros ácidos hidroxicinámicos como el ácido *p*-cumárico y el ácido ferúlico, en la prevención de la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL, *Low density lipoprotein*, por sus siglas en inglés), proteína cuya oxidación está asociada con afectaciones cardíacas por endurecimiento causada por la acumulación de lípidos en las paredes arteriales ²⁷.

También se ha evaluado su efectiva capacidad antiinflamatoria y anticoagulante en tejido cardiaco murino, sugiriendo propiedades cardioprotectoras ²⁸; así como algunas capacidades anticancerígenas en pruebas con líneas celulares HT1080 de fibrosarcoma humano ²⁹ (un tipo de cáncer en tejido conectivo), así como sus efectos antivirales *in vitro* sobre el virus herpes tipo HSV-1 ³⁰.

Los ácidos hidroxicinámicos, y particularmente el ácido cafeico y sus derivados (figura 13) están presentes en prácticamente todas las plantas puesto que son intermediarios en la síntesis de lignina, polímero estructural esencial de la pared celular vegetal ³¹. Se ha reportado concentraciones considerables de este compuesto en el café, los arándanos, manzana, papa, orégano, hierbabuena y semillas de girasol ³²⁻³⁴. Por lo que representa un antioxidante relevante en la dieta humana, además de que sus capacidades antioxidantes son superiores a la de los demás ácidos hidroxicinámicos como el ácido sinápico, ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico ³⁵.

Se ha estudiado la biodisponibilidad de este compuesto en humanos y se ha concluido que el ácido cafeico es capaz de absorberse en el intestino delgado hasta en un 95 %, valor significativamente mayor que el alcanzado por su derivado, el ácido clorogénico cuyo porcentaje de absorción está reportado en un 33 % ³⁶.

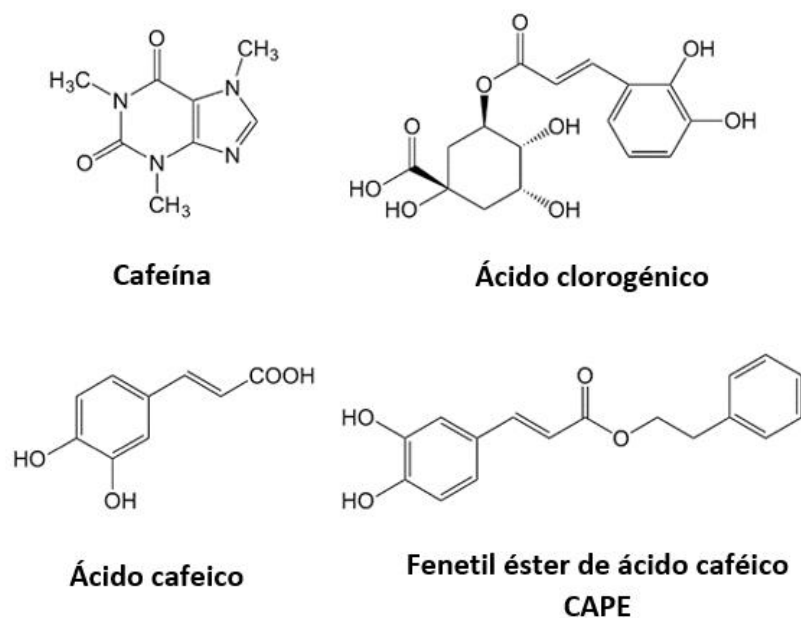


Figura 13. Estructura química del ácido cafeico y sus derivados. A pesar de que el nombre del compuesto “ácido cafeico” puede recordar a la cafeína (1,3,7-trimetilpurina-2,6-diona), ambas moléculas tienen diferencias estructurales fundamentales, siendo el primero un fenilpropanoide relativo a la familia de los ácidos hidroxicinámicos, mientras que el segundo es un alcaloide derivado de la purina ³⁷. El ácido clorogénico es un éster conformado por el ácido cafeico y el ácido quínico encontrado en concentraciones significativas en el café ³⁸ el cual se ha visto que en modelos murinos es hidrolizado por la microbiota en varios ácidos aromáticos incluyendo el ácido cafeico y el ácido quínico ³⁹. Por otra parte el fenetil éster de ácido cafeico (CAPE) es otro derivado del ácido cafeico y es un componente activo de los extractos de propóleo ⁴⁰ (mezcla de resinas vegetales producidas por abejas).


Además de sus aplicaciones en el campo farmacéutico, el ácido cafeico también ha sido estudiado como agente activo en productos cosméticos, que aunque este tipo de productos podría no tener la misma relevancia como los alimentarios o farmacéuticos, es un hecho que en décadas recientes se ha ido fomentando y ha ido creciendo el interés por el cuidado de la piel y el cabello principalmente ⁴¹, en este sentido el ácido cafeico se ha estudiado como posible agente fotoprotector contra radiación ultravioleta a través de experimentos en donde se observó su protección antioxidante sobre la fosfatidilcolina de membranas liposomales, así como su capacidad de permear a través del *stratum corneum* ⁴² (capa más externa de la epidermis).



Finalmente, otra aplicación del ácido cafeico fuera del campo alimentario, farmacéutico y cosmético es como agente anticorrosivo en la industria acerera. En este campo dadas las tendencias ecológicas dentro de los procesos industriales, se ha explorado la posibilidad de utilizar moléculas naturalmente disponibles que sean inhibitoras de la corrosión y que además tengan afinidad por superficies metálicas; algunos ejemplos de este tipo de compuestos orgánicos utilizados por esta industria son el ácido ascórbico ⁴³, el ácido succínico ⁴⁴ o la cafeína ⁴⁵.

El ácido cafeico también se ha estudiado como “agente verde anticorrosivo” y en este sentido se ha demostrado tener una eficiencia en la inhibición de la corrosión del acero en condiciones ácidas de hasta un 96 % ⁴⁶.

El ácido cafeico es tradicionalmente extraído a partir de materia vegetal.



Actualmente, la mayor parte de la extracción de este compuesto proviene de materia vegetal. En general, para obtener ácido cafeico se requieren grandes cantidades de biomasa (del orden de kilogramos) y es necesario el uso de solventes orgánicos. Si bien la obtención de este compuesto es exitosa, algunas problemáticas que se presentan son: el uso de solventes no amigables con el medio ambiente, bajos rendimientos de extracción y prolongado tiempo de crecimiento de las plantas. En el **Cuadro 8** se resumen algunos ejemplos y características de la extracción de ácido cafeico en plantas.






Planta	Cantidad y características notables de extracción.	Referencia	Imagen de la planta
<i>Echinacea angustifolia</i>	33.44 g _{cafeico} /Kg _(Peso seco) 2% Rendimiento de extracción. Biorreactor de 500 L Medio Murashige y Skoog 1 mes de cultivo	47	

<p><i>Elsholtzia splendens</i></p>	<p>3.4 g_{cafeico}/Kg(Peso seco)</p> <p>Extracción con éter de petróleo y etil acetato</p> <p>4 % rendimiento de extracción.</p> <p>7 meses de crecimiento</p>	<p>48</p>	
<p><i>Rhaponticum carthamoides</i></p>	<p>18 g_{cafeico}/Kg(Peso seco)</p> <p>Extracción con <i>n</i>-hexano y metanol. 6%rendimiento de extracción.</p> <p>3 años de crecimiento.</p>	<p>49</p>	

Cuadro 8. Principales fuentes vegetales para la extracción de ácido cafeico.

Además de su existencia en plantas, se ha determinado la presencia en cantidades considerables de este polifenol en otros productos vegetales y aunque ciertamente estos productos no son utilizados como materia prima principal para la obtención de ácido cafeico puesto que son alimentos, es relevante señalar que su consumo como parte de una alimentación balanceada, contribuye a mantener una salud general debido, principalmente, a su poderosa actividad antioxidante. En el **Cuadro 9** se dan algunos ejemplos de las cantidades de ácido cafeico determinadas por cromatografía líquida de algunos alimentos.

Alimento	Cantidad determinada por cromatografía líquida	Referencia	Imagen del alimento
<p>Salvia (seca)</p>	<p>21 mg_{cafeico}/100g(Peso seco)</p>	<p>33</p>	
<p>Semillas de girasol</p>	<p>8.17 mg_{cafeico}/100 g(Peso seco)</p>	<p>50</p>	

Vino tinto	1.81 mg _{cafeico} /100 mL	51	
Papa	1.62 mg _{cafeico} /100g(Peso seco)	52	
Arándano rojo americano	0.38 mg _{cafeico} /100g(Peso seco)	53	
Café	0.13 mg _{cafeico} /100 mL	54	
Aceite de oliva	0.02 mg _{cafeico} /100g	55	

Cuadro 9. Principales fuentes alimentarias de ácido cafeico.

La síntesis bacteriana de ácido cafeico representa una manera alternativa para su obtención.

Teniendo en cuenta el potencial que la ingeniería de vías metabólicas puede tener sobre la síntesis de compuestos aromáticos, se ha explorado la posibilidad de producir ácido cafeico de manera recombinante en bacterias, particularmente en el organismo modelo *E. coli*. Y en este sentido, varios estudios han demostrado que esta bacteria una vez modificada genéticamente para expresar diversas enzimas heterólogas es capaz de producir ácido cafeico. Uno de los primeros reportes en donde se identificaron las enzimas asociadas directamente a la biosíntesis de ácido cafeico fue detallado por Berner y colaboradores en el año 2006, en este estudio se identificaron los genes *sam8* y *sam5* que codifican para las enzimas tirosina amonio liasa (TAL) y 4-cumarato-3-hidroxilasa (C3H) en el actinomiceto *Saccharothrix espanaensis*⁵⁶. La vía de síntesis propuesta en este caso es que a partir de la L-tirosina se obtiene ácido *p*-cumárico por acción de la enzima TAL y que, una vez sintetizado este compuesto, la enzima C3H cataliza la conversión de ácido *p*-cumárico a ácido cafeico. La reacción propuesta se representa en la figura 14:

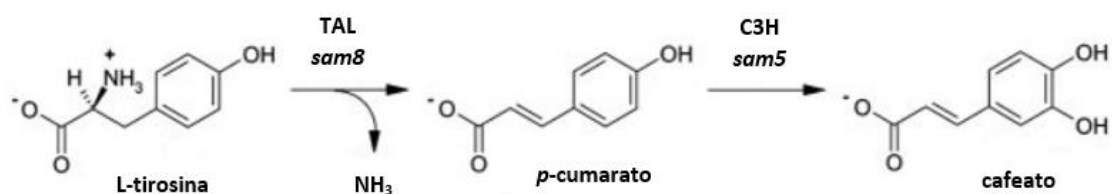


Figura 14. Esquema de representación de la biosíntesis de ácido cafeico. Propuesta en *Saccharothrix espanaensis*; los metabolitos aromáticos se representan en este caso en su forma aniónica. (Modificado de Berner; et al, 2006).

Este estudio resultó de gran relevancia puesto que se identificaron las enzimas y los sustratos en la biosíntesis de ácido cafeico en un microorganismo, fuera de las especies vegetales, lo que abrió la posibilidad para explorar la síntesis bacteriana de este compuesto a través de la expresión heteróloga de enzimas con la misma actividad en *E. coli*. Con la dilucidación de esta vía en *Saccharothrix espanaensis* se postuló que la esencia en la biosíntesis bacteriana de ácido cafeico está comprendida por la desaminación de la L-tirosina o L-fenilalanina y posterior hidroxilación en el anillo aromático de la molécula desaminada. Una vez teniendo clara las reacciones de desaminación y posterior hidroxilación de alguno de estos dos aminoácidos aromáticos se probó la actividad de algunas TAL como la de *Rhodobacter capsulatus*⁵⁷ y *Rhodobacter glutinis*⁵⁸ y de otras enzimas como la C3H con actividad de hidroxilasa como la enzima 4-hidroxifenilacetato-3-hidroxilasa (4HPA3H) nativa de *E. coli*⁵⁹, también encontrada en *Pseudomonas aeruginosa*⁶⁰ y el citocromo P450 de *Rhodopseudomonas palustris*⁶¹.

A continuación, se presentan algunos detalles de los principales trabajos en el tema de producción bacteriana de ácido cafeico mediada por *E. coli* bajo distintas condiciones de fermentación.

Enzimas – Organismo Genotipo de la E. coli productora.	Condiciones relevantes de fermentación	Título de ácido cafeico alcanzado (mg/L)	Referencia
TAL - <i>S. espanaensis</i> C3H - <i>S. espanaensis</i>	Inducción en medio LB. Fermentación en medio mínimo mineral M9. Glucosa como fuente de carbono. 26°C. 36 h de fermentación.	No reportado	62
TAL – <i>R. capsulatus</i> 4HPA3H – <i>E. coli</i>	Fermentación en medio mínimo M9.		57

<p>ΔtyrR; tyrA^{fbr}-ppsA-tktA-aroG^{fbr}.</p>	<p>Glucosa y glicerol como fuente de carbono.</p> <p>30°C.</p> <p>48 h de fermentación.</p>	<p>50.2 (En la cepa sobreproductora de tirosina)</p> <p>12.1 (En la cepa control, no sobreproductora de tirosina)</p>	
<p>CYP199A2 (Control & mutante F185L) – R. palustris Pdr – Pseudomonas putida Pux – R. palustris</p>	<p>Buffer de fosfato de potasio.</p> <p>Glucosa o glicerol como fuente de carbono.</p> <p>30°C.</p> <p>24 h de fermentación. 20 mM de ácido p-cumárico añadido.</p>	<p>510 (En la cepa control)</p> <p>2800 (En la cepa mutante)</p>	61
<p>TAL - R. glutinis C3H - S. espanaensis ΔpheA ΔtyrR; tyrA^{fbr}-aroG^{fbr}.</p>	<p>Varios medios de fermentación probados:</p> <p>Medio MOPS. (Glucosa o Xilosa como fuente de carbono).</p> <p>Medio sintético (Glucosa o xilosa)</p> <p>Medio LB (Glucosa o xilosa)</p> <p>37°C.</p> <p>7 días de fermentación en biorreactor.</p>	<p>88 (En medio LB, glucosa como fuente de carbono)</p> <p>106 (En biorreactor)</p>	58
<p>TAL - R. glutinis 4HPA3H - E. coli ΔpheA; tyrA^{fbr}-ppsA-tktA-aroG^{fbr}.</p>	<p>Medio mínimo mineral M9</p>	<p>3820 (cepa control)</p>	59

	<p>Glicerol o glicerol y glucosa como fuente de carbono.</p> <p>37°C.</p> <p>72 h de fermentación.</p> <p>20 mM de ácido <i>p</i>-cumárico añadido 3 h después de la inducción.</p> <p>3mM de ácido <i>p</i>-cumárico añadido (En el caso de la cepa control)</p>	766.68 (cepa sobreproductora de tirosina)	
4HPA3H – <i>P. aeruginosa</i>	<p>Buffer de fosfato de potasio.</p> <p>Glucosa o glicerol como fuente de carbono.</p> <p>30°C.</p> <p>24 h de fermentación.</p> <p>20 mM de ácido <i>p</i>-cumárico añadido.</p>	10200	60

Figura 15. Principales estudios de síntesis biotecnológica de ácido cafeico. (Modificado de Rodrigues; et al, 2015).

Para la producción de ácido cafeico en *E. coli*, esencialmente se requiere la desaminación de la L-tirosina o L-fenilalanina y posteriormente la hidroxilación en el anillo aromático, por lo que es necesaria la amplificación de desaminasas y de hidroxilasas, sin embargo, también se han explorado y desarrollado otras vías de biosíntesis artificial de ácido cafeico que involucran la expresión en *E. coli* de la enzima 4-cumarato-CoA ligasa (4CL) y tioesterasas. En la figura 16 se ejemplifica la vía natural de síntesis de ácido cafeico en plantas (indicada en el cuadro punteado), así como otras vías artificiales implementadas.

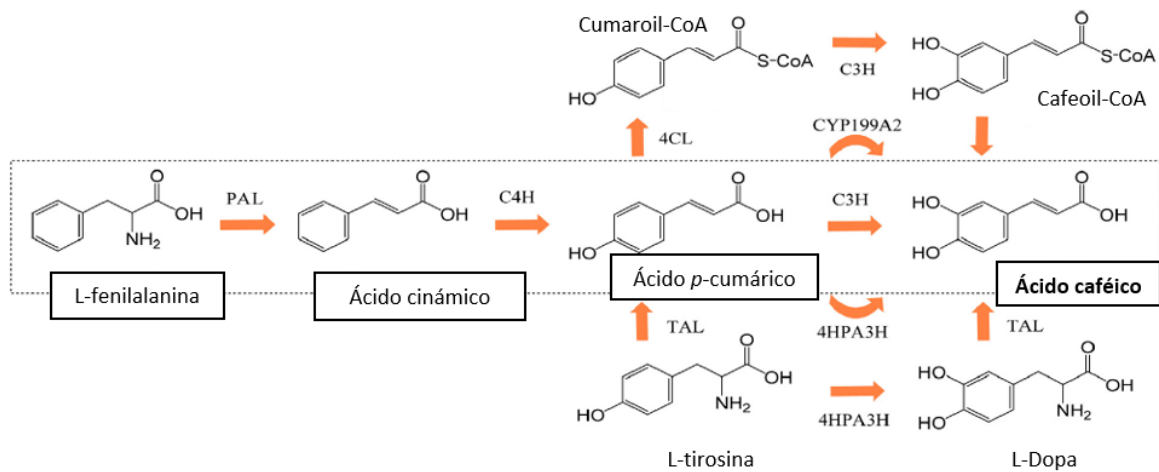
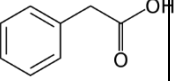
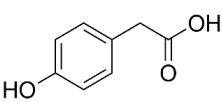
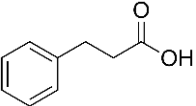
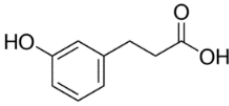
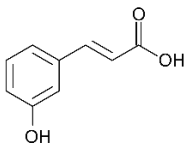


Figura 16. Biosíntesis de ácido cafeico (Modificado de Rodrigues, et al., 2015).

Abreviaciones: PAL: Fenilalanina amonio liasa; C4H: Cinamato-4-hidroxilasa; C3H: 4-cumarato-3hidroxilasa; 4CL: 4-cumarato-CoA-ligasa; 4HPA3H: 4-hidroxifenilacetato-3-hidroxilasa; TAL: Tirosina amonio liasa; CYP199A2: Citocromo P450 CYP199A2. La enzima 4CL se ha utilizado de *Potamogeton crispus* y la conversión de Cafeoil-CoA a ácido cafeico es mediada por la enzima tioesterasa propia de *E. coli*⁵⁸.

La enzima 4-hidroxifenilacetato-3-hidroxilasa de *E. coli* está involucrada en el metabolismo aromático y puede catalizar ácido p-cumárico a ácido cafeico.

La enzima para llevar a cabo la conversión de ácido p-cumárico a ácido cafeico que se decidió sobreexpresar fue la 4HPA3H la cual es una hidroxilasa propia de *E. coli* constituida por dos unidades, la unidad HpaB que es una monooxigenasa dependiente de FADH₂, y la unidad HpaC la cual es una flavín óxidorreductasa que utiliza NADH para mantener reducido a la molécula FAD⁺ la cual es requerida por la HpaB para hidroxilar a una gran variedad de compuestos aromáticos¹²². Esta enzima está involucrada en el metabolismo de compuestos aromáticos en las especies de *E. coli* B, C y W^{123,124} y se sabe que esta enzima tiene como sustrato natural al ácido 4-hidroxifenilacético, 3-hidroxifenilacético y el ácido homoprotocatecúico, y compuestos derivados de la fermentación de aminoácidos aromáticos y de la fermentación de residuos vegetales en el tracto intestinal de algunos animales. Reportes previos han determinado la capacidad de algunas especies de *E. coli* para crecer en medios de cultivo utilizando ciertos compuestos aromáticos como única fuente de carbono. Dentro de estos compuestos se encuentran el ácido fenilacético, el hidroxifenilacético, el fenilpropionico, el 3-hidroxifenilpropiónico y el ácido 3-hidroxicinámico, también denominado ácido m-cumárico¹²⁵. En el **Cuadro 10** se resume la capacidad (+) o incapacidad (-) de distintas cepas de *E. coli* de metabolizar los compuestos aromáticos antes señalados.

	Ácido aromático utilizado como única fuente de carbono				
Cepa	Fenilacético	Hidroxifenilacético	Fenilpropiónico	3HPP	3HCl
Estructura					
B	-	+	+	+	+
C	-	+	+	+	+
K-12	+	-	+	+	+
W	+	+	+	+	+
NCTC5928	+	-	+	+	+

Cuadro 10. Capacidad de degradación de algunos ácidos aromáticos por distintas especies de *E. coli*. Abreviaturas: 3HPP, Ácido 3-hidroxifenilpropiónico; 3HCl, Ácido *m*-cumárico. (Modificado de Díaz, et al., 2001 ¹²⁴).

En términos ecológicos es interesante notar que las capacidades de *E. coli* para metabolizar distintos compuestos aromáticos y ser capaz de utilizarlos como única fuente de carbono está asociada al nicho de desarrollo de esta bacteria, pues se sabe que *E. coli* es de los primeros microorganismos en colonizar el intestino humano, nicho en donde los aminoácidos aromáticos y los ácidos hidroxicinámicos constituyen la mayor fuente de compuestos aromáticos metabolizables por esta bacteria ¹²⁶.

La caracterización de la enzima 4HPA3H que es la que se utilizó en este trabajo para la catálisis de ácido *p*-cumárico a ácido cafeico surge de la dilucidación del metabolismo aromático en *E. coli*. Se sabe que esta enzima es codificada por el operón *hpaBC* el cual en *E. coli* W es parte del *cluster hpa* ¹²⁴. Este operón en *E. coli* está compuesto por once genes, ocho genes codificantes para enzimas los cuales están divididos en dos operones putativos: el operón de hidroxilación del 4-hidroxifenilacetato/3-hidroxifenilacetato (*hpaBC*) y el operón de degradación del 3,4-dihidroxifenilacetato (*hpaGEDFHI*); dos genes reguladores: *hpaR* y *hpaA*, los cuales controlan la expresión del operón *hpaGEDFHI* y del operón *hpaBC*, respectivamente; y finalmente el gen *hpaX* el cual codifica para una proteína transportadora de las moléculas 4-hidroxifenilacetato y 3-hidroxifenilacetato ¹⁰⁷, en el siguiente cuadro:

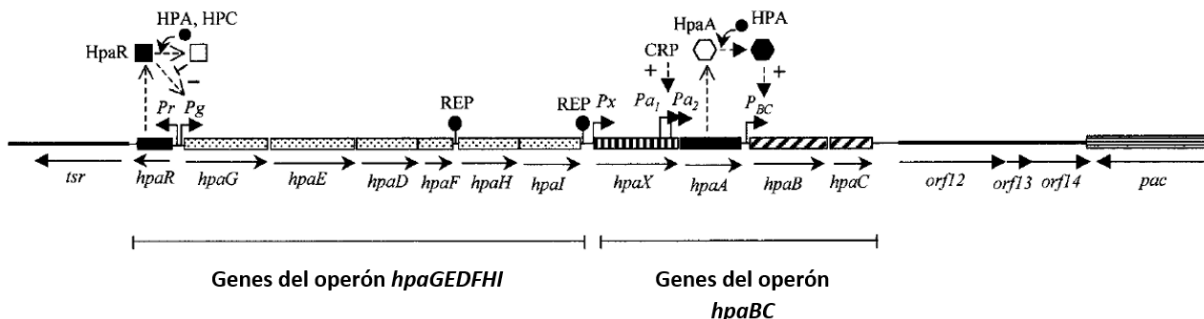


Figura 17. Representación de la disposición en el cromosoma del operón *hpaBC* y *hpaGEDFHI* en *E. coli* W. (Modificado de Díaz, et al., 2001¹⁰⁷).

Como se muestra en la figura 17, los genes de ambos operones están representados en bloques texturizados por líneas, los genes reguladores están representados por bloque negro (*hpaR*) y bloque de líneas verticales (*hpaX*). Los genes *tsr*, *orf12*, *orf13* y *orf14* son contiguos a estos operones de degradación de compuestos aromáticos y están anotados en el genoma de la *E. coli* ancestral K-12. Las flechas bajo los nombres de los genes representan la dirección de la transcripción. Las señalizaciones para P_r , P_g , P_x , P_{a_1} , P_{a_2} y P_{BC} indican a los promotores de los operones. Entre operones se encuentran indicadas las secuencias REP, las cuales son secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas que podrían estar implicadas en la regulación de la expresión de los operones a través del control de la degradación del mRNA¹²⁷. El represor HpaR y el activador HpaA están representados por un cuadro y un hexágono, respectivamente, si están en negro representan a al activador o al represor activo, en cambio, si están en blanco representan a estas moléculas en su forma inactiva; el símbolo + o – indican la activación o represión transcripcional, respectivamente. Finalmente, las moléculas HPA y HPC representan al hidroxifenilacetato y al 3,4-dihidroxifenilacetato, respectivamente, los compuestos aromáticos inductores de los operones.

La Vía de degradación del 4HPA y del 3HPA

A través de la expresión del operón *hpaBC* y *hpaGEDFHI* *E. coli* es capaz de utilizar el ácido 4-hidroxifenilacético (4HPA) y el ácido 3-hidroxifenilacético (3HPA) como única fuente de carbono y catabolizar estos compuestos a metabolitos centrales como el ácido succínico y el ácido pirúvico. A continuación, se muestra la vía metabólica propuesta en la degradación de estos ácidos aromáticos.

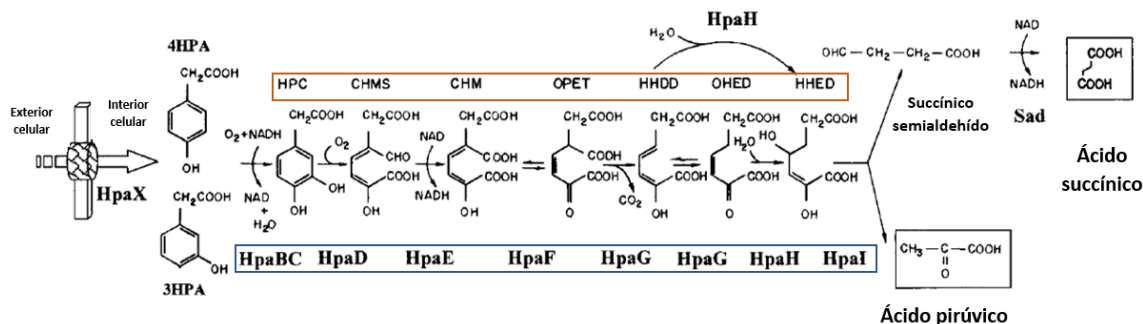


Figura 18. Metabolismo del ácido 4-hidroxifenilacético (4HPA) y 3-hidroxifenilacético (3HPA) en *E. coli*. *

* Los metabolitos están indicados en el rectángulo anaranjado y las enzimas están encerradas en el rectángulo azul; las abreviaturas son las siguientes: HPC, ácido 3,4-dihidroxifenilacético; CHMS, semialdehído 5-carboximetil-2-hidroxi-mucónico; CHM, ácido 5-carboximetil-2-hidroxi-mucónico; OPET, ácido 5-oxo-penta-3-ene-1,2,5-tricarboxílico; HHDD, ácido 2-hidroxi-hepta-2,4-dieno-1,7-diólico; OHED, ácido 2-oxo-hepta-3-ene-1,7-diólico; HHED, ácido 2,4-dihidroxi-hepta-2-ene-1,7-diólico. La abreviatura de las enzimas son las siguientes: HpaBC, 4-hidroxifenilacetato 3-hidroxilasa; HpaD, HPC 2,3-dioxigenasa; HpaE, CHMS deshidrogenasa; HpaF, CHM isomerasa; HpaG, OPET descarboxilasa; HpaH, hidratasa; HpaI, HHED aldolasa; Sad, aldehído succínico deshidrogenasa; HpaX, Proteína transportadora dehidroxifenilacetato. El exterior e interior celular están indicados, respectivamente.

Como se puede ver en la figura 17, la expresión de los operones *hpaBC* y *hpaGEDFHI* a través de ocho reacciones enzimáticas el 4HPA y el 3HPA pueden ser metabolizados a metabolitos centrales como el ácido pirúvico y semialdehído succínico, sin embargo, este último compuesto requiere de la acción de la deshidrogenación mediada por la enzima Sad para convertirse en ácido succínico y así ser parte de la vía central de los ácidos tricarboxílicos. Cabe señalar que la enzima Sad no es codificada por los operones anteriores ¹²⁸.

Es así como se ha descrito el metabolismo de algunas cepas *E. coli* utilizando 4HPA y 3HPA como únicas fuentes de carbono. Reportes previos han demostrado que ninguna de las cepas *E. coli* mostradas en la tabla anterior son capaces de crecer en compuestos como el ácido 2-hidroxifenilacetato, ácido cinámico, el ácido *ortho* y *para* cumárico y los ácidos hidroxifenilpropiónicos sustituidos con un grupo hidroxilo en la posición 2 y 4 ¹²⁵, lo cual demuestra la especificidad de los operones para ciertos compuestos aromáticos, esto de cierta manera es favorable en la producción de ácido cafeico a partir de ácido *p*-cumárico ya que por los experimentos de Burlingame y Chapman se determinó que *E. coli* no es capaz por sí misma de metabolizar el ácido *p*-cumárico ¹²⁵ y los experimentos de Peppercorn y Goldman concluyeron que *E. coli* tampoco puede utilizar ácido cafeico como fuente de carbono ¹²⁶; lo cual propicia un escenario ideal para la producción de este último compuesto en *E. coli*.

Las proteínas transportadoras facilitan el movimiento de algunos metabolitos secundarios.

Es sabido que tanto en células vegetales como en células bacterianas existe movimiento de moléculas entre las células y su entorno. Muchas veces en estos sistemas de transporte están involucrados los metabolitos secundarios, recordemos que este tipo de metabolitos son definidos como aquellos compuestos que no están directamente involucrados en el desarrollo y/o crecimiento del organismo ⁶³.

En el caso de plantas, los metabolitos secundarios son transportados entre células vecinas de un mismo tejido o de cierto tejido productor a partes remotas de la planta. La vacuola vegetal llega a ocupar entre un 40 – 90 % del volumen interno de la célula vegetal ⁶⁴. Y es en la vacuola en donde se almacena una gran parte de los metabolitos secundarios; en este orgánulo se han propuesto dos principales mecanismos para su transporte: Transporte secundario dependiente del gradiente de protones a través de proteínas de membrana de antiporte de H⁺ y los transportadores dependientes de energía asociados a ATP, los llamados transportadores ABC ⁶⁵ (*ATP-binding cassette*). Sin embargo, en términos generales, tratándose de plantas, los transportadores de metabolitos

secundarios han sido clasificados en cuatro grandes familias: los transportadores ABC, los transportadores de nitrato (NRT), los transportadores de eflujo de compuestos tóxicos (MATE; *Multidrug and toxic compound extrusión*) y las permeasas de purinas (PUP; *Purine permease*)⁶⁶.

En el **Cuadro 11** se presentan algunos ejemplos de transportadores con relación al tipo de compuesto que movilizan.

Transportador	Tipo de compuesto que transporta	Especie	Familia del transportador	Función fisiológica asociada	Referencia
Nt-JAT2	Alcaloide	<i>Nicotiana tabacum</i>	MATE	Transporte de nicotina hacia el interior de las vacuolas celulares de la hoja.	66
Nt-MATE1	Alcaloide	<i>Nicotiana tabacum</i>	MATE	Transporte de nicotina hacia el interior de las vacuolas celulares de la hoja.	67
NtPDR1	Terpenoide	<i>Nicotiana tabacum</i>	ABC	Transporte de eflujo de diterpenos	68
AtABCG40/AtPDR12	Terpenoide	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ABC	Transporte de esclareol	69
AtFFT	Compuestos fenólicos	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MATE	Transportador de flavonoides	70
VVAM1	Compuestos fenólicos	<i>Vitis vinifera</i>	MATE	Transporte de antocianinas aciladas hacia al interior de las vesículas	71

Cuadro 11. Ejemplos de proteínas transportadoras y sus sustratos.

La mayoría de los transportadores bacterianos están asociados a la resistencia a antibióticos

La mayor parte de la investigación en términos de fisiología bacteriana asociada con transportadores de metabolitos secundarios está relacionada con sistemas de transporte de eflujo que le permite a la bacteria contender con la toxicidad generada por los antibióticos. Históricamente, el estudio de los mecanismos bacterianos contra los antibióticos surge debido a la problemática de resistencia a los mismos⁷². Uno de los mecanismos utilizados por las bacterias para sobrevivir en presencia de antibióticos es que, una vez que el antibiótico ha logrado a travesar la membrana externa, caracterizada por su baja permeabilidad en el caso de las bacterias gram-

negativas ⁷³ y ha logrado entrar al citoplasma, este es expulsado hacia al exterior celular a través de las denominadas bombas de eflujo, las cuales con básicamente proteínas transmembranales ⁷⁴.

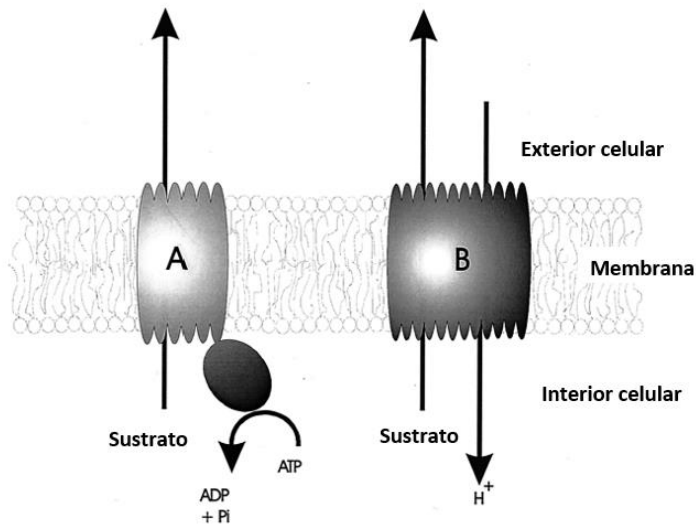


Figura 19. Esquema general del mecanismo de las proteínas transportadoras.

A) Los transportadores de la clase ABC aprovechan la energía libre generada por la hidrólisis de ATP para expulsar las moléculas fuera de la célula, mientras que los transportadores representados en B) son energizados por el movimiento generado por el gradiente electroquímico transmembranal de protones H^+ . (Esquema modificado de Putman et al. 2000).

Algunos transportadores pueden ser específicos para ciertas moléculas como es el caso del transportador de tetraciclina ⁷⁵, o bien pueden ser transportadores de una gama más amplia de compuestos no necesariamente relacionados en términos estructurales ⁷⁴ como el transportador AcrAB ⁷³.

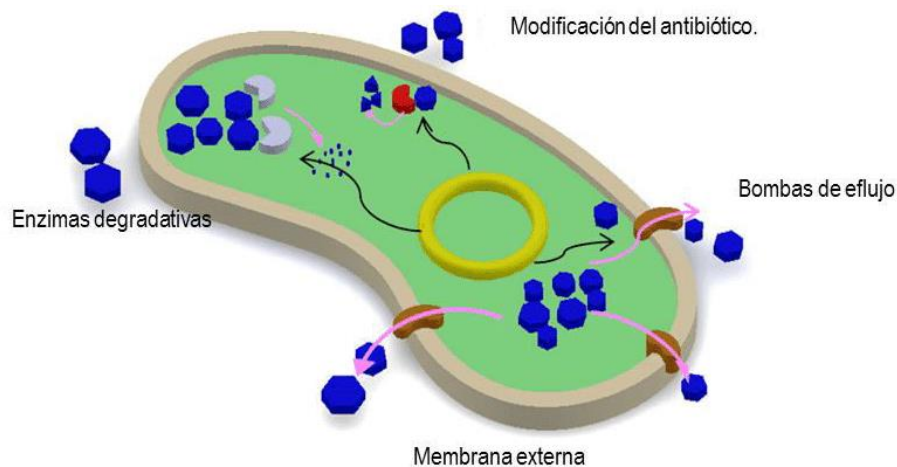


Figura 20. Esquema que representa de manera general los cuatro tipos de estrategias en bacterias para contender con la toxicidad generada por antibióticos ⁷⁶.

El transportador AaeXAB de *E. coli* tiene como sustrato al ácido *p*-hidroxibenzoico.

En el año 2004, Van Dyk y colaboradores reportaron la caracterizaron la expresión y la actividad de un transportador de ácidos carboxílicos aromáticos en *E. coli* (figura 21) encontrado en el operón *aaeXAB* que codifica para un sistema de eflujo transmembranal tripartita del mismo nombre AaeXAB y que está regulado por el gen *aaeR* que codifica para una proteína reguladora de la familia LysR, familia de reguladores transcripcionales altamente conservada en bacterias, descritas formalmente en especies como *E. coli*, *Salmonella entérica* serovar Typhimurium, *Rhizobium* spp. y *Enterobacter cloacae*⁷⁷.

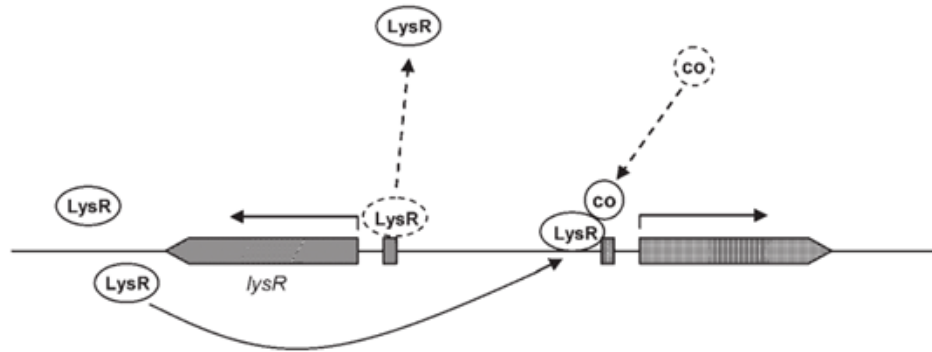


Figura 21. Esquema que representa la regulación transcripcional dependiente de proteínas del tipo LysR. El gene *lysR* se transcribe cuando la proteína LysR es disociada de su promotor. El producto del gen *lysR* se une río arriba del promotor del gen que será transcrito de manera divergente y en el momento que la proteína LysR interactúa con el co-inductor (el cual puede ser alguna otra molécula o proteína intermediaria en la vía de síntesis de alguna ruta metabólica, la transcripción del gen en cuestión es activada⁷⁸). Esquema tomado de Maddocks et al., 2008⁷⁹.

Se sabe que en *E. coli* el ácido *p*-hidroxibenzoico es el precursor en la síntesis de ubiquinona a través de ocho reacciones enzimáticas descritas en la figura 22:

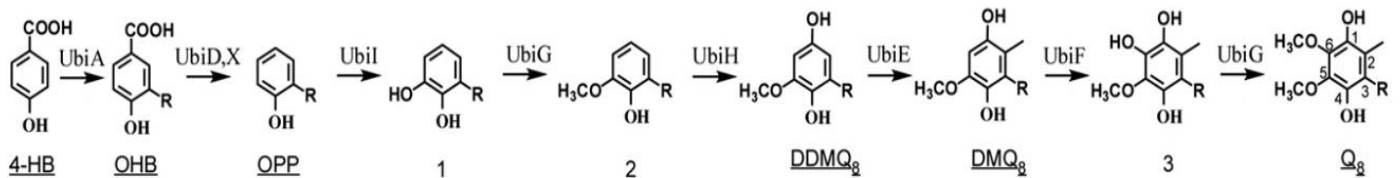


Figura 22. Ruta biosintética de la ubiquinona a partir de ácido *p*-hidroxibenzoico. Abreviaciones 4-HB: Ácido *p*-hidroxibenzoico; OHB: ácido 3-octapropenil-4-hidroxibenzoico; OPP: 3-octapropenilfenol; Q₈: Coenzima Q₈; DDMQ₈: C₁-demetil-C₆-demetóxido-Q₈; DMQ₈: C₆-demetóxido-Q₈. Modificado de Aussel et al., 2014⁸⁰.

La ubiquinona, también denominada coenzima Q₈ es una molécula lipídica involucrada en ciclos de óxido-reducción en el metabolismo de *E. coli*, está constituida por un anillo aromático asociado a una cadena de polipropileno de extensión variable según el metabolismo de la especie que lo sintetiza, en el caso de *E. coli* esta extensión es de ocho unidades ⁸¹. La ubiquinona Q₈ en procariontes es encontrada en la membrana plasmática de los organismos procariontes y ha sido descrita en términos fisiológicos como una molécula esencial en eventos como crecimiento aeróbico, la regulación de génica, la adaptación al estrés oxidativo y de varios procesos relacionados con fuerza motriz dependientes de protones ⁸². El precursor de la ubiquinona es el ácido *p*-hidroxibenzóico (*p*-HBA) el cual en la naturaleza es encontrado durante la degradación de ligninas, siendo este compuesto un representante mayoritario durante este proceso ⁸³. Van Dyk y colaboradores basaron su propuesta de funcionamiento del sistema de eflujo AaeXAB a través de experimentos en donde trataron a *E. coli* con *p*-HBA y otros ácidos carboxílicos aromáticos y determinaron la sensibilidad del sistema a estos compuestos, llegando a la consideración de que este sistema puede funcionar como una bomba de eflujo que cuando se llega a una concentración crítica en el interior celular, expulsa desde citoplasma a una gran variedad de compuestos aromáticos, sirviendo así como una especie de “válvula de alivio metabólico”. En la figura 23 se presenta un esquema del modelo operacional propuesto para el sistema AaeXAB.

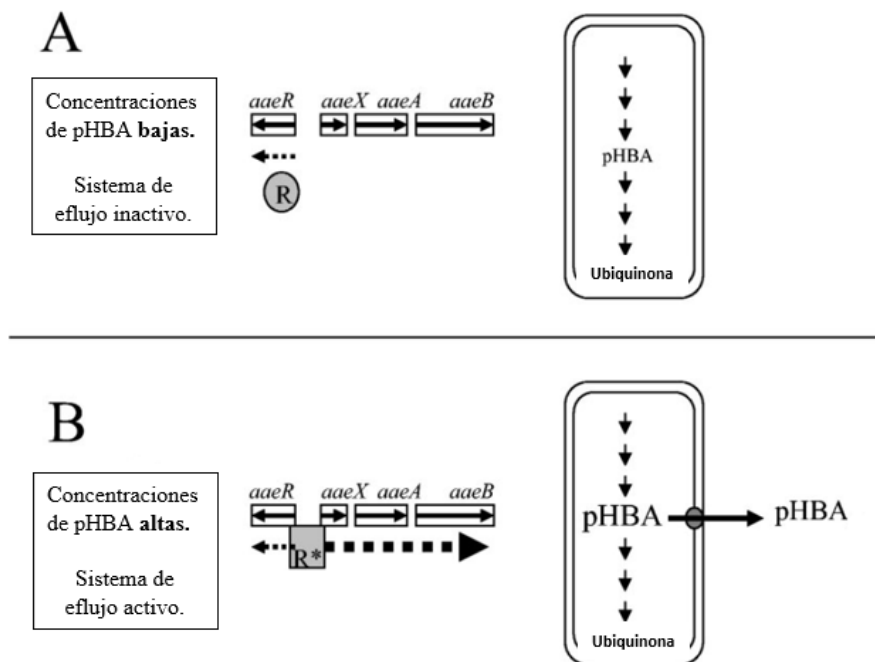


Figura 23. Modelo del funcionamiento del sistema AaeXAB basado en experimentos de cultivos de *E. coli* tratados con *p*-HBA.

A) Se representa al *p*-HBA como precursor en la síntesis de ubiquinona, este precursor es encontrado a bajas concentraciones intracelulares y aunque el gen *aaeR* se expresa, la forma inactiva de la proteína AaeR no permite la expresión del operón *aaeXAB*. **B)** En este caso las concentraciones intracelulares de *p*-HBA, este compuesto se une a la proteína AaeR de tal manera que pueda convertirse en su forma activa y así, promover la expresión del operón *aaeXAB* cuyo sistema de eflujo permitiría la salida de la célula del exceso de *p*-HBA, restaurando así las concentraciones intracelulares normales de *p*-HBA. (Modificado de Van Dyk, et al., 2004).

La proteína TolC está involucrada en múltiples sistemas de eflujo en *E. coli*.

En el contexto de las proteínas transportadoras en *E. coli*, TolC se ha convertido en un modelo de estudio debido a su participación en múltiples sistemas de eflujo involucrados en transporte de diversos tipos de moléculas que van desde proteínas tóxicas como la colicina hasta compuestos antibióticos como la vancomicina.

TolC es un componente proteínico presente en una variedad de sistemas de transporte bacterianos, particularmente en los sistemas de transporte tipo I en bacterias Gram-negativas. Por si solo TolC no es un sistema de transporte integral de membrana.

Según sus características y mecanismos de acción, se han descrito al menos cinco clases de sistemas de transporte bacterianos. Los del tipo I (figura 24) como TolC y AaeXAB (estudiados en este proyecto de tesis) son sistemas de transporte tripartitas, es decir, son complejos multiproteínicos en donde un componente está dispuesto en la membrana interna, otro en la membrana externa y el último está incorporado en el espacio periplásmico donde sirve de enlace entre los componentes de membrana interna y externa. La estructura cristalográfica de TolC (figura 25) se ha determinado y se ha visto que esta proteína es un componente de la membrana externa en sistemas de eflujo como AcrAB-TolC y EmrAB-TolC que contribuye a la resistencia a sales biliares, detergentes, ácidos grasos, solventes orgánicos y ácido nalidíxuco y tiolactomicina, respectivamente.

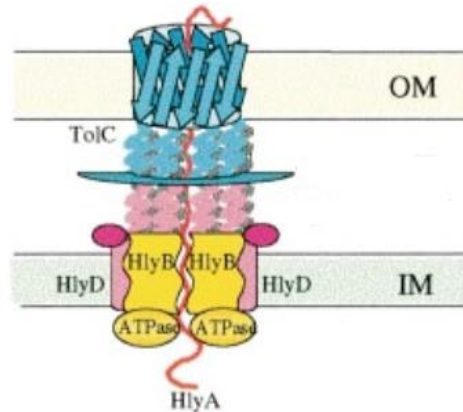


Figura 24. Sistema de excreción tipo I en *E. coli*. Este esquema representa la secreción de α -hemolisina del citoplasma al medio extracelular. Los tres componentes del sistema son: la proteína de membrana interna HlyB (asociada a la proteína HlyD de la membrana interna), las proteínas de fusión (en color rosa y verde) y la proteína de membrana externa TolC.

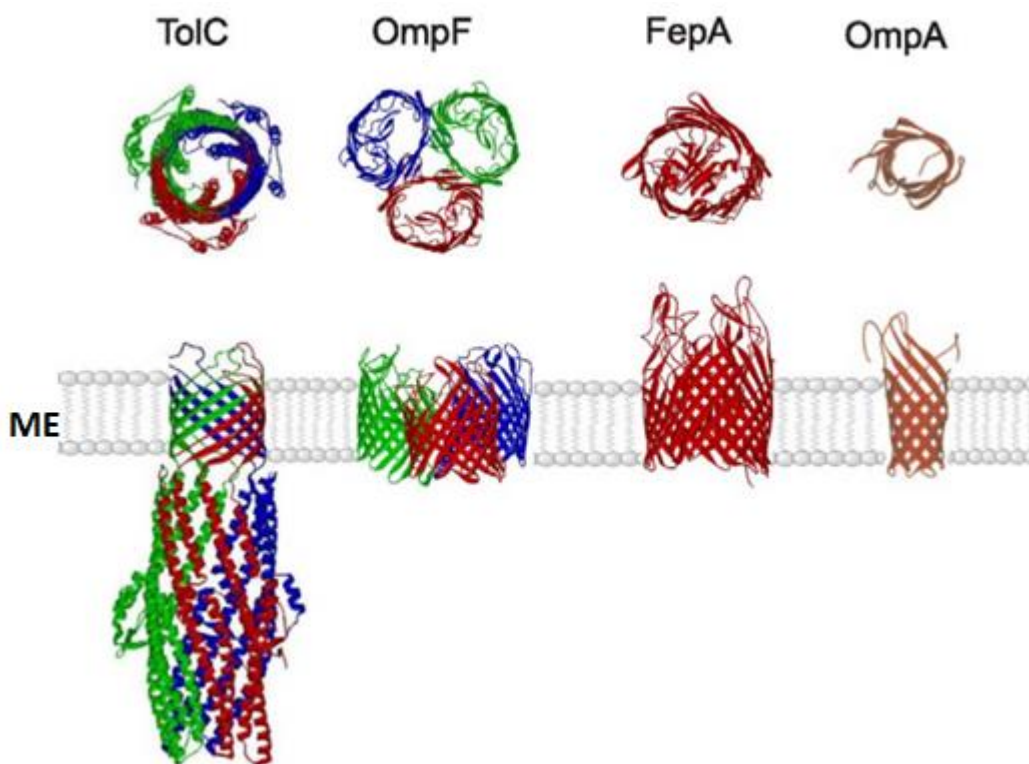


Figura 25. Estructuras cristalográficas generales de TolC y de otras proteínas de membrana externa de *E. coli*. **OmpF** (Outer membrane protein F), **FepA** (Ferreinenterobactin receptor precursor) y **OmpA** (Outer membrane protein A). **ME**: Membrana externa.

1.2 Justificación

Dado el potencial farmacéutico y nutracéutico que presenta el ácido cafeico fundamentalmente por sus propiedades antioxidantes (superiores a la de otros ácidos hidroxicinámicos) es deseable el incremento en su producción con fines de investigación, desarrollo y distribución; sin embargo algunas limitantes para su obtención a partir de materia vegetal están representadas por sus bajos rendimientos de extracción a partir de materia vegetal debido a la baja concentración que naturalmente existe en las plantas debido a su condición de molécula intermediaria en el metabolismo de los fenilpropanoides⁸⁴ y porque los métodos de extracción involucran el uso de altas temperaturas, tratamientos con compuestos derivados del petróleo y extracción con solventes como el metanol y acetato de etilo, haciendo del proceso de extracción un evento costoso y contaminante en términos ecológicos^{48,85}. Se ha demostrado ya en estudios previos con una *E. coli* genéticamente modificada que la producción bacteriana de ácido cafeico a partir de su precursor inmediato anterior, el ácido *p*-cumárico es posible, a través de la sobreexpresión de una enzima nativa de la propia *E. coli*, la enzima 4-hidroxifenilacetato-3-hidroxilasa (4HPA3H) codificada por el operón *hpaBC* la cual es capaz de hidroxilar al ácido *p*-cumárico (ácido 4-hidroxicinámico) en la posición 3 del anillo aromático convirtiéndolo en ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinámico).

Por otra parte, tratándose tanto del precursor como del producto de compuestos aromáticos y teniendo el antecedente de que en *E. coli* está reportado el sistema de eflujo AaeXAB específico para ácidos carboxílicos aromáticos, resulta interesante explorar el efecto que tendría la

sobreexpresión o la inactivación de este sistema sobre la capacidad de síntesis de ácido cafeico en *E. coli*, considerando que desde una perspectiva biotecnológica, los mecanismos de transporte celular representan objetivos atractivos de análisis puesto que pueden resultar críticos en estrategias que estén enfocadas en el mejoramiento de los parámetros de producción de compuestos de alto interés biotecnológico como es el caso de los compuestos aromáticos; en este caso del ácido cafeico. Son por tales motivos que resulta conveniente el estudio simultáneo de mecanismos enzimáticos involucrados en el metabolismo de moléculas aromáticas y en su transporte, como lo es la enzima 4HPA3H y el sistema de eflujo de ácidos carboxílicos aromáticos AaeXAB, respectivamente en el organismo modelo *E. coli* enfocado en la producción de un compuesto naturalmente valioso como el ácido cafeico.

2 Hipótesis

La inactivación en *E. coli* del sistema de transporte de ácidos carboxílicos aromáticos AaeXAB evitará la salida de ácido *p*-cumárico del interior celular, aumentando así la disponibilidad de este precursor y mejorando los parámetros de producción de ácido cafeico respecto a la cepa control con el sistema AaeXAB activo, en un cultivo de medio suplementado con ácido *p*-cumárico.

3 Objetivos

3.1 General

El objetivo general de este trabajo es evaluar el efecto que tiene el transportador de ácidos carboxílicos aromáticos AaeXAB de *E. coli* sobre la resistencia a la toxicidad de este tipo de compuestos y sobre la capacidad de síntesis de ácido cafeico a partir de la hidroxilación de ácido *p*-cumárico en una cepa con fondo genético W3110 que sobreexpresa la enzima 4-hidroxifenilacetato-3-hidroxilasa (4HPA3H).

3.2 Particulares

En tanto los objetivos particulares, derivados del objetivo general anterior son los siguientes:

- Determinar la sensibilidad al ácido *p*-cumárico y al ácido cafeico a través de la evaluación del crecimiento de la cepa *E. coli* W3110, *E. coli* W3110/pTrcaaeXAB, *E. coli* W3110Δ*aaeXAB*::*cat* en medios de cultivo con distintas concentraciones de estos ácidos.
- Transformar la cepa *E. coli* W3110 con el plásmido pTrc/*hpaBC* el cual codifica para la enzima 4HPA3H.

- Transformar la cepa *E. coli* W3110 Δ *aaeXAB::cat* con el plásmido pTrc/*hpaBC* el cual codifica para la enzima 4HPA3H.
- Determinar los parámetros cinéticos de los cultivos de producción bacteriana de ácido cafeico con las cepas *E. coli* W3110/pTrc*hpaBC* y *E. coli* W3110 Δ *aaeXAB::cat*/pTrc*hpaBC*.
- Determinar el efecto sobre la sensibilidad al ácido *p*-cumárico y al ácido cafeico en una cepa *E. coli* con la proteína TolC inactivada en medios de cultivo con distintas concentraciones de estos ácidos.

4 Materiales y Métodos

Cepas *E. coli* utilizadas en este proyecto

Cepa	Genotipo	Referencia
W3110	<i>F, λ, (rnnD-rnnE)</i>	ATTC 27325
W3110 Δ <i>aaeXAB</i>	Cepa W3110 con el sistema AaeXAB inactivado a través de la sustitución en el cromosoma por un <i>cassette</i> de resistencia a cloranfenicol.	Vargas-Tah, 2015.
W3110/pTrc <i>aaeXAB</i>	Cepa W3110 transformada con el plásmido pTrc clonado con el operón <i>aaeXAB</i> de la especie <i>E. coli</i> W.	Vargas-Tah, 2015.
W3110 Δ <i>aaeXAB</i> /pTrc <i>hpaBC</i>	Cepa W3110 con el sistema AaeXAB inactivado y sustituido por un <i>cassette</i> de resistencia a cloranfenicol, transformada con el plásmido pTrc <i>hpaBC</i> que expresa la enzima 4HPA3H.	Este trabajo.
W3110/pTrc <i>hpaBC</i>	Cepa W3110 transformada con el plásmido pTrc <i>hpaBC</i> que sobreexpresa la enzima 4HPA3H.	Este trabajo.
W3110 Δ <i>tolC::Km^a</i>	Cepa W3110 cuyo gen <i>tolC</i> que codifica para la proteína des mismo nombre está sustituido por un <i>cassette</i> de resistencia a kanamicina.	Este trabajo.

Cuadro 12. Descripción general de las cepas *E. coli* utilizadas en este proyecto.

^a En la construcción de este modelo se utilizó como cepa donadora la colección de KEIO mutante en *tolC*. La técnica de transducción de DNA mediada por el fago P1 fue empleada en este proyecto para transferir el material genético de la mutante de KEIO a la cepa receptora *E. coli* W3110.

Plásmidos

Plásmido	Características	Referencia
pTrc99A	Vector de expresión de alto número de copias bajo el promotor <i>trc</i>	Este trabajo
pTrchpaBC	Vector de expresión bajo el promotor <i>trc</i> clonado con los genes <i>hpaBC</i> que codifica a la enzima 4HPA3H de la especie <i>E. coli</i> W	Este trabajo.
pTrcaaeXAB	Vector de expresión bajo el promotor <i>trc</i> clonado con el operón <i>aaeXAB</i> que codifica el sistema de eflujo de ácidos carboxílicos aromáticos AaeXAB.	Vargas-Tah.

Cuadro 13. Descripción general de los plásmidos utilizados en este proyecto.

Criopreservación de cepas.

La criopreservación de cepas es una manera efectiva de conservar y mantener durante largos periodos de tiempo cepas de *E. coli*. Para ello se utilizan tupos de polipropileno de 1.6 mL en los cuales se vierten 800 μ L de cultivo saturado de la cepa de interés y 800 μ L de glicerol en una concentración de 80 % previamente esterilizado. Los componentes se mezclan por inversión y se almacenan en un ultracongelador a una temperatura de -70°C.

Extracción de DNA plasmídico por el método de miniprep por lisis alcalina.

El plásmido pTrchpaBC utilizado en este trabajo fue mandado a sintetizar por la compañía GenScript®. Este plásmido se extrajo de la cepa *E. coli* W3110 a través del protocolo de "Miniprep por lisis alcalina" establecido en el Laboratorio de Ingeniería del Vías Metabólicas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Este método está basado en la desnaturalización alcalina selectiva de DNA de alto peso molecular con soluciones cuyo valor de pH ronda entre 12 y 12.5; plásmidos de DNA circular unidos de manera covalente y cerrados, permanecen en la conformación de doble cadena. La extracción de DNA a través del método de "Miniprep por lisis alcalina" permite extraer DNA plasmídico de manera simple y eficiente, además de ser lo suficientemente libre de impurezas, lo cual permite su uso en técnicas de biología molecular como reacciones de restricción, reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) o transformación bacteriana.

Transformación de *E. coli* con DNA plasmídico.

El proceso de transformación bacteriana por electroporación es un método de alta eficiencia a través del cual se introduce DNA exógeno mediante la aplicación de un pulso eléctrico breve e

intenso a soluciones bacterianas previamente tratadas en frío para facilitar la apertura de microporos en la célula a través de los cuales el DNA plasmídico podrá introducirse. Las múltiples transformaciones bacterianas llevadas a cabo durante este proyecto se realizaron siguiendo el protocolo establecido en el Laboratorio de Ingeniería del Vías Metabólicas; para introducir los vectores y transformar las cepas W3110 y W3110 Δ aaeXAB.

Medios de cultivo

Preinóculo.

El preinóculo consiste en reactivar el metabolismo celular bacteriano una vez que la cepa es sacada de la condición de criopreservación a una temperatura de -70°C. Para tal fin se tomó una muestra de la suspensión bacteriana conservada en glicerol con un asa previamente esterilizada por calentamiento y se resuspendió en 4 ml de medio LB con 4 ml del antibiótico de selección correspondiente en una concentración de 100 mg/ml en el caso de la carbenicilina (Cb) y de 30 mg/ml en el caso del cloranfenicol (Cm) durante 14 h en tubos de ensayo para su incubación a una temperatura de 37° y una agitación de 300 rpm. Posteriormente se determinó la densidad óptica (D.O) del cultivo y se realizó el cálculo necesario del volumen requerido para el inicio de la adaptación de las cepas en medio mínimo mineral M9 en 0.05 D.O.

Inóculo adaptativo.

El inóculo utilizado para evaluar la sensibilidad de las cepas *E. coli* a distintas concentraciones de ácido *p*-cumárico y de ácido cafeico así como el de las fermentaciones del ácido *p*-cumárico fue primero adaptado en medio mínimo mineral M9. Este inóculo adaptativo se realizó en matraces bafleados de 125 mL con 25 mL de medio M9. Para las cinéticas de evaluación de la sensibilidad a los ácidos *p*-cumárico y cafeico la fuente de carbono utilizada fue glucosa en una concentración de 2g/L, mientras que la fuente de carbono utilizada en las fermentaciones de ácido *p*-cumárico a ácido cafeico fue glicerol en una concentración de 10 g/L. Los componentes del medio mineral M9 por litro son los siguientes: Na₂HPO₄ (6g), KH₂PO₄ (3g), NaCl (0.5 g), NH₄Cl (1g), MgSO₄ (2 mM), CaCl₂ (0.1 mM), vitamina B₁ (0.01 g) y el antibiótico correspondiente según la cepa. Las condiciones de incubación fueron 37°C y 300 rpm durante 16 horas.

Cinética de crecimiento microbiano bajo distintas concentraciones de ácido p-cumárico y de ácido cafeico.

La determinación de la sensibilidad de las distintas cepas de *E. coli* bajo diferentes concentraciones de ácido *p*-cumárico y de ácido cafeico se llevó a cabo en medio mínimo mineral M9 con glucosa como fuente de carbono en una concentración de 2 g/L y el antibiótico correspondiente según la cepa. Las condiciones de cultivo fueron 37°C y 300 rpm. Partiendo del inóculo adaptativo, las

cinéticas de determinación del crecimiento microbiano en esta etapa del proyecto se iniciaron con una $D.O_{600\text{ nm}}$ de 0.1 en matraces bafleados de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo.

Cultivos de producción bacteriana de ácido cafeico a partir de ácido p-cumárico .

Las cinéticas de producción de ácido cafeico a partir de ácido *p*-cumárico se llevaron a cabo en matraces de 250 mL utilizando 50 mL de medio M9 siendo el glicerol en una concentración de 10 g/L la fuente de carbono. El medio fue suplementado con 4 g/L de ácido *p*-cumárico, los antibióticos correspondientes (Cb o Cm) según la cepa en cuestión y con IPTG como inductor en una concentración de 0.1 mM cuando los cultivos llegaron a una biomasa con valor de 0.3 $D.O_{600}$. En cada tiempo de muestreo se tomó una muestra de 1 mL de cultivo y se centrifugó a máxima velocidad (13400 rpm) por 5 minutos, el medio libre de células fue recuperado y conservado a -20°C hasta su análisis a través de HPLC.

Métodos Analíticos

Densidad óptica.

La densidad óptica se determinó en un espectrofotómetro Thermo Scientific® Modelo Genesys 10s UV-Visible con una longitud de onda de 600 nm de absorbancia. El valor de la $D.O$ convertido a gramos de peso seco se obtiene usando la siguiente equivalencia $1 D.O_{600\text{ nm}} = 0.37\text{ g/L}$ de biomasa seca.

Cuantificación de la fuente de carbono y el subproducto de fermentación.

La cuantificación de glicerol y de ácido acético se llevó a cabo de manera cromatográfica a través de un equipo de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de la marca Waters® empleando una columna Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm; 9 μM), de Bio-Rad®, acoplada a un detector de índice de refracción (Waters® 996). La fase móvil utilizada fue H_2SO_4 5 mM con un flujo de 0.5 mL/min y una temperatura de 50°C . Las muestras fueron filtradas con membranas de 0.45 μm .

Cuantificación de ácido p-cumárico y ácido cafeico

La cuantificación de ácido *p*-cumárico y ácido cafeico se realizó a través de un HPLC Agilent® 1100 System con un detector de arreglo de diodos, este equipo también cuenta con un detector de UV de longitud de onda múltiple. Se utilizó una columna Supelco Discovery C18, La fase móvil utilizada consistió de agua con ácido trifluoroacético al 0.1 % y de metanol al 40 % con ácido trifluoroacético al 0.1 % a un flujo de 0.5 mL/min y una temperatura de 45°C . La detección para ambos compuestos se llevó a cabo a 280 nm. Bajo estas condiciones el tiempo de retención del ácido *p*-cumárico fue de

13.1 minutos y el del ácido cafeico fue de 11.2 minutos. Las muestras analizadas para la detección de estos ácidos fueron centrifugadas y los sobrenadantes fueron filtrados con membranas de nylon de 0.45 μm .

Parámetros cinéticos y estequiométricos

- (Tomando una curva estándar de D.O vs. gramos (peso seco), se determinó que 1 D.O_{600 nm} = 0.37 g_{peso seco}/L.)
- Estimación de la velocidad específica de crecimiento.

La velocidad específica de crecimiento (μ) se determinó durante la fase exponencial de crecimiento. Se utilizó un coeficiente de correlación mayor a 0.97 en las pendientes. La ecuación en la fase de crecimiento exponencial se caracteriza de la siguiente manera:

$$\ln N - \ln N_0 = \mu (t - t_0). \text{ (El valor de } \mu \text{ se expresa en términos de } h^{-1}\text{).}$$

- Velocidad específica de consumo de sustrato en la fase exponencial de crecimiento ($q_s \text{ exp}$).

$$q_s \text{ exp} = \mu / Y_{x/s \text{ exp}}$$

μ = Velocidad específica de crecimiento microbiano.

$Y_{x/s \text{ exp}}$ = rendimiento de biomasa con respecto al sustrato durante la fase exponencial.

- Velocidad específica de producción en la fase exponencial ($q_p \text{ exp}$).

$$q_p \text{ exp} = \mu * Y_{p/s \text{ exp}}$$

$Y_{p/s \text{ exp}}$ = rendimiento del producto respecto al sustrato durante la fase exponencial.

- Productividad volumétrica.

Q_p = g de producto/volumen en L * tiempo del cultivo (en el momento de máxima concentración de producto) (g/L*h)

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Evaluación de la sensibilidad al ácido *p*-cumárico y ácido cafeico de distintas cepas *E. coli*.

En esta primera etapa del proyecto se decidió abordar la pregunta de qué efecto tiene la presencia en el medio de cultivo tanto del ácido *p*-cumárico (precursor) como el ácido cafeico (producto) sobre la capacidad de crecimiento de *E. coli*, considerando que la estrategia de producción de ácido cafeico a partir de ácido *p*-cumárico constará de un solo paso a través de la hidroxilación de este último mediada por la actividad de la enzima 4HPA3H de *E. coli* W sobreexpresada en el fondo genético W3110. El fundamento de la evaluación de la capacidad de crecimiento bajo distintas concentraciones de ácido *p*-cumárico y ácido cafeico es determinar la sensibilidad de *E. coli* a estos

ácidos y por ende el nivel de toxicidad que representan, lo cual en última instancia representa una limitante importante en el campo de la producción heteróloga de metabolitos especializados de plantas como es el caso del ácido cafeico. La evaluación del crecimiento microbiano que se genera en el medio de cultivo bajo condiciones de estrés resulta esencial ya que es un parámetro práctico de cuantificar el cual refleja el estatus general del metabolismo bacteriano en términos de producción de biomasa y de generación y mantenimiento de energía metabólica necesaria para mantener esa biomasa ⁸⁶. En el **Cuadro 14** se muestra un cuadro que engloba la información de la velocidad específica de crecimiento (μ) de la cepa bacteriana indicada, así como el tipo de ácido con la que fue tratada y su concentración en unidades milimolares y en gramos por litro.

	Concentración utilizada de ácidos	BL21 (DE3)	W3110	W3110 Δ aaeXAB	W3110/pTrcaaeXAB	W3110 Δ ToIC
Control	Sin ácidos adicionados	0.571 \pm 0.2 h ⁻¹	0.581 \pm 0.2 h ⁻¹	0.54 \pm 0.23 h ⁻¹	0.55 \pm 0.12 h ⁻¹	0.419 \pm 0.17 h ⁻¹
Ácido cumárico	2.25 g/L (12.5 mM)	-	0.378 \pm 0.11 h ⁻¹	0.176 \pm 0.07 h ⁻¹	-	0.178 \pm 0.06 h ⁻¹
	4.5 g/L (25 mM)	0.35 \pm 0.08 h ⁻¹	0.35 \pm 0.15 h ⁻¹	0.044 \pm 0.03 h ⁻¹	0.29 \pm 0.08 h ⁻¹	No hubo crecimiento
	9 g/L (50 mM)	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento
Ácido cafeico	4.5 g/L (25 mM)	0.13 \pm 0.03 h ⁻¹	0.12 \pm 0.03 h ⁻¹	0.12 \pm 0.05 h ⁻¹	0.12 \pm 0.04 h ⁻¹	0.123 \pm 0.06 h ⁻¹
	9 g/L (50 mM)	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento

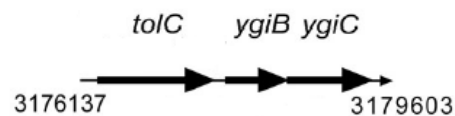
Cuadro 14. Resultados de las pruebas de sensibilidad al ácido *p*-cumárico y al ácido cafeico sobre el crecimiento de distintas cepas *E. coli*.

Como se puede observar en el **Cuadro 14**, en estas evaluaciones de la sensibilidad de *E. coli* a los distintos ácidos, se utilizaron cinco cepas distintas: BL21 (DE3), W3110, W3110 Δ aaeXAB, W3110/pTrcaaeXAB y W3110 Δ ToIC. En primera instancia se realizó para cada cepa, una cinética de crecimiento microbiano sin los ácidos adicionados, en matraz con medio mínimo mineral M9 adicionado con glucosa como fuente de carbono en una concentración de 2 g/L, incubado a 37° C y 300 rpm sin ácido *p*-cumárico ni ácido cafeico adicionado, esto con la finalidad de tener el control de referencia del crecimiento particularmente en medio mínimo, el cual es un tipo de medio completo en sales ampliamente usado en el campo de la microbiología debido a que es un medio de fácil preparación y que contiene los requerimientos esenciales para soportar el crecimiento microbiano a la vez que permite realizar determinaciones cuantitativas del crecimiento con diversos sustratos y fuentes de carbono ⁸⁷ en este caso la glucosa fue la fuente de carbono, la preferencial

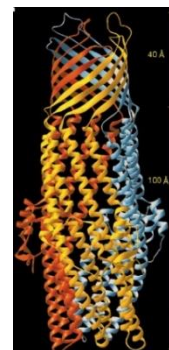
de *E. coli* sobre la lactosa o el glicerol ²⁰. En el caso de las cinéticas de crecimiento control, sin los ácidos hidroxicinámicos adicionados, se observa que el valor de la velocidad específica de crecimiento (μ) en general para todas las cepas rondan entre 0.54 y 0.57 h⁻¹, menos para la cepa W3110 Δ to/C la cual tuvo un valor relativamente menor con una μ de 0.41 h⁻¹. El valor de la velocidad específica de crecimiento en este medio con glucosa como fuente de carbono en una concentración de 2 g/L para la cepa W3110 fue de 0.58 h⁻¹, similar al previamente reportado por Varma & Palsson en 1994 en un estudio especializado en la caracterización de esta misma cepa ⁸⁸. *E. coli* W3110 es una cepa derivada de la *E. coli* ancestral denominada K-12, elegida por prácticamente todos los grupos de investigación en el mundo puesto que ha sido la más exhaustivamente estudiada; a diferencia de la cepa parental K-12, la variante W3110 tiene un factor de fertilidad negativo F⁻, lo que significa que no posee los genes que codifican para el pilus sexual requerido durante el proceso de conjugación bacteriana y carece del profago λ ⁸⁹; el genoma de esta cepa ha sido completamente secuenciado ^{89,90}, es fácil de crecer en medio mínimo (es un organismo protótrofo) y tiene un tiempo de generación corto. La cepa *E. coli* BL21 (DE3) por otra parte es una cepa ampliamente usada para la producción de proteínas recombinantes bajo el control de la RNA polimerasa del fago T7 ⁹¹, a diferencia de la cepa W3110, el profago DE3 se integró en un sitio adjunto para proveer a la cepa BL21 de una fuente de polimerasa del fago T7 para la producción de proteínas recombinantes. La cepa BL21 adicionalmente, posee una baja actividad de las proteasas codificadas por los genes *lon* y *ompT* lo cual la hace todavía más una cepa adecuada para la sobreexpresión de proteínas ⁹², considerando que la estrategia de producción de ácido cafeico a partir de ácido *p*-cumárico sería mediada por la actividad dada por la sobreexpresión e inducción de la enzima 4HPA3H de *E. coli*, en esta etapa del proyecto se consideró adecuado caracterizar su crecimiento bajo distintas concentraciones de estos ácidos hidroxicinámicos. Al igual que con la cepa W3110, el crecimiento de la cepa BL21(DE3) se cotejó con lo previamente reportado en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono siendo el valor de 0.57 h⁻¹ similar a lo reportado por Natarajan y Srienc en el 2000 ⁹³. Los valores de la μ para todas las cepas en medio mínimo son similares, sin embargo, es ligeramente menor en el caso de la cepa W3110 con el gen *to/C* inactivado. La idea de incluir en esta serie de experimentos de evaluación de sensibilidad a ácidos hidroxicinámicos a una cepa W3110 con el gen *to/C* inactivado se consideró como un modelo de referencia futura en la comparación de una proteína que forma parte de diversos sistemas de transporte transmembranal en *E. coli* con sustratos de diversa índole, a diferencia del sistema AaeXAB especializado en el transporte hacia el exterior de la célula de diversos ácidos carboxílicos aromáticos.

TolC es una proteína de membrana externa codificada por el gen del mismo nombre, esta proteína está involucrada en aspectos relacionados con la integridad, permeabilidad y regulación de otras proteínas de membrana externa en bacterias gram-negativas ⁹⁴. TolC forma parte de un grupo de proteínas denominadas proteínas de eflujo de membrana externa. Se ha visto que esta proteína es capaz de asociarse con otros sistemas de transporte transmembranal como los del tipo *cassette* de unión a ATP (sistema de transporte del tipo ABC), los del tipo de resistencia a división por nodulación (denominados RND) y los del grupo de facilitadores principales ⁹⁵ (denominados MF). El valor de la μ para la cepa con el gen *to/C* inactivo fue de 0.42 h⁻¹, el menor de todas las cepas en el cultivo control sin los ácidos hidroxicinámicos adicionados, cotejando este resultado con la literatura se encontró un estudio en donde se evalúa el impacto que tiene la mutación en *to/C* sobre la fisiología de *E. coli* en términos de la integridad de la membrana plasmática, del balance de óxido-reducción dado por la relación NADH/NAD⁺ y del crecimiento bacteriano, en el estudio de Dhamdhare y Zgurskaya ⁹⁶ se reporta el crecimiento en medio mínimo mineral M9 con glucosa como fuente de carbono de la cepa *E. coli* en el fondo genético BW25113 con genotipo: *lac*^q, *rrnB*_{T14}, *DlacZ*_{WJ16}, *hdsR514*, Δ araBADAH33, Δ *ΔrhaBAD*_{LD78} mutada en *to/C* ⁹⁷, siendo el valor de la velocidad específica

de crecimiento 0.44 h^{-1} , valor muy similar al obtenido en este trabajo pero en la cepa *E. coli* con fondo genético W3110, el cual fue de 0.42 h^{-1} . En este caso, respecto a la cepa control *E. coli* W3110, la disminución en la velocidad específica de crecimiento es del 28 %, en el caso del estudio con la cepa *E. coli* BW25113 Δ *tolC*, la disminución del valor de la μ respecto a la cepa parental *E. coli* BW25113 fue de 29 %, coincidiendo prácticamente con el porcentaje de disminución en el fondo genético W3110, lo cual sugiere que a pesar de tratarse de fondos genéticos distintos, la simple mutación en *tolC* causa un efecto negativo sobre el crecimiento en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono, esto previo a la adición de agentes que generen estrés en el cultivo como los ácidos hidroxicinámicos. Se sabe que en el genoma de *E. coli* y de varias enterobacterias el gen *tolC* se encuentra en el locus cromosomal que también contiene a otros dos genes: *ygiB*, *ygiC*; los cuales presumiblemente se expresan como un solo operón⁹⁶. Con base en el análisis de secuencia de los aminoácidos de las otras dos proteínas que conforman el operón se determinó a YgiB como una lipoproteína de membrana externa la cual contiene un péptido señal tipo II, tipo de péptido em donde la secuencia señal forma un bucle a través de la membrana, y el extremo C-terminal de la proteína es transferido a través de la membrana mientras que el extremo N-terminal permanece del lado citoplasmático⁹⁸. De igual manera el análisis de la secuencia de la proteína YgiC (figura 26) determinó homología significativa con la enzima glutationil espermidina sintasa, enzima que cataliza la síntesis de glutationil espermidina a partir de una molécula de glutatión, una de espermidina y una de ATP; esta enzima está involucrada en el metabolismo del glutatión, responsable, entre otras moléculas del mantenimiento un ambiente intracelular reductor en *E. coli*. Sin embargo, la función en conjunto de las tres proteínas sobre la fisiología general en *E. coli* aún es un aspecto a dilucidar⁹⁶.



A)



B)

Figura 26. Representación diagramática de *tolC* formando parte de un operón que codifica a un sistema de excreción de tetraciclina en *E. coli* y estructura cristalográfica de TolC. **A)** Representación de *tolC* siendo parte del operón junto con los genes *ygiBC* en el cromosoma de *E. coli*, los números que se encuentran flanqueando los genes en este esquema representan su posición en el cromosoma (Dhamdhare & Zgurskaya, 2010⁹⁶); **B)** Esquema de la estructura general cristalizada de TolC (Koronakis, et al., 2000⁹⁹).

La causa del detrimento en un aspecto tan básico como el crecimiento del cultivo puede deberse a que la mutación en *tolC* genera dos tipos de alteraciones en *E. coli* según el estudio de Dhamdhare & Zgurskaya en el 2010: Compromete la integridad de la membrana plasmática puesto que es una proteína requerida por varios sistemas de transporte de eflujo y altera el balance óxido-redox en el interior de la célula⁹⁶. En términos de la integridad de la membrana, se encontró que las cepas de *E. coli* mutantes en *tolC* se generaba notablemente la producción de una proteína periférica de membrana interna la cual se sabe, es inducida cuando la bacteria censa un estrés sobre la membrana

plasmática y cuando se disipa la fuerza protón-motriz dada por el potencial electroquímico de protones ¹⁰⁰. Otra observación asociada al desequilibrio en la membrana plasmática es la producción de proteínas relacionadas con respuesta a estrés, particularmente de proteínas bajo el control del regulón SoxRS es cual se sabe, coordina la inducción de al menos otros doce genes en respuesta al estrés oxidativo activado por las especies reactivas de oxígeno o de nitrógeno ¹⁰¹. Otro aspecto característico de la mutación en *tolC* en *E. coli* es la desproporción en la relación de NADH/NAD⁺; según la referencia de Dhamdhare y Zgurskaya (2010), se encontró que la concentración de NADH excedía tres veces la de su forma oxidada, algo que en términos metabólicos significa un claro desbalance oxido-redox puesto que se ha reportado que altos niveles de NADH inhiben enzimas del metabolismo central como la citrato sintasa y la malato deshidrogenasa, enzimas que son compartidas en la vía de los ácidos tricarbónicos ¹⁰². Finalmente, otra consecuencia de relevancia dada por altas concentraciones de NADH intracelular en *E. coli* es que este dinucleótido puede actuar como agente reductor del ion Fe³⁺ en la reacción de Fenton *in vivo*, reacción en donde el NADH forma un complejo con el hierro que deriva en la reducción del Fe³⁺ el cual es quelado por el enlace fosfodiéster de la cadena nucleotídica, resultando en una ruptura y por consiguiente daño severo a la molécula de DNA ¹⁰³. Por lo anterior expuesto y cotejando con los datos experimentales sobre la disminución en la capacidad de crecimiento de la cepa *E. coli* W3110Δ*tolC* respecto a la cepa control W3110 en medio mínimo mineral M9 se podría decir que esta sola mutación, al inactivar múltiples sistemas de transporte dependientes de esta proteína arquetípica de membrana externa, aún en medio mínimo, genera un estrés tal en la membrana plasmática que, acentuado con las disfuncionalidades metabólicas asociadas al desbalance óxido-redox previamente reportado en genotipos similares, tiene un impacto negativo directo sobre el crecimiento.

Por otra parte, en la cepa inactivada en el sistema AaeXAB y en la cepa que sobreexpresa este mismo sistema, el valor de la velocidad específica de crecimiento, 0.54 h⁻¹ es prácticamente igual al crecimiento de la cepa control W3110 con el sistema AaeXAB nativo 0.58 h⁻¹, es decir, sin suprimir ni sobreexpresar. En el caso de la cepa W3110Δ*aaeXAB*, un crecimiento similar a la cepa control significaría en primera instancia que la inactivación de este sistema de eflujo no es letal ni representa implicaciones fisiológicas sobre el metabolismo de *E. coli* que impacten de manera negativa sobre el crecimiento bacteriano. Esto es de esperarse ya que, según lo reportado por Van Dyk y colaboradores, el sistema de eflujo AaeXAB es activado fundamentalmente sólo en presencia de ácidos carboxílicos aromáticos como el ácido *p*-hidroxibenzóico, el ácido 6-hidroxi-2-naftóico y el ácido 2-hidroxicinámico, también llamado ácido *o*-cumárico, y el medio de cultivo mínimo M9 en esta prueba control no contiene compuestos aromáticos de la clase de los ácidos carboxílicos aromáticos. La estructura de los compuestos aromáticos reportados como sustrato del sistema AaeXAB se muestran en la figura 27:

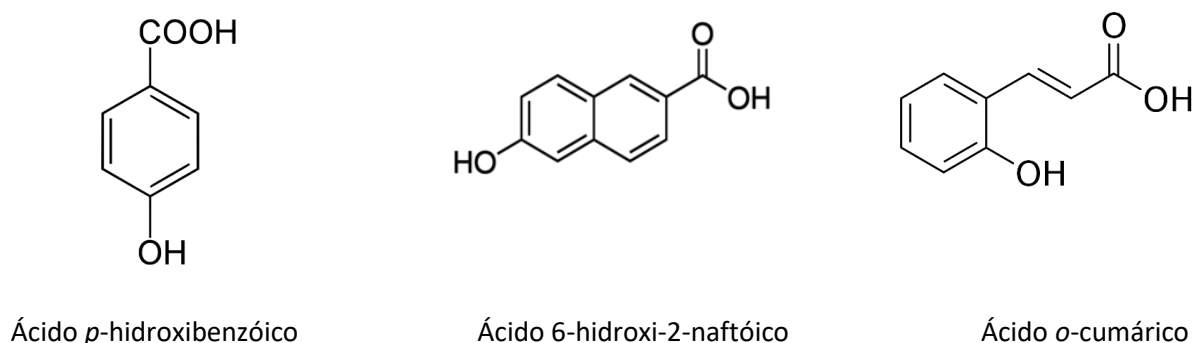


Figura 27. Sustratos aromáticos con afinidad al sistema de eflujo AaeXAB.

Para el caso de la cepa W3110/pTrc*aaeXAB* la cual es portadora del plásmido de la serie pTrc que codifica el sistema AaeXAB para su sobreexpresión, la velocidad específica de crecimiento con un valor μ de 0.55 h^{-1} no difiere significativamente de la cepa control W3110 cuyo valor es de 0.58 h^{-1} . Lo cual indicaría que la expresión del plásmido codificante para la expresión del producto del operón *aaeXAB* a través del plásmido pTrc no representa para esta cepa una carga metabólica, efecto que se presenta cuando existe una demanda extra de biosíntesis de DNA plasmídico o cuando ocurren perturbaciones en los sistemas regulatorios que afecten las vías metabólicas centrales de *E. coli* ¹⁰⁴. En este caso, la mínima diferencia en el crecimiento de la cepa W3110/pTrc*hpaBC* y la cepa control puede deberse principalmente a dos cosas: las propiedades del sistema de expresión basado en el plásmido con promotor *pTrc* y la naturaleza no tóxica del producto del gen *aaeXAB*. Un aspecto importante de la biotecnología moderna implica el desarrollo de técnicas de biología molecular que propicien un mejor control sobre la producción de proteínas recombinantes y que evite el efecto de la carga metabólica en microorganismos, estos aspectos en general han sido tratados a través del desarrollo de técnicas como promotores inducibles como λ_{PL} , *lacUV5*, *T7*, *tac* los cuales cuando son insertados río arriba del gen de interés, facilitan la regulación de su expresión ¹⁰⁵. En este caso la sobreexpresión del sistema AaeXAB estuvo bajo el control del promotor *trc* en el plásmido pTrc, este promotor es uno de los promotores sintéticos más usados en los sistemas de expresión en *E. coli*, deriva de los promotores *trp* y *lacUV5*, su regulación está basada en el sistema *lac*. La fuerza de los promotores se determina por la frecuencia relativa del inicio de la transcripción, lo cual es principalmente afectado por la afinidad de la secuencia del promotor con la RNA polimerasa, en este sentido se ha visto que el promotor sintético *trc* es mucho más fuerte que los promotores de los cuales deriva, el *trp* y el *lacUV5* ¹⁰⁶. Se sabe que la presencia de plásmidos de alto número de copias puede acarrear cambios significativos en el metabolismo de las células hospedadoras lo cual incluye la denominada carga metabólica asociada al incremento de la demanda de nucleótidos dirigidos a la replicación del DNA plasmídico ¹⁰⁵. En este sentido los vectores de la serie pTrc, además de contener un promotor fuerte, ofrecen la ventaja de poder controlar la expresión del producto génico por ser sistemas químicamente inducibles por IPTG, ser de bajo peso molecular (de menos de 5 kbp) y ser plásmidos de bajo número de copias. Todas estas características favorecen la estabilidad y el mantenimiento del plásmido a través de las generaciones del cultivo bacteriano reduciendo significativamente el impacto debido a la carga metabólica que representa la expresión de estos sistemas; además de que el producto génico que expresa (el operón *aaeXAB*) no es tóxico puesto que es un producto propio de *E. coli*.

Una vez teniendo los datos de las cinéticas control, se procedió a realizar cinéticas de evaluación del crecimiento de las distintas cepas de *E. coli* en medio con varias concentraciones de ácido *p*-cumárico y ácido cafeico. La primera serie de experimentos se iniciaron adicionando, desde el inicio del cultivo ácido *p*-cumárico en una concentración 2.25 g/L (12.5 mM). En estos experimentos se trabajó con las cepas *E. coli* W3110, W3110 Δ *aaeXAB* y W3110 Δ *tolC*; en esta etapa del experimento no se consideró a la cepa W3110/pTrc*aaeXAB* la cual sobreexpresa el sistema de eflujo AaeXAB teniendo en cuenta que la hipótesis del proyecto está centrada en suprimir su actividad y determinar los efectos que esta inactivación tiene sobre la sensibilidad a este par de ácidos hidroxicinámicos y sobre la capacidad de síntesis de ácido cafeico. Los resultados entonces para las tres cepas anteriores en general demuestran una considerable disminución en el valor de la velocidad específica de crecimiento respecto a los valores de la μ en las cinéticas control. Para el caso de la cepa W3110, el valor de la μ en el cultivo con 2.25 g/L de ácido *p*-cumárico fue de 0.37 h^{-1}

¹, lo cual representa una disminución del 35 % en la velocidad específica de crecimiento si se compara con el cultivo en el cual no se adicionó, ácido *p*-cumárico; este efecto en la disminución del valor de la μ se observó de manera más acentuada en las cepas W3110 Δ *aaeXAB* y W3110 Δ *tolC* con el sistema de eflujo de ácidos carboxílicos aromáticos AaeXAB y la proteína externa de membrana TolC inactivo, respectivamente. El valor de la velocidad específica de crecimiento fue similar para ambas cepas, tanto en el caso de la cepa W3110 Δ *aaeXAB* como de la W3110 Δ *tolC* el valor de μ fue de 0.17 h⁻¹ significando una disminución del 67.4 % respecto al valor de la velocidad específica de crecimiento para la cepa W3110 Δ *aaeXAB* y de 58.5 % para la cepa W3110 Δ *tolC*. Estos valores reflejan una evidente afectación para las dos cepas en el crecimiento debida a la presencia de ácido *p*-cumárico, la cual se ve más acentuada en la cepa con el sistema AaeXAB inactivado algo que es de esperarse puesto que como se ha demostrado por Van Dyk y colaboradores, este sistema de transporte de eflujo transmembranal tiene afinidad por ácidos carboxílicos aromáticos e inactivarlo en un cultivo adicionado con ácido *p*-cumárico significaría bloquear esa bomba de eflujo que estaría aliviando el estrés fisiológico que resulta de la elevada concentración intracelular de este ácido hidroxicinámico.

En primera instancia la entrada del ácido *p*-cumárico y el ácido cafeico hacia el interior de las células *E. coli* está favorecida por la diferencia de concentración entre el interior y el exterior celular ya que en un inicio la concentración intracelular de ácido *p*-cumárico es prácticamente nula ya que por naturaleza *E. coli* no es capaz de sintetizar ni metabolizar el ácido *p*-cumárico de manera natural ¹⁰⁷. Ahora bien, el cruce de los ácidos hidroxicinámicos se tiene que llevar a cabo a través de las envolturas celulares bacterianas, en este sentido, se sabe que a diferencia de las bacterias Gram positivas que solamente tienen la membrana citoplasmática rodeada de la pared celular, las bacterias Gram negativas como *E. coli* además de la membrana citoplasmática poseen una membrana externa compuesta por fosfolípidos y por lipopolisacáridos ⁷³, y que en el espacio que existe entre ambas membranas se encuentra una pequeña capa de peptidoglicanos además de lipoproteínas y complejos protéicos transmembranales como se muestra en la figura 28:

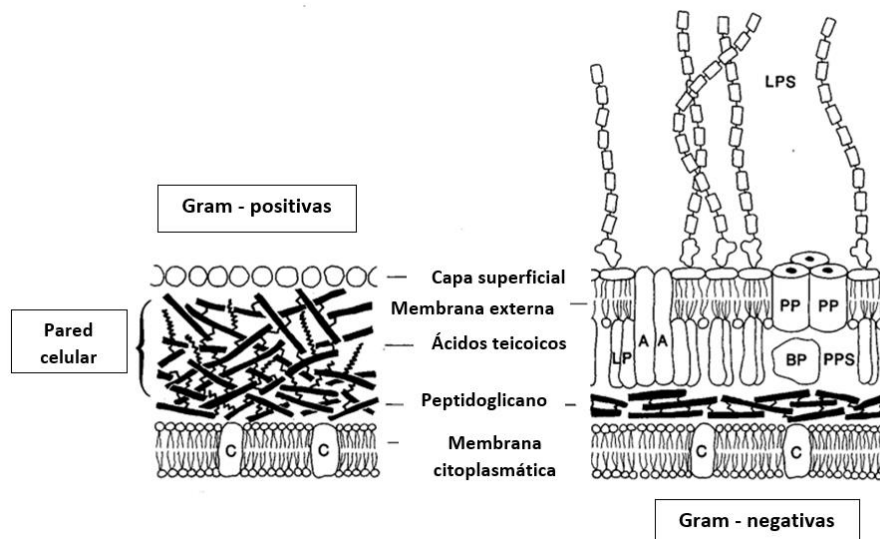


Figura 28. Comparación de la estructura general de la pared celular entre bacterias Gram-positivas y bacterias Gram-negativas. Abreviaciones: C: Proteínas embebidas en la membrana plasmática; BP: Proteínas de unión; PPS: Espacio periplásmico; LP: Lipoproteínas; A: Proteínas de membrana externa; PP: Porinas; LPS: Lipopolisacáridos.

Para que en *E. coli* pasen los ácidos hidroxicinámicos hasta el citoplasma celular es necesario que estos crucen la matriz externa de lipopolisacáridos, la membrana externa, el espacio periplásmico y la membrana plasmática. La primera barrera que se presenta es la matriz de lipopolisacáridos la cual se ha considerado que favorece una baja permeabilidad para moléculas hidrofóbicas ⁷³, sin embargo, se sabe que la membrana externa abundante en su composición de porinas de baja especificidad sirve como una especie de malla molecular que evita el paso de moléculas con una masa molecular mayor de 600 a 1000 Daltons ¹⁰⁸. Finalmente, la membrana citoplasmática, que es la última barrera por la cual los ácidos hidroxicinámicos tienen que atravesar, juega un papel crítico en el mantenimiento del estatus energético de la célula, la regulación del ambiente intracelular, la presión de turgor, y la señalización celular ¹⁰⁹, también tiene baja permeabilidad para moléculas polares con carga, no así cuando se trata de compuestos apolares como los hidrocarburos cíclicos, los cuales se ha visto, pueden atravesar la bicapa fosfolipídica fácilmente ¹¹⁰. En este respecto, tanto el ácido *p*-cumárico como el ácido cafeico al ser de una naturaleza química similar por constar esencialmente de una base de anillo aromática (región apolar) unido a una cadena de fenilpropano, difiriendo entre moléculas sólo por un sustituyente hidroxilo (región polar) en el anillo bencénico, comparten una naturaleza físico-química similar.

Estos compuestos hidroxicinámicos son parcialmente lipofílicos, característica que hace que en la membrana causen cambios significativos que resulten en perturbaciones entre las cadenas de acilglicerol de los fosfolípidos, generando así modificaciones sobre la fluidez de la membrana que pueden llevar a la expansión de la misma dada por la acumulación de las porciones lipofílicas de estos compuestos, este tipo de fenómeno se ha visto también en compuestos que poseen una región polar como grupos hidroxilo (-OH) o con moléculas cargadas (por ejemplo compuestos aniónicos o catiónicos).

La toxicidad generada por los compuestos fenólicos es debida principalmente al efecto que tienen a nivel de membrana. Se ha deducido una alta correlación entre la toxicidad y la hidrofobicidad de estos compuestos ¹¹¹ a través de observaciones que indican que este tipo de compuestos inducen alteraciones en el funcionamiento normal de la membrana plasmática que involucran afectaciones también a la integridad de proteínas transmembranales ¹¹². Considerando que las dos funciones principales de la membrana plasmática son: ser una barrera protectora transductora de energía química que permite la formación de gradientes iónicos esenciales en procesos endergónicos y ser una matriz estable para proteínas del tipo ATPasas, transferasas, óxidoreductasas y otras proteínas de transporte y señalización ¹¹³ responsables de mantener la fuerza de protón motriz a través del potencial químico de protones H⁺ (Δp H) y del potencial eléctrico (Δp) ¹¹⁴, afectaciones en la homeostasis membranar significan interrupciones en procesos como el transporte de solutos por alteración de proteínas transportadoras y limitada síntesis de ATP impactando así en el metabolismo general de la bacteria ¹¹⁵.

En estudios anteriores sobre el efecto ácidos fenólicos en membranas bacterianas, se determinó que efectivamente la actividad antimicrobiana asociada a estos compuestos está directamente relacionada con su efecto negativo sobre la membrana citoplasmática ya que estas moléculas decrementan la polaridad de la membrana a la vez que la hacen más permeable ¹¹⁶. Estudios al respecto han demostrado que la manera en que alteran la membrana es que una vez que estas moléculas están en el medio, difunden de manera pasiva hacia el interior citoplasmático; en este proceso algunas de estas moléculas pueden acumularse entre las cadenas acilo hidrocarbonadas de los fosfolípidos o dentro del ambiente interior hidrofóbico de la fosfolipídica de la membrana

plasmática ¹¹⁷. Es probable que la despolarización de la membrana ocurra en el momento que existan suficientes moléculas acumuladas en la membrana de tal modo que la permeabilidad iónica se incrementa y el gradiente transmembranal desaparece ¹¹⁶.

Otro parámetro que determina alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática es la liberación de iones de potasio K^+ . En este respecto, un estudio hecho por Borges y colaboradores determinó que tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas, incluyendo *E. coli* el tratamiento con ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos generaba una liberación de iones K^+ al medio dos veces más que el tratamiento control sin ácido hidroxicinámico adicionado, siendo la concentración de la prueba control de 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de iones de potasio, mientras que en la prueba con ácido ferúlico adicionado fue de 0.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ¹¹⁸. Otro estudio llevado a cabo en donde se aborda el efecto que tiene la presencia de otro ácido hidroxicinámico, en este caso el ácido *p*-cumárico sobre el gradiente de K^+ en la membrana de *Shigella dysenteriae* fue descrito por Lou y colaboradores; en este estudio se reveló que la adición de ácido *p*-cumárico en una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ al medio de cultivo bacteriano generaba un claro eflujo de iones de potasio en este organismo Gram-negativo ¹¹⁹.

El tipo de microorganismo y la composición de su estructura membranal juegan un papel importante en la susceptibilidad a ciertas moléculas ¹²⁰. Un aspecto que también se ha visto, es blanco de susceptibilidad de los ácidos hidroxicinámicos es la acidificación del espacio intracelular causada por el incremento en la permeabilidad de la membrana lo cual podría generar la desnaturalización de proteínas y el escape de algunos componentes celulares de gran relevancia como proteínas, ácidos nucleicos o iones inorgánicos como K^+ y PO_4^{3-} conduciendo en última instancia a la muerte celular ¹²¹.

Lou y colaboradores determinaron también que el ácido *p*-cumárico en una concentración de 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tiene efecto sobre el DNA genómico bacteriano de *Shigella dysenteriae*, bacteria Gram-negativa al igual que *E. coli*. El efecto que observaron fue que las moléculas de este ácido hidroxicinámico se focalizaba en el ambiente hidrofóbico del DNA, intercalándose entre pares de bases lo cual tiene efectos negativos directos sobre la replicación y la transcripción del DNA, inhibiendo a nivel de DNA las funciones celulares esenciales ¹¹⁹.

En la tabla de inhibición del crecimiento se observa que cuando se incrementa al doble la concentración inicial de ácido *p*-cumárico pasando de 2.25 g/L (12.5 mM) a 4.5 g/L (25 mM) el efecto negativo sobre la velocidad específica de crecimiento se acentúa en todas las cepas *E. coli* tratadas. En la cepa BL21(DE3) y W3110 el valor de la μ fue de 0.35 h^{-1} , lo cual representa una disminución del 39% para ambas cepas respecto a la condición control sin ácido *p*-cumárico añadido. La cepa W3110 Δ *aaeXAB* tuvo un valor de 0.044 h^{-1} lo cual representa una disminución significativa en la velocidad específica de crecimiento, con un valor de disminución de 91.85 %; resultado que era de esperarse ya que como se ha mencionado previamente la mutación en esta cepa es sobre el sistema AaeXAB el cual tiene como sustrato a algunos ácidos carboxílicos aromáticos. Van Dyk y colaboradores probaron al ácido *o*-cumárico como sustrato de este sistema de eflujo. El resultado arrojado con este experimento complementa al del tratamiento con 2 g/L de ácido *p*-cumárico y sugiere fuertemente que también este ácido hidroxicinámico, a pesar de estar hidroxilado en la posición cuatro y no en la dos en el anillo aromático como el ácido *o*-cumárico, es sustrato del sistema AaeXAB de *E. coli*. La cepa W3110/*pTrcaaeXAB* la cual sobreexpresa el sistema de eflujo de ácidos carboxílicos aromáticos, probada en esta concentración de 4 g/L de ácido *p*-cumárico tuvo un valor de μ de 0.29 h^{-1} lo que significó una disminución del 47.27 % de la velocidad específica de crecimiento en comparación con la cinética de crecimiento control sin ácidos adicionados, dato que

resulta interesante ya que esta cepa que se esperaba fuera más resistente a altas concentraciones de *p*-cumárico puesto que sobreexpresa su sistema de eflujo resultó tener una μ más baja que la cepa control W3110 la cual posee su sistema AaeXAB nativo, es decir, sin sobreexpresar. En este sentido se podría descartar el efecto de carga metabólica debida a la sobreexpresión basada en el plásmido pTrc puesto que los datos de la cinética control sin ácidos hidroxicinámicos adicionados muestran un valor similar en la cepa W3110/pTrcaaeXAB y en la W3110. El hecho de que en la cinética de crecimiento con 4 g/L de ácido *p*-cumárico adicionado se observe que la cepa W3110/pTrcaaeXAB tenga un valor menor que la cepa W3110 significaría que el sistema de eflujo AaeXAB sobreexpresado en el fondo genético W3110 a través de un plásmido de la serie pTrc no es suficiente para mejorar el crecimiento o al menos igualar el de la cepa W3110 sin el sistema AaeXAB sobreexpresado.

Finalmente, el caso más severo sobre el crecimiento en el medio con 4 g/L de ácido *p*-cumárico se observó en la cepa W3110 Δ toIC puesto que hubo una inhibición completa del crecimiento. Esto indica que la eliminación de ToIC resulta letal en un cultivo con alta concentración (4 g/L) de ácido *p*-cumárico. Este es un efecto asociado con la concentración de este ácido hidroxicinámico puesto que esta misma cepa W3110 Δ toIC con la proteína ToIC inactivada es capaz de crecer deficientemente en medio con una concentración de 2 g/L de ácido *p*-cumárico. Lo anterior también sugiere que ToIC podría estar involucrada en otro u otros sistemas de eflujo de ácido *p*-cumárico independientes de AaeXAB puesto que la cepa inactivada en este sistema fue capaz de crecer bajo este mismo tratamiento de 4 g/L.

Finalmente, los resultados anteriores indican que una concentración de 9 g/L (50 mM) de ácido *p*-cumárico resulta letal para todas las cepas estudiadas puesto que en ninguna se reportó crecimiento bacteriano.

5.2 El ácido cafeico no es sustrato del sistema AaeXAB de *E. coli*.

Como se puede notar en el cuadro de evaluación de la sensibilidad para ácidos hidroxicinámicos, la determinación del efecto sobre la velocidad específica de crecimiento también se llevó a cabo utilizando ácido cafeico en dos concentraciones 4.5 g/L y 9 g/L. La idea de realizar esta serie de experimentos fue evaluar qué tan tóxico resulta ser para *E. coli* este producto de fermentación del ácido *p*-cumárico catalizado por la 4HPA3H. El ácido cafeico un ácido hidroxicinámico el cual sólo difiere del ácido *p*-cumárico por el hecho de tener un grupo hidroxilo en la posición tres del anillo aromático. Estos experimentos tenían como objetivo determinar si también es esta molécula aromática sustrato del sistema de eflujo AaeXAB. Como se puede observar en la tabla de sensibilidad de ácidos hidroxicinámicos sobre *E. coli* la cepa BL21(DE3) tuvo un valor de la μ de 0.13 h⁻¹, lo cual representa una disminución del 77 % en el crecimiento si la comparamos con el crecimiento de la cepa BL21(DE3) en medio sin ácidos adicionados. De manera interesante el valor de la velocidad específica de crecimiento de las cepas W3110, W3110 Δ aaeXAB, W3110/pTrcaaeXAB y W3110 Δ toIC fue de 0.12 h⁻¹, siendo el porcentaje de disminución respecto al control de 80, 78, 78 y 71 %. Es interesante notar que el porcentaje de disminución en la velocidad específica de crecimiento con esta concentración (4 g/L) de ácido cafeico es mayor que el generado por el ácido *p*-cumárico con una concentración igual además del hecho de que en todas las cepas tratadas el valor de la μ es similar sugiriendo que no importando el genotipo, el efecto sobre el crecimiento es el mismo para todas las cepas, lo cual indicaría que independientemente de que si en una cepa la proteína de factor

externo de membrana TolC se encuentra inactivada (cepa W3110 Δ tolC) o que si en otra el sistema de eflujo de ácidos carboxílicos aromáticos AaeXAB se encuentra sobreexpresado (W3110/pTrcaaexAB) o inactivado (W3110 Δ aaexAB), estas modificaciones no están teniendo efecto fisiológico que impacte directamente en el crecimiento bacteriano, ya que si el valor de la μ se compara con el de la cepa control W3110, resulta prácticamente el mismo. Estos resultados indican fuertemente que la inactivación en tolC no resulta letal para la cepa crecida a esta concentración de ácido cafeico y que el sistema de eflujo AaeXAB de *E. coli* no tiene como sustrato al ácido cafeico. Esto es algo muy curioso ya que esta molécula, tratándose al igual que el ácido *p*-cumárico de un ácido hidroxicinámico siendo estructuralmente semejantes, el hecho de que posea una doble hidroxilación en el anillo aromático ya no la hace sustrato del sistema AaeXAB, reportado inicialmente como una “bomba” de eflujo para ácidos carboxílicos aromáticos. Dados los datos de la velocidad específica de crecimiento de los cultivos en ácido cafeico, comparados con los de las cinéticas en ácido *p*-cumárico con una concentración de 4 g/L y considerando la similitud de la μ , se podría decir que el ácido cafeico para *E. coli* en general resulta más tóxico que el ácido *p*-cumárico y los sistemas de eflujo dependientes de TolC y el sistema AaeXAB parecen no estar asociados con la excreción de ácido cafeico, es decir, que esta molécula no es sustrato de estos sistemas de eflujo.

5.3 Los cultivos para la conversión de ácido *p*-cumárico a ácido cafeico muestran diferencias en los parámetros de producción que están asociados a la inactivación del sistema de eflujo de ácidos carboxílicos aromáticos AaeXAB de *E. coli*.

Una vez llevada a cabo la serie de experimentos de determinación de la sensibilidad de los ácidos *p*-cumárico y cafeico, se procedió a realizar cultivos bacterianos adicionados con ácido *p*-cumárico para producir ácido cafeico en un solo paso a través de la actividad de la enzima 4HPA3H de *E. coli*. Estos cultivos se realizaron con una concentración inicial de 4 g/L de ácido *p*-cumárico con las cepas *E. coli* W3110/pTrchpaBC y *E. coli* W3110 Δ aaexAB/pTrchpaBC con el objetivo de determinar el efecto de la inactivación del sistema AaeXAB sobre la capacidad de síntesis de ácido cafeico.

Parámetros cinéticos de producción de ácido cafeico con las cepas *E. coli* W3110/pTrchpaBC y *E. coli* W3110/pTrchpaBC Δ aaexAB

Hasta esta etapa del proyecto, dados los resultados de las pruebas de sensibilidad al ácido *p*-cumárico y ácido cafeico, se determinó que el sistema de transporte de ácidos carboxílicos aromáticos AaeXAB es sustrato de ácido *p*-cumárico, pero no de ácido cafeico, y que este último tiene un efecto más tóxico para *E. coli* que el ácido *p*-cumárico. Un escenario que favorecía la hipótesis inicial centrada en inactivar la bomba de eflujo AaeXAB con la finalidad de generar una mayor concentración intracelular de ácido *p*-cumárico en una *E. coli* que sobreexpresara la enzima 4HPA3H para mejorar los rendimientos de producción de ácido cafeico respecto a una cepa con el sistema AaeXAB activo. Para probar esta hipótesis se llevaron a cabo cultivos de producción de ácido cafeico a partir de ácido *p*-cumárico y a continuación se presentan los resultados:

Cepa	μ (h^{-1}) Velocidad específica de crecimiento	q_s exp Glicerol $g_s/g_{DWC} * h$	q_s Ácido p-cumárico $g_s/g_{DCW} * h$	Yp/s (Rendimiento producto sustrato) (g_p/g_s) * En el punto de máxima producción.	Máximo título alcanzado de ácido cafeico [g/L]	Productividad volumétrica Q_p ($g/L * h^{-1}$) *En el punto máximo de producción	q_p Ácido cafeico $g_p/g_{DWC} * h$
W3110/pTrchpaBC	0.15	1.5 (t 0-22 h)	1.26	0.80 (t 26 h)	3.31	0.12 (t 26 h)	0.98
W3110 Δ aaeXAB/pTrchpaBC	0.07	0.18 (t 0-14 h)	3.17	0.43 (t 34 h)	1.43	0.04 (t 34 h)	1.64

Cuadro 15. Parámetros cinéticos de las fermentaciones de ácido p-cumárico a ácido cafeico con las cepas E. coli W3110/pTrchpaBC y E. coli W3110 Δ aaeXAB/pTrchpaBC.

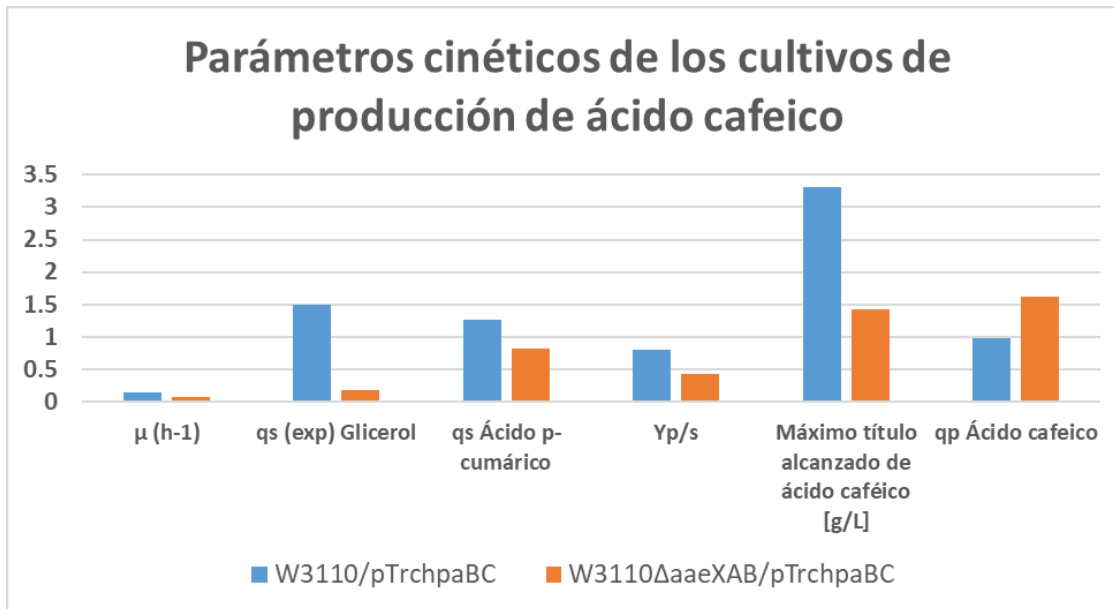


Figura 29. Gráfica comparativa de los parámetros cinéticos de los cultivos de producción de ácido cafeico con las cepas *E. coli* W3110/pTrchpaBC y *E. coli* W3110ΔaaeXAB/pTrchpaBC.

Crecimiento bacteriano de los cultivos de producción de ácido cafeico

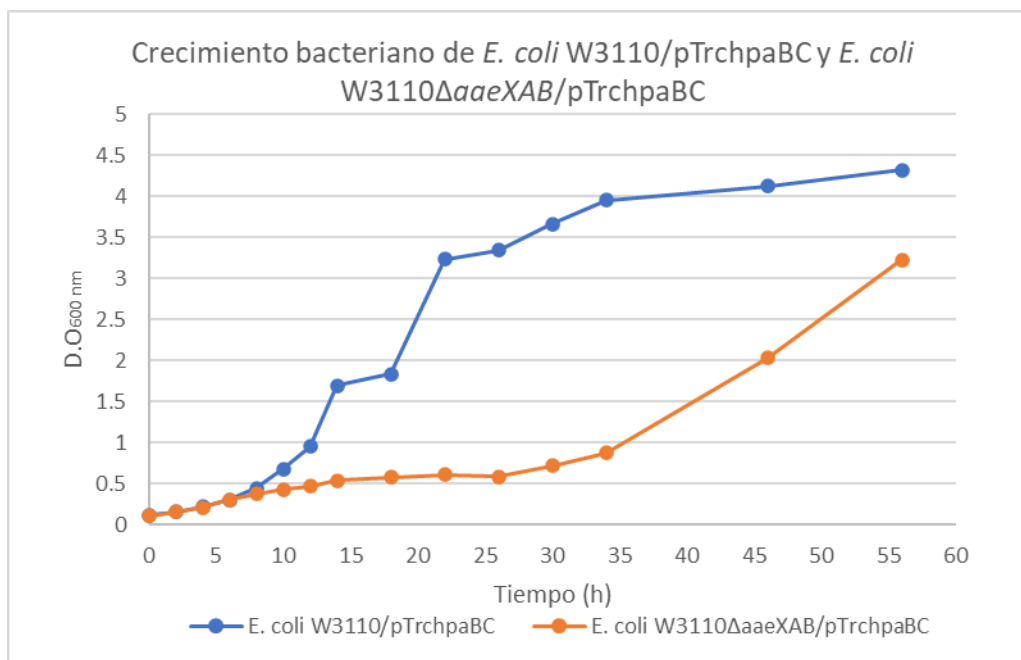


Figura 30. Crecimiento bacteriano de las cepas *E. coli* W3110/pTrchpaBC y *E. coli* W3110ΔaaeXAB/pTrchpaBC durante los cultivos de producción de ácido cafeico a partir de ácido p-cumárico. El cultivo se comenzó con una biomasa inicial de 0.1 D.O_{600 nm}. Los cultivos se indujeron

con IPTG 0.1 mM y se les adicionó ácido *p*-cumárico en una concentración de 4 g/L cuando alcanzaron una biomasa de 0.3 D.O.

En la figura 30 se observa que ambas cepas crecen de manera similar durante las primeras 6 horas del cultivo, al momento de que se alcanzó una biomasa con valor de 0.3 D.O_{600 nm} se indujo la expresión del plásmido pTrc/*hpaBC* que codifica para la enzima 4HPA3H propia de *E. coli* tanto en la cepa control, la cepa *E. coli* W3110 como en la cepa con el sistema AaeXAB inactivo, la cepa *E. coli* W3110Δ*aaeXAB*. En esta gráfica se observa que el crecimiento antes de la adición del ácido *p*-cumárico es prácticamente el mismo para ambas cepas, sin embargo a la hora 6 cuando se indujeron ambos cultivos con IPTG y se adicionó el ácido *p*-cumárico en una concentración de 4 g/L se observa una clara diferencia en la velocidad de crecimiento entre las cepas, siendo la mutante en el sistema AaeXAB la que se vió mayormente afectada respecto a la cepa control, comportamiento que es acorde a los resultados de las pruebas de toxicidad en donde se demostró que la cepa que tiene inactivado el sistema de eflujo de ácidos carboxílicos aromáticos AaeXAB resulta ser más sensible al ácido *p*-cumárico. La cepa *E. coli* W3110/pTrc*hpaBC* muestra un comportamiento típico microbiano en términos de crecimiento; a partir de la hora 22 de cultivo alcanza la máxima biomasa la cual se mantiene hasta el final del cultivo hasta las 52 h. Sin embargo, el comportamiento de la cepa mutante en el sistema AaeXAB, la cepa *E. coli* W3110Δ*aaeXAB*/pTrc*hpaBC* muestra un comportamiento atípico ya que después de la adición de ácido *p*-cumárico a las 6 horas del cultivo parece alcanzar una fase estacionaria con una biomasa con valor de 0.5 D.O_{600 nm} desde la hora 15 hasta la hora 26 en donde hay un repunte en el crecimiento hasta la hora 52 simulando un efecto de crecimiento tipo diáuxico, algo que por supuesto no ocurre en este caso ya que el comportamiento estrictamente diáuxico se presenta en cultivos definidos con dos fuentes de carbono en donde las curvas de crecimiento se interpretan como adaptaciones que maximizan el crecimiento bacteriano en ambientes multi-nutriente¹²⁹ y en las fermentaciones se utilizó únicamente glicerol en una concentración 10 g/L como única fuente de carbono. En el caso de la cepa *E. coli* W3110Δ*aaeXAB*/pTrc*hpaBC*, el repunte en el crecimiento a partir de la hora 26, podría interpretarse como una adaptación a la condición de cultivo en fermentación en donde el ácido *p*-cumárico (agente que acentúa el detrimento en el crecimiento en esta cepa) está siendo consumido (catalizado) a ácido cafeico mediante la enzima que sobreexpresa la 4HPA3H y que, aunque el ácido cafeico resulte ser más tóxico que el ácido *p*-cumárico, la proporción de ambos ácidos hidroxicinámicos en ese momento de la fermentación genera un comportamiento en la cepa mutante en *aaeXAB* semejante al tipo diáuxico. Este efecto, en otras palabras, podría estar siendo causado por las concentraciones de precursor y de producto más que por el efecto de tener presente más de una fuente de carbono.

Consumo de glicerol y producción de ácido acético en la cepa W3110/pTrchpaBC

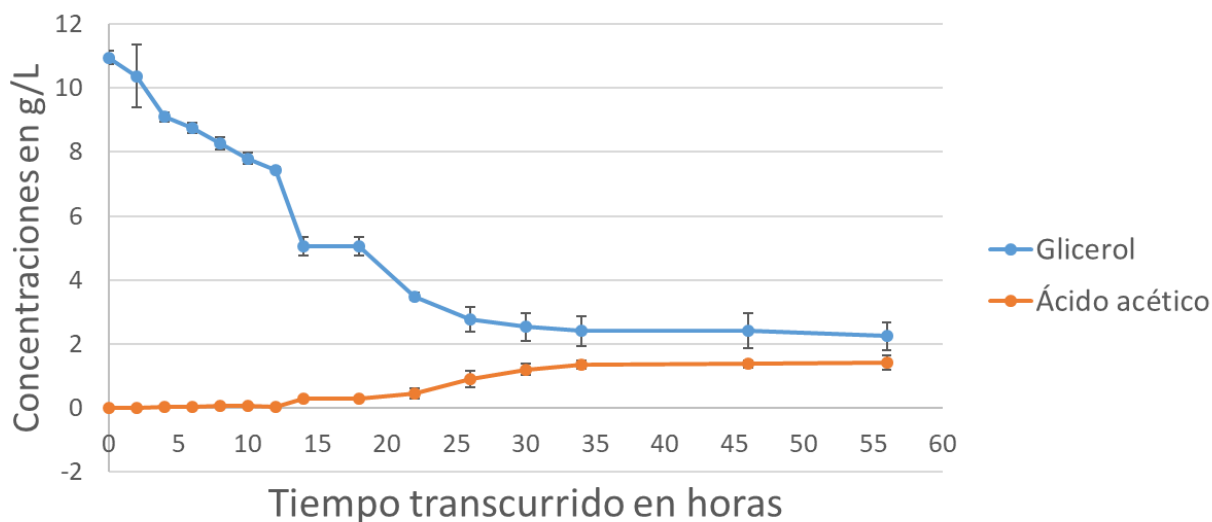


Figura 31. Consumo de glicerol y producción de ácido acético en la cepa *E. coli* W3110/pTrchpaBC.

Como es sabido, todas las cepas de *E. coli* tienen la capacidad de crecer con distintas fuentes de carbono dentro de las cuales encontramos el glicerol ¹³⁰. En este proyecto se decidió utilizar glicerol en una concentración de 10 g/L como única fuente de carbono para llevar a cabo las fermentaciones de ácido *p*-cumárico a ácido cafeico por las cepas *E. coli* W3110/pTrchpaBC y *E. coli* W3110Δ*aaeXAB*/pTrchpaBC. En la figura 31 se muestra el consumo de glicerol y la producción de ácido acético durante la fermentación del ácido *p*-cumárico de la cepa control, la cepa *E. coli* W3110/pTrchpaBC. Se muestra la producción de ácido acético teniendo en consideración que este ácido orgánico es un subproducto de la fermentación aerobia que ocurre esencialmente cuando la fuente de carbono es glucosa y esta se encuentra en altas concentraciones en el medio lo cual lleva a que el flujo de carbono proveniente de la glucólisis sobrepase la capacidad del ciclo de los ácidos tricarboxílicos para oxidar completamente el acetil-CoA producido, este compuesto es entonces metabolizado por las enzimas fosfato acetil transferasa (Pta) y acetato cinasa (AckA) las cuales convierten el acetil-CoA en acetil fosfato y el acetil fosfato en acetato, respectivamente ¹³¹. En la gráfica de consumo de glicerol y producción de acetato de la cepa control *E. coli* W3110/pTrchpaBC observamos que la fuente de carbono se consume gradualmente conforme la fermentación avanza, pasando de los 10 g/L iniciales a los 2.3 g/L en la hora 34 de fermentación (momento en el que la curva de crecimiento alcanza el estado estacionario), a partir de ese momento no parece haber un consumo adicional de glicerol, puesto que la concentración de 2 g/L se mantiene hasta el final de la fermentación hasta las 56 horas. Respecto a la producción de acetato, observamos que este está prácticamente ausente en las primeras horas de fermentación y empieza a acumularse a partir de la hora 22 hasta alcanzar su máximo título a la hora 34, siendo la máxima concentración alcanzada de 1.7 g/L, la cual se mantiene hasta el final de la fermentación a las 56 horas. Particularmente este último resultado de la concentración de ácido acético, concentración que evidentemente es menor

a los 4 g/L en donde se sabe que existe efectos negativos sobre el crecimiento de *E. coli*¹³². Otra consideración relevante respecto a la producción de acetato es que conforme lo observado por Nakano, *et al.* 1997, a diferencia de los cultivos con altas concentraciones iniciales de glucosa en donde la producción de acetato se observa en etapas tempranas de la fermentación, cuando se utiliza glicerol como fuente de carbono, el acetato se comienza a producir una vez que el cultivo ha alcanzado la máxima biomasa, es decir una vez que se alcanzó la fase estacionaria¹³² y en ese sentido la producción de acetato por la cepa *E. coli* W3110/pTrchpaBC asemeja un comportamiento similar.

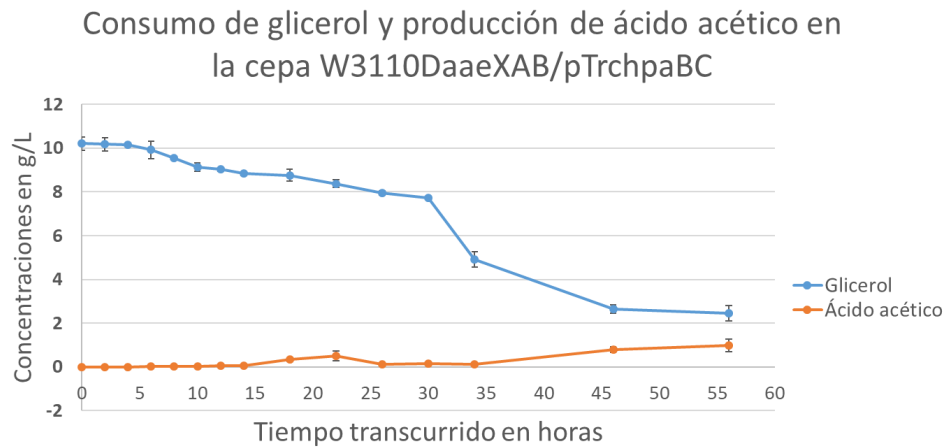


Figura 32. Consumo de glicerol y producción de ácido acético en la cepa *E. coli*Δ*aaeXAB*/pTrchpaBC.

En la figura 32 se muestra, de igual manera, el consumo de glicerol y la producción de acetato como subproducto de fermentación por la cepa *E. coli* W3110Δ*aaeXAB*/pTrchpaBC, mutante en el sistema de eflujo de ácidos carboxílicos aromáticos AaeXAB se observa que, en general, al igual que en la cepa control, la tendencia en la concentración del glicerol tiende a disminuir conforme la fermentación transcurre. Al igual que en el cultivo con la cepa control, se observa que la cepa mutante en *aaeXAB* no consume por completo el glicerol, consumiendo solo 8 de los 10 g/L disponibles al inicio del cultivo. La producción de ácido acético, al igual que en el cultivo control, no se observa hasta transcurridas 35 horas de cultivo, llegando a una máxima acumulación de 1 g/L al final de la fermentación, es decir, hasta las 56 horas de cultivo. La diferencia más notoria entre los perfiles de consumo de glicerol y la producción de ácido acético, sin embargo, es la velocidad de consumo de la fuente de carbono, el parámetro q_s Glicerol en la fase exponencial que mientras para la cepa control el valor fue de 1.5, el de la cepa mutante en el sistema AaeXAB fue de 0.18 (g/g*h), es decir, la velocidad con la que la cepa mutante *E. coli* W3110Δ*aaeXAB*/pTrchpaBC consumió el glicerol fue 8.3 veces menor que la de la cepa control, la cepa *E. coli* W3110/pTrchpaBC. Estos datos son congruentes ya que como se puede observar en las gráficas de crecimiento microbiano, el comportamiento de la cepa control durante la fase exponencial es mucho mayor que en la cepa mutante en el sistema AaeXAB. Algo que puede verse reflejado en el valor de la velocidad específica de crecimiento, siendo en el caso de la cepa control de 0.15, y en el de la cepa mutante en *aaeXAB* de 0.07 h⁻¹. Se observa también, además del consumo gradual desde el inicio de la fermentación, a partir de la hora 30 y hasta la hora 45 hay un consumo de glicerol pronunciado, consumo que estaría asociado esencialmente a la generación de biomasa y al mantenimiento del metabolismo activo de la cepa *E. coli* W3110Δ*aaeXAB*/pTrchpaBC ya que el fondo genético no está modificado para el desvío del flujo de carbono hacia la síntesis de metabolitos aromáticos. Ni de la cepa mutante en *aaeXAB* ni de la cepa control *E. coli* W3110/pTrchpaBC.

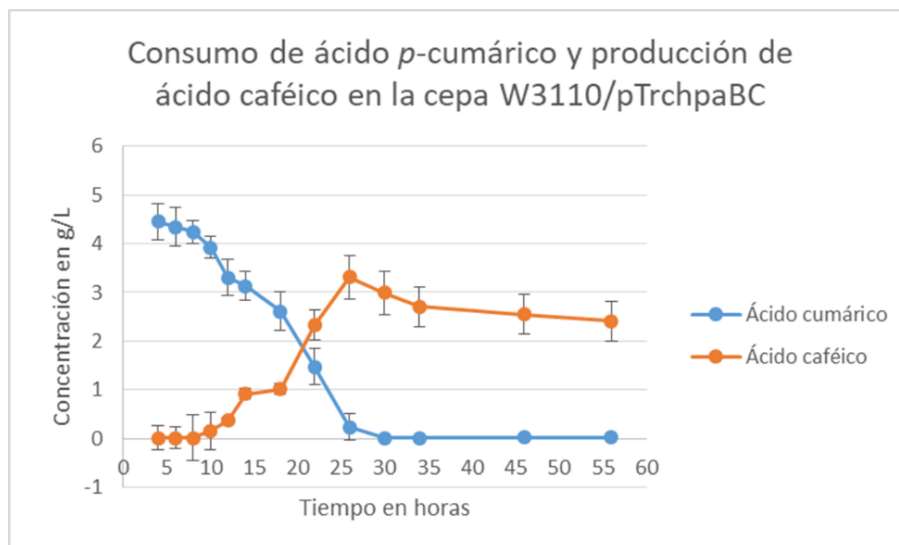


Figura 33. Consumo de ácido *p*-cumárico y producción de ácido cafeico en la cepa *E. coli* W3110/pTrchpaBC.

En la figura 33 se grafica la concentración tanto de precursor como de producto de fermentación ácido *p*-cumárico y ácido cafeico, respectivamente; en el cultivo con la cepa *E. coli* W3110/pTrchpaBC observamos que la concentración de ácido *p*-cumárico tiende a disminuir conforme avanza la fermentación hasta agotarse por completo a partir de la hora 30, mientras que, por el contrario, la concentración de ácido cafeico tiende a aumentar conforme avanza la fermentación, lo cual es evidencia clara de que la hidroxilasa sobre el ácido *p*-cumárico por la enzima 4HPA3H está siendo activa y que la producción de ácido cafeico está asociada al crecimiento del cultivo puesto que la acumulación de este metabolito se genera justo en la fase exponencial de esta cepa en fermentación. Lo anterior tiene sentido si se considera que el cofactor requerido para la hidroxilación del ácido *p*-cumárico, el NADH está siendo regenerado por el metabolismo central y que esa regeneración de poder reductor se lleva a cabo principalmente durante la fase exponencial. Es interesante notar que una vez que se alcanza el punto máximo de producción de ácido cafeico, este metabolito tiende a degradarse conforme la fermentación avanza y esto se observa ya que una vez que se alcanza el título máximo de producción que es de 3.31 g/L a las 26 h, la concentración del mismo cae a 2.4 g/L al final del cultivo de producción, después de 56 horas de cultivo. Esta tendencia en la disminución en la concentración de ácido cafeico ya ha sido observada por Furuya & Kino^{60,61} y la causa principal en la degradación de este metabolito podría ser su oxidación mediada por la misma 4HPA3H a través de una tercera hidroxilación en el anillo aromático del ácido cafeico (figura 34). La hidroxilación del ácido cafeico por la enzima 4HPA3H ha sido observada en un estudio hecho por Furuya & Kino⁶⁰ a través de procesos fermentativos con cultivos de *E. coli* que sobreexpresan de manera heteróloga la enzima 4HPA3H de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PAO1, en sus estudios sobre hidroxilación de derivados de ácidos cinámicos determinaron que la 4HPA3H una vez hidroxilado el ácido *p*-cumárico, continúa teniendo actividad de hidroxilasa sobre el ácido cafeico catalizándolo a ácido 3,4,5-trihidroxicinámico. Por tanto, resultaría interesante determinar si la misma enzima, pero de *E. coli* es capaz de realizar tal catálisis.

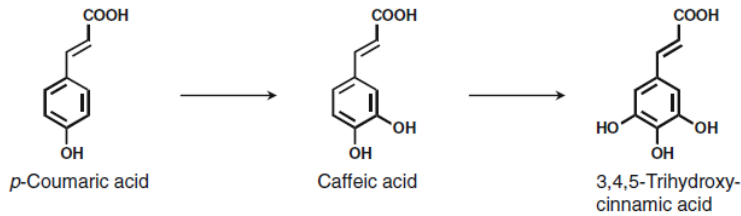


Figura 34. Hidroxilación de ácidos hidroxicinámicos mediada por la enzima 4HPA3H de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PAO1. (Furuya & Kino, 2014).

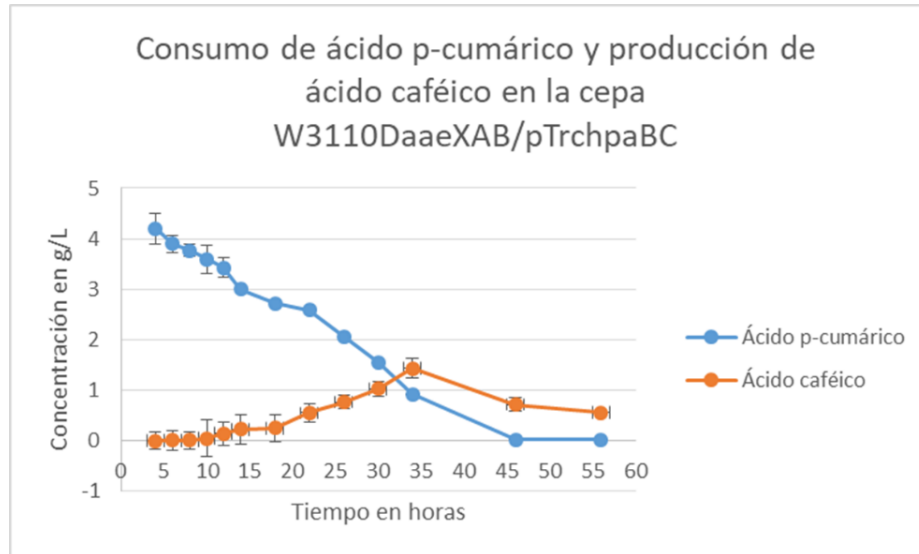


Figura 35. Consumo de ácido *p*-cumárico y producción de ácido cafeico en la cepa *E. coli* W3110Δ*aaeXAB*/pTrchpaBC.

Por otra parte, en la figura 35 se muestra de igual manera el perfil de consumo de ácido *p*-cumárico y producción de ácido cafeico, pero ahora por la cepa con el sistema de eflujo de ácidos carboxílicos aromáticos AaeXAB inactivo, es decir, la cepa *E. coli* W3110Δ*aaeXAB*/pTrchpaBC, se observa que en general la tendencia de consumo de ácido *p*-cumárico y de producción de ácido cafeico es similar al de la cepa control, sin embargo se observan claras diferencias en la velocidad de consumo del precursor y en la velocidad de producción de ácido cafeico, siendo en la cepa mutante en *aaeXAB* unos valores de velocidad de consumo y de producción reducidos respecto a la cepa con el sistema AaeXAB activo. (los parámetros cinéticos se determinaron para cada cepa y se discuten más adelante).

Otro aspecto relevante en el perfil de producción de ácido cafeico es que a diferencia de la cepa control, el título máximo alcanzado por la cepa mutante en *aaeXAB* fue de 1.43 g/L en el tiempo 34 de cultivo. Al igual que en el perfil de la cepa control se observa que una vez llegando a la máxima acumulación de ácido cafeico este tiende a degradarse pasando de 1.43 g/L a 0.71 g/L al final de la fermentación, esta degradación del ácido cafeico podría deberse principalmente a la oxidación de este.

Por los datos de la fermentación con 4 g/L iniciales de ácido *p*-cumárico resumidos en el **Cuadro 15** anterior se observa que en términos de la velocidad específica de crecimiento la cepa *E. coli*

W3110/pTrchpaBC crece mejor que la cepa W3110ΔaaeXAB/pTrchpaBC siendo el valor de la μ de esta última la mitad de la primera. Este resultado concuerda con los experimentos de sensibilidad a distintas concentraciones de ácido *p*-cumárico en donde se demostraba que el valor de la concentración era inversamente proporcional al valor de la velocidad específica de crecimiento. Y que el efecto negativo sobre el crecimiento se observó de manera más acentuada en la cepa con el sistema AaeXAB inactivo. Sin embargo, al comparar los datos de las pruebas iniciales de toxicidad dada por los ácidos hidroxicinámicos observamos que los valores de la μ son distintos a 4 g/L de ácido *p*-cumárico con las cepas utilizadas en fermentación, la cepa *E. coli* W3110 y *E. coli* W3110ΔaaeXAB, ya que mientras en las pruebas de sensibilidad las cepas alcanzaron valores de la μ de 0.35 y 0.04 h⁻¹, respectivamente, en la fermentación el crecimiento fue menor para la cepa *E. coli* W3110/pTrchpaBC obteniéndose un valor de 0.15 h⁻¹, lo cual representa una disminución del 57.1; caso contrario con la cepa W3110ΔaaeXAB/pTrchpaBC en donde en fermentación resultó crecer ligeramente mejor con un valor de 0.07 h⁻¹, siendo que en las pruebas de sensibilidad el valor del crecimiento fue de 0.04 h⁻¹. Esta diferencia de valores podría explicarse debido a las diferencias en las condiciones de cultivo y en las modificaciones genéticas en las cepas empleadas, ya que si bien es cierto que en ambos casos, tanto en las pruebas de sensibilidad de ácido *p*-cumárico y ácido cafeico el medio empleado fue medio mineral mínimo M9, la fuente de carbono fue distinta, siendo en estas primeras pruebas glucosa en una concentración inicial de 2 g/L, mientras que en la fermentación la fuente de carbono empleada fue glicerol en una concentración inicial de 10 g/L. Esto permitiría explicar la disminución del crecimiento en la fermentación de la cepa *E. coli* W3110/pTrchpaBC ya que es sabido que la fuente de carbono preferencial de *E. coli* es la glucosa sobre el glicerol¹³³, una disminución en el valor de la μ era de esperarse también en la cepa *E. coli* W3110ΔaaeXAB por efecto del cambio en la fuente de carbono, sin embargo de manera sorpresiva se observó un ligero aumento de la μ pasando de 0.04 en la evaluación del crecimiento del cultivo con glucosa 2 g/L a 0.07 h⁻¹ en la producción de ácido cafeico a partir de ácido *p*-cumárico con 10 g/L de glicerol como fuente de carbono. Puede que lo anterior sea debido a que la mutación en AaeXAB junto con la expresión del plásmido pTrchpaBC, aunado al cambio de la fuente de carbono, de manera particular favorezca ligeramente a este fondo genético durante la fermentación del ácido *p*-cumárico.

Respecto a las fuentes de carbono, la determinación del uso de glucosa en una concentración de 2 g/L en los cultivos para las pruebas de toxicidad de los ácidos cafeico y *p*-cumárico tuvo base en la consideración de que estudios previos han determinado que la glucosa es la fuente de carbono preferencial de *E. coli*, comportamiento reflejado en el velocidad específica de crecimiento el cual es mayor respecto a otros compuestos como la lactosa, el glicerol, el succinato o el acetato¹³³, con el hecho de normalizar el uso de glucosa [2 g/L] en todos los cultivos con distintas concentraciones de ácido *p*-cumárico y cafeico, se descartó de que la variable, fuente de carbono, tuviera efecto en el valor del crecimiento bacteriano en las pruebas de sensibilidad con los ácidos hidroxicinámicos.

La concentración de 2 g/L adoptada en las pruebas de sensibilidad tiene fundamento en estudios previos en donde se caracterizó la velocidad específica de crecimiento (μ), la velocidad de consumo de glucosa (*qs*) y producción de acetato (*qac*) de la cepa *E. coli* W3110 y de cepas mutantes en el sistema PTS¹³⁴. En este estudio se determinó que en medio mineral mínimo es suficiente esa relativa alta concentración de glucosa inicial (como única fuente de carbono) para favorecer el crecimiento bacteriano de la cepa *E. coli* W3110 a la vez que produce DNA recombinante sin que haya efectos adversos por la concentración de acetato, el cual se sabe que es el subproducto predominante de fermentación aerobia de *E. coli* que se manifiesta cuando el flujo de carbono a través de la glucólisis excede la capacidad del ciclo de los ácidos tricarbónicos para oxidar completamente todo el acetil-

CoA producido ¹³⁵ y que afecta su fisiología en términos de crecimiento y rendimientos de producción cuando *E. coli* es usada como vehículo para la expresión heteróloga de moléculas de interés ¹³⁶.

Glicerol como fuente de carbono en los cultivos bacterianos

El uso de glicerol como única fuente de carbono durante las fermentaciones bacterianas está basado en el hecho de que *E. coli* tiene la capacidad de crecer en este compuesto el cual es capaz de, como cualquier otra molécula apolar, pasar la membrana citoplasmática a través del proceso de difusión simple o a través de difusión facilitada mediada por la proteína integral de membrana llamada facilitador de glicerol (GlpF) ¹³⁷. Una vez en el interior celular, el glicerol es metabolizado a glicerol-3-fosfato por la enzima glicerol cinasa (GlpK), posteriormente en condiciones aerobias es convertido en dihidroxiacetona (DHA) por acción de la enzima glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (GlpD), el DHA es después catalizado a gliceraldehído-3-fosfato (GA3P) por la enzima triosafosfato isomerasa (TpiA), finalmente el GA3P es catabolizado a piruvato a través del proceso de la glucólisis, el piruvato finalmente como metabolito central entra al ciclo de los ácidos tricarbónicos ¹³⁸.

Otra consideración relevante en el uso del glicerol como fuente de carbono es que este compuesto ha aumentado su producción en años recientes debido a que es un subproducto de síntesis durante la transesterificación alcohólica de aceites vegetales o de la grasa animal en la producción de biodiésel ¹³⁹; y en este sentido el éster generado por este proceso de alcoholisis es glicerol puro en una proporción aproximada de 10 % (v/v) ¹⁴⁰. Finalmente la concentración 10 g/L iniciales de glicerol se adoptaron teniendo en consideración que el facilitador de glicerol GlpF, es un transportador no saturable a altas concentraciones de sustrato pues se sabe que sigue siendo activo en medio con concentraciones mayores a 200 mM (18.4 g/L) ¹⁴¹.

Respecto a la velocidad de consumo de la fuente de carbono, indicada en el **Cuadro 15** en donde aparecen demás parámetros cinéticos como el valor de la q_s (glicerol) durante la fase exponencial, observamos claramente que la cepa *E. coli* W3110/pTrchpaBC tiene un valor 10 veces mayor de la velocidad específica de consumo de glicerol respecto a la cepa *E. coli* W3110 Δ aaeXAB/pTrchpaBC siendo la q_s (glicerol) de 1.5 y de 0.18 (g/g_{peso seco}*h) respectivamente. Estos resultados concuerdan en términos de los datos de la biomasa alcanzada durante la fase exponencial del cultivo asociada a velocidad específica de crecimiento ya que tanto los valores de la biomasa como el valor de la μ son superiores en la cepa control *E. coli* W3110/pTrchpaBC que en la cepa con el sistema de eflujo de ácidos carboxílicos aromáticos AaeXAB inactivado, la cepa *E. coli* W3110 Δ aaeXAB/pTrchpaBC. Algo que en última instancia hace sentido con que la cepa mutante en el operón *aaeXAB* sea más susceptible que la cepa control a la concentración de 4 g/L de ácido *p*-cumárico al inicio del cultivo y por lo tanto el crecimiento en la cepa mutante se vea afectado, afectación reflejada a su vez en la velocidad específica de consumo de glicerol.

Es importante señalar que en esta estrategia de síntesis de ácido cafeico en un solo paso a través de la biotransformación del *p*-cumárico mediada por la enzima 4HPA3H nativa de *E. coli* la fuente de carbono no está siendo desviada desde el metabolismo central hacia la síntesis de ácido cafeico como usualmente se haría en cepas que parten sustancialmente de las fuentes de carbono disponibles tanto para generar biomasa como para sintetizar el metabolito aromático de interés. El fondo genético utilizado W3110 en ambas cepas no está genéticamente modificado para redirigir el flujo de carbono hacia la síntesis de compuestos aromáticos, es por ello que el medio de cultivo

durante las fermentaciones fue suplementado con ácido *p*-cumárico el cual es el precursor anterior inmediato del ácido cafeico y sustrato de la enzima codificada por el operón *hpaBC*¹⁴². Así, en este trabajo, la estrategia de fermentación aeróbica del ácido *p*-cumárico con ambas cepas está mediada por la sobreexpresión de la enzima 4HPA3H la cual es dependiente de poder reductor en forma de NADH como cofactor necesario en la hidroxilación, cofactor que es regenerado por el metabolismo central activo de *E. coli*¹²³.

Respecto a la velocidad de consumo de ácido *p*-cumárico representado por la $q_s(p\text{-cumárico})$ se observa que el valor de este parámetro en la cepa *E. coli* $\Delta aaeXAB/pTrchpaBC$ es superior al de la cepa control *E. coli* W3110/*pTrchpaBC* siendo los valores de 3.17 y 1.26 (g/g_{peso seco}*h) respectivamente. Esto significa que la cepa mutante en el sistema AaeXAB, *E. coli* $\Delta aaeXAB/pTrchpaBC$ estaría consumiendo más rápido el ácido *p*-cumárico que la cepa con el sistema de ácidos carboxílicos aromáticos activo *E. coli/pTrchpaBC* lo cual tendría sentido ya que se demostró por las pruebas de toxicidad que el ácido *p*-cumárico si es sustrato del sistema de eflujo AaeXAB y que su inactivación tiene como consecuencia una mayor sensibilidad a este ácido ya que se ve reflejada en una disminución de la velocidad específica de crecimiento respecto a la cepa con el sistema AaeXAB activo. El hecho de que la cepa *E. coli* W3110 $\Delta aaeXAB/pTrchpaBC$ pueda consumir de manera más rápida el ácido *p*-cumárico estaría asociado a que al estar inactivado el sistema que hace que el ácido *p*-cumárico salga de la célula, este se concentre más en el interior celular respecto a la *E. coli* W3110/*pTrchpaBC* que al tener el sistema AaeXAB activo estaría expulsando el ácido *p*-cumárico hacia el exterior. Al tener ambas cepas sobreexpresada la hidroxilasa 4HPA3H que cataliza el ácido *p*-cumárico a ácido cafeico, es de esperarse que el consumo sea mayor en la cepa en donde hay mayor disponibilidad de este precursor, o sea en la cepa con el sistema de ácidos carboxílicos aromáticos AaeXAB inactivo *E. coli* W3110 $\Delta aaeXAB/pTrchpaBC$ y que el ácido cafeico esté saliendo por difusión simple a través de la membrana celular resultado del aumento en la concentración de este metabolito en el interior celular de *E. coli*.

En términos del rendimiento producto sustrato dado por el parámetro $Y_{p/s}$ calculado en el momento de máxima producción de ácido cafeico, es decir en donde la concentración de este metabolito aromático fue máxima se observó que en la cepa *E. coli* W3110/*pTrchpaBC* fue dos veces mayor que en la cepa *E. coli* W3110 $\Delta aaeXAB/pTrchpaBC$ siendo los valores del parámetro $Y_{p/s}$ de 0.80 y 0.43 (g_{cafeico}/g_{cumárico}), respectivamente. Esto en términos biológicos significaría que en el punto de máxima producción la cepa que está catalizando de manera más eficiente el ácido *p*-cumárico es la cepa que no está inactivada en el sistema AaeXAB, algo que hace sentido ya que, en el punto de máxima producción, al haber una mayor biomasa en el cultivo *E. coli* W3110/*pTrchpaBC* que en el cultivo de la cepa *E. coli* W3110 $\Delta aaeXAB/pTrchpaBC$ la eficiencia de transformación del ácido *p*-cumárico en ese punto de la transformación es mayor en la cepa no mutante. Para este parámetro se consideró que el fondo genético W3110 no fue modificado con la intención de desviar la fuente de carbono del metabolismo central hacia la síntesis de ácido cafeico por lo tanto, tratándose de un cultivo con una cepa amplificada en la actividad de hidroxilasa mediada por la enzima 4HPA3H y alimentado inicialmente con ácido *p*-cumárico, en la determinación del $Y_{p/s}$ se consideró como sustrato precisamente al ácido *p*-cumárico y no al glicerol como tradicionalmente se haría con otras cepas capaces de desviar el flujo de carbono hacia la síntesis de compuestos aromáticos.

El máximo título de ácido cafeico alcanzado durante estas fermentaciones con 4 g/L iniciales de ácido *p*-cumárico fue de 1.43 y 3.31 g/L con las cepas *E. coli* W3110 $\Delta aaeXAB/pTrchpaBC$ y *E. coli* W3110/*pTrchpaBC*, respectivamente. Esta diferencia en el título máximo de producción de ácido cafeico de la cepa *E. coli* W3110/*pTrchpaBC* respecto a la cepa *E. coli* W3110 $\Delta aaeXAB/pTrchpaBC$ puede deberse en términos generales a la mayor biomasa alcanzada en el cultivo de la cepa control

que en el cultivo de la cepa con el sistema AaeXAB inactivo, aspecto que es importante ya que una mayor biomasa significaría mayor cantidad de catalizador o sea, mayor cantidad de enzima 4HPA3H disponible para fermentar el ácido *p*-cumárico a ácido cafeico. En ese sentido es interesante notar que en términos volumétricos la cepa control es superior a la cepa mutante en una proporción 2.3 veces mayor. Esta diferencia en la productividad puede observarse en el parámetro de la productividad volumétrica Q_p que representa los g/L de ácido cafeico en el tiempo de máxima producción del cultivo para cada cepa. La cepa *E. coli* W3110/pTrchpaBC produjo el máximo título de ácido cafeico, los 3.31 g/L máximos de ácido cafeico en un tiempo de 26 h de fermentación, mientras que la cepa *E. coli* W3110Δ*aaeXAB*/pTrchpaBC produjo su título máximo de 1.43 g/L de ácido cafeico en un tiempo de 34 horas de fermentación, así el valor de la Q_p fue de 0.12 y de 0.04 $\text{g}_{\text{cafeico}}/\text{L} \cdot \text{h}$ para la cepa control y mutante, respectivamente.

Finalmente se calculó el parámetro producto biomasa $Y_{p/x}$ que representa la cantidad de ácido cafeico producido por unidad de biomasa, un parámetro que conceptualmente refleja en términos estequiométricos la productividad específica del cultivo, y en ese sentido los valores de este parámetro $Y_{p/x}$ fueron de 0.98 y de 1.64 ($\text{g}_{\text{cafeico}}/\text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h}$) para la cepa control y para la cepa mutante en el sistema AaeXAB, respectivamente. Este último parámetro es particularmente importante ya que refleja qué tanto se produce ácido cafeico “por célula” y con los datos anteriores observamos que la cepa mutante en el sistema AaeXAB, la cepa *E. coli* W3110Δ*aaeXAB*/pTrchpaBC tiene un rendimiento producto biomasa $Y_{p/x}$ 1.6 veces mayor al de la cepa control *E. coli* W3110/pTrchpaBC. Dato que estaría sugiriendo que la estrategia de la inactivación del sistema de transporte de ácidos carboxílicos aromáticos el cual si tiene como sustrato al ácido *p*-cumárico pero no al ácido cafeico estaría contribuyendo a que el sustrato de la enzima 4HPA3H escape de la célula a través del sistema AaeXAB lo cual se ve reflejado en un mejor valor del parámetro $Y_{p/x}$ respecto a la cepa control el cual si tiene activo este sistema eflujo y que por ende estaría expulsando de la célula el precursor del ácido cafeico, sustrato de la hidroxilasa 4HPA3H. Sin embargo este efecto positivo reflejado en el rendimiento producto-biomasa en la cepa mutante en el sistema AaeXAB se ve contrarrestado con el parámetro del título final y de la productividad volumétrica puesto que con la cepa control se obtuvo un máximo título de 3.31 g/L de ácido cafeico mientras que con la cepa mutante en el sistema AaeXAB, cepa más sensible a la presencia de ácido *p*-cumárico en el medio (aspecto reflejado notoriamente en la velocidad específica de crecimiento), el máximo título alcanzado fue de 1.43 g/L, aspecto que en términos de bioprocesos podría ser optimizable ya que el objetivo final de los enfoque de producción heteróloga de metabolitos de interés industrial es la obtención de los mejores rendimientos y productividades volumétricas posibles.

6 Conclusiones

Evaluando el efecto que tienen distintas concentraciones de ácido *p*-cumárico y ácido cafeico en la cepa en distintas cepas de *E. coli* las cuales incluyen a la cepa BL21(DE3), W3110, W3110 Δ *aaeXAB*, W3110 Δ *aaeXAB/pTrcaaXAB* y W3110 Δ *toIC* y se determinó en general que, en todas ellas, la presencia de estos ácidos hidroxicinámicos en el medio de cultivo afecta negativamente la velocidad específica de crecimiento, efecto que está directamente relacionada con la concentración de los mismos.

Se determinó que para la cepa *E. coli* W3110 el ácido cafeico a una concentración de 4.5 g/L (25 mM) resulta ser un 34.3 % más tóxico que el ácido *p*-cumárico puesto que, al comparar el crecimiento de los cultivos con la misma concentración de uno u otro ácido, el valor de la μ que disminuyó de 0.35 a 0.12 h⁻¹.

La inactivación del sistema de eflujo de ácidos carboxílicos aromáticos AaeXAB de *E. coli* vuelve a las bacteria 70, 92.4 y 100% más sensibles en presencia de 2.25 (12.5 mM), 4.5 (25 mM) y 9 (50 mM) g/L de ácido *p*-cumárico, respectivamente en comparación a aquellas con el sistema AaeXAB activo. Esto indica que, en efecto, el ácido *p*-cumárico es sustrato de este sistema de eflujo; no así en el caso del ácido cafeico ya que se observó que independientemente de que el sistema AaeXAB esté activo o no, el efecto inhibitorio sobre el crecimiento fue similar para todas las cepas, con un valor de la velocidad específica de crecimiento de 0.12 h⁻¹, lo cual representa una disminución del crecimiento del 80 % en 4.5 g/L (25 mM).

Lo anterior sugiere que, además de que el ácido cafeico resulta ser más tóxico para *E. coli*, esta molécula no es sustrato del sistema de eflujo AaeXAB. Un dato interesante ya que en lo único que es distinto el ácido *p*-cumárico y el ácido cafeico es que este último posee en su estructura molecular una hidroxilación en la posición 3 del anillo aromático.

El hecho de que el ácido cafeico no sea sustrato del sistema AaeXAB indicaría la sutileza en la especificidad de este sistema de eflujo para los ácidos hidroxicinámicos.

En general una concentración de 9 g/L (50 mM) tanto de ácido *p*-cumárico como de ácido cafeico resulta en una completa inhibición del crecimiento bacteriano con todas las cepas de *E. coli* trabajadas durante este proyecto.

Adicionalmente es posible realizar cultivos de producción de ácido cafeico a partir de ácido *p*-cumárico con una concentración inicial de 4 g/L del sustrato tanto con la cepa *E. coli* W3110/pTrchpaBC (control) como con la cepa con el sistema de eflujo de ácidos carboxílicos aromáticos AaeXAB inactivado (*E. coli* W3110 Δ *aaeXAB/pTrchpaBC*).

En términos generales de producción bacteriana de ácido cafeico, el cultivo con la cepa *E. coli* W3110/pTrchpaBC obtuvo una mayor productividad volumétrica respecto al cultivo con el sistema de eflujo AaeXAB inactiva (*E. coli* W3110 Δ *aaeXAB/pTrchpaBC*), siendo los valores de la Q_p de 3.31 y 1.43 g/L, respectivamente.

Sin embargo, a pesar de la mayor sensibilidad al ácido *p*-cumárico mostrada por la cepa inactiva en el sistema AaeXAB, esta resultó obtener un mejor parámetro de productividad específica de ácido cafeico respecto a la cepa con este sistema de eflujo activo, siendo los valores de la q_p de 1.64 y 0.98 g/g_{DWC}*h.

7 Perspectivas.

Realizar las pruebas de sensibilidad de ácidos hidroxicinámicos utilizando como fuente de carbono glicerol en una concentración de 10 g/L y determinar cómo varía la velocidad específica de crecimiento respecto a las pruebas con glucosa como fuente de carbono en una concentración de 2 g/L.

Transformar a la cepa *E. coli* mutante en la proteína externa de membrana TolC, la *E. coli* W3110 Δ tolC con el plásmido pTrchpaBC para la sobreexpresión de la enzima 4HPA3H y llevar a cabo fermentaciones de ácido *p*-cumárico para determinar los parámetros estequiométricos y comparar los valores con aquellos obtenidos con la cepa *E. coli* W3110 Δ aaeXAB/pTrchpaBC con la finalidad de evaluar qué sistema de transporte de membrana resultaría ser más conveniente desactivar en la producción bacteriana de ácido cafeico con *E. coli*.

Buscar en la literatura referencias sobre transportadores específicos de ácido cafeico (ya sea en plantas o en otros microorganismos) y considerar la posibilidad de su sobreexpresión en *E. coli* durante la síntesis de ácido cafeico considerando esta estrategia como una posibilidad para contender con la toxicidad mostrada por este ácido hidroxicinámico durante las fermentaciones de ácido *p*-cumárico a ácido cafeico.

Finalmente, en el campo de los bioprocesos siempre es interesante evaluar distintas fuentes de carbono o mezclas de estas durante las fermentaciones. Podrían determinarse, por ejemplo, los parámetros de producción con glucosa 2 g/L como fuente de carbono o con glucosa y glicerol en distintas proporciones. Además, sería interesante evaluar el comportamiento de la fermentación en *E. coli* con distintos fondos genéticos por ejemplo utilizando la cepa *E. coli* VH33 la cual es una derivada de la cepa W3110 con el sistema PTS⁻, es decir, inactivando el transporte de glucosa mediado por el sistema de fosfotransferasa. También sería interesante probar cinéticas de producción de ácido cafeico en otras cepas genéticamente modificadas capaces de desviar el flujo de carbono favoreciendo la síntesis de aminoácidos aromáticos, previo a la transformación de estas con plásmidos que sobreexpresen las enzimas requeridas en la síntesis de este ácido hidroxicinámico.

8 Referencias

1. Trüper, H. G. Etymology in Nomenclature of Procaryotes. *Bergey's Man. Syst. Archaea Bact.* 1–15 (2015) doi:10.1002/9781118960608.bm00008.
2. Lee, J. W., Kim, T. Y., Jang, Y. S., Choi, S. & Lee, S. Y. Systems metabolic engineering for chemicals and materials. *Trends Biotechnol.* **29**, 370–378 (2011).
3. Blount, Z. D. The unexhausted potential of E. coli. *Elife* **4**, 1–12 (2015).
4. Adamczyk, P. A. & Reed, J. L. Escherichia coli as a model organism for systems metabolic engineering. *Curr. Opin. Syst. Biol.* **6**, 80–88 (2017).
5. Khan, S. *et al.* Role of recombinant DNA technology to improve life. *Int. J. Genomics* **2016**, (2016).
6. BEST, C. H. The history of insulin. *Diabetes* **11**, 495–503 (1962).
7. Marbach, A. & Bettenbrock, K. Lac operon induction in Escherichia coli: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. *J. Biotechnol.* **157**, 82–88 (2012).
8. Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W. & Helling, R. B. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **70**, 3240–3244 (1973).
9. Bailey, J. E. Engineering.
10. Nielsen, J. Metabolic engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 263–283 (2001).
11. Lee, J. W. *et al.* Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 536–546 (2012).
12. Derrer, B., Macheroux, P. & Kappes, B. The shikimate pathway in apicomplexan parasites: Implications for drug development. *Front. Biosci.* **18**, 944–969 (2013).
13. Ramakrishna, A. & Ravishankar, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal. Behav.* **6**, 1720–1731 (2011).
14. Rodriguez, A. *et al.* Engineering Escherichia coli to overproduce aromatic amino acids and derived compounds. *Microb. Cell Fact.* **13**, 1–15 (2014).
15. Bongaerts, J., Krämer, M., Müller, U., Raeven, L. & Wubbolts, M. Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds. *Metab. Eng.* **3**, 289–300 (2001).
16. Gibson, F. & Pittard, J. Pathways of biosynthesis of aromatic amino acids and vitamins and their control in microorganisms. *Bacteriol. Rev.* **32**, 465–492 (1968).
17. Hu, C., Jiang, P., Xu, J., Wu, Y. & Huang, W. Mutation analysis of the feedback inhibition site of phenylalanine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase of Escherichia coli. *J. Basic Microbiol.* **43**, 399–406 (2003).
18. Hernández-Chávez, G., Martínez, A. & Gosset, G. Metabolic engineering strategies for caffeic acid production in Escherichia coli. *Electron. J. Biotechnol.* **38**, 19–26 (2019).

19. Gosset, G. Production of aromatic compounds in bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**, 651–658 (2009).
20. Escalante, A., Cervantes, A. S., Gosset, G. & Bolívar, F. Current knowledge of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system: Peculiarities of regulation and impact on growth and product formation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94**, 1483–1494 (2012).
21. Balasundram, N., Sundram, K. & Samman, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* **99**, 191–203 (2006).
22. Parr, A. J. & Bolwell, G. P. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 985–1012 (2000).
23. Sroka, Z. & Cisowski, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem. Toxicol.* **41**, 753–758 (2003).
24. Concepción, S.-M., José, A. L. & Fulgencio, S.-C. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture. J Sci Food Agric* **76**, 270–276 (1998).
25. Cheng, J. C., Dai, F., Zhou, B., Yang, L. & Liu, Z. L. Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivatives in human low density lipoprotein: Mechanism and structure-activity relationship. *Food Chem.* **104**, 132–139 (2007).
26. Erukainure, O. L., Sanni, O. & Islam, M. S. *Clerodendrum volubile: Phenolics and Applications to Health. Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease* (Elsevier Inc., 2018). doi:10.1016/b978-0-12-813006-3.00006-4.
27. Nardini, M. *et al.* Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. *Free Radic. Biol. Med.* **19**, 541–552 (1995).
28. Chao, P. C., Hsu, C. C. & Yin, M. C. Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. *Nutr. Metab.* **6**, 1–8 (2009).
29. Rajendra Prasad, N., Karthikeyan, A., Karthikeyan, S. & Venkata Reddy, B. Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Mol. Cell. Biochem.* **349**, 11–19 (2011).
30. Ikeda, K. *et al.* Inhibition of multiplication of herpes simplex virus by caffeic acid. *Int. J. Mol. Med.* **28**, 595–598 (2011).
31. Iiyama, K., Lam Thi Bach Tuyet & Stone, B. A. Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiol.* **104**, 315–320 (1994).
32. Zheng, W. & Wang, S. Y. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 502–509 (2003).
33. Kivilompolo, M., Obúrka, V. & Hyötyläinen, T. Comparison of GC-MS and LC-MS methods for the analysis of antioxidant phenolic acids in herbs. *Anal. Bioanal. Chem.* **388**, 881–887 (2007).
34. Clifford, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **79**, 362–372 (1999).
35. Chen, J. H. & Ho, C. T. Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2374–2378 (1997).

36. Olthof, M. R., Hollman, P. C. H. & Katan, M. B. Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans. *J. Nutr.* **131**, 66–71 (2001).
37. Nawrot, P. *et al.* Effects of caffeine on human health. *Food Addit. Contam.* **20**, 1–30 (2003).
38. Kato, M., Ochiai, R., Kozuma, K., Sato, H. & Katsuragi, Y. Effect of Chlorogenic Acid Intake on Cognitive Function in the Elderly: A Pilot Study. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2018**, (2018).
39. Gonthier, M.-P., Verny, M.-A., Besson, C., Rémésy, C. & Scalbert, A. Chlorogenic Acid Bioavailability Largely Depends on Its Metabolism by the Gut Microflora in Rats. *J. Nutr.* **133**, 1853–1859 (2003).
40. Grunberger, D. *et al.* Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia* **44**, 230–232 (1988).
41. Chisvert, A. & Salvador, A. Cosmetic ingredients: From the cosmetic to the human body and the environment. *Anal. Methods* **5**, 309–310 (2013).
42. Saija, A. *et al.* Ferulic and caffeic acids as potential protective agents against photooxidative skin damage. *J. Sci. Food Agric.* **79**, 476–480 (1999).
43. Ferreira, E. S., Giacomelli, C., Giacomelli, F. C. & Spinelli, A. Evaluation of the inhibitor effect of L-ascorbic acid on the corrosion of mild steel. *Mater. Chem. Phys.* **83**, 129–134 (2004).
44. Giacomelli, F. C., Giacomelli, C., Amadori, M. F., Schmidt, V. & Spinelli, A. Inhibitor effect of succinic acid on the corrosion resistance of mild steel: Electrochemical, gravimetric and optical microscopic studies. *Mater. Chem. Phys.* **83**, 124–128 (2004).
45. Fallavena, T., Antonow, M. & Gonçalves, R. S. Caffeine as non-toxic corrosion inhibitor for copper in aqueous solutions of potassium nitrate. *Appl. Surf. Sci.* **253**, 566–571 (2006).
46. de Souza, F. S. & Spinelli, A. Caffeic acid as a green corrosion inhibitor for mild steel. *Corros. Sci.* **51**, 642–649 (2009).
47. Cui, H. Y., Abdullahil Baque, M., Lee, E. J. & Paek, K. Y. Scale-up of adventitious root cultures of *Echinacea angustifolia* in a pilot-scale bioreactor for the production of biomass and caffeic acid derivatives. *Plant Biotechnol. Rep.* **7**, 297–308 (2013).
48. Xing, Y. *et al.* Caffeic acid product from the highly copper-tolerant plant *Elsholtzia splendens* post-phytoremediation: Its extraction, purification, and identification. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **13**, 487–493 (2012).
49. Skąła, E., Kicel, A., Olszewska, M. A., Kiss, A. K. & Wysokińska, H. Establishment of hairy root cultures of *rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin for the production of biomass and caffeic acid derivatives. *Biomed Res. Int.* **2015**, (2015).
50. Pedrosa, M. M. *et al.* Determination of caffeic and chlorogenic acids and their derivatives in different sunflower seeds. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 459–464 (2000).
51. Burns, J. *et al.* Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 220–230 (2000).
52. Andlauer, W., Stumpf, C., Hubert, M., Rings, A. & Fürst, P. Influence of cooking process on phenolic marker compounds of vegetables. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **73**, 152–159 (2003).
53. Zuo, Y., Wang, C. & Zhan, J. Separation, characterization, and quantitation of benzoic and phenolic antioxidants in American cranberry fruit by GC-MS. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3789–

3794 (2002).

54. Mattila, P. & Kumpulainen, J. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3660–3667 (2002).
55. Bianco, A. *et al.* Analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry of biophenolic compounds in virgin olive oil, Part II. *J. Sep. Sci.* **26**, 417–424 (2003).
56. Berner, M. *et al.* Genes and enzymes involved in caffeic acid biosynthesis in the actinomycete *Saccharothrix espanaensis*. *J. Bacteriol.* **188**, 2666–2673 (2006).
57. Lin, Y. & Yan, Y. Biosynthesis of caffeic acid in *Escherichia coli* using its endogenous hydroxylase complex. *Microb. Cell Fact.* **11**, 3–11 (2014).
58. Zhang, H. & Stephanopoulos, G. Engineering *E. coli* for caffeic acid biosynthesis from renewable sugars. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 3333–3341 (2013).
59. Huang, Q., Lin, Y. & Yan, Y. Caffeic acid production enhancement by engineering a phenylalanine over-producing *Escherichia coli* strain. *Biotechnol. Bioeng.* **110**, 3188–3196 (2013).
60. Furuya, T. & Kino, K. Catalytic activity of the two-component flavin-dependent monooxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* toward cinnamic acid derivatives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 1145–1154 (2014).
61. Furuya, T., Arai, Y. & Kino, K. Biotechnological production of caffeic acid by bacterial cytochrome P450 CYP199A2. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 6087–6094 (2012).
62. Choi, O. *et al.* Biosynthesis of plant-specific phenylpropanoids by construction of an artificial biosynthetic pathway in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 1657–1665 (2011).
63. W. Gruissem, R. Jones, Eds, B. B. Biochemistry & Molecular Biology of Plants, Natural Products (Secondary Metabolites). *Am. Soc. Plant Physiol.* 1250–1318 (2000).
64. Yazaki, K. Transporters of secondary metabolites. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 301–307 (2005).
65. Martinoia, E. *et al.* Multifunctionality of plant ABC transporters - More than just detoxifiers. *Planta* **214**, 345–355 (2002).
66. Yazaki, K., Sugiyama, A., Morita, M. & Shitan, N. Secondary transport as an efficient membrane transport mechanism for plant secondary metabolites. *Phytochem. Rev.* **7**, 513–524 (2008).
67. Shoji, T. *et al.* Multidrug and toxic compound extrusion-type transporters implicated in vacuolar sequestration of nicotine in tobacco roots. *Plant Physiol.* **149**, 708–718 (2009).
68. Sasabe, M., Toyoda, K., Shiraishi, T., Inagaki, Y. & Ichinose, Y. cDNA cloning and characterization of tobacco ABC transporter: NtPDR1 is a novel elicitor-responsive gene. *FEBS Lett.* **518**, 164–168 (2002).
69. Campbell, E. J. *et al.* Pathogen-Responsive Expression of a Putative ATP-Binding Cassette Transporter Gene Conferring Resistance to the Diterpenoid Sclareol Is Regulated by Multiple Defense Signaling Pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **133**, 1272–1284 (2003).
70. Thompson, E. P., Wilkins, C., Demidchik, V., Davies, J. M. & Glover, B. J. An *Arabidopsis* flavonoid transporter is required for anther dehiscence and pollen development. *J. Exp. Bot.* **61**, 439–451 (2010).

71. Gomez, C. *et al.* Grapevine MATE-type proteins act as vacuolar h⁺-dependent acylated anthocyanin transporters 1[W][OA]. *Plant Physiol.* **150**, 402–415 (2009).
72. Cohen, M. L. Epidemiology of drug resistance: Implications for a post-antimicrobial era. *Science (80-.).* **257**, 1050–1055 (1992).
73. Nikaido, H. 1785853. **178**, 1–7 (1996).
74. Putman, M., van Veen, H. W. & Konings, W. N. Molecular Properties of Bacterial Multidrug Transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 672–693 (2000).
75. Roberts, M. C. Tetracycline resistance determinants: Mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol. Rev.* **19**, 1–24 (1996).
76. Torreón, U. Universidad Autónoma de Coahuila Facultad de Medicina. 1–36 (2011).
77. Henikoff, S., Haughn, G. W., Calvo, J. M. & Wallace, J. C. A large family of bacterial activator proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 6602–6606 (1988).
78. Van Keulen, G., Ridder, A. N. J. A., Dijkhuizen, L. & Meijer, W. G. Analysis of DNA binding and transcriptional activation by the LysR-type transcriptional regulator CbbR of *Xanthobacter flavus*. *J. Bacteriol.* **185**, 1245–1252 (2003).
79. Maddocks, S. E. & Oyston, P. C. F. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* **154**, 3609–3623 (2008).
80. Aussel, L. *et al.* Biosynthesis and physiology of coenzyme Q in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1837**, 1004–1011 (2014).
81. Nowicka, B. & Kruk, J. Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1797**, 1587–1605 (2010).
82. Søballe, B. & Poole, R. K. Microbial ubiquinones: Multiple roles in respiration, gene regulation and oxidative stress management. *Microbiology* **145**, 1817–1830 (1999).
83. Ando, S., Arai, I., Kiyoto, K. & Hanai, S. Identification of aromatic monomers in steam-exploded poplar and their influences on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Technol.* **64**, 567–570 (1986).
84. Phytochemicals, V. *Fruit and Vegetable Phytochemicals. Fruit and Vegetable Phytochemicals* (2017). doi:10.1002/9781119158042.
85. Rodrigues, J. L., Araújo, R. G., Prather, K. L. J., Kluskens, L. D. & Rodrigues, L. R. Heterologous production of caffeic acid from tyrosine in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb. Technol.* **71**, 36–44 (2015).
86. Carlson, R. & Srienc, F. Fundamental *Escherichia coli* Biochemical Pathways for Biomass and Energy Production: Creation of Overall Flux States. *Biotechnol. Bioeng.* **86**, 149–162 (2004).
87. Li, X., Erickson, A. M. & Ricke, S. C. Comparison of minimal media and inoculum concentration to decrease the lysine growth assay response time of an *Escherichia coli* lysine auxotroph mutant. *J. Rapid Methods Autom. Microbiol.* **7**, 279–290 (1999).
88. Varma, A. & Palsson, B. O. Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3724–3731 (1994).
89. Hayashi, K. *et al.* Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Mol. Syst. Biol.* **2**, (2006).

90. Yura, T., Mori, H. & Nagai, H. Systematic sequencing. **20**, 3305–3308 (1992).
91. Phillip, S. & Chen, Y. Expression Technology. *IEEE Signal Process. Mag.* **24**, 18–26 (2007).
92. Yadava, R. S., Kumar, R. & Yadava, P. K. Expression of *lexA* targeted ribozyme in *Escherichia coli* BL-21 (DE3) cells. *Mol. Cell. Biochem.* **271**, 197–203 (2005).
93. Natarajan, A. & Srien, F. Glucose uptake rates of single *E. coli* cells grown in glucose-limited chemostat cultures. *J. Microbiol. Methods* **42**, 87–96 (2000).
94. Webster, R. E. The *tol* gene products and the import of macromolecules into *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**, 1005–1011 (1991).
95. Paulsen, I. T., Park, J. H., Choi, P. S. & Saier, M. H. A family of Gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **156**, 1–8 (1997).
96. Dhamdhare, G. & Zgurskaya, H. I. Metabolic shutdown in *Escherichia coli* cells lacking the outer membrane channel TolC. *Mol. Microbiol.* **77**, 743–754 (2010).
97. Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 6640–6645 (2000).
98. Martoglio, B. & Dobberstein, B. Signal sequences: More than just greasy peptides. *Trends Cell Biol.* **8**, 410–415 (1998).
99. Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B. & Hughes, C. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* **405**, 914–919 (2000).
100. Kobayashi, R., Suzuki, T. & Yoshida, M. *Escherichia coli* phage-shock protein A (PspA) binds to membrane phospholipids and repairs proton leakage of the damaged membranes. *Mol. Microbiol.* **66**, 100–109 (2007).
101. Demple, B. Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* *soxRS* oxidative stress regulon - A review. *Gene* **179**, 53–57 (1996).
102. Prub, B. M., Nelms, J. M., Park, C. & Wolfe, A. J. Mutations in NADH:Ubiquinone Oxidoreductase. (1994).
103. Imlay, J. & Linn, S. Damage and Oxygen Radical. *Science (80-.)*. **240**, 1302–1309 (1988).
104. Ow, D. S. W., Nissom, P. M., Philp, R., Oh, S. K. W. & Yap, M. G. S. Global transcriptional analysis of metabolic burden due to plasmid maintenance in *Escherichia coli* DH5 α during batch fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* **39**, 391–398 (2006).
105. Bentley, W. E., Mirjalili, N., Andersen, D. C., Davis, R. H. & Kompala, D. S. Plasmid-encoded protein: The principal factor in the “metabolic burden” associated with recombinant bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* **35**, 668–681 (1990).
106. Tegel, H., Ottosson, J. & Hober, S. Enhancing the protein production levels in *Escherichia coli* with a strong promoter. *FEBS J.* **278**, 729–739 (2011).
107. Díaz, E., Ferrández, A., Prieto, María, A. & García, José, L. Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 523–569 (2001).
108. Nikaido, H. Outer membrane. In: Neidhardt F C, Curtiss III R, Ingraham J L, Lin E C C, Low K B Jr, Magasanik B, Reznikoff W S, Riley M, Schaechter M, Umberger H E, editors. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. 2nd ed. Washington, D.C: Amer.

Microbiol. Mol. Biol. Rev. **67**, 29–47 (1996).

109. Stock, J. B., Ninfa, A. J. & Stock, A. M. *Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. Microbiological Reviews* vol. 53 (1989).
110. Sikkema, J., De Bont, J. A. M. & Poolman, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **59**, 201–222 (1995).
111. Sierra-Alvarez, R. & Lettinga, G. The effect of aromatic structure on the inhibition of acetoclastic methanogenesis in granular sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 544–550 (1991).
112. Keweloh, H., Weyrauch, G. & Rehm, H. J. Phenol-induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 66–71 (1990).
113. SIKKEMA JAN, DE BONT JAN A. M. & POOLMAN BERT. Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **59**, 201–222 (1995).
114. Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144–148 (1961).
115. Hellingwerf, K. J. & Konings, W. N. The Energy Flow in Bacteria: The Main Free Energy Intermediates and Their Regulatory Role. *Adv. Microb. Physiol.* **26**, 125–154 (1985).
116. Hammer, K. A. & Heel, K. A. Use of multiparameter flow cytometry to determine the effects of monoterpenoids and phenylpropanoids on membrane polarity and permeability in staphylococci and enterococci. *Int. J. Antimicrob. Agents* **40**, 239–245 (2012).
117. Cristani, M. *et al.* Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 6300–6308 (2007).
118. Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J. & Simões, M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microb. Drug Resist.* **19**, 256–265 (2013).
119. Lou, Z. *et al.* P-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. *Food Control* **25**, 550–554 (2012).
120. Hayrapetyan, H., Hazeleger, W. C. & Beumer, R. R. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by pomegranate (*Punica granatum*) peel extract in meat paté at different temperatures. *Food Control* **23**, 66–72 (2012).
121. Campos, F. M. *et al.* Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **135**, 144–151 (2009).
122. Xun, L. & Sandvik, E. R. Characterization of 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase (HpaB) of *Escherichia coli* as a reduced flavin adenine dinucleotide-utilizing monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 481–486 (2000).
123. Prieto, M. A., Perez-Aranda, A. & Garcia, J. L. Characterization of an *Escherichia coli* aromatic hydroxylase with a broad substrate range. *J. Bacteriol.* **175**, 2162–2167 (1993).
124. Prieto, M. A., Díaz, E. & García, J. L. Molecular characterization of the 4-hydroxyphenylacetate catabolic pathway of *Escherichia coli* W: Engineering a mobile aromatic degradative cluster. *J. Bacteriol.* **178**, 111–120 (1996).
125. Burlingame, R. & Chapman, P. J. Catabolism of phenylpropionic acid and its 3-hydroxy

- derivative by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **155**, 113–121 (1983).
126. Peppercorn, M. A. & Goldman, P. Caffeic acid metabolism by bacteria of the human gastrointestinal tract. *J. Bacteriol.* **108**, 996–1000 (1971).
 127. Tobes, R. & Pareja, E. Bacterial repetitive extragenic palindromic sequences are DNA targets for Insertion Sequence elements. *BMC Genomics* **7**, 1–12 (2006).
 128. Donnelly, M. & Cooper, R. Succinic Semialdehyde Dehydrogenases of *Escherichia coli*. *Enzyme* **561**, 555–561 (1981).
 129. Chu, D. & Barnes, D. J. The lag-phase during diauxic growth is a trade-off between fast adaptation and high growth rate. *Sci. Rep.* **6**, 1–15 (2016).
 130. da Silva, G. P., Mack, M. & Contiero, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol. Adv.* **27**, 30–39 (2009).
 131. Wolfe, A. J. The Acetate Switch. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**, 12–50 (2005).
 132. Nakano, K., Rischke, M., Sato, S. & Märkl, H. Influence of acetic acid on the growth of *Escherichia coli* K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 597–601 (1997).
 133. Liu, M. *et al.* Global transcriptional programs reveal a carbon source foraging strategy by *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **280**, 15921–15927 (2005).
 134. Fuentes, L. G. *et al.* Modification of glucose import capacity in *Escherichia coli*: Physiologic consequences and utility for improving DNA vaccine production. *Microb. Cell Fact.* **12**, 1–11 (2013).
 135. Luli, G. W. & Strohl, W. R. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1004–1011 (1990).
 136. Lara, A. R., Caspeta, L., Gosset, G., Bolívar, F. & Ramírez, O. T. Utility of an *Escherichia coli* Strain Engineered in the Substrate Uptake System for Improved Culture Performance at High Glucose and Cell Concentrations: An Alternative to Fed-Batch Cultures. *J. Anat.* **189 (Pt 3)**, 503–505 (1996).
 137. Voegelé, R. T., Sweet, G. D. & Boos, W. Glycerol kinase of *Escherichia coli* is activated by interaction with the glycerol facilitator. *J. Bacteriol.* **175**, 1087–1094 (1993).
 138. Murarka, A., Dharmadi, Y., Yazdani, S. S. & Gonzalez, R. Fermentative utilization of glycerol by *Escherichia coli* and its implications for the production of fuels and chemicals. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 1124–1135 (2008).
 139. Wang, Z., Zhuge, J., Fang, H. & Prior, B. A. Glycerol production by microbial fermentation: A review. *Biotechnol. Adv.* **19**, 201–223 (2001).
 140. Papanikolaou, S., Muniglia, L., Chevalot, I., Aggelis, G. & Marc, I. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *J. Appl. Microbiol.* **92**, 737–744 (2002).
 141. Fu, D. *et al.* Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science (80-)*. **290**, 481–486 (2000).
 142. Jones, J. A., Collins, S. M., Vernacchio, V. R., Lachance, D. M. & Koffas, M. A. G. Optimization of naringenin and p-coumaric acid hydroxylation using the native *E. coli* hydroxylase complex, HpaBC. *Biotechnol. Prog.* **32**, 21–25 (2016).

