

2005

00551



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

“Desarrollo y caracterización de cepas de *Escherichia coli* diseñadas para la producción de antranilato y catecol”.

T E S I S

Que para obtener el título de:

MAESTRA EN CIENCIAS

Presenta:

Q. Elsa Patricia Silva Rincón

SILVA RINCÓN, ELSA PATRICIA

Cuernavaca, Mor.

Septiembre 2005

m347503



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.

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

NOMBRE: Elsa Patricia Silva

Riocón

FECHA: 2-Septiembre-2005

FIRMA: 

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

Miembros del Jurado:

PRESIDENTE: **Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo**

SECRETARIO: **Dr. Guillermo Gosset Lagarda**

VOCAL: **Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos**

SUPLENTE: **Dr. Edmundo Castillo Rosales**

SUPLENTE: **Dr. Carlos Muñoz Garay**

Agradecimientos:

A el doctor Guillermo Goseet Lagarda, por permitirme realizar mi trabajo de tesis de maestría bajo su asesoría, por compartir sus conocimientos, por su apoyo, confianza y paciencia.

A mis tutores: Dr. Gullermo Gosset, Dr. Joel Osuna y Luis Gerardo Treviño, por su valiosa participación y aportaciones durante el desarrollo del proyecto.

A los integrantes de mi comité revisor, por los comentarios y sugerencias hechas en esta tesis.

A Natividad Cabrera y Georgina Hernández por el apoyo técnico en este proyecto, por su paciencia y por sus enseñanzas.

A Mercedes Enzaldo por toda su ayuda y disposición.

A mis compañeros del laboratorio Bolivar-Gosset: por su amistad, ayuda y compañía.

A mis amigos: Adriana, Lidia, Inés, Gerardo, Natividad, Ramón, Andrea y Marina por su cariño y compañía.

En especial y con cariño a mi Familia por el apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de mi vida.

| | Página |
|--|---------------|
| Índice general | i |
| Índice de figuras | iv |
| Índice de tablas | vi |
| Abreviaciones empleadas | vii |
| | |
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 2 |
| 3. ANTECEDENTES | 4 |
| 3.1 Estrategias para incrementar la disponibilidad metabólica de los precursores E4P y PEP. | 5 |
| 3.1.1 Incremento de E4P. | 5 |
| 3.1.2 Incremento de PEP. | 5 |
| | |
| 3.2 Compuestos aromáticos con aplicaciones industriales. | 8 |
| 3.2.1 Antranilato. | 8 |
| 3.2.1.1 Síntesis de antranilato en <i>E. coli</i> . | 8 |
| 3.2.2 Catecol. | 11 |
| 3.2.2.1 Diseño, construcción y caracterización de cepas de <i>E. coli</i> productoras de catecol. | 11 |
| 3.2.2.2 Desarrollo de cepas productoras catecol a partir de antranilato. | 12 |
| 4. JUSTIFICACIÓN | 13 |
| 5. HIPÓTESIS | 14 |
| 6. OBJETIVOS | 14 |
| 6.1 Objetivo General. | 14 |
| 6.2 Objetivos Particulares. | 14 |
| 7. MATERIALES Y MÉTODOS | 15 |
| 7.1 Cepas y plásmidos. | 15 |
| 7.2 Análisis bioquímico. | 17 |
| 7.3 Medios de cultivo. | 17 |
| 7.4 Transformación de DNA. | 17 |
| 7.5 Purificación de DNA. | 18 |

| | |
|--|-----------|
| 7.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). | 18 |
| 7.7 Determinación de la toxicidad del antranilato y catecol. | 19 |
| 7.8 Cinéticas de crecimiento y manejo de muestras. | 19 |
| 7.9 Determinación de la secuencia nucleotídica de los genes <i>trpEGD</i> provenientes de la cepa productora de antranilato W3110trpD9923. | 20 |
| 7.10 Estrategia de clonación de los genes <i>trpEGD</i> ₉₉₂₃ . | 21 |
| 7.11 Inactivación de la ruta de síntesis de triptofano. | 22 |
| 7.11.1 Eliminación del gen de resistencia a antibiótico de las cepas JM101trp ⁻ ::Km y PB12trp ⁻ ::Cm. | 24 |
| 7.12 Experimentos con células en reposo. | 25 |
| 7.13 Determinación de la formación y presencia de cuerpos de inclusión por la sobreexpresión de los genes <i>trpEGD</i> ₉₉₂₃ . | 25 |
| 7.13.1 Tratamiento de las muestras. | 25 |
| 7.13.2 Preparación del gel de poliacrilamida para la electroforesis de proteínas. | 26 |
| 7.14 Clonación de los genes <i>trpEG</i> ₉₉₂₃ bajo su propio promotor (<i>ptrp</i>) en el plásmido TOPO. | 26 |
| 7.15 Clonación de los genes <i>trpEG</i> en el plásmido pCL1920. | 28 |
| 7.16 Determinación de la actividad enzimática antranilato sintasa. | 28 |
| 7.16.1 Preparación del extracto libre de células. | 28 |
| 7.16.2. Ensayo enzimático. | 29 |
| 8. RESULTADOS Y DISCUSION | 30 |
| 8.1 Determinación de la toxicidad del antranilato y catecol. | 30 |
| 8.2 Caracterización de las cepas W3110trpD9778 y W3110trpD9923. | 32 |
| 8.3 Determinación de la secuencia nucleotídica de los genes <i>trpEGD</i> provenientes de la cepa productora de antranilato W3110trpD9923. | 34 |
| 8.4 Efecto de la sobreexpresión de los genes <i>aroG^{fb}</i> y <i>tktA</i> sobre la capacidad de producir antranilato en la cepa W3110trpD9923. | 35 |

| | |
|--|----|
| 8.5 Efecto de la sobreexpresión de los genes <i>trpEGD₉₉₂₃</i> bajo el promotor <i>trc</i> en el plásmido pTrc99A en la cepa productora de antranilato W3110trpD9923. | 38 |
| 8.6 Generación de cepas de <i>E. coli</i> modificadas para la producción de antranilato. | 39 |
| 8.6.1 Experimentos con células en reposo . | 41 |
| 8.6.2 Determinación del efecto del medio de cultivo sobre la capacidad de producir antranilato. | 42 |
| 8.6.3 Experimentos con células en reposo utilizando YE a 1 g/l. | 43 |
| 8.7 Determinación de la formación y presencia de cuerpos de inclusión por la sobreexpresión de los genes <i>trpEGD₉₉₂₃</i> . | 44 |
| 8.8 Expresión de los genes <i>trpEGD₉₉₂₃</i> bajo el promotor <i>trp</i> . | 45 |
| 8.9 Expresión de los genes <i>trpEGD₉₉₂₃</i> bajo su promotor en un plásmido de bajo número de copias. | 47 |
| 8.10 Determinación de la actividad enzimática, en la cepa silvestre 9923, y las cepas que sobreexpresan los genes que codifican para la enzima antranilato sintasa en los distintos plásmidos construidos. | 49 |
| 8.11 Efecto de la introducción del plásmido que contiene los genes <i>antABC</i> sobre la capacidad de producir Catecol en la cepa W3110trpD9923 y W3110trpD9923/ <i>aroG^{br}/tktA</i> . | 51 |
| 9. CONCLUSIONES | 53 |
| 10. PERSPECTIVAS | 55 |
| 11. REFERENCIAS | 56 |

Índice de figuras

| Figura | Descripción | Página |
|--------|--|--------|
| 1. | Vía de síntesis de compuestos aromáticos, también conocida como la vía del ácido shiquímico. | 4 |
| 2. | Comparación del sistema de transporte de glucosa en una cepa silvestre y en una cepa PTS ⁻ Glc ⁺ . | 6 |
| 3. | Ruta de biosíntesis de amino ácidos aromáticos y su regulación en <i>E. coli</i> . | 9 |
| 4. | Distribución de los genes <i>trpG</i> y <i>trpD</i> . | 10 |
| 5. | Reacción catalizada por la enzima antranilato dioxigenasa de <i>Acinetobacter sp.</i> ADP1. | 12 |
| 6. | Plásmidos utilizados para la producción, visualización y cuantificación de catecol respectivamente en <i>E. coli</i> W3110. | 12 |
| 7. | Fenotipo de las colonias productoras de catecol y 4-hidroximucónico- δ -semialdheido. | 12 |
| 8. | Esquema de la hipótesis. | 14 |
| 9. | Oligos a los cuales se les introdujo un sitio de corte <i>NcoI</i> y <i>BamHI</i> . | 21 |
| 10. | Gel de agarosa en el que se observan el producto de PCR y el plásmido pTrc99A después de la digestión con ambas enzimas <i>BamHI</i> y <i>NcoI</i> . | 22 |
| 11. | Mapa del plásmido pTrc <trpegd.< td=""><td>22</td></trpegd.<> | 22 |
| 12. | Plásmido pKD46 que expresa el sistema de la Red recombinasa del fago λ . | 23 |
| 13. | Amplificación del gen de resistencia. a) PCR para amplificar el casete de resistencia. b) producto de PCR correspondiente al gen resistencia a Km purificado de gel, digerido con <i>Dpn I</i> , y repurificado c) Producto de PCR correspondiente al gen de resistencia a Cm tratado igual que el producto correspondiente al gen resistencia a Km. | 23 |
| 14. | PCR para amplificar los genes <i>trpEGD</i> . | 26 |
| 15. | Mapa del plásmido pTOPO <trpegd.< td=""><td>27</td></trpegd.<> | 27 |
| 16. | Clonación de los genes <i>trpEGD</i> en el plasmido pCL1920. a. Esquema de los plásmidos pTOPO <trpegd a="" b.="" candidatas="" colonias="" con="" de="" el="" inserto.<="" las="" patrón="" pcl1920="" plásmido="" restricción="" td="" tener="" y=""><td>28</td></trpegd> | 28 |
| 17. | Reacción catalizada por la enzima antranilato sintasa. | 29 |
| 18. | Toxicidad del antranilato y catecol en la cepa W3110/ pTrc99A. | 30 |
| 19. | Cinética de toxicidad del antranilato y catecol en la cepa W3110 pTrc99A. | 31 |
| 20. | Producción de antranilato. | 32 |
| 21. | Grafica representativa de la producción de antranilato y consumo de glucosa en la cepa 9923/pTrc99A. | 33 |

| | | |
|-----|---|----|
| 22. | Oligos diseñados para la secuenciación de <i>trpED</i> . | 34 |
| 23. | Esquema de la mutación que generó la inactivación de la actividad fosforibosil transferasa. | 34 |
| 24. | Gráficas representativas de la caracterización de la cepa <i>E. coli</i> 9923/ <i>aroG^{br}</i> . | 35 |
| 25. | Gráficas representativas de la caracterización de la cepa <i>E. coli</i> 9923/ <i>aroG^{br}/tktA</i> . | 36 |
| 26. | Esquemas de los efectos causados sobre la productividad y el rendimiento por la sobreexpresión de los genes <i>aroG^{br}</i> y <i>tktA</i> en la cepa productora de antranilato 9923. | 37 |
| 27. | Evaluación de las clonas elegidas. | 38 |
| 28. | Caracterización de la clona 5 de la cepa 9923/ <i>pTrctrpEGD</i> y su comparación con la cepa silvestre. | 38 |
| 29. | Cinética de crecimiento en medio M9. | 39 |
| 30. | Cinéticas de crecimiento en medio LB y producción de antranilato. | 40 |
| 31. | Cinéticas de crecimiento en medio LB y producción de antranilato. | 41 |
| 32. | Monitoreo de lo DO en los cultivos con células en reposo. | 41 |
| 33. | Cultivos a distintas concentraciones de YE. | 42 |
| 34. | Cultivos de células en reposo utilizando preinoculos crecidos en medio M9 suplementado con 1 g/l YE. | 43 |
| 35. | Gel de acrilamida-bisacrilamida para determinar la presencia de cuerpos de inclusión. | 44 |
| 36. | Caracterización de la cepa JM101 <i>trp</i> -/ <i>pTOPOtrpEGD</i> . | 45 |
| 37. | Comparación de el rendimiento alcanzado por la cepa JM101 <i>trp</i> -/ <i>pCLtrpEGD</i> . | 46 |
| 38. | Cinética de crecimiento de la cepa JM101 <i>trp</i> -/ <i>pTOPOtrpEGD</i> y de las cepas que expresan los genes <i>aroG^{br}</i> y <i>tktA</i> . | 46 |
| 39. | Caracterización de la cepa JM101 <i>trp</i> -/ <i>pCLtrpEGD</i> y de la cepa que expresa el gen <i>aroG^{br}</i> . | 47 |
| 40. | Comparación de la productividad alcanzada por las cepas que portan el plásmido <i>pCLtrpEGD</i> . | 48 |
| 41. | Comparación del rendimiento alcanzado por las cepas que portan el plásmido <i>pCLtrpEGD</i> . | 48 |
| 42. | Relación entre actividad enzimática y productividad de antranilato en las distintas cepas. | 49 |
| 43. | Inhibición alostérica de la enzima antranilato sintasa por triptofano en la cepa 9923/99A. | 50 |
| 44. | Caracterización de la cepa <i>E. coli</i> 9923/ <i>pTrcant3</i> . | 51 |
| 45. | Caracterización de la cepa <i>E. coli</i> 9923/ <i>aroG^{br}/tktA/ant3</i> . | 52 |

Índice de tablas

| Tabla | Descripción | Página |
|-------|--|--------|
| 1. | Plásmidos. | 15 |
| 2. | Cepas. | 16 |
| 3. | Concentraciones de los compuestos tóxicos utilizadas. | 19 |
| 4. | Oligos diseñados para la secuenciación. | 20 |
| 5. | Oligos diseñados para la inactivación de la región <i>trpE-trpC</i> . | 23 |
| 6. | Oligos diseñados para la amplificación de los genes <i>trpEGD₉₉₂₃</i> . | 26 |
| 7. | Reacción de clonación en el vector TOPO. | 27 |
| 8. | Cepas utilizadas. | 32 |
| 9. | Características de la cepa 9923/pTrc99A. | 33 |
| 10. | Comparación de las cepas 9923/ <i>aroG^{br}</i> y 9923/pTrc99A. | 35 |
| 11. | Comparación de las cepas 9923/ <i>aroG^{br}/tktA</i> y 9923/pTrc99A. | 36 |
| 12. | Cantidad de antranilato producido por gramo de célula en relación a la cantidad de YE por litro. | 42 |
| 13. | Comparación de las cepas 9923/pTrc99A y JM101trp-/pTOPOtrpEGD. | 45 |
| 14. | Comparación de las cepas JM101trp-/pCLtrpEGD y JM101trp-/pCLtrpEGD /pJLBaroG ^{br} . | 47 |
| 15. | Actividades enzimáticas. | 49 |
| 16. | Comparación de las cepa 9923/ <i>ant3</i> y 9923/ <i>aroG^{br}/tktA/ant3</i> . | 52 |

Abreviaciones empleadas:

| | |
|------------------|--|
| aKG | <i>a</i> -cetoglutarato |
| ANTA, ANT | antranilato |
| Ap, Amp | Ampicilina |
| Cat | catecol |
| CDRP | 1-(<i>o</i> -carboxyfenilamino)-1-deoxiribulosa 5-fosfato |
| CHA | corismato |
| Cm | cloranfenicol |
| DAH _P | 3-deoxy-d-arobino-heptulosonato 7-fosfato |
| DHQ | 3-dehidroquinato |
| DHS | 3-dehidroshikimato |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> . |
| E4P | eritrosa 4-fosfato |
| EPSP | 5 <i>enol</i> piruvatoilshikimato3-fosfato |
| GA3P | gliceraldehido 3-fosfato |
| Gluc | Glucosa |
| HPP | 4-hidroxifenilpiruvato |
| I3GP | indol 3-glicerolfosfato |
| IND | indol |
| Km | kanamicina |
| L-Gln | L-glutamina |
| L-Glu | L-glutamato |
| L-Phe | L-fenilalanina |
| L-Ser | L-serina |
| L-Trp | L-triptofano |
| L-Tyr | L-tirosina |
| Pck | PEP carboxicinas |
| PEP | fosfoenolpiruvato |
| PPA | prefenato |
| Ppc | PEP carboxilasa |
| Pps | PEP sintasa |
| PPY | fenilpiruvato |
| PRAA | fosforibosil antranilato |
| PRPP | 5-fosforibosil- <i>a</i> -pirofosfato |
| PTS | sistema de fosfotransferasa |
| PykA y PykF | piruvato cinasa |
| Pyr | piruvato |
| q | productividad específica |
| S3P | shikimato 3-fosfato |
| SHIK | shikimato |
| Spt | espectinomicina |
| Tc | tetraciclina |
| Trp | triptofano |
| Y | rendimiento |
| YE | extracto de levadura |

1. RESUMEN

El antranilato y el catecol son compuestos con aplicaciones en la industria química. A partir de ellos se generan una gran cantidad de productos, entre ellos, saborizantes, pigmentos, fármacos, protectores solares, etc. En este trabajo se diseñaron cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) capaces de sintetizar antranilato y catecol a partir de glucosa. Para ello se utilizaron técnicas de ingeniería metabólica que incluyen el diseño de fondos genéticos adecuados para este propósito, así como los sistemas de expresión convenientes.

La cepa *E. coli* 9923 es una cepa Trp^- generada por mutación al azar, la cual, mostró la capacidad de producir antranilato con un rendimiento a partir de glucosa del 10% con respecto al máximo teórico. Con la finalidad de aumentar la capacidad de síntesis de antranilato en ésta cepa, se comprometió el flujo de carbono hacia la ruta de síntesis de aromáticos mediante la sobreexpresión del gen *aroG^{fbr}* que codifica para una versión mutante de la enzima DAHP sintasa insensible a inhibición alostérica. Con esta estrategia se logró un rendimiento de 66.5 mg ant/g gluc, lo cual corresponde al 19% del máximo teórico. Conjuntamente, se sobreexpresó el gen *tktA* que codifica para una enzima clave en la ruta de síntesis de la eritrosa-4-fosfato y con lo cual se lograría un aumento en la disponibilidad de este precursor, de esta manera se alcanzó un rendimiento de 78.3 mg ant/g gluc que corresponde al 22% del máximo teórico.

La clonación y secuenciación de los genes *trpEGD* que codifican para la enzima antranilato sintasa provenientes de la cepa 9923 (*trpEGD₉₉₂₃*) permitió establecer que existen mutaciones en el gen *trpD*, las cuales son responsables del fenotipo observado. La expresión de los genes *trpEGD₉₉₂₃* bajo su promotor *P_{trp}* en un plásmido de bajo número de copias pCL1920 (pCL*trpEGD*), permitió transferir la capacidad de producir antranilato a otros fondos genéticos. La cepa JM101*trp⁻* fue construida mediante la inactivación de los genes cromosomales *trpEGDC* utilizando productos de PCR. Al transformar esta cepa con el plásmido pCL*trpEGD* se alcanzó un rendimiento de 90.98 mg ant/g glucosa, además se logró la conjunta sobreexpresión del gen *aroG^{fbr}*, llegando a rendimientos de 108 mg ant/ g gluc que corresponde al 34% del máximo teórico.

La cepa 9923 productora de antranilato, y la cepa 9923 que expresa los genes *aroG^{fbr}* y *tktA*, se transformaron con el plásmido pTrc*ant3* que porta los genes que codifican para la enzima antranilato dioxigenasa, en estas cepas se logró producir catecol a partir de glucosa con rendimientos del 100% de catecol a partir del antranilato producido.

2. Introducción

La biotecnología se ha descrito como una disciplina horizontal. Ya que, requiere reunir el conocimiento de diversos orígenes. La biología molecular, la ingeniería bioquímica, la microbiología, la inmunología, la genómica, la bioinformática, etc., se agrupan bajo objetivos comunes, y permiten así el estudio integral y la modificación de los sistemas biológicos con la finalidad de desarrollar mejores tecnologías para la solución de problemas en diversas áreas.

El mejoramiento genético de las especies importantes aportó conocimientos significativos acerca de la biología durante mucho tiempo. Se lograron nuevas variedades de animales y vegetales mas adaptados a las condiciones ambientales y con mejores características mediante el entrecruzamiento de especímenes con características deseables y la selección de la progenie. Con el desarrollo de las técnicas de DNA recombinante, esto cambió radicalmente, ya que incluso genes pertenecientes a otras especies lejanas en la escala evolutiva, se pueden específicamente integrar a otros organismos. Estos avances en la biología permiten diseñar, manipular, y orientar los procesos biológicos hacia la producción de compuestos de interés comercial.

La ingeniería de vías metabólicas estudia la introducción de modificaciones específicas en las redes metabólicas con el propósito de mejorar propiedades celulares. Esto abre la posibilidad de producir moléculas no proteicas a través del manejo del DNA. La modificación de algunos genes nativos dentro de una célula permite alterar los flujos de carbono, nitrógeno y energía para la producción de ciertos metabolitos, ejemplo de éstos son la producción de ácido ascórbico para las industrias alimenticia y farmacéutica, el colorante azul índigo para la industria textil, varios aminoácidos para las industrias alimenticia, farmacéutica y cosmética, antibióticos para la salud humana, animal y vegetal, la producción de biopolímeros para las industrias alimenticia, de pigmentos, química y del petróleo (Lee y Papoutsakis,)

La vía de síntesis de compuestos aromáticos, también conocida como la vía del ácido shiquímico, es una fuente de metabolitos esenciales, así como de un gran número de los llamados metabolitos secundarios en las bacterias y plantas. Con el propósito de lograr la síntesis microbiana de este tipo de compuestos, se ha aplicado la ingeniería de vías metabólicas para el diseño de cepas bacterianas de producción. Entre las estrategias de ingeniería metabólica empleadas para este fin, se encuentra incrementar la disponibilidad de los precursores directos de los aromáticos, el fosfoenolpiruvato (PEP) y la D-eritrosa-4-fosfato (E4P), inactivando las enzimas que los consumen o sobreexpresando las que los producen, así como la sobreexpresión de versiones de la enzima DAHP sintasa insensibles a inhibición alostérica para lograr el redireccionamiento del flujo de carbono hacia la ruta de síntesis de aminoácidos aromáticos (Bongaerts *et al.*, 2001).

El antranilato es uno de los intermediarios en la ruta de síntesis del aminoácido triptofano en *E. coli*. La primera reacción de la ruta terminal de biosíntesis de triptofano consiste en la conversión de corismato y glutamina a antranilató, glutamato y piruvato. Esta reacción la cataliza la enzima antranilato sintasa, la cual es un tetrámero formado por los polipéptidos específicos de los genes *trpE* y *trpD*.

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

3. ANTECEDENTES

La vía de síntesis de compuestos aromáticos, ó vía del ácido shiquímico, es una fuente de metabolitos esenciales, así como de un gran número de los llamados metabolitos secundarios en las bacterias y las plantas. La síntesis de los compuestos aromáticos en las bacterias se inicia con la condensación entre el fosfoenolpiruvato (PEP) y la D-eritrosa 4-fosfato (E4P) para formar el 3-desoxi-D-arabino-heptulosoato 7-fosfato (DAHP) en una reacción catalizada por la enzima DAHP sintasa. Después de seis reacciones enzimáticas, se produce el intermediario corismato, a partir del cual se sintetizan aminoácidos aromáticos, ubiquinona, menaquinona, folato y enteroquelina. Mediante la introducción de genes heterólogos a *E. coli*, es posible extender su repertorio metabólico para que pueda sintetizar nuevos metabolitos de interés industrial (Fig. 1). Es importante señalar que aún y cuando se han logrado desarrollar cepas de *E. coli* que pueden sintetizar compuestos como la fenilalanina, el catecol, el ácido quínico o índigo, los rendimientos en la producción de estos metabolitos a partir de glucosa son muy bajos. Por lo tanto, las tecnologías biológicas para la generación de estos productos aun no pueden competir con tecnologías de síntesis química basadas en el uso del petróleo como materia prima (Gosset, 1996).

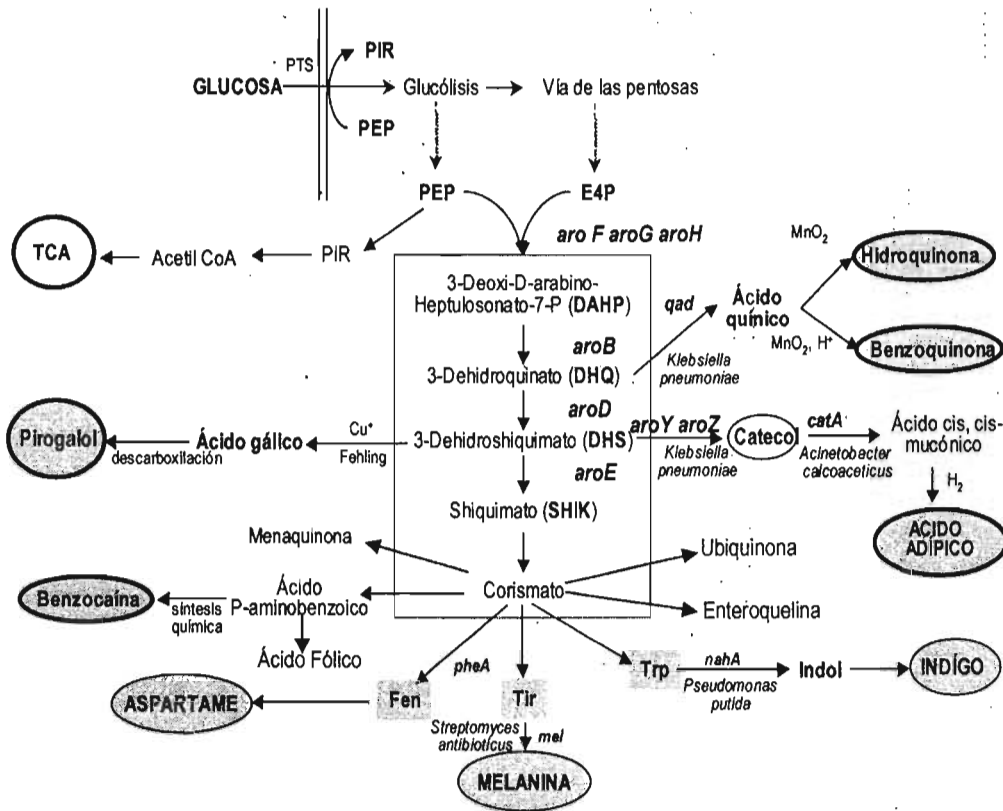


Figura 1. Vía de síntesis de compuestos aromáticos, también conocida como la vía del ácido shiquímico.

3.1 Estrategias para incrementar la disponibilidad metabólica de los precursores E4P y PEP.

Los precursores de la ruta biosintética de aminoácidos aromáticos PEP y E4P derivan del metabolismo central, el PEP se forma durante la glicólisis y la ruta de las pentosas fosfato produce la E4P.

Se han realizado una gran cantidad de estudios para lograr un incremento del flujo de carbono hacia la síntesis de estos precursores. Las estrategias más utilizadas se describen a continuación.

3.1.1 Incremento de E4P.

Las enzimas clave de la ruta no oxidativa de las pentosas fosfato son la transcetolasa y la transaldolasa. Estas catalizan reacciones que llevan a fructosa 6-fosfato y gliceraldehído 3-fosfato uniendo la ruta a la glucólisis y la otra rama a E4P, el precursor de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. Para incrementar la disponibilidad de E4P, en una cepa de *E. coli* que acumula DAHP debido a la inactivación del gen *aroB* que codifica para la enzima 3-dehidroquinato sintasa, se sobreexpresó el gen *tklA* que codifica para la enzima transcetolasa (Draths y Frost, 1990; Draths *et al.*, 1992). Se obtuvo un incremento de 2 veces en el flujo de carbono de glucosa hacia la biosíntesis de aromáticos cuando se utilizó una DAHP sintasa resistente a inhibición alostérica (*aroG^{br}*) y la transcetolasa (Draths *et al.*, 1992).

El impacto de la transaldolasa (codificada por el gen *talB*) en el flujo hacia la ruta de aromáticos se analizó también, la sobreexpresión del gen *talB* incrementa significativamente la formación de DAHP (Lu y Liao, 1997) y L-Phe (Sprenger *et al.*, 1998) a partir de glucosa. La sobre expresión adicional de *tklA* incremento el flujo en la ruta de aromáticos de una cepa de *E. coli* productora de L-Phe pero no en la cepa productora de DAHP.

De experimentos con expresión de PEP sintasa combinada con *tklA* ó *talB* se concluyó que la transcetolasa es más eficiente en dirigir el flujo de carbono hacia la ruta de los aromáticos que la transaldolasa (Liao *et al.*, 1996).

3.1.2 Incremento de PEP.

El PEP es un intermediario clave envuelto en varios procesos celulares. En *E. coli* silvestre el mayor consumidor de PEP es el sistema de fosfotransferasa (PTS), responsable de la introducción y fosforilación de la glucosa al mismo tiempo. Otras enzimas consumidoras de PEP son la PEP carboxilasa Ppc, y las piruvato cinasa PykA y PykF. Adicionalmente hay reacciones de formación de PEP, como son PEP sintasa Pps y PEP carboxicinas Pck, que actúan en gluconeogénesis.

En *E. coli*, el transporte de azúcares como la glucosa, depende de un sistema multiproteico denominado fosfotransferasa (PTS). Además de esta función, el sistema PTS forma parte de un sistema global de regulación metabólica, ya que regula los procesos de represión catabólica y participa como elemento general de transducción de señales en la quimiotaxis (Postma, 1987). No obstante que PTS es muy importante para la fisiología de *E. coli*, el control refinado y complejo que este sistema ejerce sobre el consumo de mezclas de azúcares y la dependencia sobre la utilización del PEP, para transportar azúcares, constituyen una desventaja para fines biotecnológicos (Flores *et al.*, 1996).

Considerando esta situación, en el grupo del doctor Gosset, se decidió emplear la ingeniería metabólica para desarrollar cepas de *E. coli* que carecieran del sistema PTS, pero que mantuvieran la capacidad de transportar glucosa eficientemente. Con éste propósito, a partir una cepa de *E. coli* tipo silvestre (JM101) se generó la cepa PB11 por la remoción del sistema PTS (Δ PTS). Esta cepa tiene una capacidad muy limitada para crecer utilizando glucosa como fuente de carbono (fenotipo PTS⁻Glc⁻). A partir de esta mutante y por medio de cultivos en quimiostato con glucosa como única fuente de carbono, se aislaron cepas que son capaces de crecer en glucosa (PTS⁻Glc⁺), denominadas PB12 y PB13, que utilizan la permeasa de galactosa (GalP) para transportar glucosa y la enzima glucocinasa que la fosforila para convertirla en glucosa-6P (Fig. 2) (Flores *et al.*, 1996; Flores *et al.*, 2002). Como parte de la caracterización fisiológica de estas cepas, se demostró que poseen el potencial para la síntesis de compuestos aromáticos con un alto rendimiento a partir de glucosa (Gosset *et al.*, 1996; Flores *et al.*, 1996).

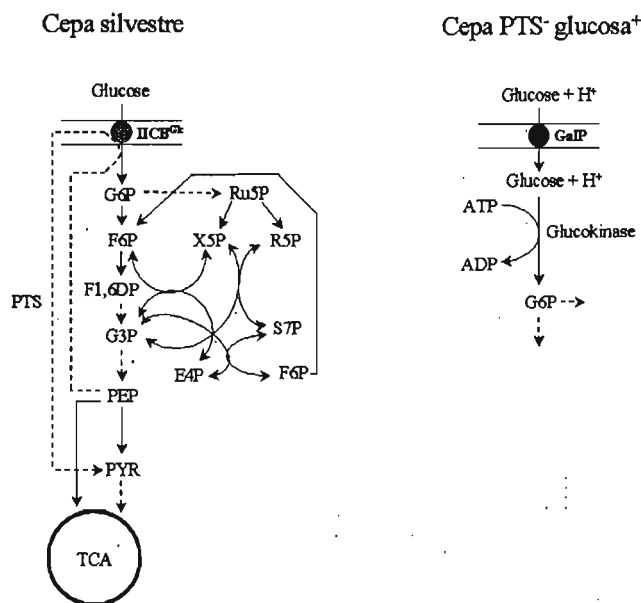


Figura 2. Comparación del sistema de transporte de glucosa en una cepa silvestre y en una cepa PTS⁻ Glc⁺.

El rendimiento máximo teórico de DAHP a partir de glucosa es de 0.43 mol/mol. Este rendimiento puede ser duplicado si cada piruvato formado durante el transporte de glucosa es reciclado a PEP o si el transporte y fosforilación de glucosa es independiente de PEP. (Förberg *et al.*, 1988; Patnaik y Liao, 1994).

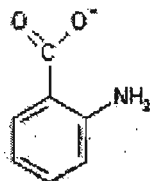
Las cepas de *E. coli* que poseen el fenotipo PTS⁻Glc⁺ tienen la capacidad de sintetizar compuestos aromáticos con un alto rendimiento. Por lo tanto, es posible pensar que cepas con este fenotipo podrían ser utilizadas para el desarrollo de tecnologías para la producción de ciertos productos aromáticos a nivel industrial. Con este propósito, durante los últimos años se ha realizado un esfuerzo multidisciplinario para lograr la generación de cepas de *E. coli* con la capacidad de sintetizar compuestos como la fenilalanina, la melanina y el catecol.

Las dos enzimas piruvato cinasas de *E. coli* representan otro punto de consumo de PEP. La inactivación de uno de los dos genes que las codifican causa escasamente algún efecto. Pero la inactivación simultánea de ambos genes incrementa significativamente el flujo de carbono hacia la síntesis de DAHP (Berry, 1996; Gosset *et al.*, y L-Phe (Grinter, 1998).

El piruvato producido vía PTS se pierde de la ruta de aromáticos ya que el piruvato no se recicla a PEP bajo condiciones glucolíticas. Sin embargo, la sobreexpresión del gen *pps* que codifica para la enzima PEP sintasa ocasionó que el flujo de carbono se dirigiera hacia la producción de DAHP (Patnaik y Liao, 1994). Este efecto positivo fue significativo cuando conjuntamente se sobreexpresó la DAHP sintasa desregulada de la inhibición alostérica y el gen *tktA*. Sugiriendo que la concentración de E4P es el primer sustrato limitante para la DAHP sintasa, seguido por PEP (Liao *et al.*, 1996).

3.2 Compuestos aromáticos con aplicaciones industriales.

3.2.1 Antranilato.



El ácido antranílico (ácido benzoico sustituido en la posición orto con un grupo amino) se usa como un intermediario para la producción de colorantes, pigmentos, solventes, mordentes, protectores solares, aromatizantes, aditivos y sacarina. Este compuesto y sus ésteres se emplean en la preparación de perfumes, productos farmacéuticos, y protectores-UV ya que tiene grupos amino y carboxilo unidos al anillo, también se emplean como inhibidores de la corrosión de metales e inhibidores de moho en la soya. El antranilato de metilo, uno de sus derivados, se usa ampliamente en la industria de fragancias, como saborizante artificial de uva en bebidas suaves, bebidas pulverizadas y como un potencializador y/o enmascarador en varios productos, como bebidas suaves orales, y de prescripción farmacéutica. Otro derivado, el antranilato de mentilo es un absorbente de radiaciones UV-A, y se usa en combinación con filtros de rayos UV-B, como el etilhexil metoxicinamato y el etilhexil silicato, para obtener protectores solares que abarcan una amplia banda del espectro UV.

3.2.1.1 Síntesis de antranilato en *E. coli*.

En *E. coli* uno de los intermediarios en la ruta de síntesis del aminoácido triptofano es el antranilato. La primera reacción de la ruta terminal de biosíntesis de triptofano envuelve la conversión de corismato y glutamina a antranilato, glutamato y piruvato. La enzima que lleva a cabo esta reacción es la antranilato sintasa, cuya actividad se inhibe por el producto final de la ruta: el triptofano (fig. 3).

La enzima antranilato sintasa es parte de una enzima multifuncional, el complejo enzimático intacto es un tetrámero formado por TrpE (componente I) y Trp D (componente II), tiene una composición $I_2 \cdot II_2$. El componente I tiene un peso molecular de alrededor de 57,325 y contiene el sitio de unión a corismato, sin embargo, en ausencia el componente II, no puede catalizar la formación de antranilato usando glutamina como fuente de nitrógeno. El componente II tiene un peso molecular de alrededor de 56,701 y contiene dos actividades específicas: una actividad glutamido transferasa, que se requiere para activar al componente I en la reacción de antranilato sintasa. Esta actividad canaliza el nitrógeno de la glutamina al el sitio activo para la producción de antranilato, solo el agregado exhibe esta actividad, la cual es estimulada por corismato. La hidrólisis de la glutamina requiere el anterior enlace del corismato al agregado. La segunda actividad del componente II convierte el antranilato en antranilato 5-fosforibosil pirofosfato. Esta es nombrada antranilato fosforibosil transferasa, Esta actividad es funcional aún en ausencia del componente I (Pittard, 1996).

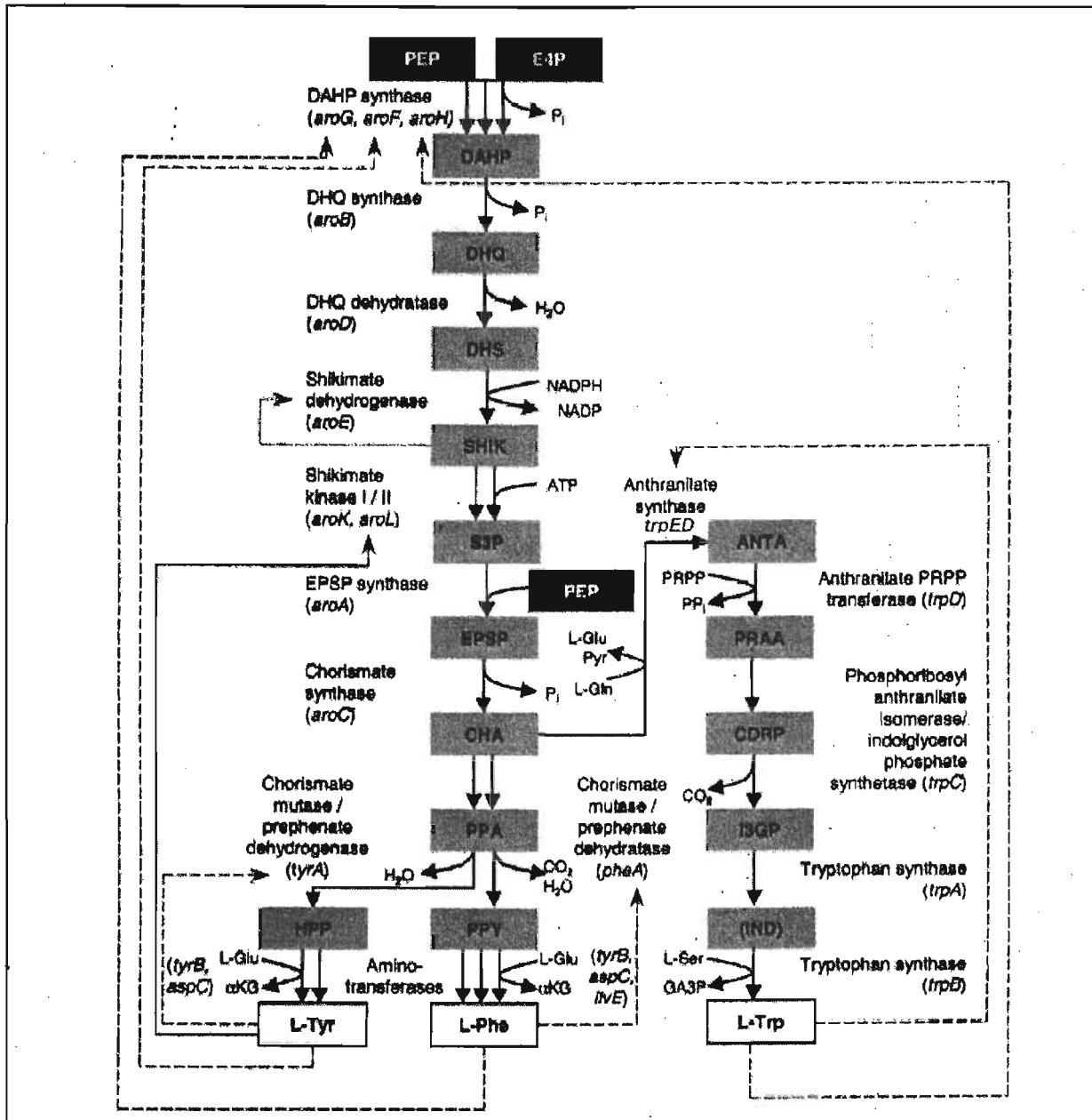


FIG. 3. Ruta de biosíntesis de amino ácidos aromáticos y su regulación en *E. coli*. Los diferentes tipos de líneas indican el tipo de regulación ejercida por el amino ácido (producto final): - - -, control transcripcional y alostérico; ···, solo control alostérico; —, solo control transcripcional.

Abreviaciones usadas: ANTA, antranilato; αKG, α-cetoglutarato; CDRP, 1-(o-carboxifenilamino)-1-deoxirribulosa 5-fosfato; CHA, corismato; DAHP, 3-deoxy-d-arobino-heptulosonato 7-fosfato; DHQ, 3-dehidroquinato; DHS, 3-dehidroshiquimato; EPSP, 5-enolpiruvilshiquimato 3-fosfato; E4P, eritrosa 4-fosfato; GA3P, gliceraldehido 3-fosfato; HPP, 4-hidroxifenilpiruvato; I3GP, Indol 3-glicerolfosfato; IND, Indol; L-Gln, L-glutamina; L-Glu, L-glutamato; L-Phe, L-fenilalanina; L-Ser, L-serina; L-Trp, L-triptofano; L-Tyr, L-tirosina; PEP, fosfoenolpiruvato; PPA, prefenato; PPY, fenilpiruvato; PRAA, fosforibosil antranilato; PRPP, 5-fosforibosil-a-pirufosfato; Pyr, piruvato; SHIK, shiquimato; S3P, shiquimato 3-fosfato.

En *Serratia marcescens* la enzima glutamido transferasa y PRA transferasa son codificadas por genes contiguos (*trpG* y *trpD*) (fig.4). En contraste, en *S. typhimurium* y *E.coli*. los genes *trpG* y *trpD* se encuentran fusionados. La secuencia del final de *trpG* y el principio de *trpD* de *Serratia marcescens* incluyendo la región intercistronica entre ellos se comparó con la región correspondiente al gen bifuncional *trpD* de *S. typhimurium* y *E.coli*, la región intercistronica es de 13 pb. Una remoción hipotética del codón de paro y el sitio de unión a ribosoma de *trpD* produce un gen igual al de *S. typhimurium* y *E.coli*, el cual pudo haberse formado por fusión de los genes separados *trpG* y *trpD* de alguna cepa ancestral (Nichols et al., 1980).

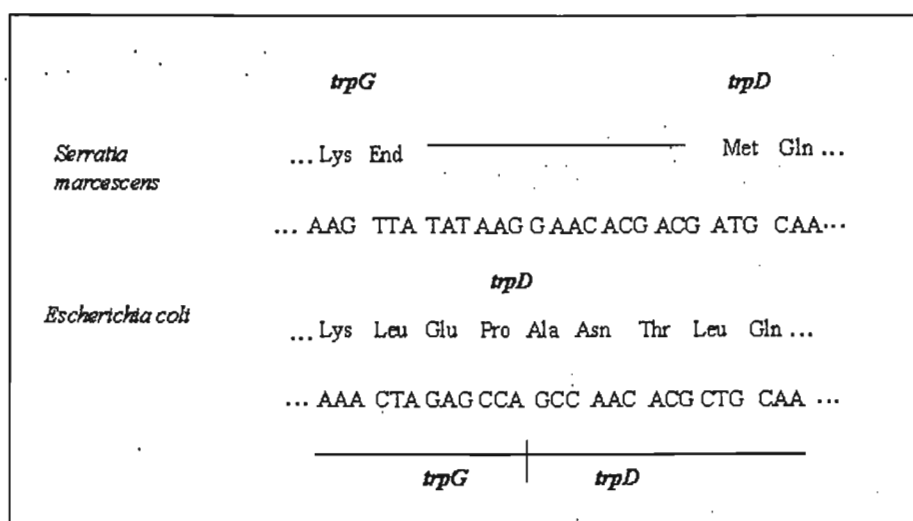
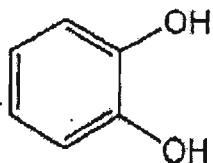


Figura 4. Distribución de los genes *trpG* y *trpD*.

3.2.2 Catecol.



El catecol es una molécula utilizada como materia prima para la síntesis de compuestos farmacéuticos, protectores solares, fragancias, saborizantes, e inhibidores de polimerización. Algunos de los productos derivados del catecol son la viloxazina (antidepresivo), epinefrina (broncodilatador), guayacol (antioxidante), vainillina (saborizante) y L-Dopa (tratamiento del mal de Parkinson) y el ácido adípico (utilizado para la manufactura de nylon). El catecol es un compuesto producido actualmente mediante la síntesis química a partir de fenol derivado del petróleo. La producción anual mundial se estima en 20,000 toneladas (Draths y Frost, 1995).

3.2.2.1 Diseño, construcción y caracterización de cepas de *E. coli* productoras de catecol.

El grupo de Frost reportó la creación de una cepa de *E. coli* capaz de sintetizar catecol a partir de D-glucosa. Este desarrollo requirió reunir actividades del anabolismo aromático y catabolismo hidroaromático (Draths y Frost, 1995).

Este grupo escogió como microorganismo huésped, la cepa *E. coli* AB2834 auxótrofa debido a una mutación en el locus genómico *aroE* que inactiva la enzima shiquimato dehidrogenasa. Ya que el 3-dehidrosiquimato (DHS) no se convierte en ac. shiquímico, está disponible para la síntesis de catecol en lugar de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (Fig. 1).

La síntesis de DHS por *E. coli* AB2834 se aumentó substancialmente por la transformación con el plásmido pKD136, que porta los genes *tkl*, *aroF* y *aroB* que codifican respectivamente las enzimas transcetolasa, DAHP sintasa, y 3-Dehidroquinato sintasa (DHQ sintasa).

La enzima DHS dehidratasa es una de las enzimas que capacita a los microorganismos a usar compuestos hidroaromáticos como el ácido quinónico y shiquímico como única fuente de carbono para crecer. El ácido protocatecuico (PCA) producido de la catálisis de DHS es un intermediario en la rama del p-hidroxibenzoato de la ruta del β -cetoadipato. El rol de PCA descarboxilasa en el metabolismo microbial no se ha detallado claramente.

En la cepa *E. coli* AB2834/ pKD136 se introdujeron los genes de *Klebsiella pneumoniae* que codifican para las enzimas 3-dehidrosiquimato dehidratasa (*aroZ*) y ácido protocatecuico descarboxilasa (*aroY*) contenidos en el plásmido pKD9.069. *E. coli* AB2834/pKD136/pKD9.069, sintetiza 18.5 ± 2.0 mM de catecol a partir de 56mM de D-glucosa.

3.2.2.2 Desarrollo de cepas productoras catecol a partir de antranilato.

Considerando lo anterior, nuestro grupo revisó la literatura con el propósito de identificar otro posible método para la producción de catecol en *E. coli*. Algunos reportes recientes revelan que existe otra ruta posible para la síntesis de este compuesto. Se ha descubierto una enzima que participa en la asimilación de compuestos fenólicos. Esta enzima, la antranilato dioxigenasa fue caracterizada en *Acinetobacter* sp. ADP1 y se sabe que está presente en algunas bacterias relacionadas con *E. coli*. Se utilizó la enzima antranilato dioxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 que transforma, en este microorganismo, el antranilato en catecol y que posteriormente es convertido por otras enzimas en intermediarios del ciclo de ácidos tricarbóxicos para su asimilación (Fig. 5). Esta enzima esta constituida por tres subunidades (la dioxigenasa α , la dioxigenasa β y una reductasa) que no se han caracterizado en este organismo y que se encuentran codificadas por los genes *antABC*. Estos genes se amplificaron mediante PCR y se obtuvo un producto de 3,027 pb en el que se generó un sitio *NcoI* en el inicio traduccional del gen *antA* y que se clonó en el plásmido pTOPO (Invitrogene). Posteriormente, estos genes se subclonaron en el plásmido de expresión pTrc99A para generar el plásmido pTrc-*ant3* que se transformó en la cepa de *E. coli* W3110. Para visualizar la producción de catecol se construyó el plásmido pACYC-*xylE* (Fig. 6) que contiene el gen *xylE* que codifica para una catecol 2,3-dioxigenasa que corta, en posición *meta*, el anillo aromático del catecol generando el compuesto ácido *cis, cis*-mucónico- γ -semialdehído que es de color amarillo (Fig. 7) (Treviño, datos no publicados) .

Figura 5. Reacción catalizada por la enzima antranilato dioxigenasa de *Acinetobacter* sp. ADP1

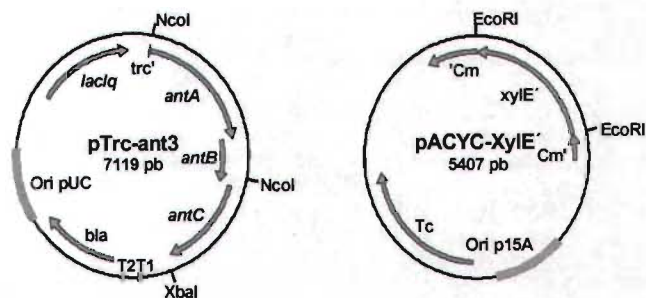
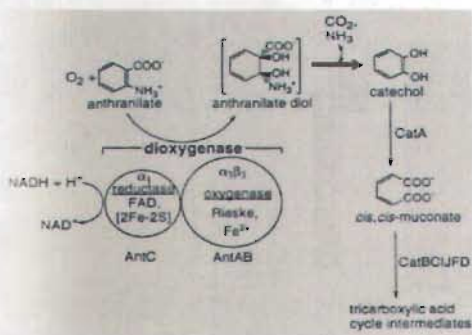


Figura 6. Plásmidos utilizados para la producción, visualización y cuantificación de catecol respectivamente en *E. coli* W3110.



Figura 7. Fenotipo de las colonias productoras de catecol y 4-hidroximucónico- γ -semialdehído

E. coli es uno de los organismos procarióticos más usados para manipulaciones genéticas y para la producción industrial de proteínas de interés comercial o terapéutico. Por su larga historia como sistema modelo, *E. coli* está bien caracterizada genéticamente y se han desarrollado muchas herramientas para la ingeniería cromosomal y para facilitar la clonación y expresión de genes (Baneyx y Mujacic, 2004). Igualmente se conoce su metabolismo y mediante la ingeniería de vías metabólicas se han desarrollado una gran cantidad de estrategias para dirigir el flujo de carbono, nitrógeno y energía hacia la síntesis de metabolitos de interés.

En el laboratorio del Dr. Guillermo Gosset estamos interesados en desarrollar cepas de *E. coli* productoras de antranilato y catecol dos compuestos con aplicación en la industria. Asimismo, existe la opción de futuras modificaciones genéticas en las cepas productoras de antranilato y catecol para expandir los compuestos sintetizados a partir de ellas.

4. JUSTIFICACIÓN

El antranilato y el catecol son dos compuestos de interés industrial, ya que a partir de ellos se pueden generar una gran cantidad de compuestos comerciales, entre ellos, saborizantes, pigmentos, aromatizantes, fármacos, protectores solares, etc. Estos compuestos se producen actualmente mediante la síntesis química a partir de fenol derivado del petróleo. Esta tecnología de producción no representa un proceso totalmente deseable, ya que, además de emplear condiciones de reacción extremas (250°C y 600 psi), se basa en materia prima no renovable a partir de la cual se generan también otros compuestos que contaminan al producto y al medio ambiente. Por lo anterior, resulta deseable contar con una mejor tecnología, basada en el uso de azúcares como materia prima, y por lo tanto respetuosa del medio ambiente, con la cual se pueda lograr la producción de estos importantes compuestos.

E. coli es uno de los organismos procarióticos más usados para manipulaciones genéticas y para la producción industrial de proteínas de interés comercial o terapéutico. Por su larga historia como sistema modelo, *E. coli* está bien caracterizada genéticamente y se han desarrollado muchas herramientas para la ingeniería cromosomal y para facilitar la clonación y expresión de genes (Baneyx y Mujacic, 2004). Igualmente se conoce su metabolismo y mediante la ingeniería de vías metabólicas se han desarrollado una gran cantidad de estrategias para dirigir el flujo de carbono, nitrógeno y energía hacia la síntesis de metabolitos de interés.

En el laboratorio del Dr. Guillermo Gosset estamos interesados en desarrollar cepas de *E. coli* productoras de antranilato y catecol dos compuestos con aplicación en la industria. Asimismo, existe la opción de futuras modificaciones genéticas en las cepas productoras de antranilato y catecol para expandir los compuestos sintetizados a partir de ellas.

4. JUSTIFICACIÓN

El antranilato y el catecol son dos compuestos de interés industrial, ya que a partir de ellos se pueden generar una gran cantidad de compuestos comerciales, entre ellos, saborizantes, pigmentos, aromatizantes, fármacos, protectores solares, etc. Estos compuestos se producen actualmente mediante la síntesis química a partir de fenol derivado del petróleo. Esta tecnología de producción no representa un proceso totalmente deseable, ya que, además de emplear condiciones de reacción extremas (250°C y 600 psi), se basa en materia prima no renovable a partir de la cual se generan también otros compuestos que contaminan al producto y al medio ambiente. Por lo anterior, resulta deseable contar con una mejor tecnología, basada en el uso de azúcares como materia prima, y por lo tanto respetuosa del medio ambiente, con la cual se pueda lograr la producción de estos importantes compuestos.

5. HIPÓTESIS

Si una cepa de *E. coli trpD*- expresa los genes que codifican para la enzima antranilato sintasa obtendrá la capacidad de sintetizar antranilato a partir de glucosa.

Si una cepa de *E. coli* productora de antranilato expresa los genes *antABC* obtendrá la capacidad de producir catecol a partir de glucosa (Fig. 8).

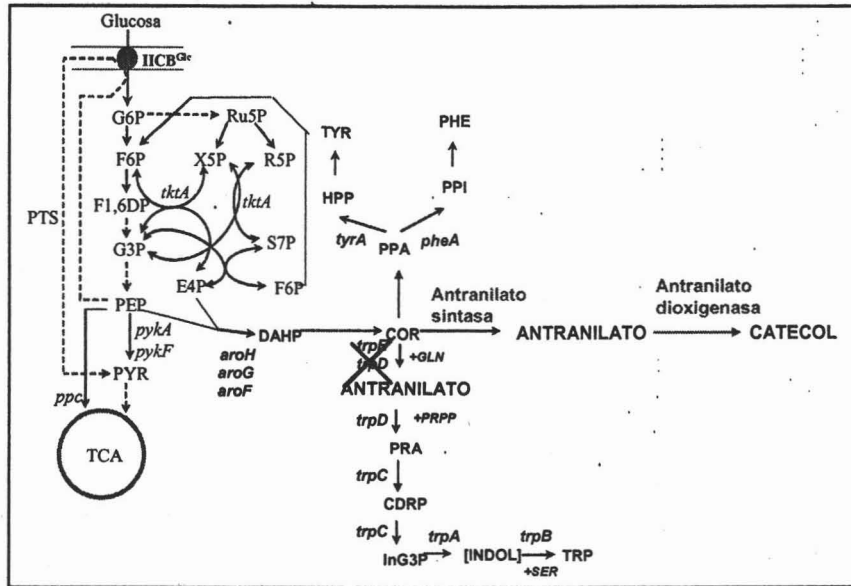


Fig. 8 Esquema de la hipótesis

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General.

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

6.2 Objetivos Particulares.

1. Establecer la toxicidad del antranilato y catecol para *E. coli*.
2. Determinar la secuencia nucleotídica de los genes *trpEGD* provenientes de la cepa productora de antranilato W3110trpD9923.
3. Evaluar el efecto de la expresión de los genes *aroG^{fb}* y *tktA* sobre la capacidad de producción de antranilato.
4. Evaluar el efecto de la introducción de los genes que codifican para la enzima antranilato sintasa sobre la capacidad de una cepa *trp* de *E. coli* para sintetizar antranilato a partir de glucosa.
5. Analizar el efecto del medio de cultivo sobre la capacidad de producir antranilato.
6. Determinar el efecto de introducir los genes *antABC* a la cepa *E. coli* productora de antranilato sobre la conversión de antranilato a catecol.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Cepas y plásmidos.

En las tablas 1. y 2 se muestran los plásmidos y cepas empleados.

Tabla 1. Plásmidos

| Plásmidos | Características | Origen |
|-----------------------------------|---|-----------------------------|
| pTrc99A | vehículo de clonación | Amann <i>et al.</i> , 1988 |
| pCR-Blunt II- TOPO | vehículo de clonación | |
| pCL1920 | Vehículo de clonación | Lerner y Inouye, 1990 |
| pJLBaro ^{G^{br}} | gen <i>aro^{G^{br}}</i> codifica para la DAHP sintasa insensible a inhibición alostérica bajo el control de los genes <i>lac^q</i> y <i>tet</i> , origen de replicación de pACYC184, resistencia a tetraciclina | Baéz <i>et al.</i> , 2004 |
| PCL <i>tklA</i> | gen <i>tklA</i> codifica para la transcetolasa (replicón pCL1920, resistencia a espectinomicina). | Draths et al. 1992 |
| pTrcant3 | genes <i>antABC</i> codifica para la enzima antranilato dioxigenasa. Resistencia a ampicilina | Treviño datos no publicados |
| pTrctrpEGD ₉₉₂₃ | genes <i>trpEGD</i> de la cepa 9923 codifican para la enzima antranilato sintasa. Resistencia a ampicilina. | Este estudio |
| pTOPO <i>trpEG</i> | genes <i>trpEG</i> de la cepa 9923 codifican para la enzima antranilato sintasa bajo el promotor <i>P_{trp}</i> . Resistencia a kanamicina | Este estudio |
| pCL <i>trpEG</i> | genes <i>trpEG</i> de la cepa 9923 codifican para la enzima antranilato sintasa bajo el promotor <i>P_{trp}</i> . Resistencia a spectinomicina | Este estudio |

El vector pTrc99A (Pharmacia Biotech), es un vector basado en pKK23-2, porta un promotor fuerte (*trc*) híbrido *trp/lac*, el sitio de unión a ribosoma (RBS) *lacZ*, el sitio de clonación múltiple PUC18 y los terminadores transcripcionales *rrnB*. (Amann et al., 1988)

El Zero-Blunt-TOPO, está compuesto por un promotor/operador *LacZ*, un sitio de clonación TOPO, un ORF *LacZ*-alpha, un gen letal *ccdB*, un gen de resistencia a kanamicina, un gen de resistencia a zeocina y un origen de replicación pUC.

El vector pCL1920 es un plásmido de bajo número de copias el cual contiene un fragmento de 580 bp *Bst*UI que contiene el promotor/operador *lac*, un sitio de clonación múltiple y un fragmento de *lacZ* de PUC19. Este vector tiene clonado un plásmido derivado pSC101 el cual confiere resistencia a spectinomicina/strepomicina en *E. col.* (Lerner y Inouye 1990).

Las cepas W3110*trpD9778* y W3110*trpD9923* las obtuvo Charles Yanofsky para la realización de un estudio de polaridad y funciones enzimáticas en mutantes de los genes del operón de triptofano (Yanofsky y Ito 1966; Yanofsky *et al.*, 1971).

Tabla 2. Cepas

| Cepas | Características | Designada | Origen |
|--|--|---|----------------|
| W3110trpD9778 | <i>trpD</i> , auxótrofa a triptofano, mutagenizada al azar por luz UV, probablemente generando un codón de término. | 9778 | Yanofsky, 1966 |
| W3110trpD9923 | <i>trpD</i> , auxótrofa a triptofano, mutagenizada al azar por luz UV, probablemente generando un cambio de amino ácido. | 9923 | Yanofsky, 1971 |
| JM101 | Cepa de <i>E. coli</i> silvestre PTS+ | JM101 | Flores, 1996 |
| PB12 | PTS ⁻ Glic ⁺ derivada de JM101 | PB12 | Flores, 1996 |
| W3110trpD9923/pJLBaroG ^{br} | Expresa el gen <i>aroG</i> ^{br} codifica para la DAHP sintasa insensible a inhibición alostérica. | 9778/ <i>aroG</i> ^{br} | Este trabajo |
| W3110trpD9923/pJLBaroG ^{br} /pCL <i>tkA</i> | Expresa el gen <i>aroG</i> ^{br} que codifica para la DAHP sintasa insensible a inhibición alostérica y el gene <i>tkA</i> que codifica para la transcetolasa | 9923/ <i>aroG</i> ^{br} / <i>tkA</i> | Este trabajo |
| W3110trpD9923/pTrc <i>ant3</i> | Expresa los genes <i>ant3</i> que codifican para la enzima antranilato dioxigenasa | 9923/ <i>ant3</i> | Este trabajo |
| W3110trpD9923/pJLBaroG ^{br} /pCL <i>tkA</i> /pTrc <i>ant3</i> | Expresa el gen <i>aroG</i> ^{br} que codifica para la DAHP sintasa insensible a inhibición alostérica, el gene <i>tkA</i> que codifica para la transcetolasa, y los genes <i>ant3</i> que codifican para la enzima antranilato dioxigenasa | 9923/ <i>aroG</i> ^{br} / <i>tkA</i> / <i>ant3</i> | Este trabajo |
| W3110trpD9923/pTrc <i>trpEGD</i> ₉₉₂₃ | Expresa los genes <i>trpEGD</i> de la cepa 9923 que codifican para la enzima antranilato sintasa | 9923/pTrc <i>trpEGD</i> | Este trabajo |
| W3110trpD9923/pTrc <i>trpEGD</i> ₉₉₂₃ /pJLBaroG ^{br} | Expresa los genes <i>trpEGD</i> de la cepa 9923 que codifican para la enzima antranilato sintasa y el gen <i>aroG</i> ^{br} que codifica para la DAHP sintasa insensible a inhibición alostérica | 9923/pTrc <i>trpEGD</i> / <i>aroG</i> ^{br} | Este trabajo |
| JM101Δ <i>trpEDC</i> ::Km | JM101, auxótrofa a triptofano por la delección de la región <i>trpEDC</i> del operón de triptofano. | JM101 <i>trp</i> - | Este trabajo |
| PB12Δ <i>trpEDC</i> ::Cat | PB12 auxótrofa a triptofano por la delección de la región <i>trpEDC</i> del operón de triptofano. | PB12 <i>trp</i> - | Este trabajo |
| JM101Δ <i>trpEDC</i> ::Km/pTrc <i>trpEGD</i> ₉₉₂₃ | Expresa los genes <i>trpEGD</i> de la cepa 9923 que codifican para la enzima antranilato sintasa | JM101 <i>trp</i> -/pTrc <i>trpEGD</i> | Este trabajo |
| PB12Δ <i>trpEDC</i> ::Cat/pTrc <i>trpEGD</i> ₉₉₂₃ | Expresa los genes <i>trpEGD</i> de la cepa 9923 que codifican para la enzima antranilato sintasa | PB12 <i>trp</i> -/pTrc <i>trpEGD</i> | Este trabajo |
| JM101Δ <i>trpEDC</i> ::Km/pTrc <i>trpEGD</i> ₉₉₂₃ /pJLBaroG ^{br} | Expresa los genes <i>trpEGD</i> de la cepa 9923 que codifican para la enzima antranilato sintasa y el gen <i>aroG</i> ^{br} que codifica para la DAHP sintasa insensible a inhibición alostérica | JM101 <i>trp</i> -/pTrc <i>trpEGD</i> / <i>aroG</i> ^{br} | Este trabajo |
| PB12Δ <i>trpEDC</i> ::Cat/pTrc <i>trpEGD</i> ₉₉₂₃ /pJLBaroG ^{br} | Expresa los genes <i>trpEGD</i> de la cepa 9923 que codifican para la enzima antranilato sintasa y el gen <i>aroG</i> ^{br} que codifica para la DAHP sintasa insensible a inhibición alostérica | PB12 <i>trp</i> -/pTrc <i>trpEGD</i> / <i>aroG</i> ^{br} | Este trabajo |
| JM101Δ <i>trpEDC</i> /pTOPO <i>trpEG</i> ₉₉₂₃ | Expresa los genes <i>trpEG</i> de la cepa 9923 que codifican para la enzima antranilato sintasa bajo el promotor de triptofano. | JM101 <i>trp</i> -/pTOPO <i>trpEG</i> | Este trabajo |
| JM101Δ <i>trpEDC</i> /pTOPO <i>trpEGD</i> ₉₉₂₃ /pJLBaroG ^{br} | Expresa los genes <i>trpEG</i> de la cepa 9923 que codifican para la enzima antranilato sintasa bajo el promotor de triptofano y el gen <i>aroG</i> ^{br} que codifica para la DAHP sintasa insensible a inhibición alostérica | JM101 <i>trp</i> -/pTOPO <i>trpEG</i> / <i>aroG</i> ^{br} | Este trabajo |
| JM101Δ <i>trpEDC</i> /pCL <i>trpEG</i> ₉₉₂₃ | Expresa los genes <i>trpEG</i> de la cepa 9923 que codifican para la enzima antranilato sintasa bajo el promotor de triptofano en un plásmido de bajo número de copias. | JM101 <i>trp</i> -/pCL <i>trpEG</i> | Este trabajo |
| JM101Δ <i>trpEDC</i> /pCL <i>trpEGD</i> ₉₉₂₃ /pJLBaroG ^{br} | Expresa los genes <i>trpEG</i> de la cepa 9923 que codifican para la enzima antranilato sintasa bajo el promotor de triptofano en un plásmido de bajo número de copias y el gen <i>aroG</i> ^{br} que codifica para la DAHP sintasa insensible a inhibición alostérica | JM101 <i>trp</i> -/pCL <i>trpEG</i> / <i>aroG</i> ^{br} | Este trabajo |
| PB12Δ <i>trpEDC</i> /pCL <i>trpEG</i> ₉₉₂₃ | Expresa los genes <i>trpEG</i> de la cepa 9923 que codifican para la enzima antranilato sintasa bajo el promotor de triptofano en un plásmido de bajo número de copias. | PB12 <i>trp</i> -/pCL <i>trpEG</i> | Este trabajo |
| PB12Δ <i>trpEDC</i> /pCL <i>trpEGD</i> ₉₉₂₃ /pJLBaroG ^{br} | Expresa los genes <i>trpEG</i> de la cepa 9923 que codifican para la enzima antranilato sintasa bajo el promotor de triptofano en un plásmido de bajo número de copias y el gen <i>aroG</i> ^{br} que codifica para la DAHP sintasa insensible a inhibición alostérica | PB12 <i>trp</i> -/pCL <i>trpEG</i> / <i>aroG</i> ^{br} | Este trabajo |

7.2 Análisis bioquímico.

El análisis bioquímico de los metabolitos producidos por las cepas que se estudiaron en este proyecto se efectuó principalmente mediante cromatografía líquida de alta resolución por sus siglas en inglés HPLC. El equipo HPLC Agilent modelo 1100 cuenta con detector de UV de longitud de onda múltiple. Para la determinación de antranilato y catecol se utilizó una columna Supelco Discovery C18, se eluyó con una fase móvil de metanol al 40% en HAc al 0.1 %, a un flujo de 0.5 ml/min. La detección se hizo a 282 nm para catecol y 330 nm para antranilato.

La glucosa se determinó con un analizador bioquímico YSI modelo 2700. El YSI es un electrodo enzimático que emplea una o más reacciones catalizadas por enzimas para producir peróxido de hidrógeno, el cual es electroquímicamente oxidado en el ánodo de platino de la sonda electroquímica.

7.3 Medios de cultivo.

A continuación se describen los medios de cultivo empleados:

-Medio líquido y sólido (con agar 1.5%) Luria Bertani (LB: 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura (YE), y 5 g/l de NaCl (Sambrook, et al., 1989).

-Medio mineral M9 líquido y sólido (Atlas, 1993), compuesto de Na_2HPO_4 6 g/l, NaCl 0.5 g/l, KH_2PO_4 3 g/l, NH_4Cl 1 g/l, NaCl 0.5 g/l, MgSO_4 246.5 mg/l, CaCl_2 14.7 mg/l y 10 $\mu\text{g/ml}$ de vitamina B1.

-Medio bajo en sales YENB para la preparación de células electrocompetentes que contiene 7.5 g/l de extracto de levadura y 8 g/l de caldo nutritivo.

- El medio SOC se empleó para recuperar las células después de electroporarlas. Éste medio contiene 20 g/l de bactotripton, 5 g/l de extracto de levadura, 2.5 g/l de MgSO_4 , 2 g/l MgCl_2 , 0.58 g/l NaCl, 93.18 mg/l KCl. En casos específicos, se empleó el medio SOB que contiene 20 g/l de bactotripton, 5 g/l de extracto de levadura, 0.58 g/l NaCl, 186 mg/l KCl a un pH de 7.

NOTA: El YE, el agar y la tripton empleados fueron de la marca DIFCO. El NaCl, el NH_4Cl , el CaCl_2 , el KCl, y la glucosa fueron de la marca J.T. Baker. MgSO_4 , El triptofano, el antranilato y el catecol fueron de la marca SIGMA.

7.4 Transformación de DNA.

El DNA se introdujo en *E. coli* por el método de electroporación utilizando un electroporador modelo 2510 de la marca Eppendorf a 2500 volts.

Después de la electroporación las células se recuperaron en medio SOC a 37°C por una hora y en el caso de vectores termosensibles a 30°C por 3 horas.

7.5 Purificación de DNA.

Para el análisis de clonas recombinantes, el DNA de plásmido se preparó por medio del método de lisis alcalina, el principio de éste método es la desnaturalización alcalina selectiva del DNA cromosómal de alto peso molecular, mientras que el DNA circular permanece en doble-cadena (Birnboim y Doly, 1979). Los plásmidos para clonación se purificaron por Miniprep System kit de Gibco-BRL como lo describen los fabricantes. El DNA cromosomal se extrajo de cultivos de toda la noche usando un kit de MO BIO para extracción de DNA cromosomal de microorganismos. Un "kit" para purificación de productos de PCR marca ROCHE se empleó para la purificación de los productos de PCR.

7.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las reacciones de PCR se realizaron con la enzima *Elongasa* (Gibco-BRL. Life Technologies, Rockville, MD, USA) y la enzima *Pfu* DNA polimerasa recombinante (Fermentas). Las mezclas de reacción se prepararon en un volumen final de 50 μ l, conteniendo 100 ng de DNA templado, 25 o 50 pmol de cada oligo, 0.20 mM de la mezcla de dNTPs, 2mM de $[Mg^{2+}]$ y 1-2 unidades de DNA polimerasa. Para el proceso de amplificación las mezclas se incubaron en un Robo Cycler Gradient 96 de STRATAGENE en 3 etapas:

1. Un ciclo de pre-desnaturalización a 94°C por 1 minuto.
2. 30 ciclos de amplificación, cada uno con un paso de desnaturalización (94°C por 30 segundos), alineamiento (54-56°C por 30 segundos para *Elongasa* y 61°C para *Pfu*) y polimerización (68°C por 3.5 minutos para *Elongasa* y 72°C por 2 min para *Pfu*).
3. Un ciclo de extensión final de 10 minutos a la temperatura óptima de la polimerasa empleada.

7.7 Determinación de la toxicidad del antranilato y catecol.

La cepa silvestre W3110 se transformó con el plásmido pTrc99A que tiene una resistencia a ampicilina. La cepa se creció en cajas de medio LB con ampicilina a una concentración de 200 µg/ml (Ap²⁰⁰) por 12 horas y después se resuspendió en un pequeño volumen de M9 con el cual se inocularon los matraces para iniciar a una OD de 0.1 a 600nm.

Se utilizaron cultivos en matraces bafleados de 250 ml con 50 ml de medio de cultivo mínimo M9 suplementado con 2 g/l de glucosa y Ap²⁰⁰ a diferentes concentraciones de los compuestos tóxicos. Los matraces se incubaron a 37°C por 24 horas y se determinó la densidad óptica a 600nm

Tabla 3. Concentraciones de los compuestos tóxicos utilizadas.

| CATECOL (g/l) | ANTRANILATO (g/l) |
|---------------|-------------------|
| 0 | 0 |
| 0.5 | 0.5 |
| 1.0 | 1.0 |
| 2.5 | 2.5 |
| | 5.0 |

7.8 Cinéticas de crecimiento y manejo de muestras.

Todas las cepas se almacenaron en soluciones de glicerol al 40% (800µl de medio de cultivo en 800µl de glicerol al 80%) a una temperatura de -70°C. Para la realización de los cultivos, se tomó una asada de los gliceroles de las cepas a analizar y se sembraron en cajas de LB con el antibiótico correspondiente, se incubaron a 37°C por 12 horas para su recuperación, las cepas crecidas se resembraron en cajas de medio mínimo M9 suplementado con glucosa 2 g/l y triptofano 10 µg/ml, y se incubaron a 37°C por 12 h más. De éstas colonias adaptadas al medio mínimo, se tomó una porción, y se resuspendió en un mililitro de medio M9, después de determinar su densidad óptica (absorbancia a 600nm), se calculó el volumen necesario para inocular un matraz con 50 ml de medio M9 a una densidad óptica de 0.1. Los matraces inoculados se incubaron a 37°C (ó 30°C en casos específicos) por aproximadamente 24 horas, durante ese tiempo, se monitoreó su crecimiento midiendo la absorbancia a 600nm en un espectofotómetro (Beckman DU-70), dicha absorbancia fue convertida a peso seco mediante la relación $1DO_{600nm} = 0.45 g_{DCW/l}$ (DCW= peso seco de células; Baez *et al.*, 2004), una vez determinada la DO, se tomaron muestras de 1 ml cada 2 h, las muestras se centrifugaron a 12000rpm por 5 min, y el sobrenadante se almacenó a -20°C para su posterior análisis.

7.9 Determinación de la secuencia nucleotídica de los genes *trpEGD* provenientes de la cepa productora de antranilato W3110trpD9923.

La secuenciación se realizó en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Preparación de las muestras:

-Se realizó un PCR de la región comprendida por los genes *trpEGD* (3160 pb) utilizando los oligos TrpENcoI, TrpDBamHI, el producto de PCR se purificó por medio de un kit marca Roche.

Para lograr secuenciar toda la región de los genes *trpEGD* se diseñaron varios oligos.

Tabla 4. Oligos diseñados para la secuenciación de los genes *trpEGD*.

| Oligo | Secuencia |
|-----------|---|
| TrpENcoI | 5' TAGAGAATAACCATGGAAACACAAAAACCG 3' |
| TrpDBamHI | 5' CGCGGATCCCGGTTTGCATCATTTACCCTCG 3' |
| TrpEG5 | 5' CGATTACCAGCAGGCCTCCGGTTGCAGCGTGGTGGCTGGCTCTAG 3' |
| TrpG3 | 5' ATTCCAGTCCATCCGGAATCC 3' |
| TrpG5 | 5' ATCTCGTTCGGGTGCTCACC 3' |
| TrpG5-2 | 5' CAGGAGAAAGCATCAGCACC 3' |
| TrpE2 | 5' GAGTTCGGTGGCGTAGTGCG 3' |

7.10 Estrategia de clonación de los genes *trp EGD*₉₉₂₃.

Para la amplificación de los genes *trpEGD*₉₉₂₃, que codifican para la enzima antranilato sintasa, se diseñaron los oligos adecuados a los cuales se les introdujo un sitio de corte *Nco*I y *Bam*HI respectivamente (fig. 9), se realizó la amplificación mediante PCR usando la enzima *Elongasa* a partir de DNA cromosomal de la cepa *E. coli* W31109923, obteniéndose un producto de 3,160 pb.

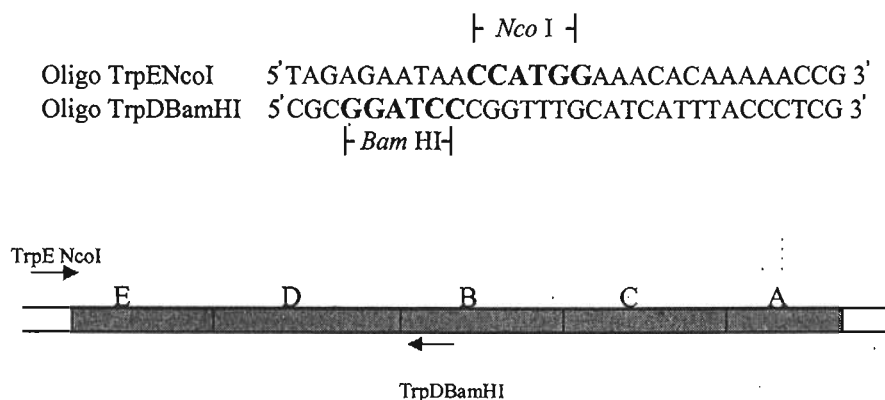


Fig 9. Oligos a los cuales se les introdujo un sitio de corte *Nco*I y *Bam*HI.

El producto de PCR y el plásmido pTrc99A se digirieron con las enzimas *Bam*HI y *Nco*I por doce horas a 37 °C (fig. 10). El vector y el inserto digeridos se ligaron utilizando la enzima T4 DNA ligasa (Biolabs), para generar el plásmido pTrcE. coli XLI-Blue. De las colonias obtenidas se eligieron 20 candidatas a las que se les extrajo plásmido por el método de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979) y se digirió con las enzimas *Bam*HI y *Nco*I para comprobar que se tenía el inserto deseado. De las clonas obtenidas con el inserto se eligieron 3 y se transformo con estos plásmidos a la cepa W31109923.

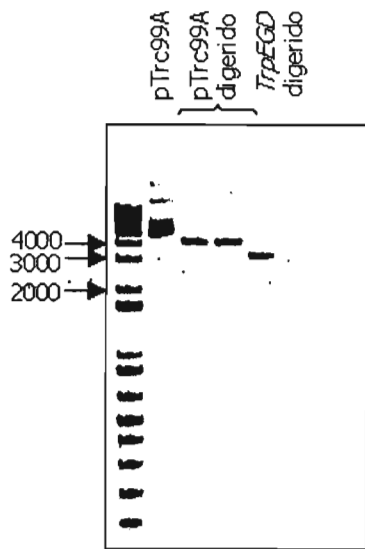


Fig.10 Gel de agarosa en el que se observan el producto de PCR y el plásmido pTrc99A después de la digestión con ambas enzimas BamHI y NcoI.

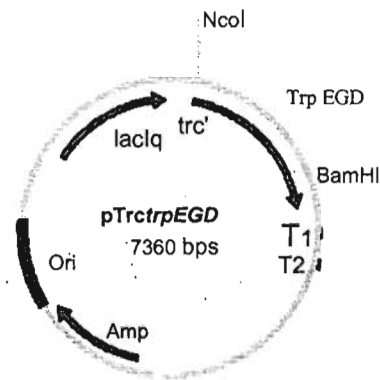


Fig.11 Mapa del plásmido pTrctrpEGD

7.11 Inactivación de la ruta de síntesis de triptofano

Se sustituyó la región comprendida desde *trpE* hasta *trpC* del operón de triptofano con un cassette de resistencia a Kanamicina (Km) en la cepa JM101 y Cm para PB12 mediante el método de Wanner (Datsenko y Wanner, 2000) para inactivar genes cromosomales usando productos de PCR, en el cual los oligos proveen la homología al gen blanco, En este procedimiento se usó el sistema de la Red recombinasa del fago λ (el sistema incluye 3 genes: γ , β , y *exo*, cuyos productos son llamados Gam, Bet y Exo respectivamente, Gam inhibe la exonucleasa V, mientras que Bet y Exo pueden ganar acceso a los extremos de DNA para promover la recombinación) el cual se sintetiza bajo el control de un promotor inducible por arabinosa en un plásmido de bajo número de copias fácilmente curable (Fig. 12). Se utilizaron oligos con 60 nucleótidos de extensión que son homólogos a regiones adyacentes a los genes *trpE-trpC* que se deseaban inactivar y templados para el plásmido que porta el gen de resistencia a antibiótico flanqueado por sitios FRT (Tabla 5).

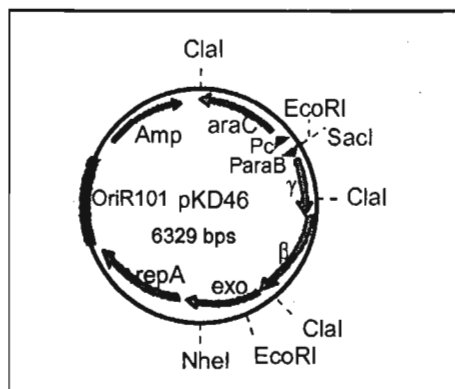


Fig.12 Plásmido pKD46 que expresa el sistema de la Red recombinasa del fago λ .

Tabla 5. Oligos diseñados para la inactivación de la región *trpE-trpC*.

| Oligo | Secuencia |
|---------------|---|
| 60merotrpe | GACATCATAACGGTTCGGCAAATATTCTGAAATGAGCTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC |
| 60merotrpc | GCGGGCTTCTACCCAAATCGCCTTGTCTGCGACGATTTTCATTCGGGGATCCGTCGACC |
| 60merotrpecat | GCGGGCTTCTACCCAAATCGCCTTGTCTGCGACGATTTTCATATGAATATCCTCCTTAG |

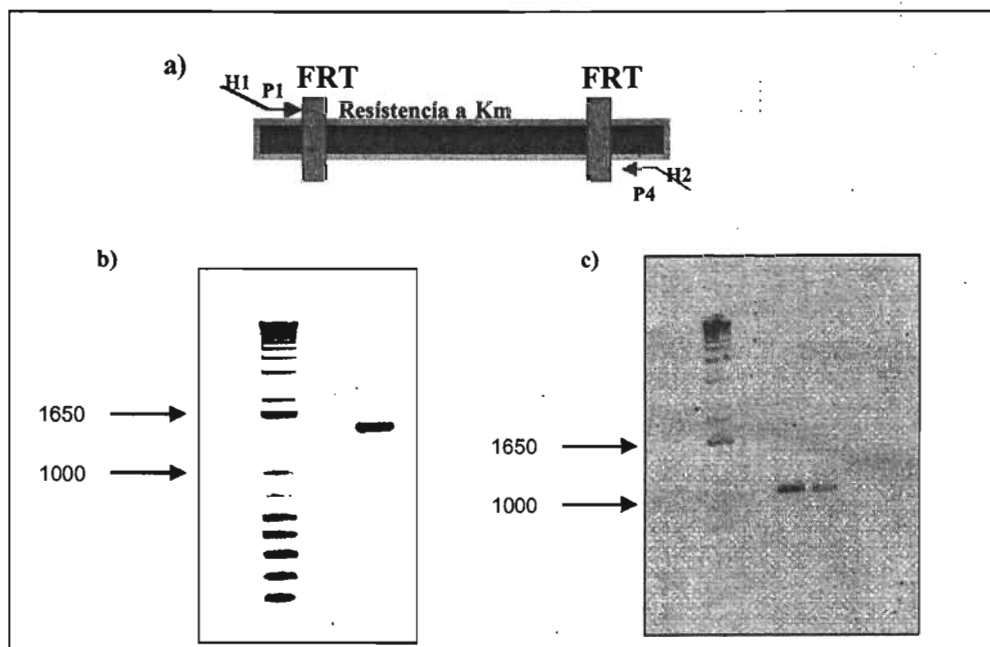


Fig.13 Amplificación del gen de resistencia. a) PCR para amplificar el casete de resistencia. b) producto de PCR correspondiente al gen resistencia a Km purificado de gel, digerido con *Dpn I* y repurificado. c) Producto de PCR correspondiente al gen de resistencia a Cm tratado igual que el producto correspondiente al gen de resistencia a Km.

La cepa con el plásmido pKD46 (expresa la Red recombinasa), se creció en medio LB Ap²⁰⁰ toda la noche a 30°C, se inocularon de 10 a 20 colonias en 25 ml de medio SOB más 50 µl de Ap¹⁰⁰ y 2.5 ml de L-arabinosa 1M, se incubaron a 30°C con agitación hasta una densidad óptica de 0.6, y se centrifugaron por 10 min a 8000 rpm a 4°C, la pastilla se lavó con un mililitro de agua estéril fría 3 veces y se resuspendió en un volumen final de 100 µl de H₂O. De estas células se tomaron 50 µl y se electroporaron con el producto de PCR (los productos de PCR se purificaron de gel, se digirieron con *DpnI*, y se repurificaron y suspendieron en H₂O). Las células se resuspendieron en 1 ml de medio SOC y se incubaron 1h a 37°C, después se platearon en cajas de LB Km²⁵ o Cm²⁵. Las colonias que crecieron, se picaron en nuevas cajas de LB Km²⁵ o Cm²⁵ y se crecieron a 42°C para promover la pérdida del plásmido pKD46. Después se seleccionaron por sensibilidad a ampicilina para comprobar la pérdida del plásmido helper (Fig.13). Además se picaron en cajas de medio M9 y M9 con triptofano para comprobar la auxotrofia causada por la depleción de parte del operón de triptofano.

Las cepas obtenidas **JM101ΔtrpEDC::Km** y **PB12ΔtrpEDC::Cat** se transformaron con el plásmido pTrc

7.11.1 Eliminación del gen de resistencia a antibiótico de las cepas JM101trp::Km y PB12trp::Cm.

Se utilizó el plásmido pCP20 (plásmido helper FLP) el cuál confiere resistencia a Ap y Cm, este plásmido muestra sensibilidad de replicación a la temperatura e inducción térmica para la síntesis de FLP. Las cepas resistentes a Km y Cm se transformaron con el plásmido pCP20 y las transformantes se seleccionaron en Ap a 30°C. De las colonias obtenidas se tomaron 25 colonias las cuales se picaron en placas de LB Ap²⁰⁰ y se crecieron a 30°C por toda una noche. Posteriormente se sembraron en tubos con medio LB líquido y se incubaron a 42°C por un día para inducir la pérdida del plásmido. Por último, se probó la pérdida del plásmido por crecerlas en placas de medio LB y LB con Ap, para comprobar la pérdida del gen de resistencia en LB con Km o Cm, y en placas de M9 con y sin triptofano para comprobar el fenotipo deseado. (Datsenko y Wanner, 2000).

7.12 Experimentos con células en reposo.

Las células se recuperaron del glicerol en cajas de LB por 12 horas a 37°C, posteriormente se inocularon 50 ml de medio M9 suplementado con extracto de levadura 5 g/l (un medio rico, pero no tan complejo como LB) este preinoculo se dejó crecer a 30°C y 300 rpm. Las células se cosecharon cuando se encontraban a la mitad de la fase exponencial, se centrifugaron y se lavaron 2 veces con M9 y se usaron como inóculo en los experimentos de células en reposo. La totalidad de las células fue utilizada para inocular 50 mililitros de M9 suplementado con glucosa 10 g/l, y los antibióticos necesarios para mantener los plásmidos, no fue necesario la utilización de cloranfenicol (el cual inhibe la síntesis de proteínas y por lo tanto impide el crecimiento) ya que las cepas de estudio no crecen en medio mínimo M9. Se tomó muestra cada hora durante 10 horas, se determino la densidad óptica y se centrifugo cada muestra conservando el sobrenadante a -20°C para su posterior análisis.

7.13 Determinación de la formación y presencia de cuerpos de inclusión por la sobreexpresión de los genes *trpEGD*₉₉₂₃.

Se realizaron cultivos con las cepas 9923/99A y JM101trp⁻ como control y 9923/pTrctrpEGD y JM101trp⁻/pTrctrpEGD como cepas a analizar, después de crecerlas en cajas de LB Ap²⁰⁰ por 12 horas, se tomo una azada y se resuspendió en 1ml de medio LB el cual se utilizó para inocular 50 ml de LB Ap²⁰⁰ a una densidad inicial de 0.1, el matraz se incubo a 37°C y 300 rpm. Se tomó una muestra a la mitad de la fase exponencial e inmediatamente se adicionó IPTG a una concentración de 1 mM, posteriormente se tomó otra muestra en la fase estacionaria, las muestras se centrifugaron y se desecho el sobrenadante, las células se conservaron congeladas a -20°C.

7.13.1 Tratamiento de las muestras

Muestra 1. Las pastillas celulares se resuspendieron en 25 µl de agua y 25 µl de buffer desnaturalizante (el cual contiene β-mercaptoetanol). Posteriormente se sonicaron con una punta delgada a 14 micrones con dos pulsos de 5 segundos cada uno. En está muestra se tendrían todas las proteínas solubles y no solubles.

Muestra 2. Las células se resuspendieron en un mililitro de buffer Tris pH 6.8 diluido 1:10, y se sonicaron con una punta delgada a 14 micrones con dos pulsos de 5 segundos cada uno. Posteriormente se centrifugaron un minuto a 12000 rpm con el propósito de separar los cuerpos de inclusión, en caso de haberlos. Los sobrenadantes que contienen las proteínas solubles se concentraron en un concentrador 5301de marca eppendorf por 5 horas el cual se resuspendieron en 25 µl de agua y 25 µl de buffer desnaturalizante; los precipitados también se resuspendieron en 25 µl de agua y 25 µl de buffer.

7.13.2 Preparación del gel de poliacrilamida para la electroforésis de proteínas

De acuerdo con el tamaño de las proteínas que esperábamos observar y según los estándares establecidos (Biorad), se decidió preparar un gel desnaturante acrilamida-bisacrilamida al 15% con un buffer de corrida Tris/glicina/SDS.

7.14 Clonación de los genes *trpEGD*₉₉₂₃ bajo su propio promotor (*P_{trp}*) en el plásmido TOPO.

Para la amplificación de los genes *trpEGD*₉₉₂₃, desde 88 pb antes del promotor hasta aproximadamente 55 pb después de la mutación en *trpD*, que codifican para la enzima antranilato sintasa, se diseñaron los oligos adecuados a los cuales se les introdujo un sitio de corte *Ava*I y *Bam*HI respectivamente (Tabla 6). La amplificación de los genes se realizó mediante PCR a partir del DNA cromosomal de la cepa *E. coli* W3110Pfu DNA polimerasa (Fermentas) obteniéndose un producto de 2531 bp (Fig. 14).

Tabla 6. Oligos diseñados para la amplificación de los genes *trpEGD*₉₉₂₃.

| Oligo | 5' | Secuencia | 3' |
|-----------|----|-----------------------------|----|
| TrpEAval | | CTC GAG TTC GTG TCG CTA AAG | |
| TrpGBamHI | | GGA TCC GAA AAC AGC TGG TGG | |

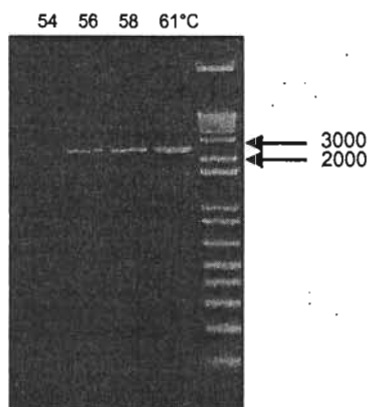


Fig.14 PCR para amplificar los genes *trpEGD*.

La reacción de clonación en el vector Zero Blunt-TOPO se realizó según el manual de los fabricantes (Invitrogen).

Tabla 7. Reacción de clonación en el vector TOPO.

| Reactivo | Cantidad |
|-------------------------------|-------------|
| Producto de PCR fresco | 2 μ l |
| Solución salina diluida (1:4) | 0.5 μ l |
| Agua estéril | 0 μ l |
| Zero Blunt-TOPO | 0.5 μ l |
| Volumen final | 3 μ l |

Se homogeneizó la reacción y se incubó media hora a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo de reacción, se pasó a hielo y se procedió a transformar 50 μ l de células electrocompetentes de la cepa XLI-Blue con 2 μ l de la reacción. Después de la electroporación las células se recuperaron por una hora a 37°C y se platearon en cajas de LB Km⁵⁰. De las colonias obtenidas se eligieron 10 colonias, las cuales se crecieron en LB Km⁵⁰ toda una noche, de estas colonias se extrajo el plásmido por lisis alcalina y se digirió con la enzima *EcoRI* por 4 horas a 37°C. Se obtuvieron 2 colonias con el inserto del tamaño esperado, se transformó con éstos plásmidos cepas electrocompetentes de la cepa JM101trp- para obtener la cepa JM101trp-/pTOPotrpeGD. Con estas cepas se relajaron cultivos en medio M9 suplementado con triptofano 20 μ g/ml, glucosa 10 g/l y Km⁵⁰, se tomaron varias muestras para determinar la presencia de antranilato y se monitoreo su crecimiento.

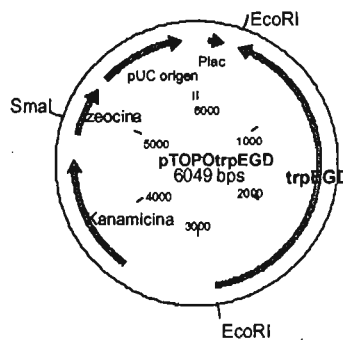


Fig 15. Mapa del plásmido pTOPotrpeGD.

7.16.2. Ensayo enzimático: La mezcla de reacción contenía 1 μmol de corismato, 4 μmoles de MgSO_4 , 10 μmoles de L-glutamina, 50 μmoles de buffer Tris-cloruro a pH 7.5 y 10 o 2.5 μl del extracto, la mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 2 ml con agua destilada. La reacción fue iniciada por adición del extracto libre de células a la mezcla de reacción precalentada a 37 °C. La actividad se observó siguiendo el incremento en la fluorescencia a 390 nm (excitación a 314). Se realizó una curva a distintas concentraciones de antranilato para poder relacionar unidades de fluorescencia con concentración de antranilato. (Ito y Crawford, 1965). La determinación de proteína se realizó por el método de Bradford.

Se realizaron ensayos enzimáticos con extractos de la cepa 9923, adicionando distintas concentraciones de triptofano (5, 25, 50 y 250 mg/ml) para comprobar la inhibición alostérica de la enzima antranilato sintasa de la cepa 9923.

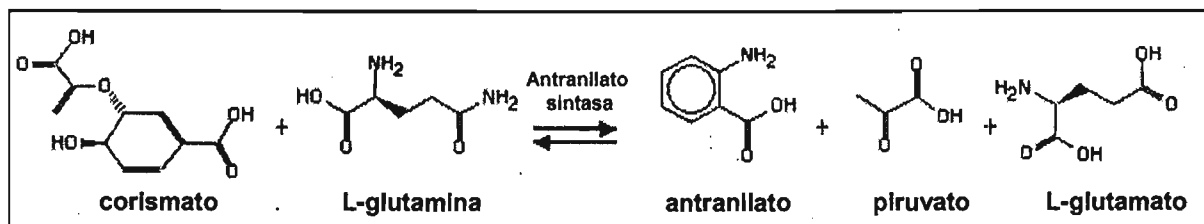


Fig. 17 Reacción catalizada por la enzima antranilato sintasa.

8. Resultados y discusión

8.1 Determinación de la toxicidad del antranilato y catecol

La extrema toxicidad de muchos compuestos orgánicos impone un serio problema en la aplicación de estos compuestos en procesos de producción biotecnológicos. La principal razón de la toxicidad es la acumulación de estas moléculas en la membrana celular bacteriana, causando efectos adversos en su estructura y función (Kieboom y De Bont, 2000).

El antranilato y el catecol se encuentran dentro de éste grupo de compuestos, así que, fue indispensable conocer los límites de tolerancia de las cepas de trabajo, ya que ello, marcaría los límites de crecimiento y producción.

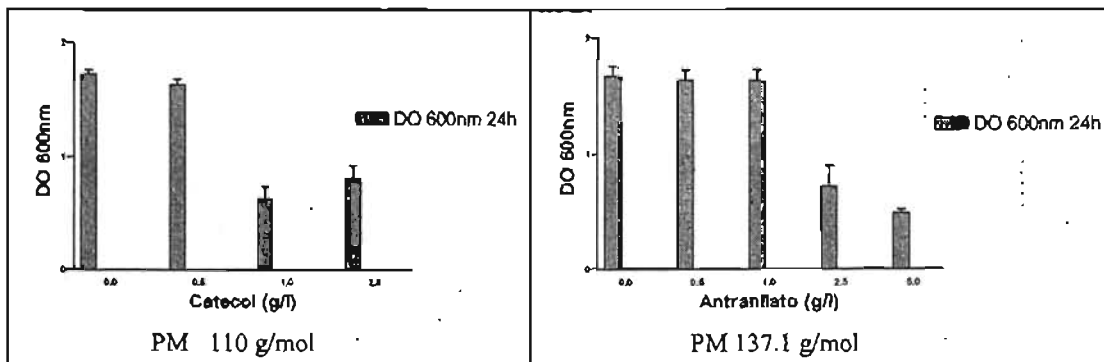


Figura 18. Toxicidad del antranilato y catecol en la cepa W3110/pTrc99A

En la figura 18 se muestra la densidad óptica alcanzada a las 24 h por los cultivos a distintas concentraciones de dichos compuestos tóxicos, podemos observar que a una concentración de 0.5 g/l de catecol no afectó negativamente la densidad óptica, si se toma como referencia la DO alcanzada por la cepa que creció en ausencia de éste. Sin embargo a una concentración de 1.0 g/l se observa una notoria disminución en la DO final, no obstante a 2.5 g/l, aunque el blanco utilizado para determinar las densidades ópticas fue el mismo medio a las mismas concentración de catecol y en las mismas condiciones de incubación, se observó un ligero aumento en la DO medida, que no forzosamente indicar un aumento en la cantidad de células, ya que debido a las limitaciones de la metodología empleada solo se determina la turbidez, sin diferenciar si es originada por las células o por algún efecto del medio de cultivo. En cuanto al antranilato, a concentraciones de 0.5 g/l y 1.0 g/l no hubo cambios significativos en la DO final, fue hasta concentraciones de 2.5 g/l que se observó una disminución en la DO, al aumentar la concentración de antranilato a 5.0 g/l la OD alcanzada es aún menor. Esto indica que el antranilato es un compuesto menos tóxico que el catecol para nuestras cepas.

Estos experimentos permitieron establecer que concentraciones de 1 g/l de catecol y 2.5 g/l de antranilato, afectan el crecimiento. Por lo tanto, resultó de interés probar concentraciones mayores de antranilato para conocer el punto en que se inhibe completamente el crecimiento, sin embargo, para el catecol esto no fue factible ya que su oxidación interfiere con la determinación de la concentración celular (fig 19).

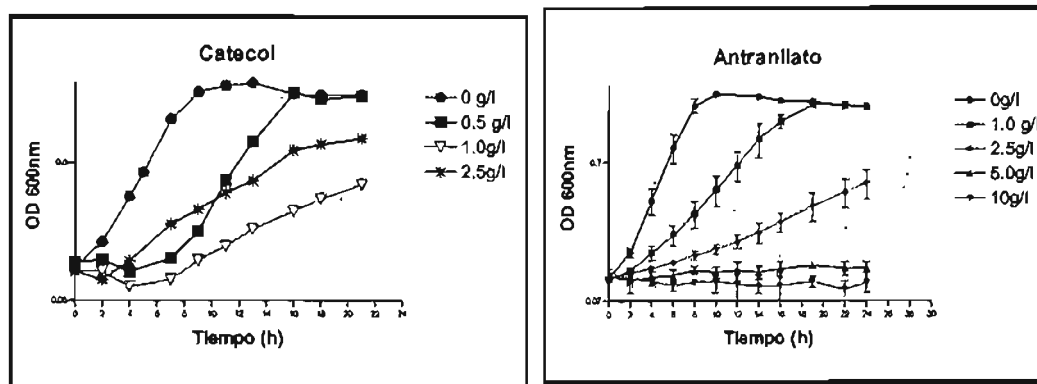


Figura 19. Cinética de toxicidad del antranilato y catecol en la cepa W3110 pTrc99A

Realizando cinéticas, mediante el monitoreo regular de la densidad óptica para las diferentes concentraciones utilizadas de los compuestos tóxicos y con los experimentos realizados anteriormente, pudimos determinar las consecuencias que traería sobre el crecimiento la acumulación de diferentes concentraciones de antranilato y catecol.

A concentraciones de antranilato mayores de 1.0 g/l y de catecol de 0.5 g/l se afecta drásticamente la velocidad de crecimiento. Estos resultados son útiles para proponer una estrategia de fermentación para la producción de antranilato y catecol, dado que los cultivos inician a concentraciones de 0 g/l de antranilato y/o catecol y DO de 0.1, existen 2 posibilidades, una, que las cepas crezcan hasta alcanzar la fase estacionaria y ahí comiencen a producir hasta alcanzar concentraciones que dañen su membrana celular, o bien, podrían producir al mismo tiempo que crecen y detener su crecimiento al alcanzar dichas concentraciones.

8.2 Caracterización de las cepas W3110trpD9778 y W3110trpD9923.

Para la realización de este proyecto, se planeó la sobreexpresión de algunos genes en las cepas W3110trpD9778 y W3110trpD9923, para poder emplearlas posteriormente como control, se transformaron con el plásmido pTrc99A.

Tabla 8. Cepas utilizadas

| Cepas |
|-----------------------|
| W3110trpD9778/pTrc99A |
| W3110trpD9923/pTrc99A |

Las cepas utilizadas en esta parte del estudio, se obtuvieron en el laboratorio de Charles Yanofsky junto con otras mutantes para la realización de estudios de polaridad y funciones enzimáticas de los genes del operón de triptofano (Yanofsky *et al.*, 1966; Yanofsky *et al.*, 1971). Primero, se realizó su caracterización, y se comprobó la auxotrofia a triptofano, en cultivos en medio M9 con y sin triptofano.

También se realizaron cultivos en medio mínimo M9 suplementado con triptofano a 10 µg/ml, para determinar la concentración de antranilato acumulado en el medio, y evaluar así la capacidad de las cepas para producirlo. En la figura 20, se observa como la cepa 9923/pTrc99A acumuló antranilato hasta concentraciones de 120 mg/l, sin embargo, la cepa 9778/pTrc99A no mostró acumulación de dicho intermediario.

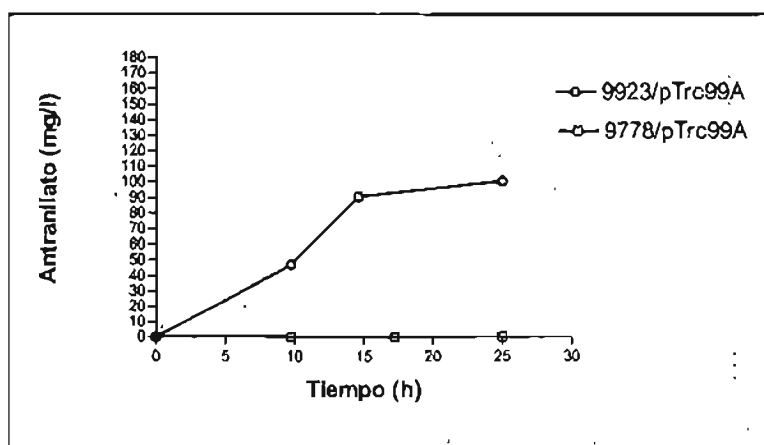


Figura 20. Producción de antranilato

Para tener una caracterización más detallada de la cepa *E. coli* 9923/ptrc99A, se hicieron cultivos por triplicado, en los cuales se determinó el consumo de sustrato (glucosa) y la producción de antranilato (Fig. 21). Estos resultados se analizaron para obtener el rendimiento y productividad de antranilato alcanzados (Tabla 9).

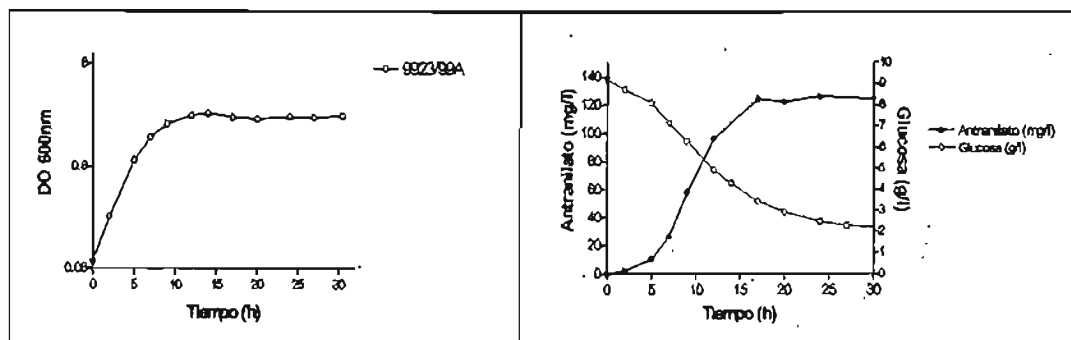


Figura 21. Grafica representativa de el crecimiento, la producción de antranilato y el consumo de glucosa en la cepa 9923/pTrc99A

Tabla 9. Características de la cepa 9923/pTrc99A

| | | |
|--------------------------|-------------------------------------|---------------|
| CEPA | Biomasa alcanzada (g/l) | 1.19 ± 0.10 |
| | Antranilato acumulado (mg/l) | 128.33 ± 9.29 |
| | Y (mg antranilato /g-peso seco) | 107.71 ± 8.55 |
| FASE EXPONENCIAL | μ (h ⁻¹) | 0.37 ± 0.002 |
| | q_{ant} (mg ant/g-peso seco x h) | 14.9 ± 7.2 |
| | q_{gluc} (g gluc/g-peso seco x h) | 1.01 ± 0.031 |
| | Yp/s (mg ant/g gluc) | 8.2 ± 0.07 |
| FASE ESTACIONARIA | q_{ant} (mg ant/g-peso seco x h) | 13.2 ± 2.3 |
| | q_{gluc} (g gluc/g-peso seco x h) | 0.39 ± 0.09 |
| | Yp/s (mg ant/g gluc) | 33.6 ± 2.2 |

Estos resultados sugerían que la mutación presente en la cepa 9923 inactivó la actividad fosforibosil transferasa (*trpD*), pero no la de antranilato sintasa (*trpEG*) permitiendo así la producción de antranilato y no su consumo, lo que da como resultado su acumulación.

El rendimiento de antranilato a partir de glucosa en la fase exponencial fue de 8.2 mg ant/g gluc, y en la fase estacionaria de 33.6 ya que, aunque la productividad fue muy similar en las dos fases, el consumo de glucosa disminuyó de 1 a 0.39 g gluc/g-peso seco x h. En la fase estacionaria, no hay producción de biomasa, y el consumo de glucosa se reduce, ya que las células no se duplican. Por lo tanto toda la glucosa consumida podría ser dirigida hacia la síntesis de antranilato, hasta el punto en que algún otro metabolito sea limitante para dicha síntesis. En esta fase puede compararse el rendimiento obtenido (0.034 g/g) con el máximo teórico (0.35 g/g) ya que como se mencionó, todo el flujo de carbono podría ser dirigido hacia la síntesis de antranilato, resultando rendimientos de casi el 10% del máximo teórico.

8.3 Determinación de la secuencia nucleotídica de los genes *trpEGD* provenientes de la cepa productora de antranilato W3110trpD9923.

Después de comprobar que la cepa 9923 produce antranilato naturalmente, y dado que solo se sabía que se mutagenizó al azar, se secuenció la región comprendida desde *trpE* hasta *trpD*, con la finalidad de identificar la mutación que generó la inactivación de la enzima fosforibosil transferasa.

Con los diferentes oligos diseñados (Fig. 22), se secuenciaron aproximadamente 9000 pb. En total fueron 12 secuencias con un promedio de 750 bases cada una (con algunos oligos se secuenció más de una vez).

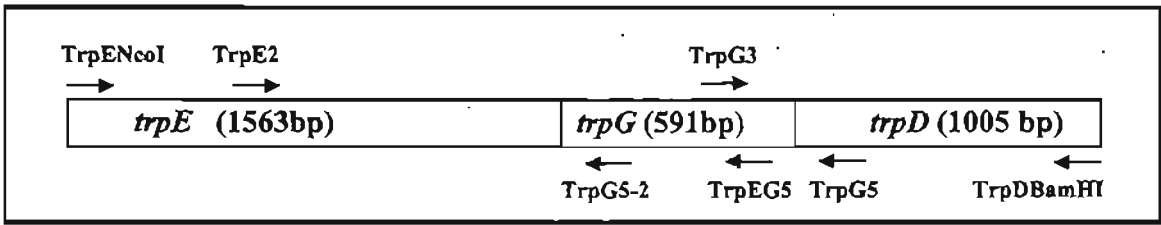


Figura 22. Oligos diseñados para la secuenciación de *trpED*

Las secuencias obtenidas, se compararon con la secuencia de los genes *trpEGD* tomada de la base de datos dedicada al análisis del genoma de *E. coli* (<http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>) para ubicar y determinar la mutación que causó la inactivación de la actividad fosforibosil transferasa.

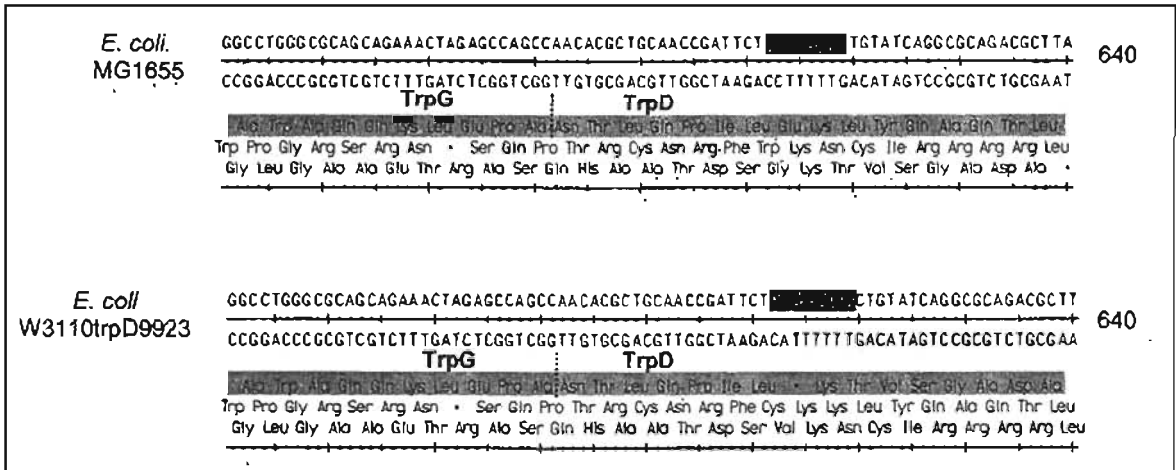


Figura 23. Esquema de la mutación que generó la inactivación de la actividad fosforibosil transferasa.

Como se observa en la Fig. 23 dicha mutación consistió en un cambio de base de G por T y la inserción de una A al inicio de *trpD*, lo que generó un codón de término provocando la síntesis de una proteína TrpD trunca no funcional de 7 aminoácidos de longitud.

8.4 Efecto de la sobreexpresión de los genes *aroG^{br}* y *tklA* sobre la capacidad de producir antranilato en la cepa W3110trpD9923.

Puesto que la cepa 9923 tiene la capacidad de producir antranilato debido a la mutación en el gen *trpD*, nuestros esfuerzos se enfocaron a aumentar el flujo metabólico hacia la producción de dicho intermediario, mediante la aplicación de ingeniería de vías metabólicas con la finalidad de mejorar su capacidad de producción de antranilato.

Como primer paso, se sobreexpresó en la cepa 9923 el gen *aroG^{br}* que codifica para una enzima DAHP sintasa insensible a inhibición alostérica, con el fin de aumentar el flujo de carbono hacia la ruta de síntesis de aminoácidos aromáticos, y por lo tanto hacia la ruta truncada de producción de triptofano lo cual llevaría a un aumento en la acumulación de antranilato.

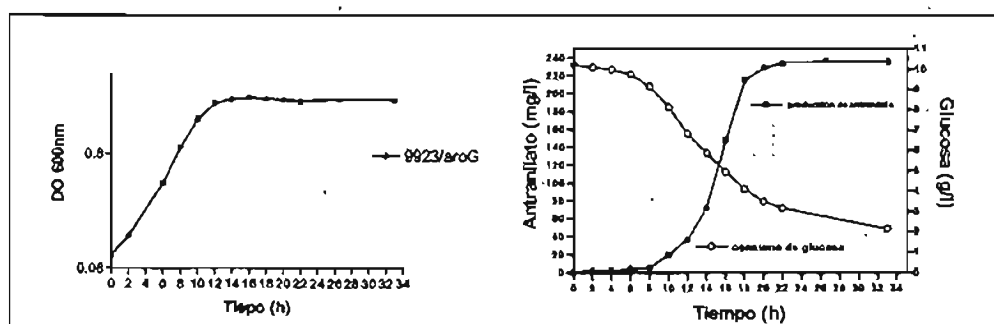


Figura 24. Gráficas representativas de la caracterización de la cepa *E. coli* 9923/*aroG^{br}*

Tabla 10. Comparación de las cepas 9923/*aroG^{br}* y 9923/*pTrc99A*.

| | | 9923/ <i>pTrc99A</i> | 9923/ <i>aroG^{br}</i> | Relación (<i>aroG</i> /99A) |
|-------------------|-------------------------------------|----------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Cepa | Biomasa alcanzada (g/l) | 1.19 ± 0.10 | 1.1 ± 0.09 | 0.92 |
| | Antranilato acumulado (mg/l) | 128.33 ± 9.29 | 253.96 ± 29.19 | 1.98 |
| | Y (mg ant /g-peso seco) | 107.71 ± 8.55 | 231.16 ± 17.85 | 2.15 |
| Fase Exponencial | μ (h^{-1}) | 0.37 ± 0.002 | 0.34 ± 0.037 | 0.92 |
| | q_{ant} (mg ant/g-peso seco x h) | 14.9 ± 7.2 | 12.9 ± 1.9 | 0.87 |
| | q_{gluc} (g gluc/g-peso seco x h) | 1.01 ± 0.031 | 0.95 ± 0.12 | 0.94 |
| | Yp/s (mg ant/g gluc) | 8.2 ± 0.07 | 13.6 ± 1.9 | 1.66 |
| Fase Estacionaria | q_{ant} (mg ant/g-peso seco x h) | 13.2 ± 2.3 | 25.2 ± 1.8 | 1.91 |
| | q_{gluc} (g gluc/g-peso seco x h) | 0.39 ± 0.09 | 0.38 ± 0.04 | 0.97 |
| | Yp/s (mg ant/g gluc) | 33.6 ± 2.2 | 66.5 ± 3.0 | 1.98 |

Como se observa en la figura 24 y en la tabla 10, la expresión del gen *aroG^{br}* no afectó el crecimiento, y si logró dirigir un mayor flujo de carbono hacia la síntesis de antranilato, logrando una producción de 254 mg/l de antranilato comparado con 128 mg/l de la cepa 9923/pTrc99A. Como consecuencia, la productividad aumentó de 13 a 25 mg ant/g celxh, esto es, 2 veces respecto a la cepa silvestre, y dado que el consumo de glucosa no varió significativamente, el rendimiento g producto/g sustrato en la cepa que sobreexpresa el gen *aroG^{br}* también aumentó de 0.034 a 0.066 g/g correspondiente a el 19% del máximo teórico.

Siguiendo con las estrategias de ingeniería de vías metabólicas, se expresó en la cepa 9923/*aroG^{br}* simultáneamente el gen *tklA* que codifica para la enzima transcetolasa, enzima clave de la ruta de las pentosas y cuya sobreexpresión lleva a un incremento en la disponibilidad de E4P, uno de los precursores de la ruta de síntesis de aminoácidos aromáticos.

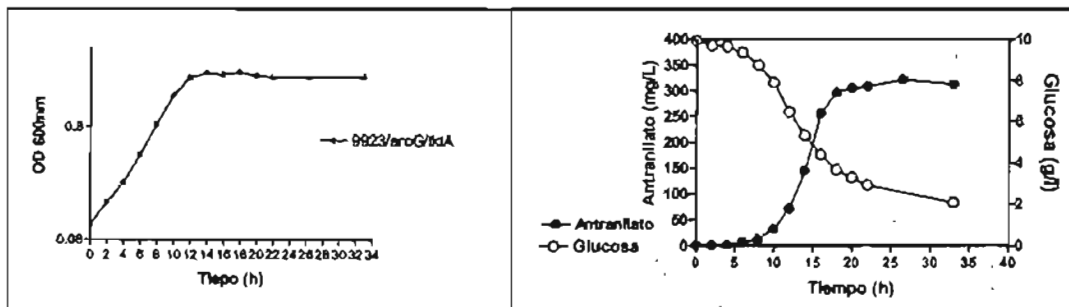


Figura 25. Gráficas representativas de la caracterización de la cepa *E. coli* 9923/*aroG^{br}*/*tklA*

Tabla 11. Comparación de las cepas 9923/*aroG^{br}*/*tklA* y 9923/pTrc99A.

| Cepa | | 9923/pTrc99A | 9923/ <i>aroG^{br}</i> / <i>tklA</i> | Relación |
|---------------------------------|--|-------------------------|--|--------------|
| | Cepa | Biomasa alcanzada (g/l) | 1.19 ± 0.10 | 1.06 ± 0.006 |
| Antranilato acumulado (mg/l) | | 128.33 ± 9.29 | 324.37 ± 3.08 | 2.5 |
| Y (mg antranilato /g-peso seco) | | 107.71 ± 8.55 | 305.18 ± 1.08 | 2.83 |
| Fase Exponencial | μ (h ⁻¹) | 0.37 ± 0.002 | 0.289 ± 0.02 | 0.78 |
| | q _{ant} (mg ant/g-peso seco x h) | 14.9 ± 7.2 | 25.6 ± 12.9 | 1.72 |
| | q _{gluc} (g gluc/g-peso seco x h) | 1.01 ± 0.031 | 1.0215 ± 0.09 | 1.01 |
| | Yp/s (mg ant/g gluc) | 8.2 ± 0.07 | 25.7 ± 14.2 | 3.13 |
| Fase Estacionaria | q _{ant} (mg ant/g-peso seco x h) | 13.2 ± 2.3 | 35.1 ± 0.4 | 2.66 |
| | q _{gluc} (g gluc/g-peso seco x h) | 0.39 ± 0.09 | 0.45 ± 0.008 | 1.15 |
| | Yp/s (mg ant/g gluc) | 33.6 ± 2.2 | 78.3 ± 2.4 | 2.33 |

La figura 25 y la tabla 11, muestran los resultados obtenidos de la sobreexpresión conjunta del gen *aroG^{br}* y *tklA* sobre la capacidad de producir antranilato de la cepa 9923. La simultanea expresión del gen *aroG^{br}* y *tklA* en la cepa 9923 generó una pequeña disminución en la velocidad de crecimiento, sin embargo, la biomasa alcanzada fue muy similar a la de la cepa silvestre. La cepa 9923/*aroG^{br}/tklA* produjo 324 mg ant/l, es decir, 2.5 veces con respecto a lo producido por la cepa 9923. La productividad también aumentó de 0.13 a 0.35 mg ant/g cel x h, no obstante la cepa consume 15% más glucosa dando como resultado un menor incremento en el rendimiento, el cuál aumentó de 0.034 a 0.078 (mg ant/g celxh) que corresponde al 22% del maximo teórico, esto es 2.33 veces con respecto a la cepa 9923.

Si comparamos la cepa 9923/*aroG^{br}/tklA* contra la cepa 9923/*aroG^{br}*, podemos determinar el efecto causado por la sola sobreexpresión del gen *tklA*. La cepa 9923/*aroG^{br}/tklA* produjo 324 mg ant/l comparado con 254 de la cepa 9923/*aroG^{br}* es decir, el aumento causado por la sobreexpresión del gen *tklA* sobre la producción fue de 28%. Asimismo la productividad incrementó 39%, esto es, de 25.2 (mg ant/g celxh) de la cepa 9923/*aroG^{br}* a 35.1 de la cepa 9923/*aroG^{br}/tklA*, pero, dado que el consumo de glucosa también fue mayor, el aumento en el rendimiento fue tan solo de un 18%, esto es de 66.6 de la cepa que sobreexpresa el gen *aroG^{br}* a 78.3 mg ant/g gluc. Estos resultados coinciden con lo reportado por Patnaik en 1995, ya que, al restar el efecto causado por la sobreexpresión del gen *aroG^{br}*, la sobreexpresión del gen *tklA*, tiene un pequeño efecto positivo sobre la concentración final de antranilato, y aún menor sobre el rendimiento (Fig. 26).

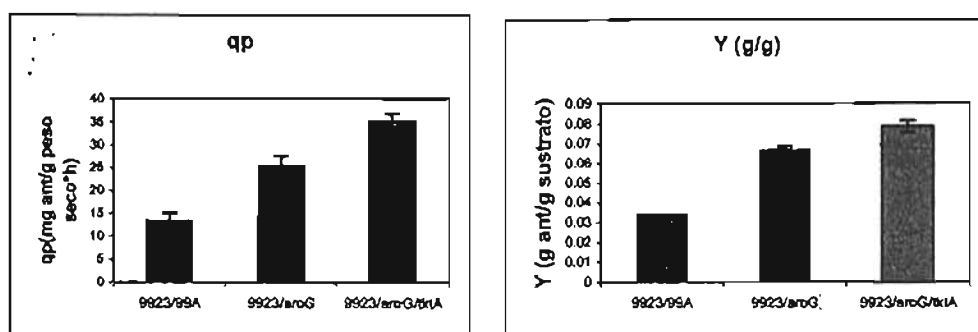


Figura 26. Esquemas de los efectos causados sobre la productividad y el rendimiento por la sobreexpresión de los genes *aroG^{br}* y *tklA* en la cepa productora de antranilato 9923.

8.5 Efecto de la sobreexpresión de los genes *trpEGD*₉₉₂₃ bajo el promotor *trc* en el plásmido pTrc99A en la cepa productora de antranilato W3110trpD9923.

Con el aumento de flujo hacia la síntesis de aromáticos, el paso limitante en la producción de antranilato podría ser la actividad de la enzima antranilato sintasa. Con la finalidad de generar una mayor cantidad de la enzima antranilato sintasa, los genes *trpEGD* provenientes de la cepa 9923 se clonaron bajo el promotor *trc* en el plásmido de expresión pTrc99A para generar el plásmido pTrc*trpEGD*, el cual se transformó en la cepa 9923. Se evaluaron tres clonas (1, 5 y 19) para determinar el efecto de la sobreexpresión de los genes *trpEGD* sobre la producción de antranilato.

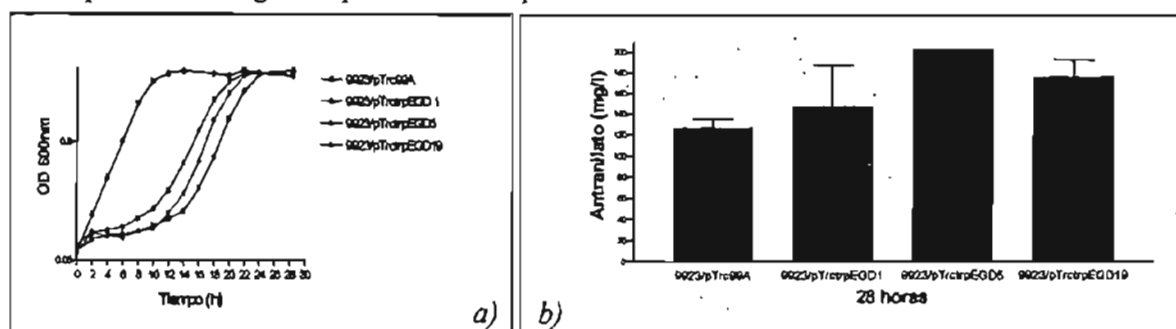


Fig. 27 Evaluación de las clonas elegidas.

En la figura 27a se muestra el efecto de la sobreexpresión de los genes *trpEGD* sobre el crecimiento, aunque la velocidad de crecimiento de las cepas fue muy similar, las cepas que sobreexpresan los genes *trpEGD*, presentaron una fase lag (de adaptación) muy larga en comparación con la cepa 9923/pTrc99A.

Al comparar las mediciones de antranilato acumulado a las 28h, la clona 5 de las cepas 9923/pTrc*trpEGD* fue la mayor productora de antranilato (fig. 27b). Por ello, se realizó una caracterización más detallada de esta clona 5, determinando la producción de antranilato en términos de productividad y rendimiento específicos.

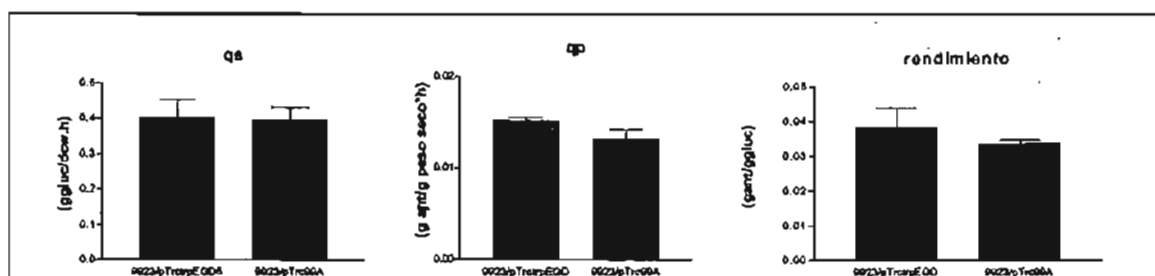


Fig. 28 Caracterización de la clona 5 de la cepa 9923/pTrc99A EOD5 y su comparación con la cepa silvestre.

Como se muestra en la figura 28, no se observó un claro efecto sobre la productividad ni el rendimiento después de la sobreexpresión de los genes que codifican para la enzima antranilato sintasa.

Para determinar el efecto de aumentar el flujo de carbono hacia la síntesis de aromáticos, se transformó la cepa 9923/pTrcaroG^{br} que contiene el gen *aroG^{br}*, al mismo tiempo que se sobreexpresaban los genes que codifican para la enzima antranilato sintasa, con lo cual se esperaba un mayor efecto sobre la producción de antranilato. Los cultivos en medio mínimo M9 (suplementado con glucosa, triptofano, IPTG y los antibióticos correspondientes) con esta nueva cepa no crecieron. La sobreexpresión de los genes *trpEGD* causó una fase de adaptación muy larga, el efecto ocasionado por su conjunta sobreexpresión con el gen *aroG^{br}* fue mayor e inhibió totalmente el crecimiento. Para determinar el origen de este efecto se plantearon varios experimentos:

8.6 Generación de cepas de *E. coli* modificadas para la producción de antranilato.

El hecho de tener clonados los genes que codifican para la enzima antranilato sintasa activa en el plásmido pTrc- Glc⁺) la cual se ha demostrado que posee el potencial para la síntesis de compuestos aromáticos con altos rendimientos a partir de glucosa. (Flores *et al.*, 1996; Flores *et al.*, 2002).

Por ello, mediante el método de Wanner (Datsenko and Wanner, 2000) para inactivar genes cromosomales usando productos de PCR, se deletó la ruta de síntesis de triptofano en las cepas JM101 y PB12. Se utilizaron oligos con 60 nucleótidos de extensión que son homólogos a regiones adyacentes a los genes *trpE* y *trpC* del operón de triptofano y templados para el plásmido que porta el gen de resistencia a antibiótico (Km para JM101 y Cm para PB12) flanqueado por sitios FRT con el cual se sustituyó la región comprendida desde *trpE* hasta *trpC* en el cromosoma de las cepas JM101 y PB12. Las cepas obtenidas JM101- y PB12- se transformaron con el plásmido pTrc

Como se tenía el antecedente de que *trpE* y/o *trpLE* se han usado exitosamente como fusiones por su naturaleza insoluble, la cual lleva a protección proteolítica en cuerpos refráctiles (Yansura, 1990), los cultivos se realizaron a una temperatura de 30°C para reducir la posibilidad de formación de cuerpos de inclusión.

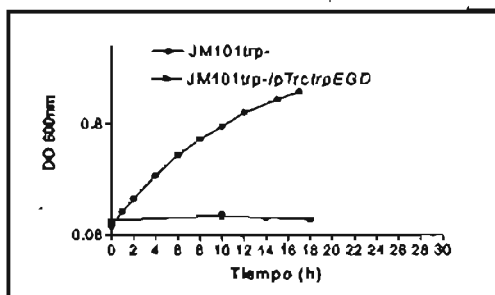


Fig. 29 Cinética de crecimiento en medio M9.

La transformación de la cepa JM101trp con el plásmido que contiene los genes *trpEGD* (*pTrctrpEGD*), causó la inhibición del crecimiento en medio mínimo M9 suplementado con triptofano (Fig 29). En estas condiciones no se pudo determinar si la enzima codificada por los genes *trpEGD* era activa o no. Para realizar las cinéticas, una opción fue la utilización de medio rico LB suplementado con glucosa 10g/l, e IPTG 1mM (fig 30).

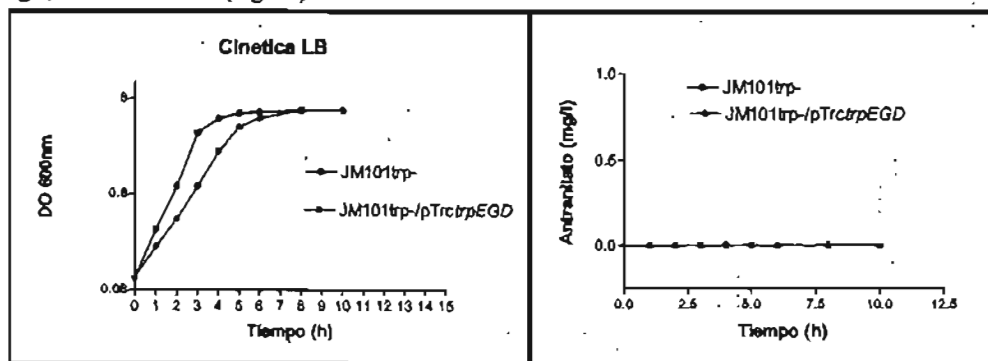


Fig. 30 Cinéticas de crecimiento en medio LB y producción de antranilato.

La cepa JM101trp/pTrctrpEGD creció bien en medio LB, pero, sin embargo, no se logró observar la producción de antranilato, probablemente debido a que la enzima TrpEGD sigue siendo sensible a inhibición alostérica por triptofano.

Se ha demostrado que la actividad antranilato sintasa se inhibe por el producto final de la ruta (*trp*) (Ito, et al., 1965; Pittard, 1996). El triptofano inhibe ambas actividades antranilato sintasa y fosforibosil antranilato transferasa de el agregado, mientras la antranilato sintasa puede ser inhibida al 100%, la inhibición de PARA transferasa es incompleta y no excede el 70%. La unión de triptofano y corismato es competitiva, se postula que ambos sitios están presentes en el componente I. Estudios mutacionales, muestran que los dos sitios de unión son distintos. La unión de sustrato o inhibidor es asociada con cambios conformacionales en ambos componentes I y II y afectan las actividades antranilato sintasa, glutamido transferasa y fosforibosil antranilato transferasa (Pabst et al., 1973).

Para determinar si la enzima antranilato sintasa aún es sensible a inhibición alostérica por triptofano, se realizaron cinéticas en LB (medio rico en triptofano, que podría inhibir la actividad antranilato sintasa) con varias cepas. Anteriormente se demostró que la cepa 9923/pTrc99A tiene la capacidad de sintetizar antranilato en medio M9, en esta cepa los genes *trpEGD* se encuentran en un operón bajo el promotor de triptofano *P_{trp}*, se sabe que es inhibido transcripcionalmente por triptofano. En la cepa 9923/pTrctrpEGD se elimina la inhibición transcripcional ya que los genes se encuentran bajo el promotor *P_{trc}* inducible por IPTG y en la cepa 9923/pTrctrpEGD/*aroG^{br}* se descarta además la inhibición de la enzima DAHP sintasa y se incrementa el flujo de carbono hacia la ruta de síntesis de aromáticos.

Como se observó en la figura 31, no se observó la producción de antranilato en ninguna de las cepas, lo que indicó que la enzima antranilato sintasa sigue siendo sensible a inhibición por triptofano, aunque no se descartó la posibilidad de que la proteína producida por los genes clonados en el plásmido pTrc99A no fuera activa (Fig. 31).

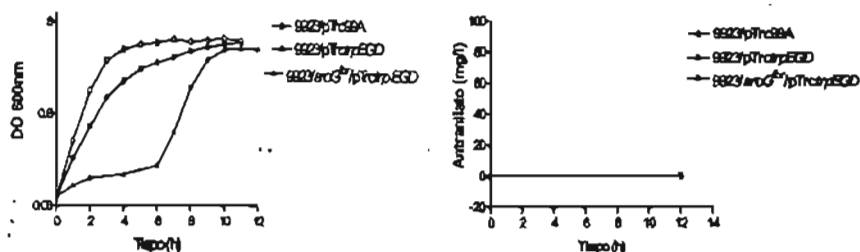


Fig. 31. Cinéticas de crecimiento en medio LB y producción de antranilato.

8.6.1 Experimentos con células en reposo

Después de los experimentos anteriores, se consideró como alternativa, la utilización de experimentos de células en reposo con el propósito de eliminar la inhibición alostérica por triptofano de la enzima antranilato sintasa. Los experimentos se realizaron con las cepas 9923/pTrc99A y 9923/aroG^{br} como controles positivos (se sabe que pueden producir antranilato), la cepa JM101trp⁻/pTrc99A/EGD fue transformada con el plásmido pJLBaroG^{br} para tener sobreexpresada la enzima DAHP sintasa insensible a inhibición alostérica.

Los cultivos se monitorearon por aproximadamente 15 horas (Fig. 32), sin embargo, los resultados no fueron positivos ya que en ninguna de las cepas se observó la producción de antranilato. Esto podría indicar que en la cepa JM101trp⁻/pTrc99A/EGD la inhibición alostérica por triptofano es muy fuerte y que, aún con los lavados de las células y el cultivo de 15 h en medio mínimo, la enzima no pierde su inhibición, así que no se observa actividad, a menos que la enzima producida por los genes clonados no fuera activa.

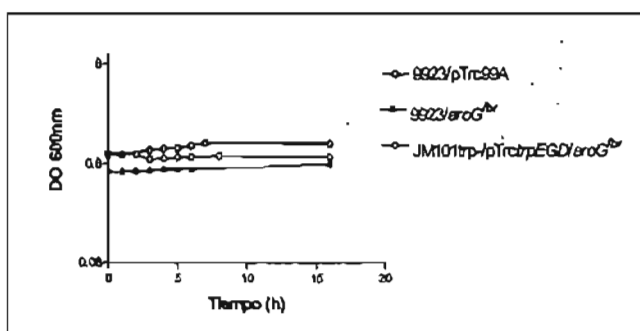


Fig. 32. Monitoreo de lo DO en los cultivos con células en reposo.

8.6.2 Determinación del efecto del medio de cultivo sobre la capacidad de producir antranilato.

Para determinar una condición que permitiera el crecimiento de la cepa pero que no inhibiera a la enzima antranilato sintasa, se analizaron cultivos con distintas concentraciones de YE a 30°C, después de 13 h se determino la concentración de antranilato y la densidad óptica alcanzada.

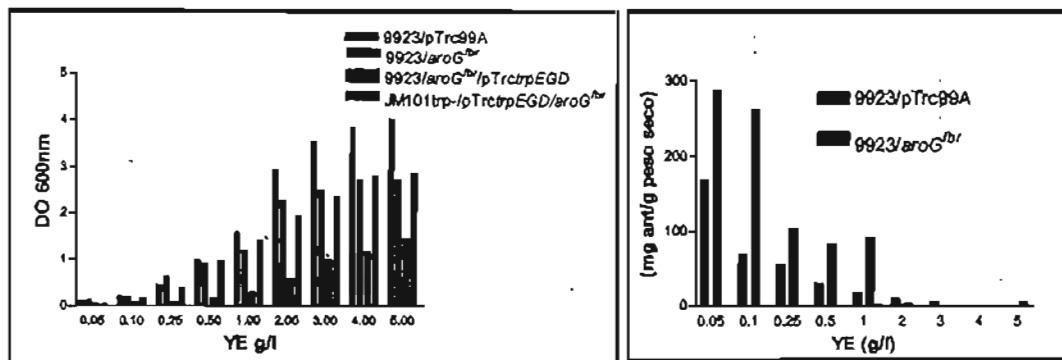


Fig 33 Cultivos a distintas concentraciones de YE.

En la figura 33 se observan los cultivos a distintas concentraciones de extracto de levadura desde 5 g/l hasta 0.05 g/l, en todos los casos con las distintas cepas, conforme disminuyó la concentración de YE disminuyó también la DO alcanzada, pero ésta es distinta entre ellas. La cantidad de antranilato producido por gramo de célula en las cepas 9923/pTrc99A y 9923/aroG^{br} disminuyó conforme aumentó la concentración de extracto de levadura (Tabla 12).

Tabla 12. Cantidad de antranilato producido por gramo de célula en relación a la cantidad de YE por litro.

| YE (g/l) | 9923/pTrc99A (mg ant / g cel x h) | 9923/aroG ^{br} (mg ant / g cel x h) |
|----------|--------------------------------------|---|
| 0.05 | 168.43 | 286.45 |
| 0.1 | 69.36 | 261.12 |
| 0.25 | 55.51 | 103.18 |
| 0.5 | 30.31 | 83.01 |
| 1 | 17.63 | 90.29 |
| 2 | 9.51 | 3.37 |
| 3 | 5.78 | 1.14 |
| 4 | 0.00 | 1.03 |
| 5 | 0.02 | 4.25 |

La enzima antranilato sintasa es claramente inhibida a medida que se aumenta la concentración de YE (y por ende la de triptofano). De aquí, se eligió utilizar una concentración de 1g/l de YE, la cual permite el crecimiento de la cepa y además que la enzima antranilato sintasa no se encuentre inhibida totalmente.

8.6.3 Experimentos con células en reposo utilizando YE a 1 g/L

Al emplear preinóculos crecidos en medio mínimo M9 suplementado con 1 g/l de extracto de levadura para posteriormente inocular cultivos de células en reposo en medio mínimo M9, como se muestra en la figura 34 se observó por primera vez la producción de antranilato en la cepa JM101trp⁻ que expresa los genes *trpEGD*, lo que demostró que la enzima codificada por los genes *trpEGD* es funcional. Sin embargo, contrario a lo que se esperaba, al tener clonados los genes bajo el promotor fuerte *P_{trc}*, en un plásmido de alto número de copias, la productividad fue 77% menor a la cepa silvestre 9923 y 89% menor que la cepa 9923/*aroG^{br}*. Aunque el rendimiento (mg antranilato/g-peso seco) fue de 130.6 comparado con 231.16 que genera la cepa 9923/*aroG^{br}* (43% menor).

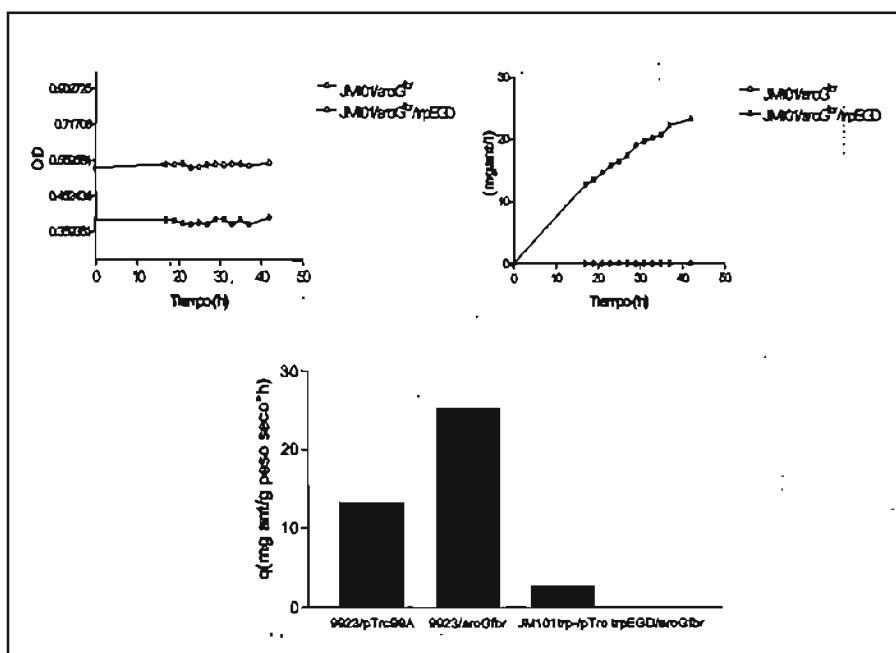


Fig 34. Cultivos de células en reposo utilizando preinoculos crecidos en medio M9 suplementado con 1 g/l YE.

8.7 Determinación de la formación y presencia de cuerpos de inclusión por la sobreexpresión de los genes *trpEGD*₉₉₂₃.

Aunque las cepas se cultivaron a una temperatura de 30°C, nuestra hipótesis fue que la enzima antranilato sintasa producida no logró un plegamiento correcto, conduciendo a una disminución de la actividad. Este plegamiento incorrecto podría llevar a la formación de cuerpos de inclusión, o a una forma de proteína soluble no activa.

Empleando las cepas 9923/pTrc99A, JM101trp⁻ como control positivo y negativo respectivamente, y las cepas 9923/pTrctrpEGD y JM101trp⁻/pTrctrpEGD como muestras a analizar. Se realizaron las cinéticas en medio LB, las muestras se tomaron y trataron como se describe en la sección de materiales y métodos, se empleo un gel de proteínas para determinar la presencia de cuerpos de inclusión generados por la sobreexpresión de la enzima antranilato sintasa.

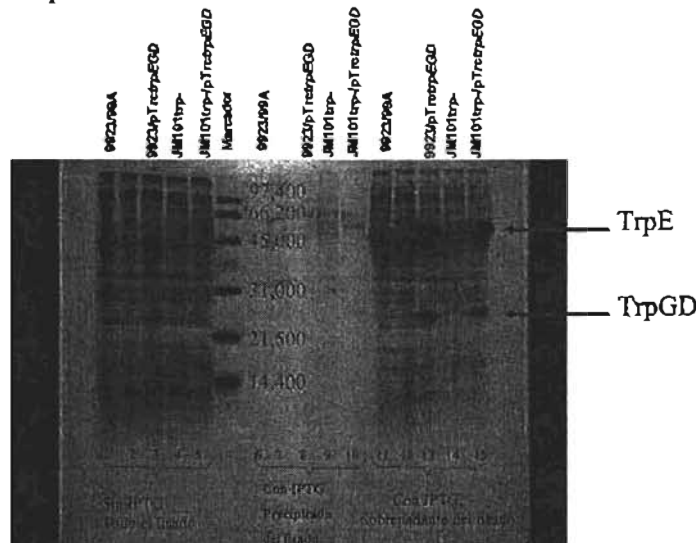


Fig 35. Gel de acrilamida-bisacrilamida para determinar la presencia de cuerpos de inclusión. Los carriles 1,6 y 11, corresponden a la cepa 9923/99A; 3, 8 y 13 a la cepa 9923/pTrctrpEGD; 4,9,14 a la cepa JM101trp⁻; 5,10 y 15 a la cepa JM101trp⁻/pTrctrpEGD en las distintas fases y condiciones.

La figura 35 muestra el gel de acrilamida-bisacrilamida para electroforesis de proteínas, en los carriles del 1 al 5 se observa la totalidad de las proteínas presentes en las distintas cepas en la fase exponencial sin IPTG. En los carriles del 6 al 15 se comparan las proteínas presentes en la fase estacionaria después de la adición de IPTG, en el sobrenadante del lisado (carriles 11 al 15) se encuentran las proteínas solubles y en el precipitado (carriles 6 al 10) se encontrarían los cuerpos de inclusión. Las proteínas TrpE y TrpGD*, no se encontraron en el precipitado, con lo que se comprobó que no forman cuerpos de inclusión, pero si se encontró una gran cantidad de estas proteínas en el sobrenadante, lo que podría indicar que aunque la enzima no forma cuerpos de inclusión, la cantidad formada es tan grande, que podría plegarse incorrectamente y que la actividad observada, fuera resultado de una parte de la enzima que sí logró un plegamiento adecuado.

8.8 Expresión de los genes *trpEGD*₉₉₂₃ bajo el promotor *P_{trp}*.

Los genes *trpEGD* se encuentran en el cromosoma de *E. coli*, formando parte de un operón bajo el control del promotor de triptófano *P_{trp}*, un promotor más débil que *P_{trc}*. Con el propósito de disminuir la cantidad de transcrito, y de la proteína producida, los genes se clonaron bajo su propio promotor, lo que podría contribuir a un mejor nivel de expresión y por lo tanto a un mejor plegamiento de la proteína. Los genes con su promotor se clonaron en el plásmido Zero Blunt-TOPO (Invitrogen) y se transformaron en la cepa JM101*trp* a la cual se le escindió en casete de resistencia a Km para poder seleccionar las transformantes con el plásmido pTOPO*trpEGD*.

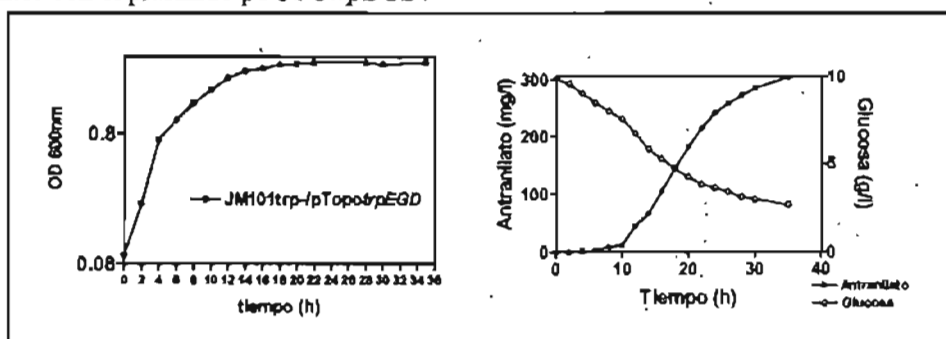


Fig 36 Caracterización de la cepa JM101*trp*/pTOPO*trpEGD*.

La cepa JM101*trp*/pTOPO*trpEGD* no se afectó en su crecimiento, aunque, aún para la cepa JM101*trp* fue necesario agregar triptófano a 20 μg/ml para lograr un óptimo crecimiento y alcanzar la fase estacionaria. Con la expresión de los genes *trpEGD* bajo un promotor menos fuerte, se produjo una proteína activa capaz de transformar el corismato a antranilato (Fig 36).

Tabla 13. Comparación de las cepas 9923/pTrc99A y JM101*trp*-pTOPO*trpEGD*

| Cepa | | 9923/pTrc99A | JM101 <i>trp</i> -pTOPO <i>trpEGD</i> | Relación |
|-------------------|--|--------------|---------------------------------------|----------|
| | Biomasa alcanzada (g/l) | 1.19 | 1.22 | 1.03 |
| | Antranilato acumulado (mg/l) | 128.33 | 284.90 | 2.22 |
| | Y (mg antranilato /g-peso seco) | 107.71 | 232.95 | 2.16 |
| F. Exponencial | μ (h ⁻¹) | 0.37 | 0.55 | 1.49 |
| Fase Estacionaria | q _{ant} (g ant/g-peso seco x h) | 13.2 | 14.93 | 1.13 |
| | q _{gluc} (g gluc/g-peso seco x h) | 0.39 | 0.20 | 0.51 |
| | Y _{p/s} (g ant/g gluc) | 33.6 | 73.10 | 2.17 |

La cepa JM101trp/pTOPOtrpEGD, solo produjo antranilato en la fase estacionaria, una vez que se agota el triptofano, se induce la síntesis de la proteína e inicia la síntesis de antranilato. La productividad alcanzada 14.9 mg ant/g cel xh fue muy similar a la de la cepa 9923, sin embargo su consumo de glucosa fue casi del 50%, esto es, 0.2 g gluc/g cel xh comparado con 0.39 de, con lo que se alcanzó un incremento en el rendimiento de 2.17 veces en relación a la cepa 9923, llegando a 73.1 mg ant/g gluc, muy cercano a el alcanzado por la cepa 9923/aroG^{br}/tklA (Fig. 37).

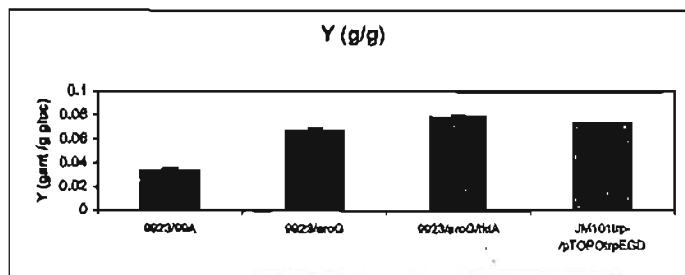


Fig 37. Comparación de el rendimiento alcanzado por la cepa JM101trp/pCLtrpEGD.

El rendimiento máximo teórico de antranilato a partir de glucosa es de 46 % mol / mol, es decir, 0.35 g/g, los rendimientos más altos alcanzados con las cepas JM101trp/pTOPOtrpEGD y 9923/aroG^{br}/tklA, corresponden al 22% de éste máximo teórico.

La aplicación de herramientas de ingeniería de vías metabólicas para aumentar el flujo de carbono hacia la ruta de interés, resultó exitosa para la cepa 9923, con la intención de lograr resultados similares, se sobreexpresaron los genes *aroG^{br}* y *tklA* en la cepa productora de antranilato JM101trp/pTOPOtrpEGD.

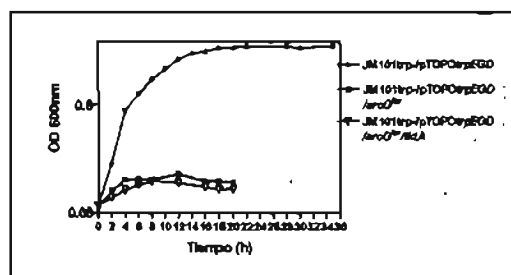


Fig 38. Cinética de crecimiento de la cepa JM101trp/pTOPOtrpEGD y de las cepas que expresan los genes *aroG^{br}* y *tklA*.

En la figura 38 se muestra la cinética de crecimiento de las distintas cepas generadas, las cepas JM101trp/pTOPOtrpEGD/aroG^{br} y JM101trp/pTOPOtrpEGD/aroG^{br}/tklA estuvieron severamente afectadas en su crecimiento, y no se pudo observar la producción de antranilato, una explicación de esto es la carga metabólica generada por los plásmidos, además, podría aún la cantidad de proteína TrpEGD producida ser grande, y aunque una parte de ella muestra actividad, la otra podría aún encontrarse en un estado de plegamiento incorrecto, ya que, aunque se tiene un promotor menos fuerte, Zero Blunt-TOPO es un plásmido de alto número de copias (~30 por célula).

8.9 Expresión de los genes *trpEGD*₉₉₂₃ bajo su promotor en un plásmido de bajo número de copias.

Para lograr una disminución en el nivel de transcripción de los genes *trpEGD* y por lo tanto de la proteína generada, con lo cual se esperaba favorecer el correcto plegamiento, se clonaron los genes *trpEGD* junto con su promotor *P_{trp}* en el plásmido pCL1920 un plásmido de bajo número de copias (~5 por célula), y conjuntamente se sobreexpresó el gen *aroG^{br}*.

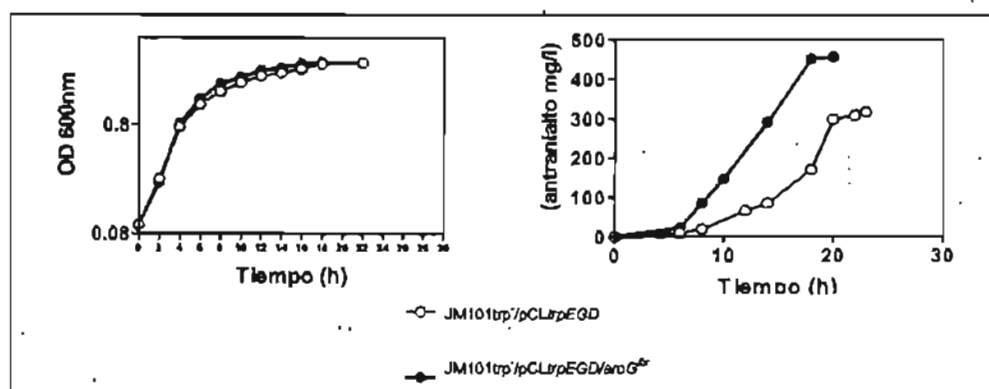


Fig 39. Caracterización de la cepa *JM101trp/pCLtrpEGD* y de la cepa que expresa el gen *aroG^{br}*.

La disminución en el número de copias del plásmido que expresa los genes que codifican para la enzima antranilato sintasa y su conjunta sobreexpresión con el gen *aroG^{br}*, no generó ningún efecto negativo sobre el crecimiento, aunado a esto, se generó un aumento en la cantidad de antranilato producido (Fig 39).

Tabla 14. Comparación de las cepas *JM101trp/pCLtrpEGD* y *JM101trp/pCLtrpEGD/pJLBaroG^{br}*

| Cepa | | <i>JM101trp/pCLtrpEGD</i> | <i>JM101trp/pCLtrpEGD/aroG^{br}</i> | Relación |
|-------------------|--|---------------------------|---|----------|
| | Biomasa alcanzada (g/l) | 1.26 ± 0.08 | 1.37 ± 0.035 | 1.09 |
| | Antranilato acumulado (mg/l) | 284.71 ± 17.38 | 448.33 ± 16.07 | 1.57 |
| | Y (mg antranilato /g-peso seco) | 218.44 ± 14.17 | 322.14 ± 21.06 | 1.47 |
| Fase Exponencial | μ (h ⁻¹) | 0.513 ± 0.03 | 0.54 ± 0.09 | 1.06 |
| Fase Estacionaria | q _{ant} (mg ant/g-peso seco x h) | 19.19 ± 3.06 | 28.67 ± 4.32 | 1.49 |
| | q _{gluc} (g gluc/g-peso seco x h) | 0.206 ± 0.009 | 0.24 ± 0.028 | 1.16 |
| | Y _{p/s} (mg ant/g gluc) | 90.98 ± 7.8 | 119.53 ± 10.56 | 1.31 |

La productividad lograda por la cepa JM101trp/pCLtrpEGD, fue aproximadamente 1.5 veces la productividad de la cepa 9923/99A, lo que significó un aumento del 50%, la sobreexpresión conjunta de el gen *aroG^{br}* en la cepa JM101trp/pCLtrpEGD generó un aumento en la productividad de 19 a 29 (mg ant/g-peso seco x h) que representa un 81% con respecto a la cepa 9923/*aroG/tkA* (Fig. 40).

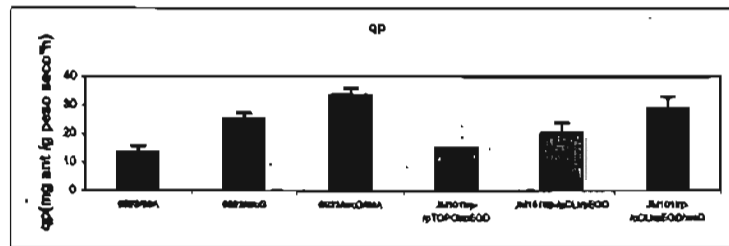


Fig 40. Comparación de la productividad alcanzada por las cepas que portan el plásmido pCLtrpEGD.

El rendimiento alcanzado por la cepa JM101trp/pCLtrpEGD fue de 90.98 mg ant/g gluc, la cepa para JM101trp/pCLtrpEGD/ *aroG^{br}* alcanzo un rendimiento de 119.52 esto es 34% con respecto al máximo teórico.

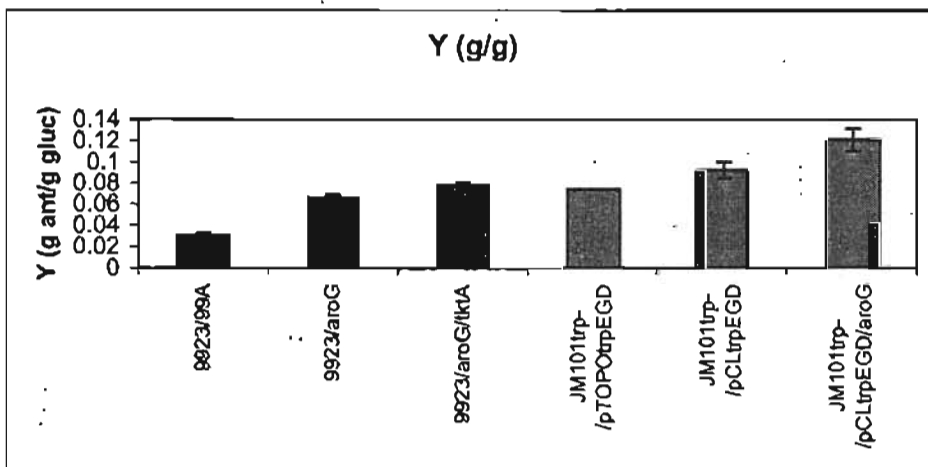


Fig 41. Comparación del rendimiento alcanzado por las cepas que portan el plásmido pCLtrpEGD.

8.10 Determinación de la actividad de la enzima antranilato sintasa en la cepa silvestre 9923 y las cepas que sobreexpresan los genes que codifican para la enzima antranilato sintasa en los distintos plásmidos construidos.

Anteriormente, se consideró que los problemas de crecimiento, en las cepas que sobreexpresan los genes que codifican para la enzima antranilato sintasa bajo promotores fuertes o en plásmidos con alto número de copias, eran producto del incorrecto plegamiento de dicha enzima causado por su alta producción, además de la carga metabólica generada. Esto se confirmó, al emplear promotores menos fuertes en plásmidos de bajo número de copias, ya que se eliminó el problema del crecimiento, y se lograron aumentos en las productividades alcanzadas.

Con el propósito de poder determinar si existe una correlación entre la fuerza del promotor, el número de copias de los vectores empleados para expresar los genes *trpEGD* y los niveles de producción de antranilato, se determinó la actividad enzimática en cada cepa que la expresa en distintos niveles. Este análisis también podría contribuir a establecer si un alto nivel de expresión de los genes *trpEGD* favorece un plegamiento incorrecto de la enzima antranilato sintasa.

Tabla 15. Actividades enzimáticas

| Cepa | Plásmido/Promotor Enzima antranilato sintasa | Actividad ($\mu\text{mol ant/min mg prot}$) |
|---------------------------------------|--|--|
| 9923/99A | Cromosoma / <i>P_{trp}</i> | 0.15 \pm 0.01 |
| 9923/pTrc <i>trpEGD</i> | pTrc (alto no. de copias) / <i>P_{trc}</i> | 0.36 \pm 0.029 |
| JM101 <i>trp</i> | ausente | -0.00021 \pm 0.0002 |
| JM101 <i>trp</i> /pTOPO <i>trpEGD</i> | pTOPO (alto no. de copias) / <i>P_{trp}</i> | 0.83 \pm 0.11 |
| JM101 <i>trp</i> /pCL <i>trpEGD</i> | pCL (bajo no. de copias) / <i>P_{trp}</i> | 1.1709 \pm 0.13 |

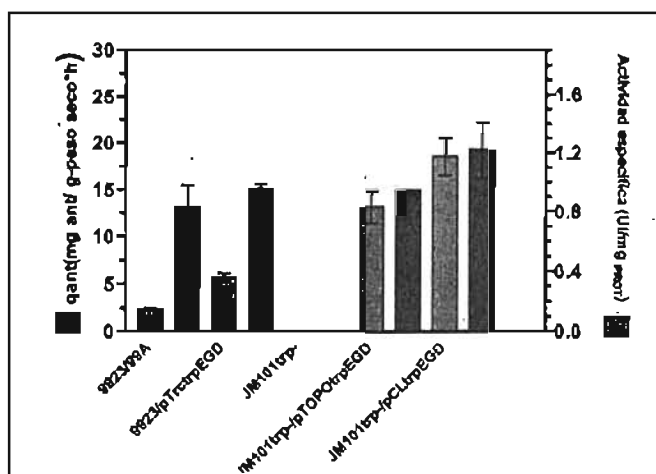


Fig 42. Relación entre actividad enzimática y productividad de antranilato en las distintas cepas.

Como se muestra en la figura 42, al tener una menor expresión de los genes que codifican para la enzima antranilato sintasa, se logró una mayor actividad. Esto demuestra que cuando se expresan fuertemente los genes *trpEGD*, una parte de la enzima producida no presenta actividad. Sin embargo, aunque se logró tener niveles mucho mayores de actividad, no se observó el mismo efecto sobre las productividades alcanzadas, sugiriendo, que en estas condiciones la enzima antranilato sintasa no es el paso limitante. La velocidad máxima se alcanza cuando la concentración de sustrato es tan grande, que esencialmente toda la enzima en el sistema esta presente como complejo enzima-sustrato (Lehninger 1976). En nuestro caso, se logró aumentar la cantidad de enzima, pero al parecer, los sustratos ya no fueron suficientes para lograr su saturación, convirtiéndose así en el factor limitante de la síntesis de antranilato.

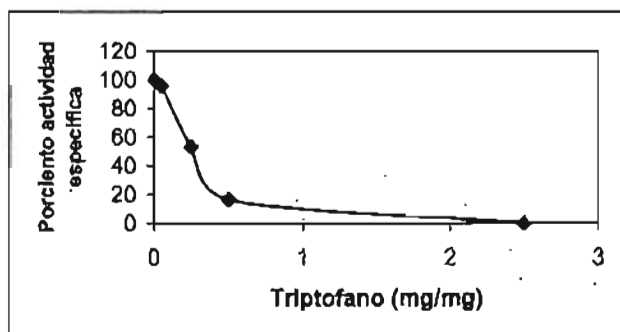


Fig 43. Inhibición alostérica de la enzima antranilato sintasa por triptofano en la cepa 9923/99A.

En la figura 43 se grafica el porcentaje de actividad antranilato sintasa a distintas concentraciones de triptofano en el medio de reacción, con este experimento se demostró que la enzima codificada por los genes *trpEGD₉₉₂₃*, sigue siendo sensible a inhibición alostérica por triptofano.

8.11 Efecto de la introducción del plásmido que contiene los genes *antABC* sobre la capacidad de producir Catecol en la cepa *W3110trpD9923* y *W3110trpD9923/aroG^{br}/tklA*.

Una vez teniendo una cepa productora de antranilato bien caracterizada, se transformó con el plásmido pTrc*ant3* que porta los genes que codifican para la enzima antranilato dioxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa*, que se sabe en este microorganismo transforma el antranilato a catecol y se esperaba que pudiera hacerlo con el antranilato endógeno producido en *E. coli*. Se utilizaron cultivos en matraz con medio de cultivo mínimo M9 suplementado con 10 g/l de glucosa, Ap²⁰⁰ e IPTG 1mM.

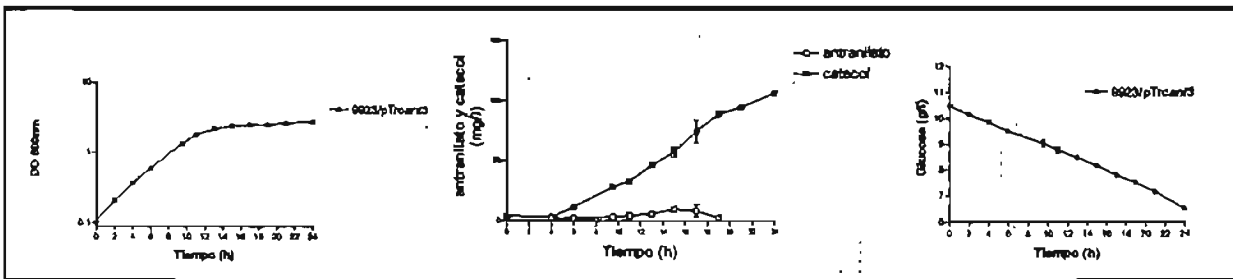


Figura 44. Caracterización de la cepa *E. coli* 9923/ant3.

Con este experimento se demostró que los genes *antABC* de *Pseudomonas aeruginosa* le permiten a *E. coli* sintetizar catecol a partir de antranilato endógeno. El rendimiento teórico de catecol a partir de antranilato es de 1 mol/mol (0.80 g/g). Tomando en cuenta que la cepa 9923 produce 128 mg/l de antranilato, y que la cepa 9923/ant3 acumuló 106 mg/l de catecol, y además no se observó antranilato al final del cultivo, se puede decir que, en estas condiciones, se tienen rendimientos del 100% de catecol a partir de antranilato (Fig. 44).

La sobreexpresión de los genes *aroG^{br}* y *tklA* en la cepa 9923 logró un aumento del 160 % y 130% sobre la productividad y el rendimiento de antranilato a partir de glucosa. Los genes *ant3* se transformaron en esta cepa sobreproductora de antranilato para analizar el efecto de la sobreexpresión de los genes *aroG^{br}* y *tklA* sobre la capacidad de producir catecol a partir de glucosa (Fig. 45).

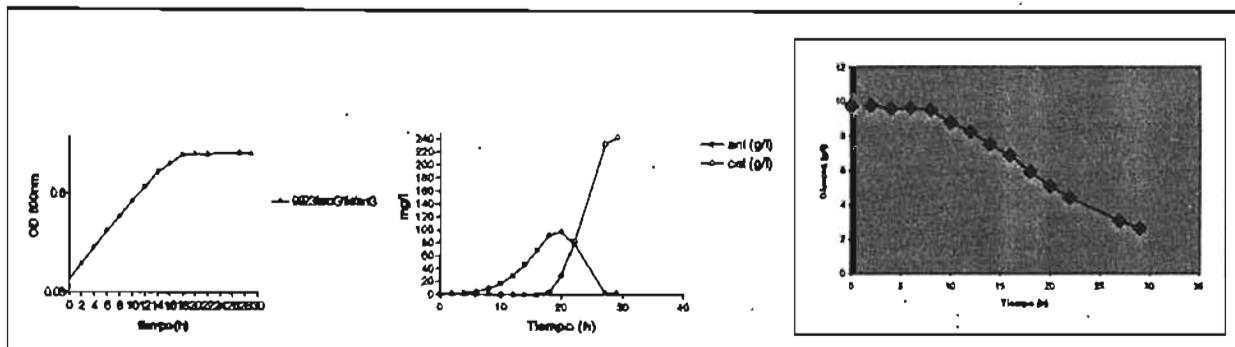


Figura 45. Caracterización de la cepa *E. coli* 9923/*aroG^{br}*/*tklA*/*ant3*.

Como se observa en la figura 45, la cepa 9923/*aroG^{br}*/*tklA*/*ant3* tampoco acumula antranilato al final del cultivo, lo que indica que el 100% es convertido a catecol.

En la tabla 15 se hace una comparación entre las cepas 9923/*ant3* y 9923/*aroG^{br}*/*tklA*/*ant3*, la sobreexpresión de los genes *aroG^{br}* y *tklA* incremento significativamente el flujo de carbono hacia la síntesis de catecol. Esto se vio reflejado en el incremento de la productividad de 5.2 en la cepa 9923/*ant3* a 32.10 mg catecol/g peso secoxh en la cepa 9923/*aroG^{br}*/*tklA*/*ant3* y un incremento del 100% en el rendimiento.

Tabla 16. Comparación de las cepa 9923/*ant3* y 9923/*aroG^{br}*/*tklA*/*ant3*

| Cepa | | 9923/ <i>ant3</i> | 9923/ <i>aroG^{br}</i> / <i>tklA</i> / <i>ant3</i> | Relación (aroG ^{br} /99A) |
|-------------------|---|-------------------|--|---------------------------------------|
| | Biomasa alcanzada (g/l) | 1.215 | 0.91 | 0.75 |
| | Catecol acumulado (mg/l) | 106.46 | 232.94 | 2.2 |
| | Y (mg catecol /g-peso seco) | 86 | 255.93 | 2.96 |
| Fase Estacionaria | q _{cat} (mg catecol/g peso secoxh) | 5.2 | 32.03 | 6.15 |
| | q _{gluc} (g gluc/g-peso seco x h) | 0.16 | 0.47 | 2.9 |
| | Yp/s (mg cat/g gluc) | 31.25 | 64.79 | 2.07 |

Es importante señalar, que en este trabajo se generaron las primeras cepas de *E. coli* sobreproductoras de antranilato, además, se sentaron las bases para que se lleven a cabo estudios que conduzcan a mejorar las cepas obtenidas. Adicionalmente, se demostró que mediante la introducción de los genes heterólogos de *Pseudomonas aeruginosa* estas cepas son capaces de producir catecol a partir del antranilato generado.

9. CONCLUSIONES

- a) Concentraciones de 1 g/l de catecol y 2.5 g/l de antranilato, afectan drásticamente el crecimiento de la cepa W3110.
- b) La cepa W3110trpD9923 acumula antranilato naturalmente ya que la mutación presente en dicha cepa generó la inactivación de la actividad fosforibosil transferasa (TrpD), pero no la de antranilato sintasa (TrpEG) permitiendo así la producción de antranilato y no su consumo, dando como resultado su acumulación.
- c) La mutación presente en la cepa W3110trpD9923 consiste en un cambio de base de G por T y la inserción de una A al inicio de *trpD* generando un codón de término que provoca la obtención de una proteína TrpD trunca no funcional de 7 aminoácidos de longitud.
- d) La sobreexpresión de los genes *aroG^{fbr}* y *tktA* incrementa significativamente el flujo de carbono hacia la síntesis de antranilato. La sobreexpresión conjunta de los genes *tktA* y *aroG* generó aumento de 160 y 130% sobre la productividad y el rendimiento respectivamente.
- e) La enzima antranilato sintasa codificada por los genes *trpEGD* de la cepa W3110trpD9923, sigue siendo sensible a inhibición alostérica por triptofano.
- f) La clonación de los genes *trpEGD* bajo el promotor fuerte *trc* en un plásmido de alto número de copias pTrc99A, no resultó una buena estrategia para lograr un aumento de la actividad antranilato sintasa, ya que al parecer la proteína producida es tóxica y se genera una carga metabólica alta.
- g) Al clonar los genes *trpEGD* bajo el promotor *trp* un promotor menos fuerte que *trc* en un plásmido de alto número de copias se logró transferir la actividad antranilato sintasa a la cepa JM101trp. El rendimiento alcanzado en esta cepa fue muy similar al logrado con la cepa 9923/*aroG/tktA* y 2.17 veces con respecto a la cepa 9923.
- h) Las cepas JM101trp/pTOPOtrpEG que expresan los genes *aroG^{fbr}* y *tktA*, no crecen en medio mínimo M9, probablemente debido a la carga metabólica generada.
- i) Con la clonación de los genes *trpEGD* bajo el promotor *trp* en un plásmido de bajo número de copias pCL1020, se logró que la cepa JM101trp/pCLtrpEGD alcanzara rendimientos mayores a la cepa 9923/*aroG^{fbr}/tktA*, también se logró disminuir la carga metabólica, con lo que se pudo sobreexpresar exitosamente el gen *aroG^{fbr}*, con lo cual, se lograron rendimientos del 34% con respecto al máximo teórico.

- j) Con una menor expresión de los genes que codifican para la enzima antranilato sintasa, se logró una mayor actividad, lo que confirmó que cuando se expresan fuertemente los genes *trpEGD*, una parte de la enzima producida no presenta actividad. aunque se logró tener niveles mucho mayores de actividad, no se observó el mismo efecto sobre las productividades alcanzados, sugiriendo, que en estas condiciones la enzima no se encuentra saturada.
- k) Las cepas 9923 y 9923/*aroG^{br}/tltA* transformadas con el plásmido pTrcant3 tienen la capacidad de producir catecol a partir de glucosa con rendimientos del 100% a partir de antranilato.

10. PERSPECTIVAS

- Generar una versión mutante de la enzima antranilato sintasa insensible a inhibición alostérica y transcripcional por triptofano. El hecho de que la enzima antranilato sintasa sea sensible a inhibición por triptofano, limita las condiciones de cultivo, el generar una enzima insensible a inhibición podría permitir el uso de medios que favorecieran un mejor crecimiento sin afectar la actividad enzimática.
- Transformar y caracterizar la cepa PB12trp-/pCLtrpEGD/aroG^{fb}. Se ha demostrado que las cepas PB12 (PTS⁻ Gluc⁺), tienen el potencial para la síntesis de compuestos aromáticos con un alto rendimiento a partir de glucosa, con el empleo de dichas cepas se espera alcanzar rendimientos del doble de los alcanzados con la cepa JM101trp⁻.
- Transformar las cepas JM101trp-/pCLtrpEGD/aroG^{fb} y PB12trp-/pCLtrpEGD/aroG^{fb} con el plasmido pTrcant3 y evaluar su capacidad para producir catecol. Se demostró que las cepas 9923/pTrcant3 y 9923/aroG^{fb}/tktA/pTrcant3, tienen rendimientos del 100% de catecol a partir de antranilato, así que resulta de interés transformar las mejores cepas productoras de antranilato con el plasmido pTrcant3 y evaluar su capacidad para producir catecol.
- Construir el plásmido pJLBaroG^{fb}/tktA, con la finalidad de poder sobreexpresar el gen que codifica para la enzima trascetolasa en las cepas sobreproductoras de antranilato que expresan los genes *trpEGD* en el plásmido pCLtrpEGD incompatible con el plásmido pCLtktA.
- Realizar la determinación de los intermediarios en la ruta de síntesis de aromáticos para identificar posibles puntos de control que estén limitando el flujo hacia la producción de antranilato.