



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

**PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS  
BIOQUIMICAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA CELULAR Y BIOCATALISIS**

**EFFECTO DE LA INHIBICION DE ACTIVIDADES  
ENZIMATICAS QUE CONSUMEN FOSFOENOLPIRUVATO  
(PEP) SOBRE LA CAPACIDAD DE SINTESIS DE  
SHIKIMATO EN *Bacillus subtilis***

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

**Ing. B. Cuauhtémoc Licona Cassani**

**DIRECTOR DE TESIS: Guillermo Gosset Lagarda**



**CUERNAVACA, MORELOS AGOSTO 2008**

Al Dr. Guillermo Gosset, por darme la oportunidad de participar en su grupo de investigación fomentando un ambiente de trabajo armónico y cordial.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

A los Dr. Ricardo Oropeza, Dr. Miguel Ángel Cevallos, Dr. Mario Soberón y la Dra. Cinthia Núñez por sus acertadas críticas a este trabajo.

A la M. en C. Georgina Hernández Chávez por el apoyo técnico recibido en el manejo y análisis de muestras de HPLC

A C. D. Mercedes Enzaldo Cruz por el apoyo técnico recibido en la preparación de medios de cultivo y materiales para la realización de este trabajo.

Al Dr. Francisco Barona por su orientación, apoyo, y críticas a este trabajo.

A todos y cada uno de los integrantes del laboratorio Bolívar/Gosset por formar un grupo de investigación cordial, con un ambiente de respeto y compañerismo.

A la M. en C. Natividad Cabrera por brindarme sus conocimientos, compañía y orientación durante mi estancia en el laboratorio.

A mis amigos fuera del laboratorio Eugenio, José, Sergio, Omar, Mariana, Pol, Ric, Jalis, Daniela, Gilda y todos integrantes de la reven y ruca banda.

A mis padres Juan M. Licon Valencia y A. Patricia Cassani Galindo por acompañarme una vez más en esta etapa de mi vida compartiendo su orientación, su incansable apoyo y sobre todo por brindarme el calor y amor de un núcleo familiar inmejorable.

A mis hermanos Tona y Cintli, por mostrar apoyo y comprensión en todo momento y ante cualquier circunstancia.

A mis entrañables amigos Víctor y Fernando por acompañarme hombro a hombro durante la mayor parte de mi vida, por su apoyo, por su comprensión y los ánimos recibidos en los peores momentos.

A ti, porque a pesar de la distancia eres la personita que siento más cerca de mi, gracias Tanny.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE TABLAS.....	10
ABREVIATURAS.....	11
1. RESUMEN.....	12
2. INTRODUCCIÓN.....	14
2.1 Gripe aviar y Tamiflu®.....	14
2.2 Ingeniería de Vías Metabólicas (IVM).....	16
2.3 Compuestos Aromáticos.....	19
2.4 Ácido Shikímico.....	19
2.5 Biosíntesis de Aminoácidos Aromáticos (Vía del shikimato).....	20
2.6 Regulación de la actividad enzimática en la vía de síntesis de compuestos aromáticos en <i>B. subtilis</i> .....	22
2.7 Estrategias de IVM para incrementar la producción de Aminoácidos Aromáticos.....	24
2.8 Aumento de flujo de carbono dentro de la vía de biosíntesis de compuestos aromáticos.....	25
2.9 Incremento de la disponibilidad de precursores del metabolismo central.....	25
2.9.1 Aumento de la disponibilidad de E4P.....	25
2.9.2 Aumento de la disponibilidad de PEP.....	26
2.9.3 El sistema de Transporte de Azúcares (PTS).....	27
2.10 Comparación entre <i>B. subtilis</i> y <i>E. coli</i> como sistemas para la producción de aromáticos.....	28
2.10.1 Diferencias en la estructura del Metabolismo Central entre <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i> .....	29
2.10.1.1 Formación de Fosfoenolpiruvato (Piruvato cinasas).....	30
2.10.2 Diferencias Fisiológicas.....	30
3. ANTECEDENTES.....	32
3.1 Estrategias de IVM para la producción de shikimato.....	32
3.1.1 IVM dentro del metabolismo central para la producción de shikimato.....	32
3.2 Producción de shikimato en <i>B. subtilis</i> .....	33
3.2.1 Inactivación de la piruvato cinasa en <i>B. subtilis</i> .....	34
3.2.2 Modificaciones en el metabolismo central en cepas de <i>B. subtilis</i> .....	34

4. HIPÓTESIS.....	36
5. OBJETIVOS.....	37
5.1 Objetivo General.....	37
5.2 Objetivos Específicos.....	37
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
6.1 Generación de cepas de <i>B. subtilis</i> que carezcan de la actividad de shikimato cinasa ( <i>aroI</i> ).....	39
6.1.1 Construcción del vector pLox_IR_IL.....	39
6.1.2 Inactivación del gen <i>aroI</i> .....	41
6.2 Determinación del rendimiento y producción de shikimato a partir de glucosa en las cepas generadas.....	41
6.2.1 Cultivos de Células en Reposo.....	41
6.3 Evaluación de la cepa con mejores características para producción de shikimato en un sistema lote y lote alimentado.....	43
6.4 Generación de cepas de <i>B. subtilis</i> que sobreexpresan el gen <i>aroA</i> que codifica para la enzima DAHP sintasa.....	44
6.4.1 Construcción del plásmido pHCMC05_aroA.....	44
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
7.1 Generación de cepas de <i>B. subtilis aroI</i> en distintos fondos genéticos.....	46
7.1.1 Construcción del cassette de inactivación en el plásmido pLox-Spec.....	46
7.1.2 Inactivación del gen <i>aroI</i> en cepas de <i>B. subtilis</i> 168 con distintas modificaciones en el metabolismo central.....	47
7.1.3 Efectos fisiológicos generales de la inactivación del gen <i>aroI</i> en cepas de <i>B. subtilis</i> 168.....	51
7.2 Caracterización y determinación de parámetros de producción de shikimato, subproductos y productos de fermentación en las cepas construidas...	52
7.2.1 Caracterización de las cepas construidas en cultivos de células en reposo.....	52
7.2.1.1 Cepa CLC58-168.....	52
7.2.1.2 Cepa CLC6-PYKA.....	54
7.2.1.3 Cepa CLC2-PTS.....	57
7.2.2 Constantes de producción de las cepas construidas.....	59

7.3 Evaluación de la cepa con mejores características para producción de shikimato en un sistema en lote y lote alimentado.....	60
7.4 Generación de cepas de <i>B. subtilis</i> que sobreexpresan el gen <i>aroA</i> que codifica para la enzima DAHP sintasa.....	66
8. CONCLUSIONES.....	68
9. PERSPECTIVAS.....	69
10. ANEXOS.....	70
11. BIBLIOGRAFIA.....	78

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1.-</b> Estructura química del shikimato.....	20
<b>Figura 2.-</b> Vía del shikimato en <i>B. subtilis</i> . ....	21
<b>Figura 3.-</b> Vía del shikimato y vía de biosíntesis de aminoácidos aromáticos en <i>B. subtilis</i> .....	23
<b>Figura 4.-</b> Mapa de distribución de carbono en el nodo de PEP en <i>Escherichia coli</i> .....	28
<b>Figura 5.-</b> Esquema del metabolismo central de <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i> .....	30
<b>Figura 6.-</b> Mapa de la región blanco para la inactivación del gen <i>aroI</i> ;.....	40
<b>Figura 7.-</b> Fórmulas para calcular rendimientos, tasa de generación de producto y tasa de consumo de sustrato para cultivos de células en reposo.....	43
<b>Figura 8.-</b> (A) Plásmido pLox_IR_IL construido. (B) Evento de doble recombinación entre las regiones clonadas del plásmido con las regiones adyacentes al gen <i>aroI</i> en el cromosoma de <i>B. subtilis</i> .....	46
<b>Figura 9.-</b> (A) gel agarosa 1%; digestión del plásmido pLox_IR_IL (EcoRI/Spel). (B) gel agarosa 1%; amplificación por PCR del cassette de inactivación de <i>aroI</i> en las cepas (1) CLC6-PYKA; (2) CLC58-168 (3) CLC2-PTS; (4) <i>B. subtilis</i> 168 (control negativo); (5) amplificación del cassette del plásmido pLox_IR_IL (control positivo).....	47
<b>Figura 10.-</b> Caracterización fenotípica de la cepa CLC58-168.....	50
<b>Figura 11.-</b> Crecimiento de las cepas <i>B. subtilis</i> 168, <i>B. subtilis aroI</i> y <i>B. subtilis aroB</i> en medio rico utilizado para cultivos de células en reposo.....	52
<b>Figura 12.-</b> Acumulación de shikimato, DAHP y DHS para la cepa CLC58-168 en cultivos de células en reposo con 8 g/L de glucosa.....	53
<b>Figura 13.-</b> Acumulación de ácidos orgánicos (Láctico, Acético y Acetoína); consumo de glucosa y comportamiento de la biomasa en los cultivos de células en reposo (con 8 g/L de glucosa) para la cepa CLC58-168.....	54
<b>Figura 14.-</b> Acumulación de shikimato, DAHP y DHS para la cepa CLC6-PYKA en cultivos de células en reposo con 8 g/L de glucosa.....	55
<b>Figura 15.-</b> Acumulación de ácidos orgánicos (Acético y Acetoína); consumo de glucosa y comportamiento de la biomasa en los cultivos de células en reposo (con 8 g/L de glucosa) para la cepa CLC6-PYKA.....	56

<b>Figura 16.-</b> Acumulación de shikimato, DAHP y DHS para la cepa CLC6-PYKA en cultivos de células en reposo con 8 g/L de glucosa.....	58
<b>Figura 17.-</b> Consumo de glucosa y comportamiento de la biomasa en los cultivos de células en reposo (con 8 g/L de glucosa) para la cepa CLC2-PTS.....	58
<b>Figura 18.-</b> Acumulación de shikimato en las cepas generadas en cultivos de células en reposo.....	61
<b>Figura 19.-</b> Acumulación de shikimato con respecto al tiempo para las cepas CLC6-PYKA y CLC58-168 en un cultivo lote con 45g/L de glucosa.....	62
<b>Figura 20.-</b> Consumo de glucosa y comportamiento de la concentración de biomasa para las cepas CLC6-PYKA y CLC58-168 en un cultivo lote con 50 g/L de glucosa.....	62
<b>Figura 21.-</b> Acumulación de shikimato con respecto al tiempo para las cepas CLC6-PYKA bajo distintas condiciones de cultivo.....	65
<b>Figura 22.-</b> Concentración de biomasa de la cepa CLC6-PYKA en los sistemas lote y lote alimentado.....	65
<b>Figura 23.-</b> (A) Vector construido para la expresión del gen <i>aroA</i> en cepas de <i>B. subtilis</i> . (B) gel agarosa 1% en donde se muestra la liberación del fragmento clonado (gen <i>aroA</i> ) en el plásmido pHCMC05.....	66



## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Parámetros de producción de shikimato en cepas de *B. subtilis aro116*.....33

**Tabla 2.-** Oligonucleótidos utilizados para la inactivación del gen *aro1* en *B. subtilis*.....38

**Tabla 3.-** Nombre y genotipo de cepas utilizadas y construidas en este trabajo.....38

**Tabla 4.-** Tasa específica de crecimiento de las cepas generadas.....55

**Tabla 5.-** Parámetros de producción de shikimato de las cepas construidas.....60

## 1. RESUMEN

El shikimato es un compuesto de gran importancia farmacéutica debido a que es utilizado como materia prima para la síntesis del antiviral más comercializado contra el virus causante de la gripe aviar (H5N1). Actualmente, el shikimato se obtiene mediante extracción de frutos de una planta de origen chino (*Illicium verum*), sin embargo, la fuente de extracción disponible resulta insuficiente para abastecer a la población mundial en caso de una pandemia. Ante esta situación, distintos esfuerzos se han realizado para modificar, por medio de Ingeniería de Vías Metabólicas (IVM), el metabolismo de enterobacterias como *Escherichia coli*, de manera que proveyendo la materia prima suficiente (glucosa), se pueda producir mediante fermentación el compuesto de interés. A partir de la secuenciación del genoma de *Bacillus subtilis* y de estudios sobre su fisiología, se ha encontrado que su arquitectura metabólica, específicamente en el nodo de fosfoenolpiruvato (PEP), está dispuesta de manera tal que la inactivación del gen que codifica la enzima piruvato cinasa provoca una acumulación de PEP 30 veces mayor que la reportada en cepas mutantes de *E. coli* isogénicas; teniendo en cuenta estas características y que no existe reporte alguno de la generación de cepas de *B. subtilis* diseñadas para la producción de compuestos aromáticos, el presente trabajo utiliza cepas de *B. subtilis* con modificaciones en el metabolismo central ( $pykA^-$  y  $PTS^-$ ) para evaluar su efecto sobre la producción de shikimato. Para lograr el objetivo, en nuestro laboratorio se generaron cepas mutantes que carecen de actividad de piruvato cinasa ( $pykA^-$ ) y el sistema de fosfotransferasa ( $PTS^-$ ) (Cabrera V, *et. al.*, artículo en escritura). En dichas cepas se inactivó el gen *arol* que codifica para la enzima shikimato cinasa para dar lugar a las cepas CLC6PYKA ( $\Delta pyk, arol::pLoxspc$ ) y CLC2PTS ( $\Delta pts, arol::pLoxspc$ ); se determinaron los rendimientos y las constantes de producción de shikimato utilizando cultivos de células en reposo y un sistema de detección de metabolitos adecuado (HPLC). Es importante señalar que la cepa utilizada como control (*B. subtilis arol*), muestra acumulación de shikimato, resultado que no se observa en cepas de *E. coli* con las mismas modificaciones genéticas. La cepa CLC6PYKA muestra una  $q_p$  (tasa de generación de producto) y  $Y_{p/s}$  (rendimiento de producto

con respecto a sustrato) 1.38 y 1.58 veces mayor que la que muestra la cepa control respectivamente; del mismo modo la cepa CLC2PTS, en la que esta inactivado el sistema principal de transporte de glucosa, muestra un rendimiento 1.44 veces mayor que la cepa control aunque no una mayor  $q_p$ . Al evaluar la cepa CLC6PYKA en un cultivo lote, se alcanza un título final de shikimato de 6.7 g/L, a partir de 83 g/L de glucosa, observando que sus parámetros de producción ( $q_p$ ,  $Y_{p/s}$ ) no cambiaron significativamente con respecto a lo observado en cultivos de células en reposo. Como conclusión y con base en los resultados obtenidos, postulamos a la cepa CLC6PYKA como aquella con las mejores características para el desarrollo de un proceso biotecnológico para la producción de shikimato.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Gripe aviar y Tamiflu®

Desde la pandemia de influenza reportada en 1918, en la cual fueron reportadas aproximadamente 50 millones de muertes, dependencias como la Organización Mundial de la Salud (OMS) realizan esfuerzos destinados a prevenir la siguiente pandemia que, según se pronostica puede tener efectos devastadores en todo el mundo (Monto S. A. and Whitley R. J, 2008).

La gripe aviar, también conocida como la gripe del pollo, es un tipo de influenza provocada por el virus H5N1 principalmente. La alta tasa de mortalidad asociada a la infección de este virus ha posicionado a esta enfermedad como uno de los principales candidatos de causa de una futura pandemia en el mundo. Como consecuencia a este factor principalmente, en la industria farmacéutica se han incrementado notablemente los esfuerzos para el desarrollo de vacunas y antivirales (Stephenson I, *et. al.*, 2004).

La OMS, reporta en un periodo de 4 años (2003-2007) 202 muertes de un total de 330 casos de personas infectadas por el virus H5N1. A pesar de la capacidad de contagio de este virus (pollo-hombre), los focos de infección han sido controlados reportándose brotes de gripe aviar en países como Indonesia, Tailandia, China, Hong Kong, Egipto, Pakistán, Vietnam, entre otros (Monto S. A. and Whitley R. J, 2008). Dada la amenaza que representa esta enfermedad en generar una pandemia los recursos económicos destinados al desarrollo de una vacuna y medicamentos profilácticos han incrementado en años recientes de 15 millones de dólares en el 2001, a 215 millones de dólares en el 2007 según el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas de Estados Unidos (Monto S. A. and Whitley R. J, 2008).

Hasta la fecha se han reportado 4 distintos antivirales contra influenza, 2 de los cuales son bloqueadores de canales M2 (amantidina y rimantadina, efectivos contra influenza tipo A) y 2 inhibidores de neuraminidasa (oseltamivir y zanamivir, efectivos contra influenza tipo A y B). Los antivirales bloqueadores de canales M2 tienen el problema de generación de una alta tasa de cepas resistentes espontáneas, por lo cual los antivirales de mayor uso han sido los inhibidores de neuraminidasa, específicamente el oseltamivir (Deyde V. M, *et. al.*, 2007; Beigel J, and Bray M, 2008).

El fosfato de oseltamivir, comercialmente conocido como Tamiflu<sup>®</sup>, es el fármaco mas utilizado contra gripe aviar; la farmacéutica Gilead Sciences Inc. es dueña de la patente y en el año de 1996 se concesionó para su venta y comercialización en todo el mundo a los laboratorios Hoffman-La Roche. La síntesis química de Tamiflu<sup>®</sup> comprende una serie de 10 pasos principales (ver anexo I), y desde su síntesis hasta generar un stock, una vez teniendo las materias primas disponibles, se estima aproximadamente un tiempo de 6 a 8 meses (Factsheet Tamiflu, ©La Roche Group, 2006).

Como se puede observar en el anexo I, la síntesis de oseltamivir inicia a partir de una molécula de ácido shikímico y después de una serie de reacciones químicas se logra la síntesis del compuesto inhibidor de neuraminidasas. El rendimiento de la reacción química global de oseltamivir a partir de shikimato es de aprox 23%, por lo que, para fabricar suficiente cantidad de ingrediente activo, se requiere tener gran cantidad de shikimato disponible (Factsheet Tamiflu, ©La Roche Group, 2006).

Para la producción del antiviral, la farmacéutica Hoffman-La Roche utiliza dos métodos: El principal y el más antiguo es mediante la extracción de la vaina de una planta denominada comúnmente anís estrella (*Illicium verum*). La farmacéutica consume el 90% de la producción mundial de esta planta, especialmente de regiones montañosas al suroeste de china (Guanxi, Sichuan,

Yunnan y Guizhou) (Factsheet Tamiflu, ©La Roche Group, 2006). La producción de shikimato mediante fermentación bacteriana (segundo método), surge a la par de la preocupación de contagio masivo por gripe aviar; siendo el proceso convencional de extracción de shikimato de rendimiento relativamente pobre (30%) y la oferta de anís estrella insuficiente para la supuesta demanda en caso de pandemia.

Al igual que las plantas, las bacterias tienen la capacidad de sintetizar shikimato. Esto abre la posibilidad de modificarlas mediante Ingeniería de Vías Metabólicas (IVM) para convertirlas en productoras de este compuesto. De esta manera, se genera el potencial para poder producir una mayor cantidad de materia prima suficiente para abastecer de antiviral a la población mundial en caso de una pandemia de gripe aviar.

## **2.2 Ingeniería de Vías Metabólicas (IVM).**

Una vez establecidos ciertos procesos de producción para metabolitos de interés industrial, surge la necesidad de aumentar los niveles de producción más allá de lo que puede ofrecer el metabolismo nativo de la cepa productora. Bajo estas circunstancias, surge una disciplina enfocada a la generación de cepas productoras que permitan aumentar los rendimientos de producción de dichos procesos industriales.

La IVM se define como la modificación directa del metabolismo celular y sus propiedades, mediante la remoción, introducción y/o modificación de sus vías metabólicas utilizando técnicas de Biología Molecular.

La IVM se ha aplicado para la mejora de cepas microbianas empleadas en los procesos de producción de distintos metabolitos de interés industrial, como lo son ácidos orgánicos, los alcoholes, los aminoácidos, las vitaminas, los

antibióticos, los compuestos quirales, las proteínas de diagnóstico o terapéuticas y los biopolímeros (Lee S. Y. and Papoutsakis E. T, 1999).

En un principio, la generación de cepas productoras de compuestos como los aminoácidos y los antibióticos a nivel industrial, se realizaba mediante métodos de mutagénesis aleatoria por agentes químicos y/o físicos acompañados de procesos de selección. El desarrollo de tecnologías de ADN recombinante ha permitido la modificación de las vías metabólicas en puntos definidos y conocidos del metabolismo de una forma racional.

En el año de 1993, Cameron y Tong clasificaron las aplicaciones de la IVM en 5 grupos (Lee S. Y. and Papoutsakis E. T, 1999):

1.- Aumento de producción, a partir de glucosa, de metabolitos y otros biológicos que ya son producidos por el organismo hospedero, ejemplos clasificados dentro de este grupo incluyen la producción de etanol y ácido succínico por *E. coli*; de acetona y butanol producidos por *Clostridium acetobutylicum*; producción de L-lisina (L-lys), L-fenilalanina (L-phe), y de L-tirosina (L-tyr) por *Corynebacterium spp*; entre otros.

2.- Producción de metabolitos nuevos o modificados y otras biomoléculas que son nuevos al organismo; por ejemplo: producción de índigo, 1,3.propanodiol, octanoato por *E. coli* y xantana modificada por *Xanthomonas campestris*.

3.- Optimización de la utilización de sustratos para el crecimiento celular y la formación de producto; por ejemplo, producción de etanol a partir de xilosa por *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*, producción de L-trp a partir de sacarosa por *E. coli*.

4.-Diseño mejorado o nuevas vías metabólicas para la degradación de varios químicos, especialmente xenobióticos. Por ejemplo: degradación de mezclas de benceno, tolueno y xileno por *Pseudomonas putida*.

5.-Modificación de propiedades celulares que facilitan el bioproceso, como la recuperación del producto en las fermentaciones. Por ejemplo: el mejoramiento del crecimiento de *E. coli* y otros microorganismos bajo condiciones microaeróbicas, reducción de la producción de acetato en *E. coli* y la utilización de glucosa sin el consumo de fosfoenolpiruvato (PEP) en *E. coli*.

La aplicación de la Ingeniería de Vías Metabólicas para cualquier propósito se ayuda de 4 estrategias principales (Lee S. Y. and Papoutsakis E. T, 1999):

- a) La eliminación de vías que compiten por precursores con la vía metabólica de interés

La eliminación de vías competidoras se alcanza mediante la remoción o mutación de genes mediante inserción de secuencias no codificantes, preferentemente sin la generación de auxotrofías. Las mutaciones puntuales pueden ser revertidas si la actividad enzimática afectada no se pierde en su totalidad. Un punto importante aquí es la existencia de vías desconocidas que puedan activarse después de la eliminación de la vía principal.

- b) La desregulación alostérica de las enzimas dentro de la vía metabólica de interés.

La desregulación de enzimas se logra de igual manera mediante la mutación aleatoria seguida de una selección o si la estructura de la proteína y sus funciones están bien caracterizadas, mediante mutagénesis dirigida.

- c) La desregulación de promotores involucrados con la expresión de los genes que codifican para dichas enzimas.



La desregulación de promotores es comúnmente lograda mediante la sustitución de las secuencias reguladoras que lo conforman por otras que no son reguladas, esto se logra a través del análisis de las regiones de unión a factores de transcripción.

- d) La sobreexpresión de los genes que codifican para las enzimas claves de la vía metabólica involucrada.

La sobreexpresión de genes en la vía metabólica en estudio, es quizá el punto más importante dentro de los esfuerzos realizados en la IVM. Con la ayuda de las técnicas de clonación molecular, la sobreexpresión de genes en plásmidos ha llegado a ser relativamente fácil. Sin embargo, los efectos de la sobreexpresión de genes de plásmidos con gran número de copias deben de ser cuidadosamente caracterizados. La existencia de plásmidos en la célula en algunas ocasiones provoca perturbaciones significativas en el patrón metabólico. Del mismo modo la integración cromosómica vía bacteriófago o vía intercambio alélico son buenas alternativas cuando los niveles de expresión requieren ser controlados de una manera más precisa. Finalmente la sobreexpresión de proteínas por si misma crea una carga metabólica provocando una redistribución del flujo en el metabolismo central (Lee S. Y. and Papoutsakis E. T, 1999).

### **2.3 Compuestos Aromáticos.**

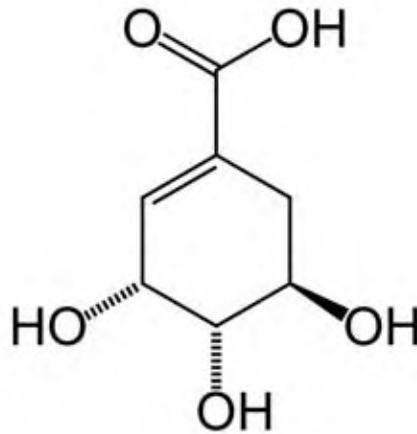
Dentro de los compuestos aromáticos, los aminoácidos aromáticos (L-triptófano, L-fenilalanina y L-tirosina) pertenecen al grupo de aminoácidos esenciales para el humano y para muchos otros mamíferos, por tal motivo, su principal aplicación radica en su uso como suplemento alimenticio. En principio, la producción industrial de aminoácidos aromáticos se realizaba mediante fermentaciones utilizando microorganismos como: *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium flavum*, *Bacillus subtilis* y *E. coli*. Las cepas productoras, como se mencionó anteriormente, se han generado

mediante técnicas convencionales de mutagénesis aleatoria acompañada de métodos de selección. A pesar de que por estos métodos se obtenían cepas mejoradas, el rendimiento de producción estaba muy alejado de aquel calculado teóricamente mediante balances de carbono en las vías metabólicas involucradas (Lee S. Y. and Papoutsakis E. T, 1999).

Además de los aminoácidos aromáticos, un gran número de compuestos aromáticos de importancia industrial se sintetizan como productos intermediarios en la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos. Algunos de los compuestos antes mencionados son los siguientes: ácido shikímico, utilizado como precursor de la síntesis de antivirales; shikimato-3 fosfato y 5-enol-piruvilshikimato-3-fosfato (EPSP) los que son considerados como precursores de dominios ciclohexano carboxilados de antibióticos (Hermann M. K. and Weaver L. M, 1999).

## **2.4 Ácido Shikímico.**

El ácido shikímico (Figura 1), mejor conocido por su forma aniónica o sal, shikimato, es un compuesto importante en plantas y microorganismos, su nombre se deriva de una planta japonesa denominada *Illicium verum* (shikimi) de la cual fue aislado por primera vez. Debido a su anillo carboxílico y a sus tres centros asimétricos, el ácido shikímico es un compuesto enantiomérico usado como materia prima para la síntesis de distintos biológicos. La importancia metabólica del ácido shikímico radica en que es precursor de los aminoácidos aromáticos, de algunos alcaloides y de lignina; del mismo modo, en la industria farmacéutica es utilizado como materia prima para la síntesis de herbicidas, de agentes antibacterianos y el antiviral inhibidor de neuraminidasa, conocido comercialmente bajo el nombre de Tamiflu<sup>®</sup> (usado para el tratamiento de influenza) (Johansson, *et. al.*, 2005; Hermann M. K. and Weaver L. M, 1999).



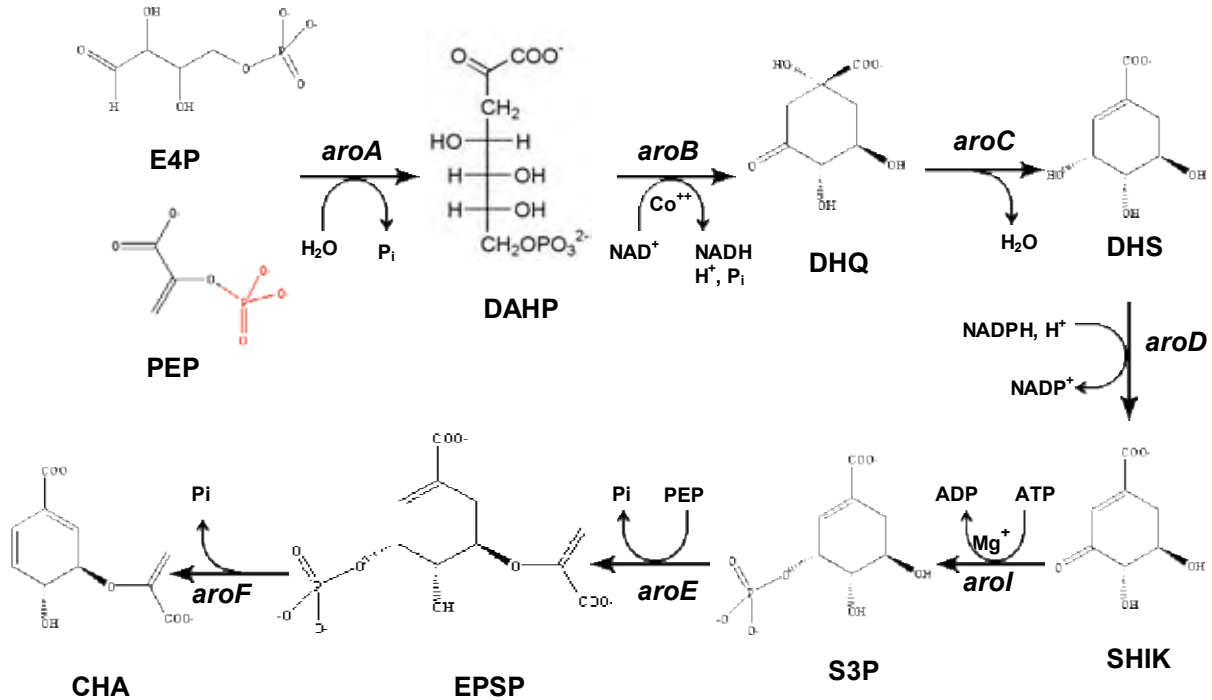
**Fig. 1.-** Estructura química del shikimato

## **2.5 Biosíntesis de Aminoácidos Aromáticos (Vía del shikimato)**

La vía del shikimato, descubierta por Davis y Sprinson hace 50 años, es la vía común que culmina con la síntesis de los aminoácidos aromáticos, esto a partir de un compuesto denominado corismato. Esta vía constituye una parte del metabolismo que solo se encuentra en plantas y en microorganismos. Se ha determinado que los intermediarios formados en la biosíntesis de corismato, son idénticos para todos los microorganismos; sin embargo, los genes y los operones involucrados se organizan y se regulan de manera diferente según la especie bacteriana (Chávez, *et. al.*, 2005).

Como se puede observar en la Figura 2, la vía del shikimato une las vías del metabolismo central a la vía de la biosíntesis de compuestos aromáticos. Esta vía inicia con la condensación de PEP (proveniente de la glucólisis) y E4P (proveniente de la vía de las pentosas fosfato) para generar DAHP, en una reacción catalizada por la enzima DAHP sintasa (en *B. subtilis*, producto del gen *aroA*). En algunas cepas de *B. subtilis*, esta enzima existe como proteína monofuncional, mientras que en otras se presenta como una enzima bifuncional,

es decir con actividad de DAHP sintasa y de corismato mutasa (Llewellyn, *et. al.*, 1980; Wu, *et. al.*, 2005).



**Figura 2.-** Vía del shikimato en *B. subtilis*. PEP, fosfoenolpiruvato; E4P, eritosa-4-fosfato; DAHP, 3-deoxi-D-arabino-heptulosonato 7-fosfato; DHQ, 3-dehidroquinato; DHS, 3-dehidroshikimato; SHIK, shikimato; S3P, shikimato 3-fosfato; EPSP, enolpiruvilshikimato 3-fosfato; CHA, corismato.

El segundo paso de la vía es la eliminación del fosfato de DAHP para generar 3-dehidroquinato (DHQ), la reacción es catalizada por la enzima DHQ sintasa (producto del gen *aroB*). El tercer paso de la vía es la deshidratación de DHQ para generar dehidroshikimato (DHS), reacción catalizada por la enzima DHQ deshidratasa (producto del gen *aroC*). La enzima Shikimato deshidrogenasa (producto del gen *aroD*), cataliza la cuarta reacción de esta vía, reduciendo DHS a shikimato; en bacterias como *E. coli* o *B. subtilis* la shikimato deshidrogenasa es una enzima dependiente de NADP. En plantas los pasos 3 y 4 son realizados por una enzima bifuncional DHQ deshidratasa-shikimato deshidrogenasa. En el quinto paso de la vía del shikimato, la shikimato cinasa (producto del gen *aroI*) cataliza la fosforilación específica del grupo 3-OH del shikimato en presencia de ATP, para

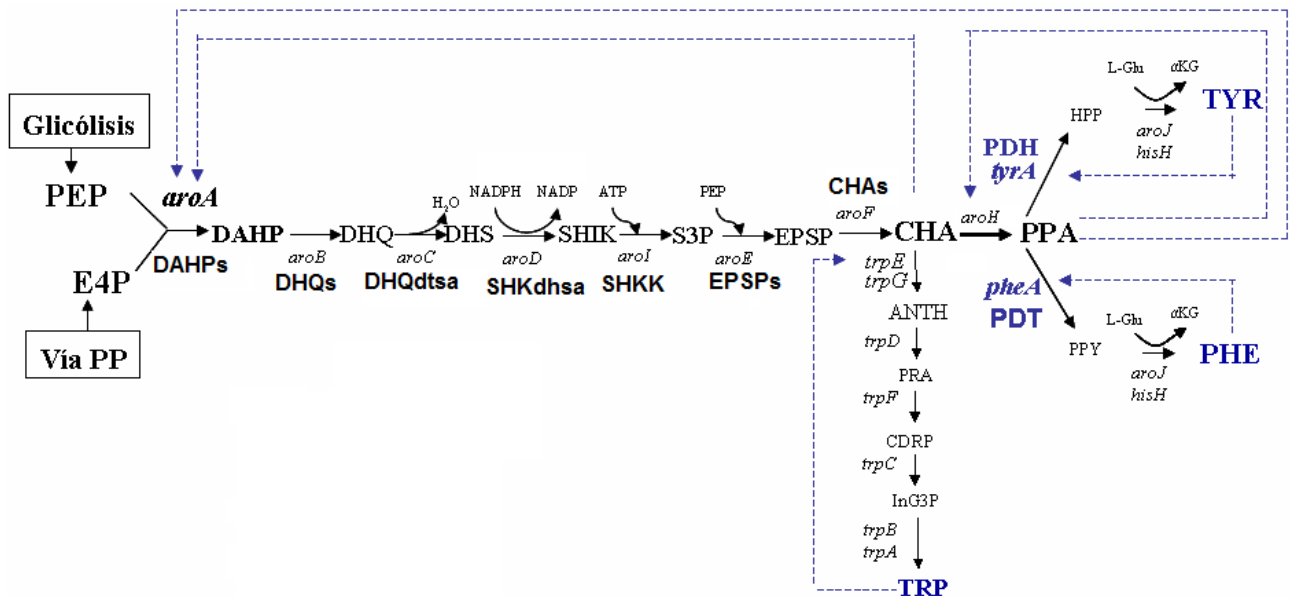
generar shikimato-3-P; en *E. coli*, existen 2 isoenzimas monoméricas para esta reacción, mientras que en *B. subtilis* se presenta como enzima única. En el sexto paso de la vía, una segunda molécula de PEP es condensada con shikimato-3 fosfato para generar EPSP y fosfato inorgánico, reacción catalizada por la enzima EPSP sintasa (producto del gen *aroE*). Por último, el séptimo paso de la vía es catalizada por la enzima corismato sintasa (producto del gen *aroF*), que cataliza la *trans*-eliminación del grupo fosfato de EPSP para generar corismato, en este paso se introduce el segundo de los 3 dobles enlaces del benceno (Hermann M. K. and Weaver L. M, 1999).

Las reacciones que continúan a partir del corismato conducen a la síntesis de los aminoácidos aromáticos; el aminoácido L-Trp se deriva de una serie de 5 reacciones que tienen como sustrato inicial el corismato, mientras que los aminoácidos L-Phe y L-Tyr se derivan a partir del intermediario prefrenato, sintetizado por la enzima corismato mutasa a partir de corismato.

## **2.6 Regulación de la actividad enzimática en la vía de síntesis de compuestos aromáticos en *B. subtilis*.**

Como se puede observar en la Figura 3, los principales puntos de regulación de la vía del shikimato en *B. subtilis* son los siguientes:

La primer enzima de la vía sujeta a regulación es aquella que se encuentra al inicio de la vía, la DAHP sintasa (*aroA*), la cual está regulada alostéricamente por los intermediarios corismato y prefrenato. Adicionalmente, dicha enzima al ser una metaloproteína, presenta inhibición por agentes quelantes. La inhibición es no competitiva con respecto a ambos sustratos, los cuales inhiben en un 50% la actividad de la enzima que puedan remover al metal necesario para la catálisis. En las bacterias como *E. coli*, esta enzima presenta inhibición alostérica por cada uno de los aminoácidos aromáticos (Jensen R. A. and Nester E. W, 1966; Jensen R. A. and Nester E. W, 1965).



**Figura 3.-** Vía del shikimato y vía de biosíntesis de aminoácidos aromáticos en *B. subtilis*. Las flechas punteadas representan inhibición alostérica en presencia de un exceso del compuesto intermediario de la vía en cuestión. PEP, fosfoenolpiruvato; E4P, eritosa-4-fosfato; DAHP, 3-deoxi-D-arabino-heptulosa-7-fosfato; DHQ, 3-dehidroquinato; DHS, 3-dehidroshikimato; SHIK, shikimato; S3P, shikimato 3-fosfato; EPSP, enolpiruvilshikimato-3-fosfato; CHA, corismato; PPA, prefenato; PPY, fenilpiruvato; HPP, 4-hidroxifenilpiruvato; PHE, L-fenilalanina; TYR, L-tirosina; ANTH, antranilato; PRA, 5-fosforibosil-antranilato; CDRP, 1-o-carboxifenilamino-1-deoxyribulosa-5-fosfato; InG3P, indol-3-glicerol fosfato; TRP, L-triptofano; DAHPs, DAHP sintasa; DHQs, Dehidroquinato sintasa; DHQdtsa, Dehidroquinato deshidratasa; SHKdhsa, shikimato deshidrogenasa; SHKK, shikimato cinasa; EPSPs, EPSP sintasa; CHAs, Corismato sintasa..

El fosfato inorgánico activa a la enzima DHQ sintasa (*aroB*) y requiere del cofactor NAD para llevar a cabo su actividad. La enzima EPSP sintasa presenta inhibición por el herbicida glifosato, el cual es un inhibidor competitivo del PEP.

Por último, la vía de síntesis de los aminoácidos aromáticos en *B. subtilis*, presenta los siguientes puntos de regulación:

La enzima antranilato sintasa, codificada por los genes *trpE* y *trpG*, presenta inhibición alostérica por el aminoácido L-Trp, mientras que la

acumulación de prefrenato inhibe alostéricamente a la enzima corismato mutasa, codificada por el gen *aroH*.

La enzima prefrenato deshidratasa, codificada por el gen *pheA*, presenta inhibición alostérica en presencia de L-Phe (Nester E. W. and Jensen R. A, 1966).

Los aminoácidos L-Phe y L-histidina inhiben la actividad de la enzima prefrenato deshidrogenasa a concentraciones 100 veces mayor que la concentración de L-Tyr requerida para lograr la misma inhibición (Nester., 1968).

## **2.7 Estrategias de IVM para incrementar la producción de Aminoácidos Aromáticos.**

Una característica inherente a los seres vivos, es su capacidad de regular la expresión de los genes y las enzimas de manera que se asegure la síntesis en cantidades adecuadas de cada componente celular. Para ello, es necesario, que la célula satisfaga la demanda de cierto metabolito sin alterar la función de vías metabólicas que comparten compuestos intermediarios dentro de la red metabólica; este balance se ha alcanzado a través de miles de años de evolución y de selección natural.

En disciplinas como la IVM, el propósito principal es destinar la mayor cantidad de recursos hacia la producción de un compuesto deseado sin generar un desequilibrio metabólico que le impida a la célula perder su viabilidad.

El metabolismo de una bacteria, está conformado por varios miles de reacciones enzimáticas, a través de las cuales sintetiza todos los componentes celulares que requiere para llevar a cabo su ciclo celular. Gran parte de las vías metabólicas, inician con uno o varios compuestos denominados precursores del metabolismo central, dentro de los cuales se encuentran la glucosa 6-fosfato, la fructosa 6-fosfato, la ribosa 5-fosfato, la eritrosa 4-fosfato, la triosa fosfato, la 3-fosfoglicerato, el PEP, el piruvato, el acetil CoA, el  $\alpha$ -cetoglutarato y el succinil

CoA. Para el caso de la vía de biosíntesis de compuestos aromáticos, los intermediarios importantes del metabolismo central son el PEP y E4P, debido a que, como se mencionó anteriormente, estos son los compuestos que alimentan la entrada de la vía.

Con base en lo anterior, las estrategias de Ingeniería de Vías Metabólicas para la síntesis de compuestos aromáticos, se han clasificado en dos grupos principalmente. Estrategias cuyo propósito principal, es incrementar la disponibilidad de precursores del metabolismo central (PEP y E4P) y aquellas encaminadas al incremento del flujo de carbono hacia la vía metabólica de interés.

## **2.8 Aumento de flujo de carbono dentro de la vía de biosíntesis de compuestos aromáticos.**

El incremento del flujo del carbono hacia el producto de interés se puede lograr mediante la sobreexpresión de las enzimas involucradas en la síntesis de compuestos intermediarios de la vía. Como se ha mencionado anteriormente, las estrategias destinadas a aumentar la disponibilidad de precursores del metabolismo central, no tienen efecto significativo por si solas sobre el aumento de la capacidad de síntesis de compuestos aromáticos, esto debido a la generación de un cuello de botella al inicio de la vía; de esta manera la combinación de estrategias involucradas en el aumento de la disponibilidad de precursores del metabolismo central, con cepas que sobreexpresan DAHP sintasa (primer enzima dentro de la vía) han mejorado significativamente los valores de producción de DAHP y su rendimiento con respecto a glucosa (Patnaik R. and Liao J. C, 1994).

Estudios enfocados a la sobreexpresión de enzimas como DAHP sintasa, han demostrado incrementar el flujo de carbono hacia la producción de compuestos aromáticos como L-Phe en *B. subtilis*. (Özçelik, *et. al.*, 2004)

## **2.9 Incremento de la disponibilidad de precursores del metabolismo central.**



### 2.9.1 Aumento de la disponibilidad de E4P.

La E4P es un compuesto intermediario de la vía de las Pentosas Fosfato, su disponibilidad dentro del metabolismo central, depende de la actividad de la enzima transcetolasa y la transaldolasa (producto de los genes *tktA* y *talB* respectivamente). El aumento de la síntesis de E4P, se alcanzó mediante la sobreexpresión de dichos genes, evaluando el efecto en la vía de síntesis de compuestos aromáticos como una medida indirecta del aumento en la disponibilidad de DAHP. Se ha demostrado en cultivos con glucosa como fuente de carbono y utilizando cepas de *E. coli* incapaces de metabolizar DAHP, que solo la sobreexpresión de la enzima transcetolasa y transaldolasa no aumenta la disponibilidad de dicho compuesto significativamente, sin embargo, utilizando cepas que sobreexpresan la enzima DAHP sintasa, sí se observa un aumento en la disponibilidad de DAHP aproximadamente 3.6 veces con respecto a cepas que solamente sobreexpresan DAHP sintasa y la cepa silvestre (Berry, 1996; Lu J. and Liao J. C, 1997).

En el año de 1994, Patnaik demostró que a independientemente de la sobreexpresión de la enzima transcetolasa, la cual genera mas E4P, la producción de DAHP aumenta en cepas que sobreexpresan *aroG<sup>fbr</sup>* (DAHP sintasa resistente a retroinhibición por aminoácidos aromáticos), alcanzando un rendimiento teórico máximo, por lo tanto, este dato indica la necesidad de incrementar la disponibilidad de PEP (Patnaik R. and Liao J. C, 1994).

### 2.9.2 Aumento de la disponibilidad de PEP.

La disponibilidad de PEP se ha logrado mediante varias estrategias. Por un lado se ha tratado de bloquear las vías metabólicas que consumen PEP, y por otro lado sobreexpresar las enzimas que lo producen.

Dentro de los esfuerzos destinados para el aumento de su síntesis se encuentra la sobreexpresión de la enzima PEP sintasa (PPS), que a partir de

piruvato sintetiza PEP. Se ha demostrado que la disponibilidad de DAHP se duplica en cepas de *E. coli* que sobreexpresan las enzimas PEP sintasa y DAHP sintasa, con respecto a la cepa que solo sobreexpresa esta última enzima (Patnaik R. and Liao J. C, 1994).

Entre las estrategias diseñadas para la inactivación de las vías que consumen PEP se encuentra la inactivación de la enzima PPC, encargada de la síntesis de oxaloacetato a partir de PEP. Las cepas de *E. coli* deficientes en la actividad de esta enzima se han utilizado para sobreproducción de L-Phe, sin embargo, bajo las condiciones empleadas se obtienen subproductos tales como ácidos orgánicos que en un proceso de producción resultan inconvenientes (Miller, *et. al.*, 1987).

En *E. coli*, la inactivación de las enzimas piruvato cinasas (PYK) generan los mismos niveles de DAHP que se alcanzan con la sobreexpresión de *tkl*. Cuando se combinan estas estrategias la disponibilidad de DAHP aumenta aún más (Berry. 1996).

### 2.9.3 El sistema de Transporte de Azúcares (PTS).

Estudios realizados por Flores y colaboradores en el año 2002, muestran la distribución de flujo de carbono en el nodo PEP para *E. coli*; de la Figura 4 se puede observar que el sistema de transporte de fosfotransferasa (PTS) consume un 50% del PEP disponible, la piruvato cinasa con un 16%, la PEP carboxilasa con un 16%, compuestos aromáticos 3% y otros un 15% (Flores N, *et. al.*, 2002).

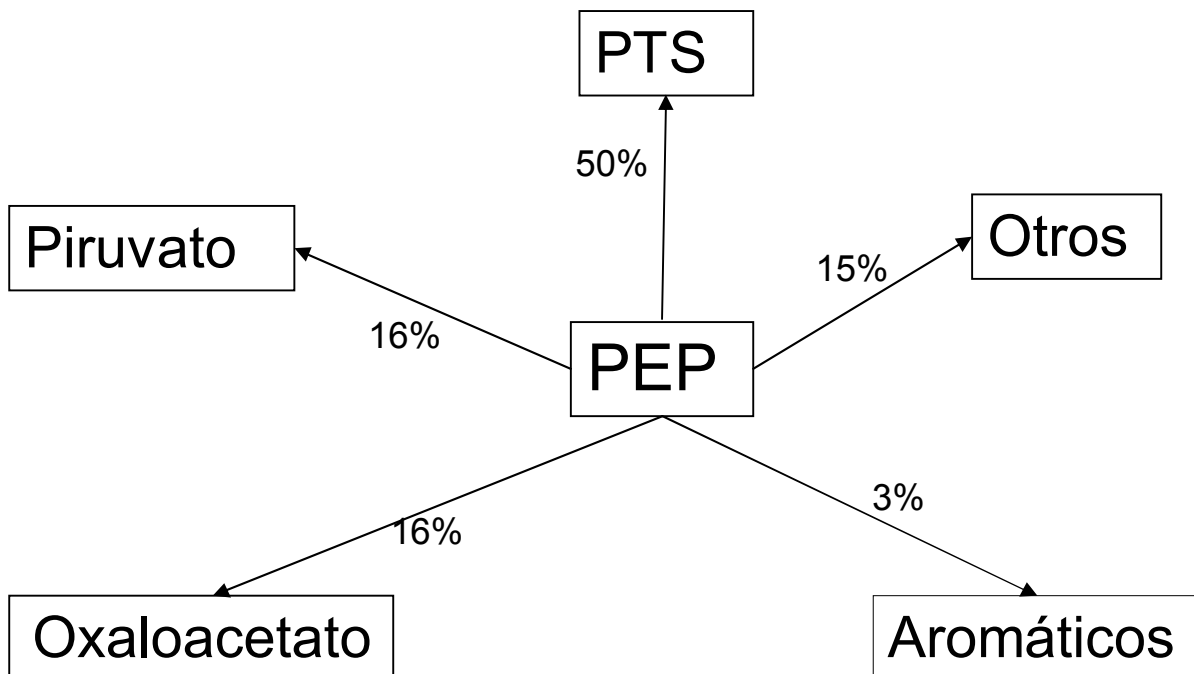
Dentro de este contexto, la supresión del consumo de PEP por el sistema PTS, duplica el rendimiento teórico de producción de DAHP a partir de glucosa (de 0.43 mol/mol a 0.86 mol/mol) (Báez J.L, *et. al.*, 2001).

El sistema PTS, es un conjunto de proteínas que participan en la internalización a la célula de varios azúcares (glucosa, manosa, fructosa, entre

otros); esto mediante la translocación del grupo fosfato proveniente del PEP hacia un receptor final que es el azúcar a ser transportado.

La inactivación del sistema PTS resulta en un fenotipo glucosa<sup>-</sup>, para resolver este problema, fue necesaria la generación de cepas PTS<sup>-</sup> glucosa<sup>+</sup>; Estas cepas internalizan glucosa mediante un transportador *galP* (galactosa permeasa), fosforilan glucosa mediante la enzima glucocinasa y ATP. De esta manera, una estrategia que ha resultado exitosa para el aumento de la disponibilidad de PEP, ha sido la inactivación del sistema PTS. Se ha demostrado que la disponibilidad de DAHP en cepas PTS<sup>-</sup> glucosa<sup>+</sup> aumenta en aproximadamente un 400% comparado con la cepa control PTS<sup>+</sup> (Hernández V, *et. al.*, 2003)

Se ha encontrado para cepas de *E. coli*, que la mayor cantidad de DAHP disponible se obtiene mediante la combinación de estrategias que aumenten la disponibilidad de E4P y la de PEP.



**Figura 4.-** Mapa de distribución de carbono en el nodo de PEP en *Escherichia coli*.

En el año de 1994, Patnaik encontró que la sobreexpresión de *pps* y *tktA* simultáneamente, genera una cantidad de DAHP igual a la que se obtiene cuando se sobreexpresa *tktA* y se inactivan los genes *pykA* y *pykF* (codificantes para las enzimas piruvato cinasas). Del mismo modo, se demostró que en cepas *tktA*<sup>+</sup> PTS<sup>-</sup> glucosa<sup>+</sup> la cantidad de DAHP aumenta 1.3 veces con respecto a la cepa PTS<sup>-</sup> glucosa<sup>+</sup>. Sin embargo, la mayor cantidad de DAHP disponible se observa en cepas *pykA*<sup>-</sup> *pykF*<sup>-</sup> PTS<sup>-</sup> glucosa<sup>+</sup> *tktA*<sup>+</sup>, en donde, comparada con su cepa control, la disponibilidad de DAHP aumenta 15.8 veces (Patnaik R. and Liao J. C, 1994).

## **2.10 Comparación entre *B. subtilis* y *E. coli* como sistemas para la producción de aromáticos.**

*B. subtilis* es una bacteria Gram positiva que se encuentra comúnmente en el suelo. Se ha clasificado históricamente como un microorganismo aerobio estricto a pesar de que puede crecer y formar esporas bajo estrictas condiciones de anaerobiosis con glucosa como fuente de carbono y nitrato como un receptor final de electrones (Sonenshein, *et. al.*, 1993). El genoma de *B. subtilis* se terminó de secuenciar en noviembre de 1997, y tiene una composición de G+C de 43%. Debido a su baja patogenicidad, la FDA lo ha clasificado como un microorganismo GRAS (Generally Recognized As Safe, por sus siglas en inglés), categoría otorgada por expertos a sustancias, químicos o microorganismos cuyo consumo no representa riesgo alguno para el hombre.

Características como su baja patogenicidad, su capacidad de desarrollar endoesporas, su capacidad de excreción de metabolitos y su factibilidad para la manipulación genética, han permitido que *B. subtilis*, represente un blanco importante en el desarrollo de la Ingeniería de Vías Metabólicas. El desarrollo y la mejora de procesos de producción de biológicos como enzimas hidrolíticas ( $\alpha$ -amilasa), fosfatasa alcalina, amino peptidasas; antibióticos, insecticidas,

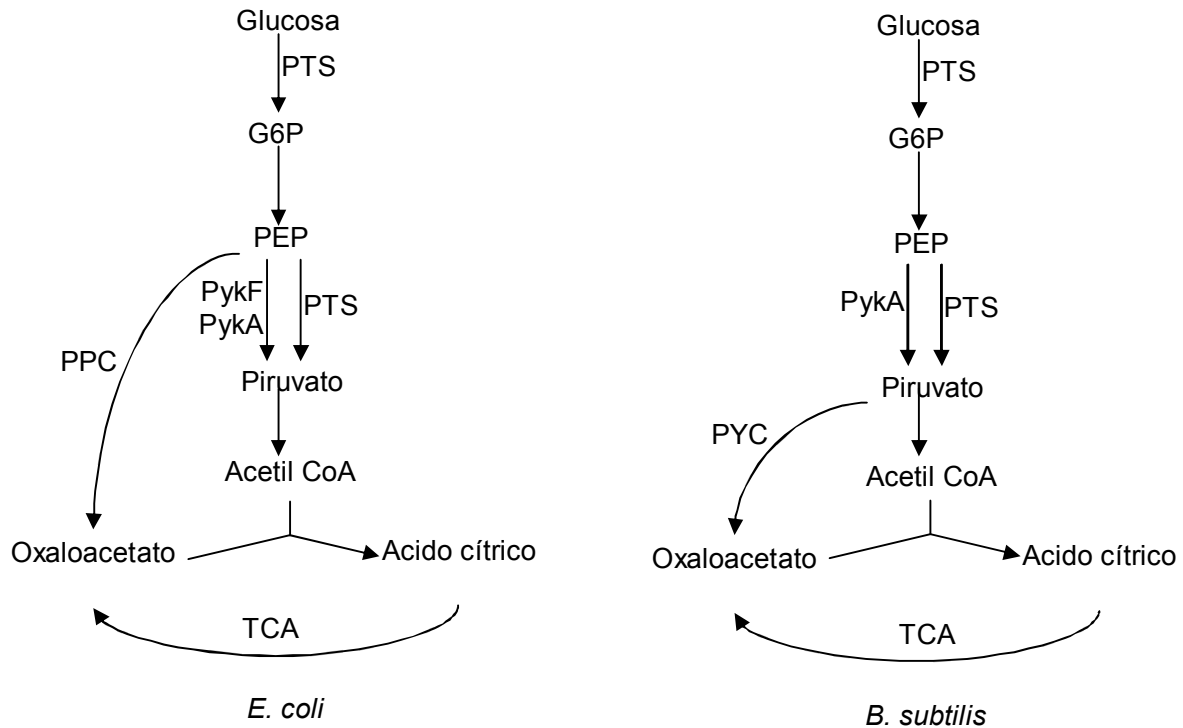
metabolitos primarios (hipoxantina y ácido inosínico), entre muchos otros son ejemplos de dichas aplicaciones (Harwood. 1992).

La ingeniería de Vías Metabólicas se ha enfocado a la modificación racional del metabolismo de bacterias como *E. coli* para la producción de compuestos aromáticos, sin embargo, en los últimos años, se han caracterizado otros microorganismos que presentan ciertas ventajas para la producción de este tipo de compuestos. De esta manera, las características metabólicas y fisiológicas de *B. subtilis*, han despertado cierto interés para su manipulación genética en la producción de compuestos aromáticos.

#### 2.10.1 Diferencias en la estructura del Metabolismo Central entre *E. coli* y *B. subtilis*

A nivel de metabolismo central, entre *E. coli* y *B. subtilis*, existen marcadas diferencias, una de las principales ocurre a nivel de la formación de oxaloacetato (ver Figura 5). En *B. subtilis* el oxaloacetato se forma a partir de piruvato a través de la enzima piruvato carboxilasa (PYC). Sin embargo, en *E. coli* el precursor para la formación de oxaloacetato es el PEP, de manera que, en cepas de *E. coli* deficientes en la actividad de piruvato cinasa, no se puede convertir PEP vía piruvato, pero PEP entra al ciclo de Krebs mediante la enzima PEP carboxilasa (Fry, *et. al.*, 2000).

En contraste, en *B. subtilis*, el PEP solo se puede convertir en piruvato via PTS, no hay otras reacciones que puedan introducir PEP al ciclo de Krebs para su posterior procesamiento (Ver Figura 5).



**Figura 5.-** Esquema del metabolismo central de *E. coli* y *B. subtilis*. Abreviaturas: PTS (sistema de fosfotransferasa); G6P (glucosa 6 fosfato); PEP (fosfoenolpiruvato); PykF (piruvato cinasa F); PykA (piruvato cinasa A); PPC (fosfoenolpiruvato carboxilasa); PYC (piruvato carboxilasa) (Fry, *et. al.*, 2000).

#### 2.10.1.1 Formación de Fosfoenolpiruvato (Piruvato cinasas)

Otra diferencia metabólica es que *B. subtilis* tiene sólo una enzima piruvato cinasa (PYK A), mientras que *E. coli* tiene dos enzimas con la misma actividad (Pyk A y Pyk F) (Figura 5). Algunos estudios han demostrado que en cepas de *E. coli* y *B. subtilis* con la actividad de Pyk<sup>-</sup> las cantidades detectadas de PEP intracelular son de 0.06 mM y 1.30 mM, respectivamente. Estos resultados sugieren cierta ventaja en la aplicación de *B. subtilis* para la producción de compuestos aromáticos debido a su capacidad para acumular a uno de los precursores de este tipo de compuestos. (Fry, *et. al.*, 2000; Zhu, *et. al.*, 2001).

### 2.10.2 Diferencias Fisiológicas

Algunas características fisiológicas que permiten que *B. subtilis* sea un microorganismo atractivo para la producción de metabolitos para la Microbiología Industrial son las siguientes:

En primer lugar, como se mencionó anteriormente, este microorganismo no es patógeno y las proteínas producidas pueden ser fácilmente purificadas sin temor a sufrir una contaminación por alguna endotoxina. En segundo lugar, la membrana celular de *B. subtilis* es mas simple que aquella presente en *E. coli*, ya que carece de membrana externa o membrana asociada a lipopolisacáridos. La ausencia de membrana externa simplifica el proceso de secreción ya que las exoproteínas solo necesitan translocarse a través de una sola membrana antes de llegar al medio de cultivo. (Young, 1980; Harwood, 1992).

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Estrategias de IVM para la producción de shikimato.

Existen 2 estrategias distintas para generar cepas productoras de shikimato, una es mediante el bloqueo de la vía del shikimato después de la síntesis del ácido shikímico, eliminando la reacción que lleva a cabo la enzima shikimato cinasa (Draths *et. al.*, 1999; Iomantas, *et. al.* 2002; Krämer, *et. al.*, 2003); y mediante la generación de cepas deficientes en la actividad de la enzima EPSP sintasa, bloqueando la vía del shikimato justo después de la síntesis de shikimato 3-fosfato, para que presumiblemente, bajo la acción de fosfatasas intracelulares se lleve a cabo la conversión de shikimato 3-fosfato a shikimato; estas estrategias han sido aplicadas tanto en *B. subtilis* (Iomantas *et. al.*, 2002) como en *E. coli* (Krämer, *et. al.*, 2003).

##### 3.1.1 IVM dentro del metabolismo central para la producción de shikimato

Las estrategias dentro del metabolismo central encaminadas a generar cepas productoras de shikimato, se han enfocado en el aumento de la disponibilidad de los precursores del metabolismo central como E4P y PEP.

La sobreexpresión del gen *tktA* ha aumentado la disponibilidad de E4P generando un incremento en el rendimiento de shikimato con respecto a glucosa en cepas de *E. coli*, de 0.12 mol/mol a 0.18 mol/mol, obteniendo un rendimiento máximo teórico de 0.43 mol/mol. La cantidad producida en cultivos en lote con esta cepa es de 52 g/L (Knop, *et. al.*, 2001).

Los esfuerzos destinados a aumentar la disponibilidad de PEP, como lo es el generar cepas de *E. coli* que sobreexpresan PEP sintasa, han aumentado el rendimiento de shikimato a partir de glucosa a 0.23 mol/mol con un título final de 66 g/L de shikimato (Chandran *et. al.*, 2003). El máximo rendimiento de shikimato con respecto a glucosa obtenido en cepas de *E. coli*, ha sido mediante la



inactivación del sistema PTS; utilizando como sistema alternativo para transportar glucosa un facilitador de *Zymomonas mobilis* (*glf*), y a la enzima glucocinasa (*glk*) como sistema de fosforilación de la misma. Al combinar estas modificaciones con la sobreexpresión de la enzima transcetolasa (*tktA*) y suplementando el medio de cultivo con extracto de levadura en un fermentador de 10L, se ha alcanzado un rendimiento de 0.33 mol/mol y una concentración final de shikimato de 84 g/L (Chandran *et. al.*, 2003).

### 3.2 Producción de shikimato en *B. subtilis*

En el año 2002, Iomantas y colaboradores reportan un proceso de producción de shikimato que utiliza como modelo a *B. subtilis*. En dicho reporte se utiliza una cepa generada en la década de los años 70's, reportada por BGSC (Bacillus Genetic Stock Center) como deficiente en actividad de shikimato cinasa. La cepa utilizada, nombrada como *B. subtilis aroI116* se transformó con los plásmidos pDP4 y pBAG7 que contienen una copia del gen *aroD* y *aroA* respectivamente. La Tabla 1 muestra los datos del proceso reportado, donde se puede observar que al final del proceso, se obtienen concentraciones de shikimato de 8.5 g/L para la cepa *B. subtilis aroI116*; 7.2 g/L para la cepa *B. subtilis aroI116* que sobreexpresa DAHP sintasa (*aroA*); y 14 g/L para la cepa *B. subtilis aroI116* que sobreexpresa la enzima shikimato deshidrogenasa (*aroD*) (Iomantas Y, *et. al.*, 2002; Yuki, S, 1975).

**Tabla 1.** Parámetros de producción de shikimato en cepas de *B. subtilis aroI116*. (Iomantas Y, *et. al.*, 2002).

Cepa	Características	[shik] g/L	[shik]/t g/h	$q_p$ h <sup>-1</sup>	$Y_{p/s}$ * g/g
<i>aroI116</i>	<i>aroI</i> <sup>-</sup>	8.5	0.121	0.0065	0.036
<i>aroI116 pDP4</i>	<i>aroI aroD</i> <sup>+</sup>	14	0.102	0.013	0.030
<i>aroI116 pBAG7</i>	<i>aroI aroA</i> <sup>+</sup>	7.2	0.2	0.0043	0.059

\*Los siguientes datos fueron calculados tomando en cuenta las siguientes consideraciones: El tiempo de la fermentación de 70h; Concentración de glucosa total = 235.39 g/L; La concentración de biomasa promedio de 18 g/L para *aro116*; 15.4 g/L para *aro116 pDP4* y 23.64 g/L para *aro116 pBAG7*. Al no tener los datos de consumo de glucosa completo, se estima que la cantidad de glucosa es consumida en su totalidad.

### 3.2.1 Inactivación de la piruvato cinasa en *B. subtilis*

Como se ha mencionado anteriormente, el aumento de la disponibilidad de los precursores del metabolismo central para la vía de los aromáticos aumenta la capacidad de síntesis de los mismos dentro de la célula. Esta observación, aunada al trabajo realizado por Fry y colaboradores en el año 2000 (descrito anteriormente) han convertido a *B. subtilis* un modelo muy atractivo para la producción de distintos compuestos aromáticos y sus derivados.

Una de las investigaciones que se derivaron del trabajo de Fry y colaboradores, es la realizada por el grupo de investigación de Domach en el año 2005, en donde a partir de una cepa de *B. subtilis 168*, construyen su derivada *pykA (ind)* (expresión del gen *pykA* bajo un promotor inducible) y observan que tanto el rendimiento volumétrico ( $\mu\text{g}$  ac. fólico/l) como el rendimiento específico ( $\mu\text{g}$  ac. fólico/g de células) se duplica para la cepa productora de ácido fólico que tiene regulada la actividad de piruvato cinasa con respecto a su parental *pykA*<sup>+</sup>. (Zhu T, *et. al.*, 2005).

### 3.2.2 Modificaciones en el metabolismo central en cepas de *B. subtilis*

En nuestro grupo de investigación se ha utilizado *E. coli* como modelo para el estudio del metabolismo central y sus intermediarios con el propósito principal de aumentar la disponibilidad de carbono en la vía de síntesis de compuestos aromáticos. A partir de los estudios previamente comentados, se decidió utilizar como modelo a *B. subtilis 168* y encontrar qué modificación en el metabolismo central favorecía la producción de compuestos aromáticos. Para ello, se han generado distintas mutantes, entre las que se encuentran la cepa CV1PYK

(variante deficiente en actividad de piruvato cinasa, *pykA*<sup>-</sup>); la cepa CV8PTS (variante con el sistema PTS inactivo, *ptsGHI*<sup>-</sup>); entre otras (Cabrera V.N, *et. al.*, resultados por publicar).

El presente trabajo pretende utilizar las cepas de *B. subtilis* con distintas modificaciones en el metabolismo central para aplicarlas a la producción de shikimato y de esta manera colaborar en la generación de conocimiento para entender el comportamiento del metabolismo central de *B. subtilis* y al mismo tiempo construir una cepa productora de shikimato, compuesto de alto valor agregado en la industria farmacéutica.

#### **4. HIPÓTESIS**

La eliminación de actividades enzimáticas que consumen PEP (fosfoenolpiruvato) incrementarán la disponibilidad de este componente del metabolismo central, aumentando así la capacidad de producción de shikimato *B. subtilis*.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

Evaluar cepas de *Bacillus subtilis* modificadas en el metabolismo central y la vía común de síntesis de aminoácidos aromáticos en su capacidad de producción de shikimato y el rendimiento a partir de glucosa.

### 5.2 Objetivos Específicos

- Generar en cepas de *B. subtilis* con distintas modificaciones en el metabolismo central (*pykA*<sup>-</sup>, *PTS*<sup>-</sup>) cepas deficientes en la actividad de shikimato cinasa (*SHKK*<sup>-</sup>).
- Determinar los parámetros de producción de shikimato para las cepas generadas.
- Evaluación de la cepa con mejores características para producción de compuestos aromáticos en un proceso lote y lote alimentado a nivel planta piloto (1.2L).
- Evaluación del efecto de la sobreexpresión de la enzima DAHP sintasa sobre los parámetros de producción de las mutantes generadas.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

**Tabla 2.-** Oligonucleótidos utilizados para la inactivación del gen *arol* de *B. subtilis*.

Nombre	Sito de restricción	Secuencia (5→3)
5arolR	<i>Nco</i> I	CCTTTCCATGGAAGAGGTTGCCG
3-SKBS-R	<i>Eco</i> RI	GGGGGAAGAGAATTCGTTGATG
5-Arol-L	<i>Spe</i> I	CTCTGCCACTAGTTGAATCGACAGG
3-Arol-L	<i>Xho</i> I	ACTGGGCTCGAGCGTTTAGCGTTC
Sc_arol_fwd	---	TTCGGCTCTCGCGGCAATGTT
Sc_arol_rwd	---	CTCAGCCTCCATAGGTTGAACCTG
5aroA	<i>Xba</i> I	GGATGTCTAGAATGAGCAACACAGAG
3aroA	<i>Sma</i> I	GATTC <del>CCGGG</del> TAAAGCGTTGACT
pHCMC05_fw	---	CTACATCCAGAACAACCTCTGC
pHCMC05_rw	---	CAGACAAAGATCTCCATGGACG

\*Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados en la unidad de Síntesis IBT-UNAM

**Tabla 3.-** Nombre y genotipo de cepas utilizadas y construidas en este trabajo.

Fuente	Nombre	Genotipo
Cepario del laboratorio	<i>E. coli</i> XL1Blue	<i>supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, (Nal<sup>R</sup>), thi, relA1, lacF'</i> [traD36 proAB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> lacZΔM15, Tn10 (Tet <sup>R</sup> )]
Cepario del laboratorio	<i>B. subtilis</i> 168 Marburg	<i>trpC2</i>
Cabrera V; por publicar	<i>B. subtilis</i> CV1PYK	<i>trpC2Δ(pykA)::loxPspc</i>
Cabrera V; por publicar	<i>B. subtilis</i> CV8PTS	<i>trpC2 Δ(ptsGHI)::loxPspc</i>
Este trabajo	<i>B. subtilis</i> CLC600-CH1	<i>ΔnprE, ΔaprE, Δepr, Δbpf, Δmpr, ΔnprB, ΔvprE, Cm<sup>R</sup>, Lin<sup>R</sup>, Eri<sup>R</sup> arol::loxPspc</i>
Este trabajo	<i>B. subtilis</i> CLC58-168	<i>trpC2 arol::loxPspc</i>
Este trabajo	<i>B. subtilis</i> CLC6PYKA	<i>trpC2 ΔpykA arol::loxPspc</i>
Este trabajo	<i>B. subtilis</i> CLC2PTS	<i>trpC2 ΔptsGHI arol::loxPspc</i>

\*Cabrera V, *et. al.*, artículo en escritura.

## **6.1 Generación de cepas de *B. subtilis* que carezcan de la actividad de shikimato cinasa (*aroI*).**

La generación de las cepas de *B. subtilis* deficientes en la actividad de shikimato cinasa se logró mediante la inactivación del gen *aroI*. El vector pLox\_Spec\_Walt, (Valle F., comunicación personal), que contiene el sitio necesario para la maquinaria necesaria para su replicación en *E. coli* pero no para *B. subtilis*, se utilizó para dicho propósito (Figura 6).

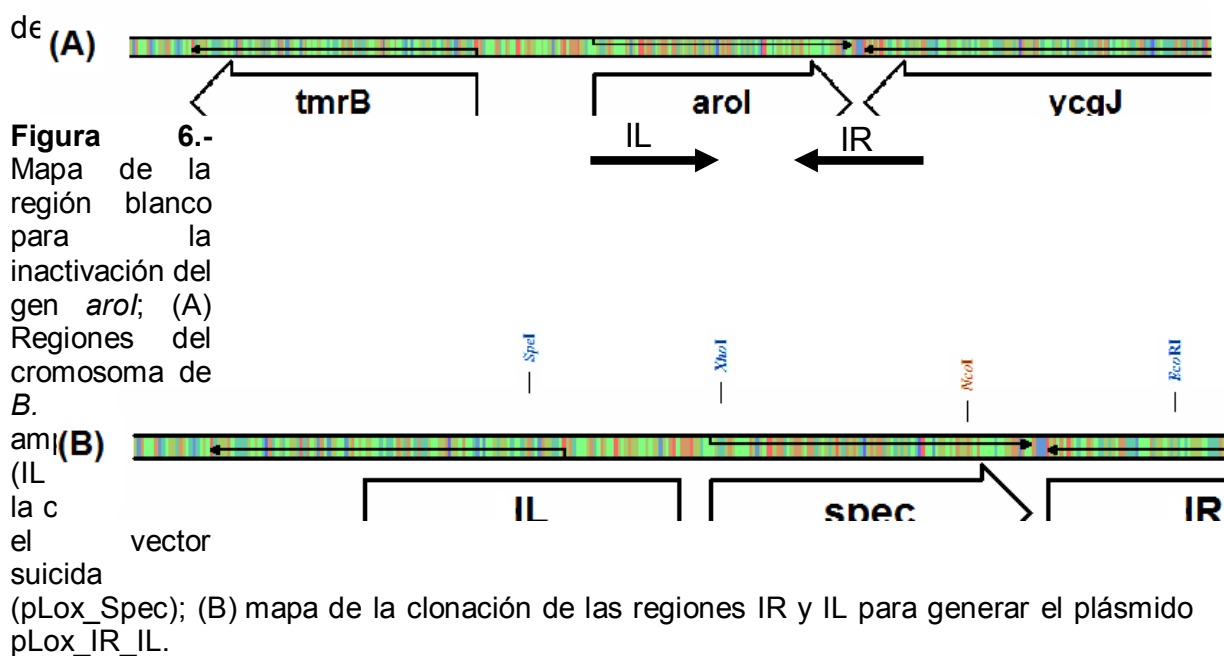
La sustitución alélica del gen *aroI*, se llevó a cabo mediante la recombinación de secuencias homólogas adyacentes al gen, de manera que se requirió de la amplificación por PCR de dichas regiones y de su correcta clonación en el vector suicida (Figura 6-A). La amplificación de las regiones homólogas se realizó mediante una reacción de PCR con la enzima elongasa (ver anexo II), utilizando como templado el ADN cromosomal de *B. subtilis* 168, extraído con el kit “QIAGEN Mini-isolation kit” (Qiagen, CA, USA) según especificaciones del fabricante. La región homóloga IR se amplificó con los primers 5aroIR/3-SKBS-R, del mismo modo, con los primers 5-AroI-L/3-AroI-R se amplificó la región homóloga IL. La secuencia de dichos primers, así como el sitio de restricción agregado se muestra en la Tabla 2.

### 6.1.1 Construcción del vector pLox\_IR\_IL

La construcción del plásmido pLox\_IR\_IL se realizó en 2 pasos; En primer lugar se clonó el segmento de la región adyacente 5' (región IR), formando el plásmido pLox\_IR, y posteriormente se clonó la región adyacente 3' (región IL), para finalmente formar el plásmido pLox\_IR\_IL (Figura 6-B).

La clonación de la región IR se inició con la digestión (*NcoI-EcoRI*, New England Biolabs) del plásmido pLox-Spec\_Walt y el producto de la reacción de PCR (previamente purificado) con los oligos 5aroIR/3-SKBS-R (anexo II).

Posteriormente, para llevar a cabo la reacción de ligación, fueron purificados utilizando el kit “Rapid PCR purification systems” de Marligen Bioscience Inc. En la reacción de ligación se utilizó la enzima T4 DNA ligasa de New England Biolabs, electroporando a 2500v bacterias XL1blue competentes con un electroporador “Biorad Gene Pulser” de Biorad. Posteriormente las células se recuperaron en 1ml de medio SOC con glucosa 0.2% durante 1hr a 37°C-300rpm; Finalmente, las bacterias transformantes se seleccionaron en medio sólido Luria Bertani (LB) (ver anexo III) utilizando espectinomicina (100µg/ml) para la selección



La segunda parte de la construcción del plásmido pLox\_IR\_IL, se llevó a cabo con la amplificación y purificación del producto de la reacción de PCR con los oligonucleótidos 5-AroI-L/3-AroI-L (ver anexo II), la digestión del plásmido pLox\_IR y el fragmento correspondiente a la región IL con las enzimas de restricción *SpeI* y *XhoI* (New England Biolabs), y la ligación, electroporación y selección de bacterias transformantes se llevó a cabo del mismo modo que el mencionado anteriormente para la clonación de la región IR.

La construcción del plásmido se comprobó por dos métodos distintos, primero mediante la digestión del plásmido construido (*SpeI-EcoRI*, New England



Biolabs) y el segundo a través de la amplificación del cassette utilizando los oligonucleótidos 5-AroI-L y 3-SKBS-R para la reacción de PCR (ver anexo II). Los productos de la reacción de digestión y de PCR se analizaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa 1% (SIGMA®). El plásmido construido se secuenció utilizando los oligonucleótidos Sc\_aroI\_fwd/Sc\_aroI\_rwd mostrados en la Tabla 2.

### 6.1.2 Inactivación del gen *aroI*

Se inactivó el gen *aroI* de las cepas CV1PYKA, CV4PTS y *B. subtilis* 168 transformándolas con el plásmido suicida pLox\_IR\_IL. La transformación se llevó a cabo preparando células competentes modificando el método descrito por Fernando Valle (comunicación personal) para transformar cepas de *B. subtilis* (ver protocolo modificado en Anexo IV). Las mutantes se seleccionaron en medio LB con espectinomicina (100µg/ml) y glucosa (4g/L). La interrupción del gen *aroI* ocurre mediante un evento de doble recombinación de las regiones adyacentes al gen, dando como resultado final la sustitución del gen de interés por el gen de resistencia a espectinomicina (Fry. *et. al.*, 2000).

La interrupción del gen *aroI* en las cepas mencionadas, se comprobó de por PCR y rectificando su auxotrofia a aminoácidos aromáticos. Para ello, se extrajo el ADN cromosomal de las cepas candidato (QIAGEN Mini-isolation kit, Qiagen CA USA) para ser usado como templado en la amplificación por PCR del cassette de interrupción (utilizando los oligonucleótidos Sc\_aroI\_fwd y Sc\_aroI\_rwd, ver anexo II); dicho fragmento se observó por electroforesis horizontal en gel de agarosa 1% (SIGMA®). Finalmente, el fenotipo de las cepas se comprobó observando la formación de colonias en medio mínimo con glucosa, aminoácidos y vitaminas aromáticas y no en medio mineral.

## **6.2 Determinación del rendimiento y producción de shikimato a partir de glucosa en las cepas generadas.**

La determinación del rendimiento y producción de shikimato para las cepas generadas se realizó mediante cultivos de células en reposo.

### 6.2.1 Cultivos de Células en Reposo

Los cultivos de células en reposo son un método de cultivo utilizado para la determinación de rendimientos ( $Y_{p/s}$ ) y tasa de generación de producto ( $q_p$ ). El establecimiento de un cultivo en células en reposo consta de 2 etapas; La primera etapa, o etapa de generación de biomasa, es aquella mediante la cual se cultiva a la cepa en un medio de cultivo rico con la finalidad de generar biomasa (generalmente el tiempo de cultivo es el necesario para llegar a una concentración celular aproximada de 1 g/L, en fase de crecimiento exponencial); La segunda etapa consta de la realización de varios lavados con medio mínimo para eliminar el medio rico de la etapa anterior y cambiar el cultivo a un medio mínimo definido, tiempo durante el cual, la cepa no se duplicará (debido a que el medio no complementa las auxotrofías de la cepas), de manera que la fuente de carbono empleada será utilizada solo para producir el compuesto de interés.

Los cultivos de células en reposo se realizaron inoculando 5 mL de medio LB spt (100 $\mu$ g/ml) glucosa (8g/L) con una asada del stock en glicerol (40%) de la cepa de interés; incubando a 37°C-300rpm. Una vez que se alcanzó una O:D<sub>600nm</sub> de 1-2 (16-30 horas) dependiendo la cepa, se utiliza este cultivo para iniciar la fase de generación de biomasa. Se inocularon matraces bafleados de 250mL de capacidad con 45mL de medio rico (ver Anexo III) con el cultivo anterior (para iniciar en una O.D<sub>600nm</sub> de 0.1) y se incubaron durante 24-48 horas (según la cepa) a 37°C-300rpm. Una vez obtenida una O.D<sub>600nm</sub> aproximada de 3.5 - 4 se realizaron 2 lavados con 20mL de medio mínimo (centrifugando a 4000 rpm a una temperatura de 20° C durante 15min), decantando el sobrenadante. Finalmente, el paquete celular se resuspendió en 5mL de medio mínimo para ser inoculado en matraces bafleados de 250mL de capacidad con 45mL de medio (ver anexo III) e incubado a 37° C, 300 rpm.

La toma de muestras se realizó de la siguiente manera: durante el tiempo de cultivo, (12-30 horas, dependiendo la cepa), se muestreó la O.D.  $_{600nm}$  cada hora para verificar que el cultivo no estuviera en fase de lisis celular o en su defecto, que las células no estuvieran en duplicación; en ese momento, a la par se extrajo 1mL de cultivo, centrifugando la muestra durante 5min a temperatura ambiente, separando el paquete celular del sobrenadante y almacenando este a  $-20^{\circ}C$  para su posterior análisis por cromatografía líquida de alta definición (HPLC, Agilent1100 HPLC system; Palo Alto Ca). El DAHP se cuantificó mediante el ensayo por ácido tiobarbitúrico (Srinivasan P.R. y Sprinson D.B, 1959). A partir de los datos obtenidos se determinó el rendimiento de shikimato con respecto al consumo de glucosa mediante las fórmulas mostradas en la figura 7.

$$q_p = \frac{[p]_f - [p]_o}{t * X_{prom}} \quad - \quad q_s = \frac{[s]_f - [s]_o}{t * X_{prom}}$$

$$Y_{p/s} = \frac{q_p}{q_s}$$

**Figura 7.-** Fórmulas para calcular rendimientos, tasa de generación de producto y tasa de consumo de sustrato para cultivos de células en reposo. Abreviaturas:  $q_p$ , tasa de generación de producto;  $q_s$ , tasa de consumo de sustrato;  $Y_{p/s}$ , rendimiento de generación de producto con respecto al sustrato consumido;  $[p]_f$ , concentración de producto final;  $[p]_o$ —concentración de producto inicial;  $t$ , tiempo de cultivo;  $X_{prom}$ , concentración celular promedio.

### **6.3 Evaluación de la cepa con mejores características para producción de shikimato en un sistema en lote y lote alimentado.**

La mutante con mejores características para la producción de shikimato, según sus parámetros de producción calculados anteriormente, se evaluó en un cultivo lote y lote alimentado a nivel planta piloto (1.2L).

Tanto para el cultivo lote como para el cultivo lote alimentado, el preinóculo se inició incubando  $20\mu L$  de la cepa (stock en glicerol al 40%) en 5mL de medio (ver

Anexo III) a 37° C, 300rpm (durante 16-24 horas según la cepa, hasta O.D<sub>600nm</sub> de 1.5-2). El volumen total del cultivo (5mL) se utilizó para inocular un matraz bafleado de 500mL con 115mL de medio (ver Anexo III). El tiempo de incubación del inóculo fue de 20 horas a 37° C, 300rpm.

Con el propósito de iniciar la fase de producción con una O.D<sub>600nm</sub> = 2, los cultivos de preinóculo e inóculo se realizaron por duplicado; de manera que, 240mL de inóculo se centrifugaron durante 15min a 20° C y se lavaron con medio mínimo para retirar los restos de metabolitos producidos, para que después de resuspenderse en 10mL de medio de cultivo de producción (ver Anexo III) inocular los fermentadores.

La fase de producción de los cultivos lote y de lote alimentado se llevó a cabo en fermentadores de 1.2L (Bio Flo 110 Modular Fermentor System, New Brunswick Scientific, NJ) a un volumen de trabajo de 0.6L. Los parámetros de operación se controlaron mediante AFS- Biocommand Bioprocessing Software (New Brunswick Scientific, NJ). Durante el proceso, las condiciones de cultivo fueron: Temperatura 37° C; flujo de aire de 0.6L/min; oxígeno disuelto controlado al 30% mediante una cascada de velocidad de agitación (500-1000 rpm) e inyección de oxígeno; pH de 7 adicionando NH<sub>4</sub>OH al 15% o H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 15%.

Para el caso del cultivo alimentado, la alimentación de glucosa (650 g/L) inició a las 14 horas, a un flujo de 2 mL/h, manteniendo la concentración de glucosa en el medio de aproximadamente 1g/L. Durante las 56 horas de alimentación, la glucosa fue cuantificada mediante tiras reactivas Accutrend<sup>®</sup>.

El tratamiento de las muestras se realizó de la misma manera que para el caso de los cultivos células en reposo (arriba descrito).

#### **6.4 Generación de cepas de *B. subtilis* que sobreexpresen el gen *aroA* que codifica para la enzima DAHP sintasa.**

Las cepas de *B. subtilis* con mayor actividad de DAHP sintasa se construyeron clonando el gen *aroA* en el vector de expresión pHCMC05. Dicho plásmido tiene origen de replicación para *E. coli* y *B. subtilis* y fue diseñado para la expresión de proteínas en éste último bajo un promotor inducible por IPTG (Nguyen, *et. al.*, 2005).

#### 6.4.1 Construcción del plásmido pHCMC05\_aroA

Para la construcción del plásmido pHCMC05\_aroA se amplificó el gen *aroA* de *B. subtilis* 168, por lo que se diseñaron oligonucleótidos adicionando en el extremo de cada uno, el sitio de reconocimiento para *Xba*I y *Sma*I; En la Tabla 2 se muestra la secuencia de los oligonucleótidos utilizados así como el sitio de restricción adicionado.

El gen *aroA* se amplificó por PCR (utilizando los primers 5aroA/3aroA, ver anexo II) y se purificó por kit, según las especificaciones del fabricante (Rapid PCR purification systems; Marligen Bioscience Inc). Una vez obtenidos, el plásmido pHCMC05 y el gen *aroA*, se digirieron con las enzimas de restricción *Xba*I y *Sma*I (New England Biolabs) y se purificaron (Rapid PCR purification systems; Marligen Bioscience Inc). La reacción de ligación (T4 DNA ligasa; New England Biolabs) se electroporó (Biorad Gene Pulser) a 2500v en bacterias XL1blue. Las bacterias transformantes se recuperaron en 1ml de medio SOC con glucosa 0.2% (1hr a 37°C -300rpm) y se seleccionaron en medio sólido LB (Anexo III) con ampicilina (100µg/ml).

La correcta clonación del gen *aroA* en el vector pHCMC05 se verificó por restricción (*Xba*I y *Sma*I; New England Biolabs) y por secuenciación utilizando los oligonucleótidos pHCMC05\_fw / pHCMC05\_rw mostrados en la tabla 2.

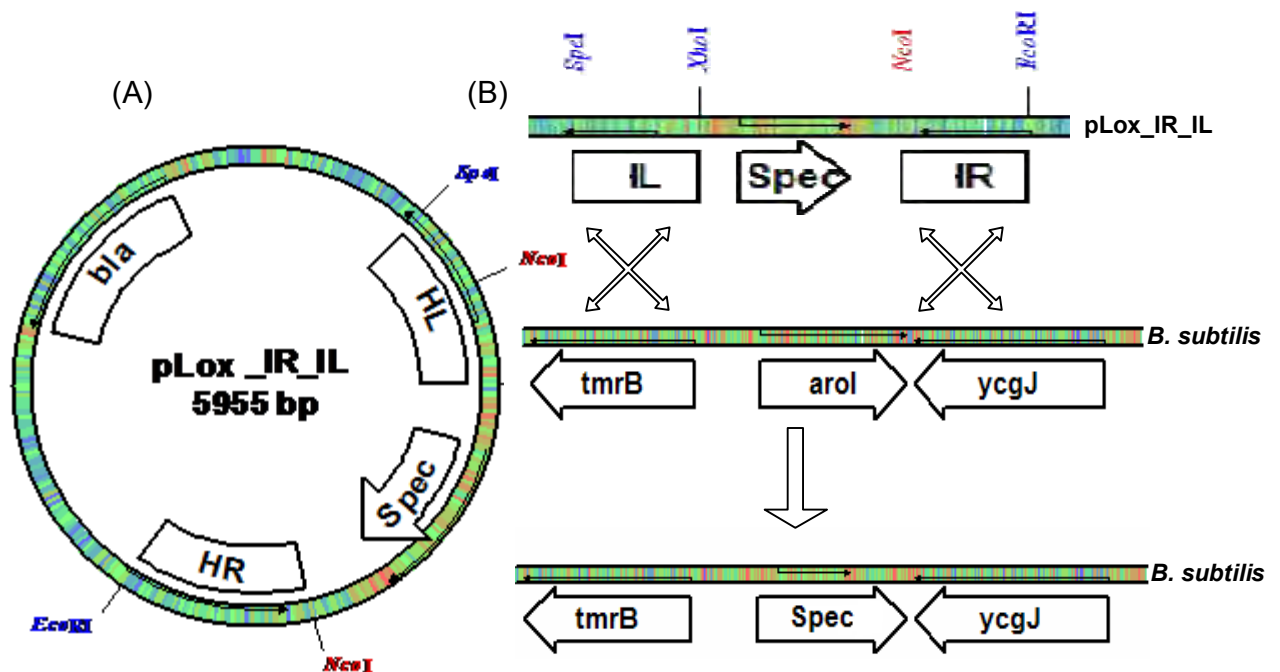
Las reacciones de ligación, la electroforésis y la electrotransformación se realizaron siguiendo los protocolos descritos en el Manual de Laboratorio (Sambrook, *et.al.*, 1989).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Generación de cepas de *B. subtilis aroI* en distintos fondos genéticos.

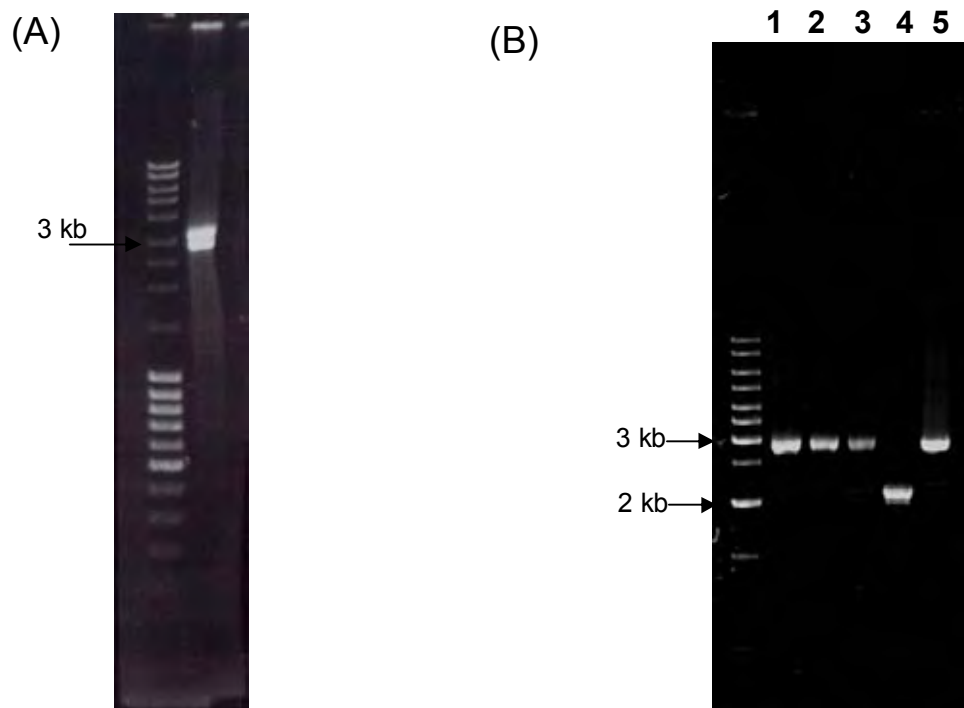
#### 7.1.1 Construcción del cassette de inactivación en el plásmido pLox\_Spec\_Walt

La inactivación del gen *aroI* se logró mediante la clonación de las regiones adyacentes al gen en el plásmido pLox\_Spec\_Walt. Este plásmido contiene un cassette de inactivación (conformado por el gen de resistencia a espectinomicina y dos sitios Lox flanqueantes), y se diseñó para realizar sustituciones alélicas dirigidas en el cromosoma en *B. subtilis* (figura 8-A; Valle F., comunicación personal). La inactivación del gen *aroI* ocurre mediante la doble recombinación de las regiones clonadas (IL y IR) con las regiones adyacentes al gen *aroI* en el cromosoma *B. subtilis*. De esta manera, ocurre una sustitución alélica en el *loci aroI* por el gen de resistencia a espectinomicina (figura 8-B).



**Figura 8.-** (A) Plásmido pLox\_IR\_IL construido. (B) Evento de doble recombinación entre las regiones clonadas del plásmido con las regiones adyacentes al gen *arol* en el cromosoma de *B. subtilis*.

La correcta clonación de las regiones IR y IL se verificó por 3 métodos: primero, digiriendo con las enzimas de restricción con que se clonaron (HR→*EcoRI/NcoI* y HL→*SpeI/XhoI*) observando la liberación de los fragmentos esperados (HR→796 pb y HL→790 pb; resultado no mostrado). El segundo método, fue observando la liberación del cassette de interrupción (2.8kb) mediante la digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *SpeI* (figura 9-A); finalmente a través de la reacción de PCR amplificando el cassette de inactivación en el cromosoma de *B. subtilis* 168, observando un fragmento de 2.8kb.



**Figura 9.-** (A) gel agarosa 1%; digestión del plásmido pLox\_IR\_IL (*EcoRI/SpeI*). (B) gel agarosa 1%; amplificación por PCR del cassette de inactivación de *arol* en las cepas (1) CLC6-PYKA; (2) CLC58-168 (3) CLC2-PTS; (4) *B. subtilis* 168 (control negativo); (5) amplificación del cassette del plásmido pLox\_IR\_IL (control positivo)

7.1.2 Inactivación del gen *arol* en *B. subtilis* 168 con distintas modificaciones en el metabolismo central.



En nuestro grupo de investigación, la transformación de plásmidos en *B. subtilis* se ha realizado utilizando el fundamento de un protocolo sugerido por F. Valle (comunicación personal). En dicho protocolo se aprovecha la capacidad natural de *B. subtilis* para entrar en estado de competencia (en fase de crecimiento estacionaria temprana), mediante cultivo en un medio mínimo. De esta manera, después de cierto tiempo de cultivo, los componentes del medio se consumen y se induce el estado de competencia al entrar a una fase estacionaria. El componente limitante del medio es el L-trp, esto debido a que *B. subtilis 168* es auxótrofo a dicho aminoácido.

A diferencia de la transformación por electroporación en *E. coli* en donde las células se recuperan en medio rico instantes después de el choque eléctrico, en *B. subtilis* se debe mantener el mismo medio de cultivo debido a que el estado de competencia se genera a consecuencia de la composición del medio, por lo que si durante la fase de incubación con el DNA se utiliza un medio rico, el estado de competencia se pierde rápidamente y la eficiencia de transformación decrece significativamente

Durante la transformación del plásmido pLox\_IR\_IL para la inactivación del gen *aroI* se presentaron algunos problemas; uno de los cuales lo provocó el intentar inactivar un gen de la vía de biosíntesis de aminoácidos aromáticos utilizando un método basado en limitar el L-trp para inducir competencia (recordando que la mutación en *aroI* provoca auxotrofia a los 3 aminoácidos aromáticos), ocurre un proceso de contraselección durante la fase de incubación con el DNA. Explicado de otra manera, lo que ocurre es que bajo las condiciones ensayadas la mutación *aroI* es letal, debido a que en el medio de incubación existe deficiencia de L-trp.

Existen reportes en donde se documenta que el gen que codifica para la shikimato cinasa puede tener otra función ligada al crecimiento de la bacteria. Por lo tanto mutaciones en dicho gen causan que la tasa de crecimiento de la cepa

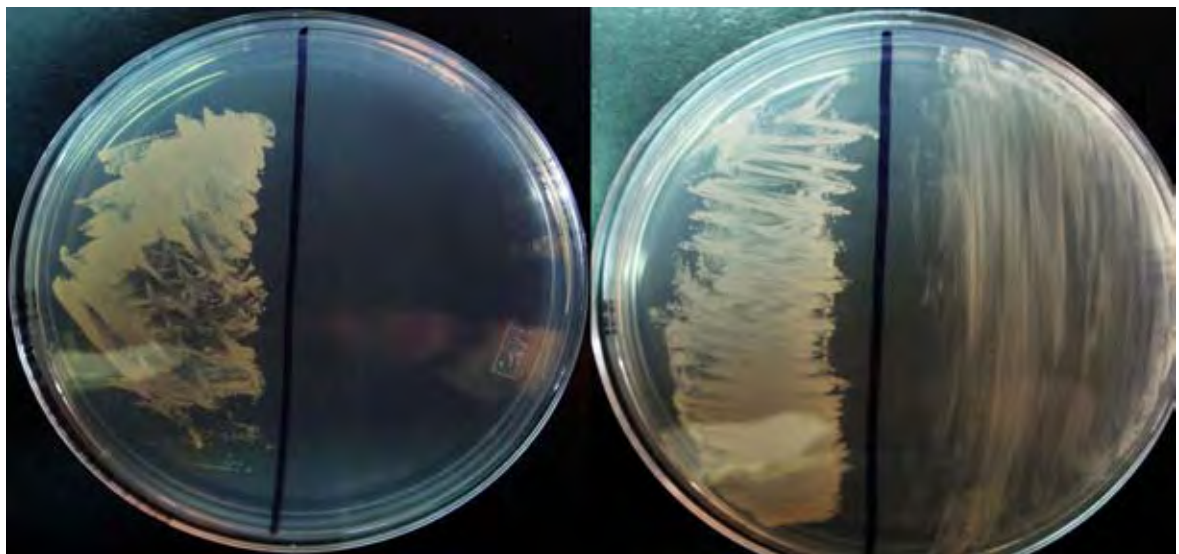
mutante disminuya significativamente con respecto a la cepa silvestre (Parish T and Stocker N.G., 2002; Parish T, *et. al.*, 1999).

De acuerdo a lo observado anteriormente, se propuso la modificación del protocolo para generar células competentes (ver Anexo IV); de manera que agregando glucosa al medio de selección de las mutantes, se activa otra parte del metabolismo de la bacteria (glucólisis), que complementa a la parte del metabolismo activo por el extracto de levadura del medio convencional (LB) evitando la contraselección de las mutantes generadas al facilitarles el crecimiento.

La interrupción del gen *aroI* en las cepas CV1PYK, CV8PTS se logró transformando dichas cepas con el plásmido pLox\_IR\_IL. En la figura 9-B se muestra la amplificación de la región correspondiente al *loci aroI* de cada una de las mutantes generadas. La amplificación de un producto aproximado de 2.8 kb (cassette de interrupción) demuestra la correcta inactivación del gen *aroI*. La inactivación se realizó en las cepas antes mencionadas para generar así las cepas CLC6-PYKA, CLC58-168, CLC2-PTS y CLC600CH1 (Tabla 3). Las cepas CLC600CH1 y CLC58-168 no tienen modificaciones en el metabolismo central, la primera proviene de una cepa con inactivación en las 7 proteasas que produce *B. subtilis*; y la segunda proviene de la cepa silvestre utilizada comúnmente (Marburg strain). Dichas cepas se utilizaron como control negativo para evaluar el efecto de las modificaciones en el metabolismo central sobre la producción de shikimato.

La inactivación del gen *aroI* genera auxotrofia a los 3 aminoácidos aromáticos, por tal motivo, las 4 cepas construidas se verificaron observando su incapacidad para crecer en medio mínimo con glucosa y complementando su fenotipo mediante la adición de vitaminas y aminoácidos aromáticos al medio de cultivo; en la figura 10 se puede observar la complementación fenotípica después de 48 horas a 37°C para la cepa CLC58-168. La comprobación fenotípica de las CLC6-PYKA, CLC600-CH1 y CLC2-PTS se realizó de la misma manera (resultados no mostrados).

La inactivación de genes que codifican para enzimas pertenecientes a la vía común de síntesis de aminoácidos aromáticos se han realizado en distintos microorganismos, sin embargo, existen reportes en los que se sugiere la participación de la enzima shikimato cinasa durante el ciclo celular, específicamente durante la polimerización de las proteínas que forman la pared celular; de manera que, no ha sido posible inactivar el gen que codifica la shikimato cinasa en microorganismos que no poseen 2 isoenzimas para dicha reacción (generalmente microorganismos gram positivos). En *Mycobacterium tuberculosis* que solo tiene la isoenzima tipo I, se ha demostrado que el gen *aroK* (codificante para la shikimato cinasa) es esencial para la viabilidad de la bacteria (Parish T and Stocker N.G., 2002; Parish T, *et. al.*, 1999; Vinella D, *et. al.*, 1996).



CLC58-168 (48 hrs) medio mínimo+glucosa  
8g/L

CLC58-168 (48 hrs) medio mínimo+glucosa  
8g/L+compuestos aromáticos

**Figura 10.**-Caracterización fenotípica de la cepa CLC58-168. Caja petri-lado izquierdo: Medio mineral con glucosa cepa lado izquierdo, *B. subtilis* 168 (control positivo) y lado derecho, CLC58-168; Caja petri-lado derecho: Medio mínimo con glucosa y compuestos aromáticos; lado izquierdo, cepa *B. subtilis* 168 y lado derecho, su derivada CLC58-168.

En algunos microorganismos como *Aeromonas salmonicida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Salmonella typhimurium* y *Corynebacterium pseudotuberculosis* se ha bloqueado la vía de síntesis de shikimato en genes distintos a los correspondientes a la shikimato cinasa para ser utilizados como vacunas atenuadas (Ingham A, *et. al.*, 2002; Vaughan LM, *et. al.*, 1993; Simmons CP, *et. al.*, 1997).

La cepa *B. subtilis* 1-118 (*aro1116*, *amy4*) utilizada en un proceso de producción de shikimato, es una cepa generada por mutagénesis química, de manera que al no presentar un reemplazo alélico, presumiblemente se trate de una cepa cuya actividad de shikimato cinasa esté atenuada, lo que le permite crecer eficientemente, pero con la desventaja de disminuir considerablemente las tasas de producción de shikimato con respecto a una mutante *aroI* (Yuki S, *et. al.*, 1975; Iommantas Y, *et. al.*, 2002). La inactivación del gen *aroI* de la cepa CLC58-168 es la primera efectuada como reemplazo alélico en *B. subtilis* 168, de manera que su utilización en procesos de producción de shikimato promete superar las capacidades de producción antes reportadas para esta bacteria.

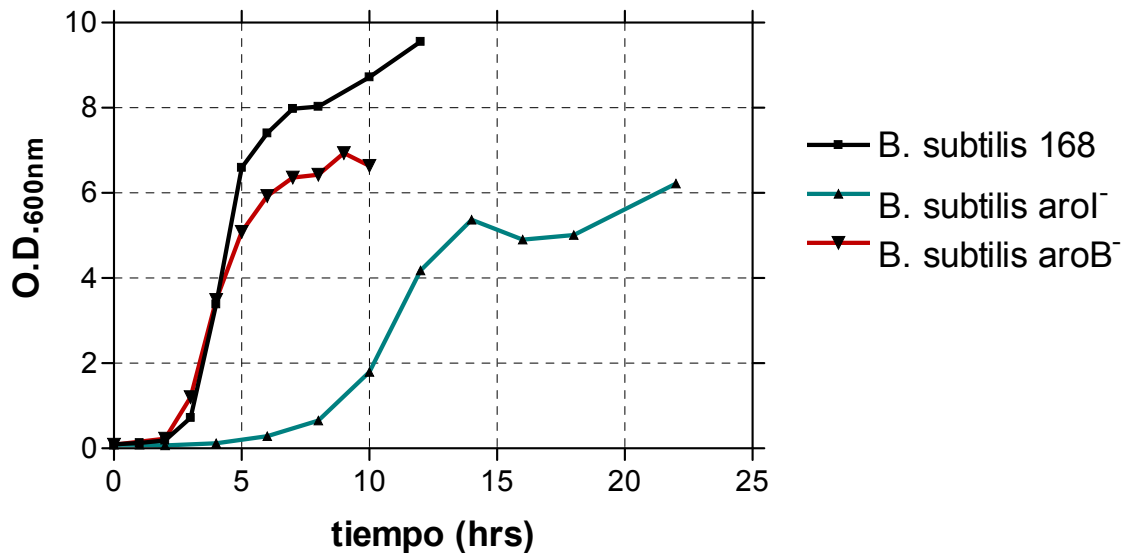
#### 7.1.3 Efectos fisiológicos generales resultantes de la inactivación del gen *aroI* en cepas de *B. subtilis* 168

Uno de los principales problemas que se presentaron durante la construcción de las cepas fue la supuesta doble función del gen *aroI*, debido a que la inactivación de la enzima shikimato cinasa trae consigo la pérdida de una

segunda función importante para el ciclo celular de la bacteria. Una manera de evidenciar la doble función del gen *aroI* fue mediante la caracterización del crecimiento de cepas *aroI* en medio rico suplementado con vitaminas aromáticas, de manera que se complemente su incapacidad de producir compuestos aromáticos (auxotrofía a L-phe, L-tyr y L-trp) y las diferencias en crecimiento observadas solo se deban a alguna otra diferencia en el metabolismo (función enzimática, regulación/desregulación de algún proceso celular importante reflejado en crecimiento).

La Figura 11 muestra el comportamiento de la concentración celular (crecimiento celular) en medio mínimo con 8 g/L de glucosa, 15 g/L de extracto de levadura y suplementado con aminoácidos y vitaminas aromáticas de las cepa *B. subtilis aroI* (deficiente en shikimato cinasa), *B. subtilis aroB* (deficiente en DAHP sintasa, enzima inicial de la vía del shikimato; Cabrera V, *et. al.*, artículo por publicar) y *B. subtilis 168*. Al ser un medio que complemente las auxotrofías provocadas por la interrupción de la vía del shikimato, las diferencias en crecimiento observadas entre las cepas en cuestión son debido a alguna otra función enzimática inherente a la enzima shikimato cinasa. Como se puede observar, la cepa mutante en *aroI*, tiene una fase lag de crecimiento mucho más larga (aprox. 7 horas) que las cepas controles (mutantes en *aroB* y cepa silvestre). Este mismo efecto se observó al comparar las cepas CLC6PYKA, CLC2PTS y CLC-CV846 con su cepa parental y la cepa silvestre (resultados no mostrados).

## Crecimiento en Medio Rico de cepas de *B. subtilis*



**Figura 11.-** Crecimiento de las cepas *B. subtilis* 168, *B. subtilis aroI*<sup>-</sup> y *B. subtilis aroB*<sup>-</sup> en medio rico utilizado para cultivos de células en reposo.

### 7.2 Caracterización y determinación de parámetros de producción de shikimato, subproductos y productos de fermentación en las cepas construidas.

El cálculo de los parámetros cinéticos de las cepas construidas se realizó mediante el cultivo de células en reposo que, como se mencionó anteriormente, son cultivos que permiten cuantificar la distribución de la fuente de carbono en el metabolismo de la bacteria.

#### 7.2.1 Caracterización de las cepas construidas en cultivos de células en reposo

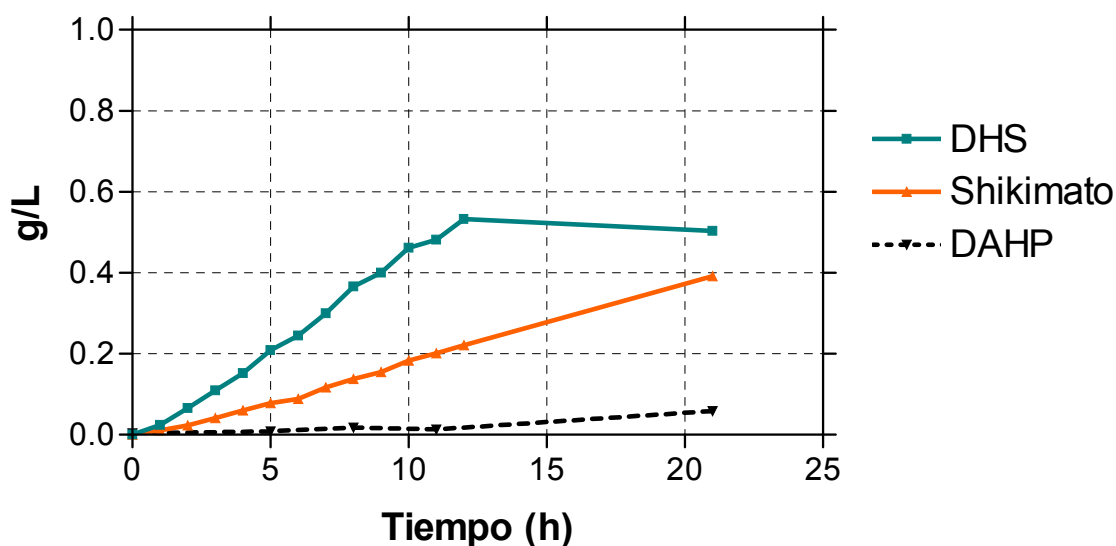
##### 7.2.1.1 Cepa CLC58-168

Esta cepa, al ser una derivada de la cepa silvestre (sin modificaciones en el metabolismo central), puede transportar glucosa eficientemente, y a pesar de que

su crecimiento está afectado considerablemente, la glucosa se consume totalmente al cabo de 20 horas de cultivo. La Figura 12 muestra la cantidad de shikimato, dehidroshikimato (DHS) y DAHP producido a lo largo de 20 horas de cultivo.

Como se puede observar, a pesar de que la interrupción de la vía fue realizada para que acumule shikimato, la cepa acumula una cantidad mayor de DHS, esto debido a un desequilibrio químico en la reacción reversible que cataliza la enzima shikimato deshidrogenasa. Este efecto, como se observará mas adelante ocurre en todas las cepas que acumulan shikimato. La cantidad de DAHP que acumula esta cepa es mínima, esto indica que la sobreexpresión de la enzima DHQ sintasa no tendría efecto significativo sobre la acumulación de shikimato.

### Acumulación de productos en la cepa CLC58-168



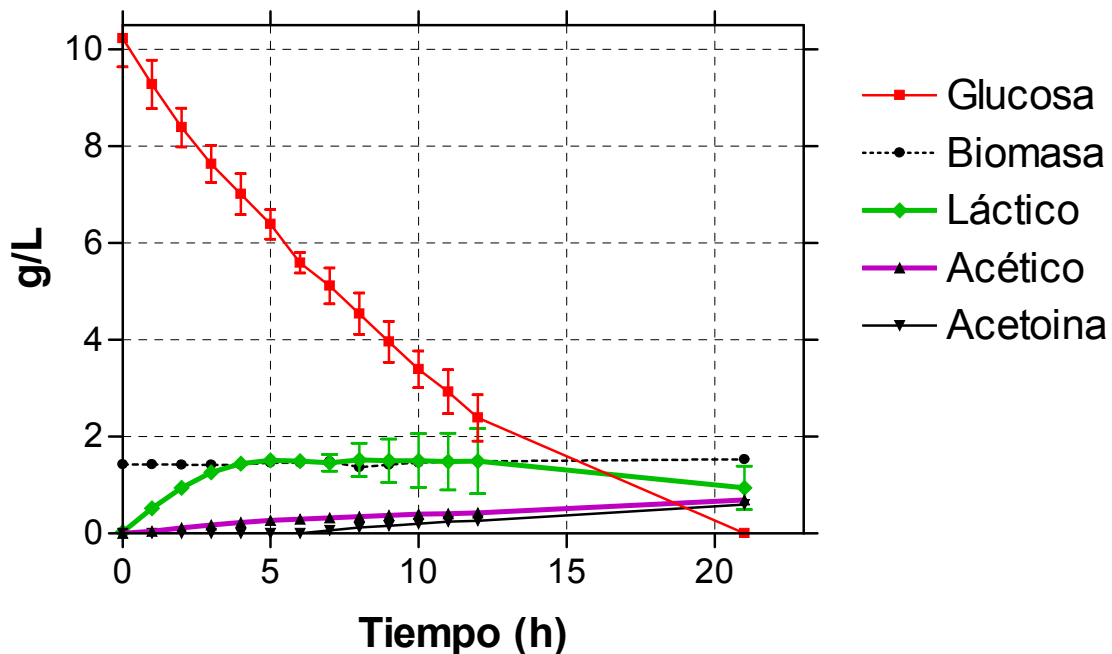
**Figura 12.-** Acumulación de shikimato, DAHP y DHS para la cepa CLC58-168 en cultivos de células en reposo con 8 g/L de glucosa.

La cantidad de productos de fermentación que se generan, así como el consumo de glucosa y el comportamiento de la biomasa a lo largo de la fermentación se muestran en la Figura 13. Durante el proceso de producción se observa la acumulación de productos de fermentación como el ácido láctico, el

ácido acético y la acetoina; esto es debido a que hay un sobreflujo de carbono en la glucólisis que ocasiona que se secreten ácidos orgánicos de vías fermentativas. A pesar de que este tipo de compuestos no son convenientes durante una fermentación, una manera que se propone para evitarlos es sobreexpresar la enzima inicial de la vía del shikimato para redireccionar el flujo de carbono desviado de vías fermentativas hacia la vía de interés.

En cepas de *E. coli* con la shikimato cinasa inactiva, no se observa acumulación alguna de shikimato, este hecho sugiere que la arquitectura y la regulación del metabolismo central y las vías de síntesis de compuestos aromáticos de *B. subtilis* son mucho más propicias para la sobreproducción de intermediarios de la vía del shikimato. En el caso de *E. coli*, para observar acumulación de shikimato se requiere de una mayor cantidad de modificaciones al metabolismo en comparación con *B. subtilis* (Baez J. L, *et. al.*, 2001; Berry A, 1996).

### Acumulación de subproductos en la cepa CLC58-168





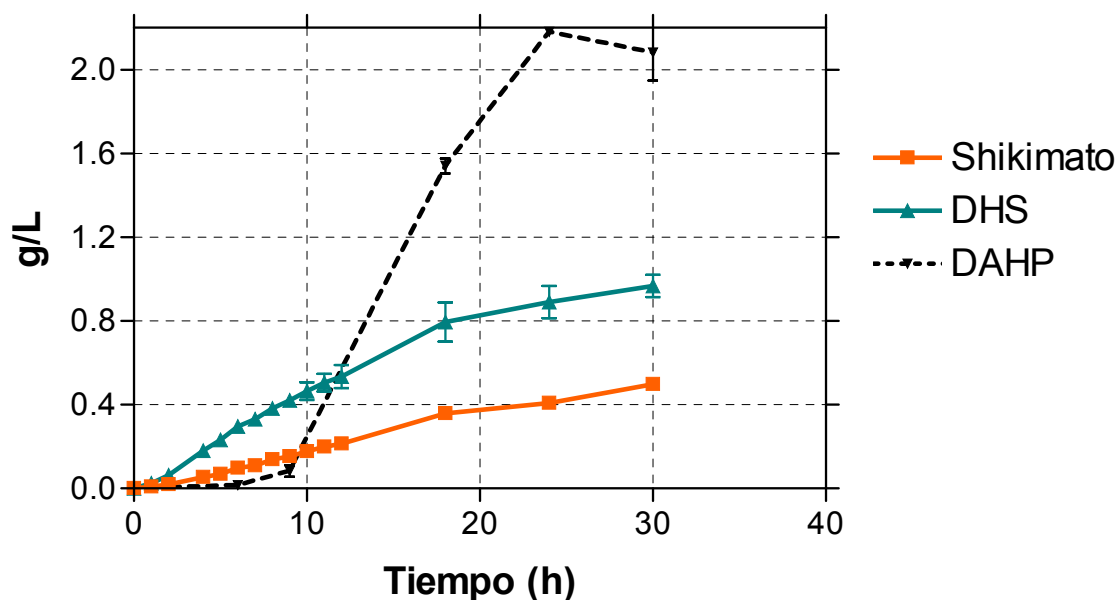
**Figura 13.-** Acumulación de ácidos orgánicos (Láctico, Acético y Acetoína); consumo de glucosa y comportamiento de la biomasa en los cultivos de células en reposo (con 8 g/L de glucosa) para la cepa CLC58-168.

#### 7.2.1.2 Cepa CLC6-PYKA

La cepa CLC6PYKA proviene de una cepa parental (*B. subtilis pykA*<sup>-</sup>) que tiene inactivada la enzima piruvato cinasa A, es decir, que el flujo de carbono hacia el ciclo de Krebs se encuentra limitado al piruvato generado por el sistema PTS. En cepas de *B. subtilis pykA*<sup>-</sup> se ha observado una acumulación considerable de PEP (fosfoenolpiruvato), uno de los intermediarios del metabolismo central que alimentan a la vía del shikimato. Por tal motivo, cepas de *B. subtilis pykA*<sup>-</sup> son candidatos importantes para la producción de compuestos aromáticos (Fry B, *et. al.*, 2000)

Como se puede observar, en la Figura 14, la cantidad de shikimato, dehidroshikimato y DAHP producidos por esta cepa son mayores a la cepa CLC58-168, sin embargo, existe una diferencia importante en el crecimiento de estas bacterias (ver Tabla 4); esto puede representar una desventaja clara en su aplicación en un proceso industrial, ya que la cepa CLC58-168 crece en un tiempo mucho más corto que la cepa CLC6PYKA.

### Acumulación de productos en la cepa CLC6-PYKA



**Figura 14.-** Acumulación de shikimate, DAHP y DHS para la cepa CLC6-PYKA en cultivos de células en reposo con 8 g/L de glucosa.

**Tabla 4.-** Tasa específica de crecimiento de las cepas generadas.

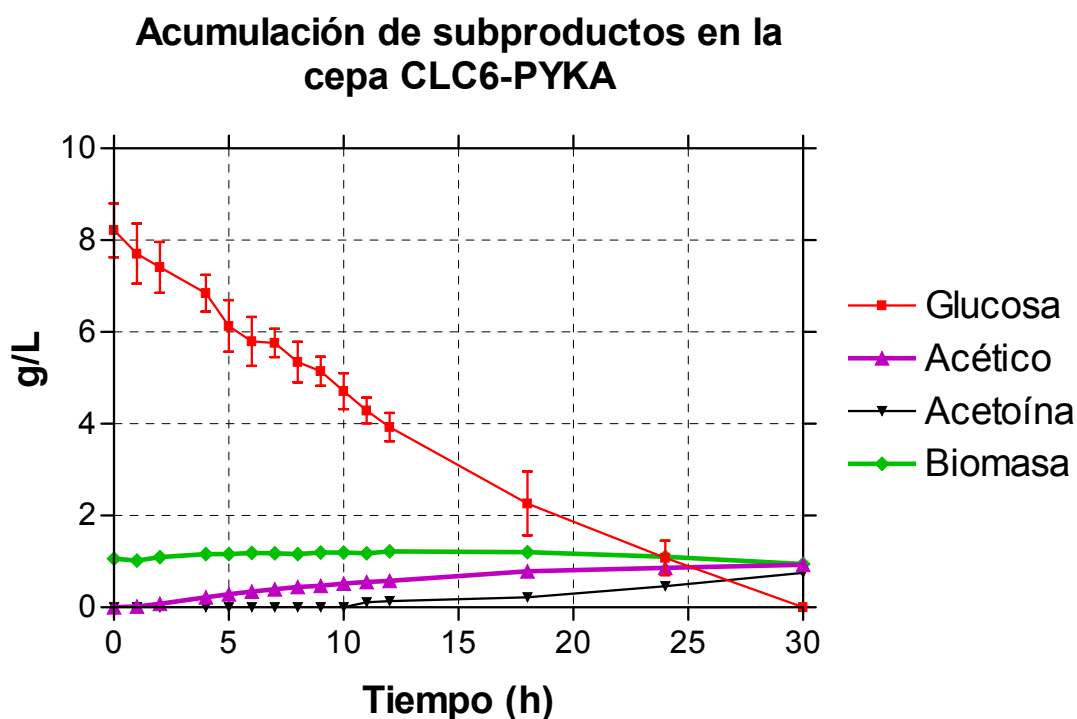
Cepa	$\mu$ [h <sup>-1</sup> ]
CLC58-168	0.34
CLC6PYKA	0.19
CLC2 PTS	0.12

La relación de acumulación de dehidroshikimate con respecto al shikimate continúa siendo mayor a 1 (como lo observado para la cepa CLC58-168), por lo tanto, se propone que al sobreexpresar la enzima shikimate deshidrogenasa, la relación shikimate/dehidroshikimate disminuiría considerablemente.

Del mismo modo, se observa que la cantidad de DAHP acumulada es mucho mayor que la observada para la cepa CLC58-168, es decir, que la arquitectura metabólica de esta cepa aumenta el flujo de carbono hacia aromáticos de manera tal que la actividad de la enzima DHQ sintasa se vuelve

insuficiente, formándose un cuello de botella en ese punto de la vía. Una manera de solucionar esto es mediante la sobreexpresión de dicha enzima; las cepas de *E. coli* sobreproductoras de shikimato tienen esta misma característica, es decir, que la DHQ sintasa también se vuelve limitante en dichas cepas (Berry A, 2001; Krämer M, *et. al.*, 2003)

La Figura 15 muestra el consumo de glucosa, el comportamiento de la concentración de biomasa y los subproductos generados para la cepa CLC6-PYKA.



**Figura 15.-** Acumulación de ácidos orgánicos (Acético y Acetoína); consumo de glucosa y comportamiento de la biomasa en los cultivos de células en reposo (con 8 g/L de glucosa) para la cepa CLC6-PYKA.

El tiempo en el que la cepa consumió la glucosa del medio aumentó debido a la dificultad que esta cepa tiene para crecer. Los productos de fermentación acumulados (como el ácido acético y la acetoína) disminuyeron en comparación con los observados en la cepa CLC58-168 que acumuló además de los anteriores, ácido láctico; esto demuestra que la cepa CLCPYKA, por su arquitectura metabólica tiene mayor capacidad de direccionar flujo de carbono hacia la vía de

los aromáticos, y una menor capacidad de sintetizar piruvato y productos de fermentación derivados de este intermediario.

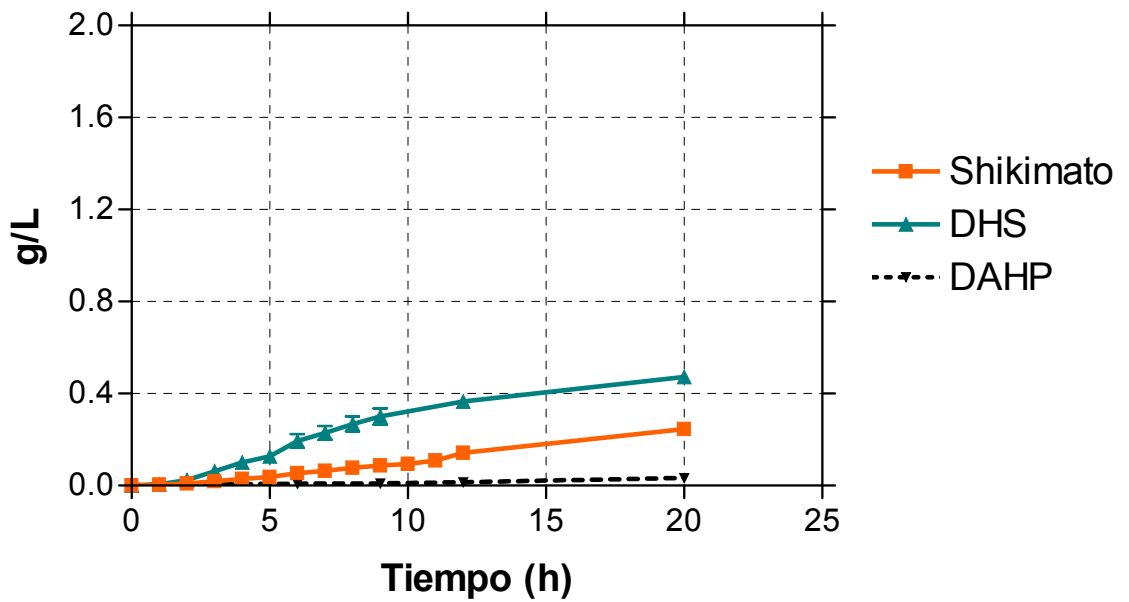
#### 7.2.1.3 Cepa CLC2-PTS

La cepa CLC2PTS posee una arquitectura metabólica distinta a las cepas anteriores, proviene de una cepa parental *B. subtilis ptsGHf* que tiene inactivo el sistema de transporte de glucosa por fosfotransferasa, es decir que el consumo de glucosa está disminuido considerablemente con respecto a la cepa silvestre. En cepas de *E. coli pts<sup>-</sup>*, la cantidad de PEP disponible aumenta un 50%, lo que representa la posibilidad de duplicar el rendimiento teórico de la producción de compuestos intermediarios de la vía del shikimato (Patnaik R, *et. al.*, 1994). Sin embargo aún cuando la cepa CLC2-PTS no se ha caracterizada en detalle, es de esperarse que el transporte y la fosforilación de la glucosa sea dependiente de ATP y por lo tanto, el sistema PTS no consume PEP.

En la Figura 16 podemos observar la cantidad de shikimato, de dehidroshikimato y de DAHP acumulada a lo largo de 20 horas de cultivo; del mismo modo que para las cepas analizadas anteriormente, la cantidad de dehidroshikimato acumulada es mayor que la de shikimato, por lo tanto, una sobreexpresión de la enzima shikimato deshidrogenasa es una solución propuesta para la disminución de dicho problema.

La cantidad de DAHP acumulada no es significativa, esto sugiere que la cantidad de carbono que la arquitectura metabólica dispone para la vía de los aromáticos no es suficiente como para sobrepasar la capacidad catalítica de las enzimas de la vía.

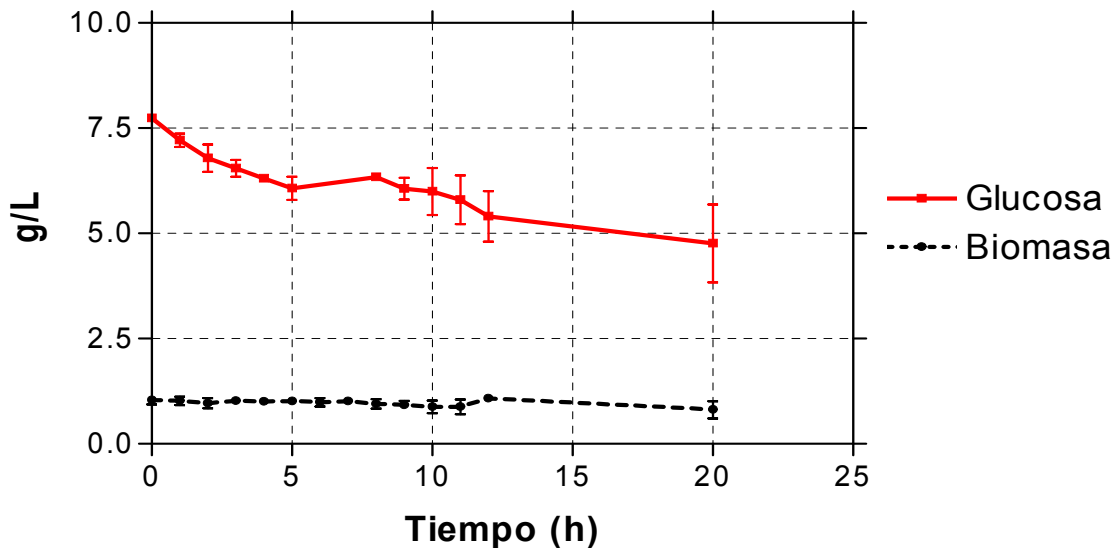
### Acumulación de productos en la cepa CLC2-PTS



**Figura 16.-** Acumulación de shikimate, DAHP y DHS para la cepa CLC6-PYKA en cultivos de células en reposo con 8 g/L de glucosa.

Es importante destacar que esta cepa no acumula ácidos orgánicos (ver Figura 17), debido a su baja tasa de consumo de glucosa el flujo de carbono sobre la glucólisis es bajo.

### Acumulacion de subproductos en la cepa CLC2-PTS



**Figura 17.-** Consumo de glucosa y comportamiento de la biomasa en los cultivos de células en reposo (con 8 g/L de glucosa) para la cepa CLC2-PTS.

Esto provoca que la glucosa consumida se utilice de una manera más eficiente para la producción de compuestos aromáticos. A pesar de que esta cepa muestra un mayor rendimiento, su aplicación para procesos industriales es poco promisorio debido a su limitada capacidad para consumir glucosa.

Una diferencia entre *E. coli* y *B. subtilis* en cuanto arquitectura metabólica se refiere, se evidencia claramente en esta cepa, ya que para el caso de *E. coli*, las cepas que presentan mayor acumulación de intermediarios de la vía del shikimato son las que presentan inactivación del sistema PTS. A diferencia de lo observado en *B. subtilis* en donde las cepas que acumulan mayor cantidad de compuestos aromáticos son las derivadas de las cepas con inactivación en la piruvato cinasa. Una posible razón es la cantidad de PEP disponible. El hecho de que *B. subtilis* no utilice PEP directamente para alimentar el Ciclo de Krebs puede generar una acumulación mayor de dicho intermediario con respecto a cepas PTS<sup>-</sup> de *E. coli*, de manera que los efectos regulatorios del PEP sobre las enzimas de la glucólisis sean mayores en la cepa *B. subtilis* PYKA<sup>-</sup> que en la cepa *E. coli* PTS<sup>-</sup>.

Para demostrar esta hipótesis es necesaria la cuantificación de PEP intracelular en las cepas involucradas.

### 7.2.2 Constantes de producción de las cepas construidas

La selección de cepas para procesos biotecnológicos es un proceso en el que se requiere tomar en cuenta muchas consideraciones. Una de las principales características que requiere una cepa para su aplicación industrial es poseer una alta tasa de crecimiento en medio mínimo. Las cepas generadas en este trabajo tienen una tasa de crecimiento en medio mínimo muy reducida con respecto a la cepa silvestre; sin embargo, si el producto tiene un elevado valor agregado, estos problemas pueden solucionarse adicionando al medio de cultivo componentes que, a pesar de ser costosos, ayuden a generar biomasa dentro del proceso industrial. Otra característica importante para la selección de una cepa son las constantes de acumulación de producto, la tasa de consumo de sustrato y el rendimiento de acumulación de producto con respecto a la cantidad de sustrato consumida.

Como se puede observar en la Tabla 5, la cepa CLC6PYKA muestra una  $q_p$  (tasa de generación de producto) y  $Y_{p/s}$  (rendimiento de producto con respecto a sustrato) 1.38 y 1.58 veces mayor que la que muestra la cepa control respectivamente; del mismo modo la cepa CLC2PTS, al estar inactivado el sistema principal de transporte de glucosa, muestra aunque no una mayor  $q_p$ , si un rendimiento 1.44 veces mayor que la cepa control. Al comparar la tasa de consumo de glucosa de las cepas CLC58-168 y CLC6-PYKA, observamos que a pesar de que la primera consume glucosa más rápido, la cepa CLC6-PYKA la utiliza de una manera más eficiente.

**Tabla 5.-** Parámetros de producción de shikimato de las cepas construidas.

Cepa	$q_s$ [ $h^{-1}$ ]	$q_p$ [ $h^{-1}$ ]	$Y_{p/s}$
CLC58-168	0.31	0.013	0.043

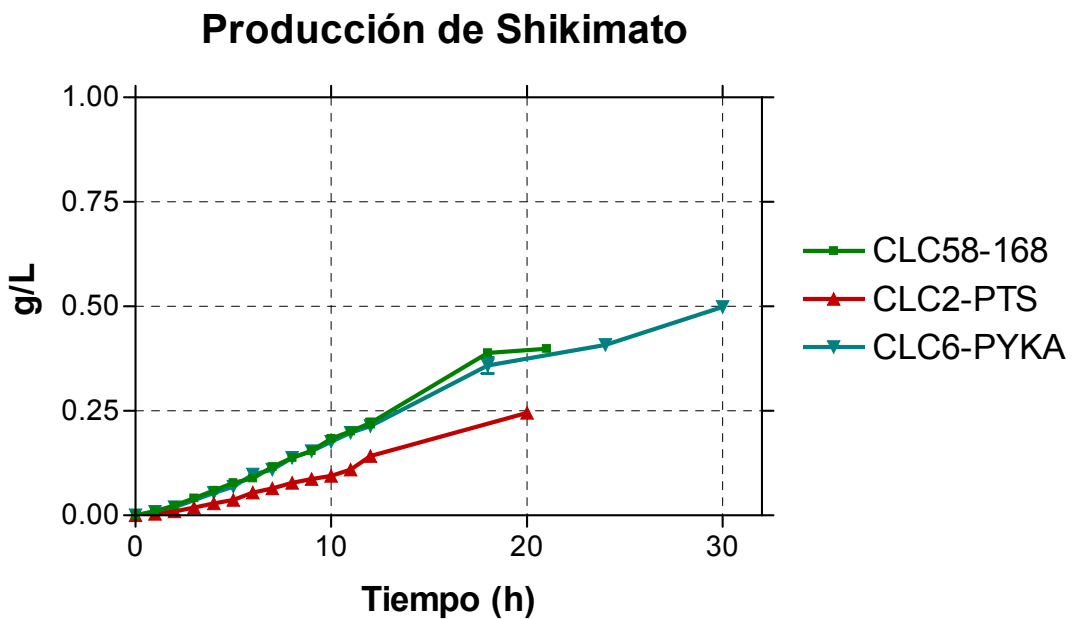
CLC6PYKA	0.27	0.018	0.068
CLC2 PTS	0.182	0.011	0.062

\* $q_p$  tasa de generación de producto;  $Y_{p/s}$  rendimiento de producto con respecto a sustrato;  $q_s$  tasa de consumo de sustrato

### 7.3 Evaluación de la cepa con mejores características para producción de shikimato en un sistema en lote y lote alimentado.

En la Figura 18 observamos el comportamiento de la acumulación de shikimato con respecto al tiempo para las cepas generadas.

Como se mencionó anteriormente, la cepa CLC6-PYKA produce mayor cantidad de shikimato que la cepa CLC2-PTS, y a pesar de que en una fase inicial del cultivo produce la misma cantidad que la cepa CLC58-168, finalmente obtuvo un mayor título de shikimato con la misma cantidad de glucosa.

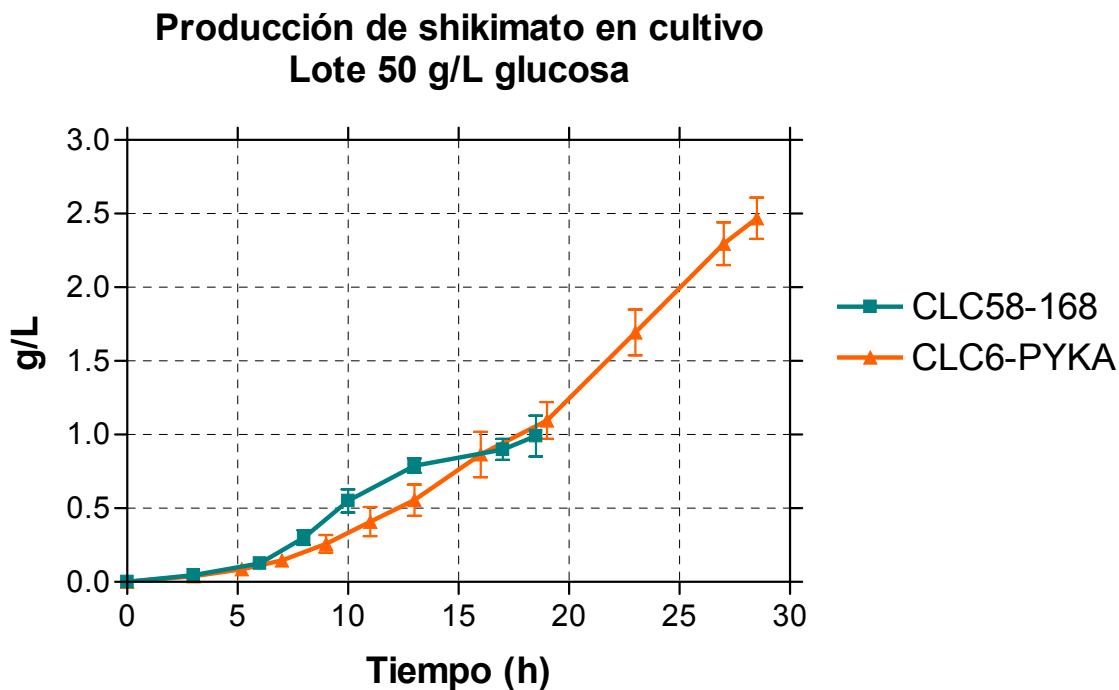


**Figura 18.-**Acumulación de shikimato en las cepas generadas en cultivos de células en reposo

Tanto las cepas CLC6-PYKA como la CLC58-168 fueron evaluadas en un sistema lote con 45 g/L de glucosa (ver Figura 19). Observamos el mismo

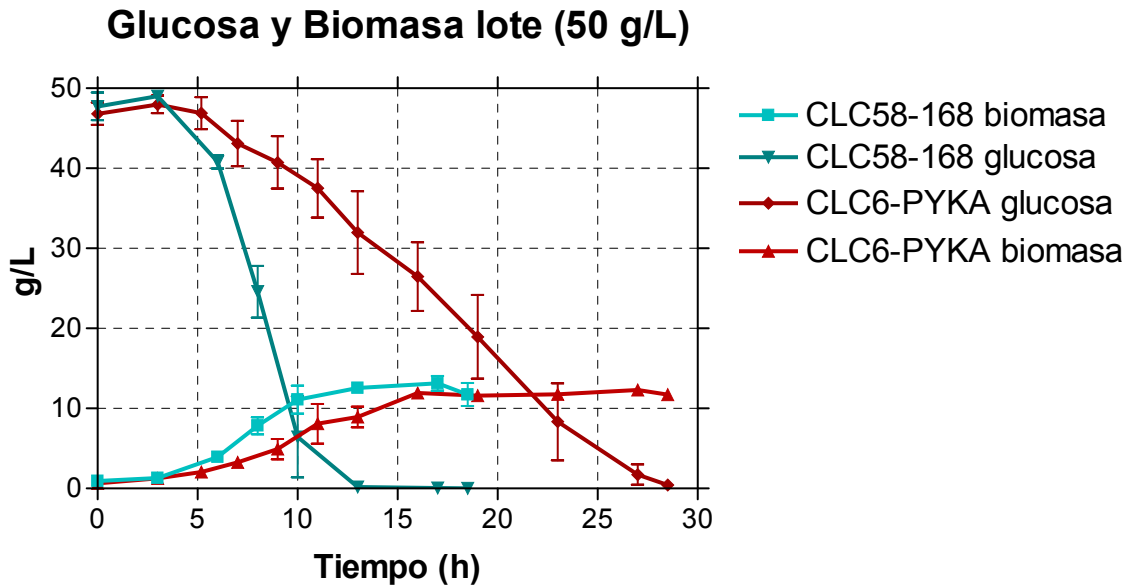


comportamiento de la acumulación de shikimato con respecto al tiempo que en los cultivos de células en reposo; es decir, que en una fase inicial de cultivo acumulan shikimato a la misma velocidad, sin embargo observando la fase final del cultivo se tiene que la cepa CLC6PYKA utiliza de una manera mas eficiente la glucosa llegando a un mayor título de shikimato (2.5 g/L para la cepa CLC-PYKA y 1 g/L para la cepa CLC58-168).



**Figura 19.-** Acumulación de shikimato con respecto al tiempo para las cepas CLC6-PYKA y CLC58-168 en un cultivo lote con 45g/L de glucosa.

Como se puede observar en la Figura 20, la cepa CLC58-168 consume la glucosa en menor tiempo que la cepa CLC6-PYKA, y a pesar de que la fase en la fase exponencial crece a una tasa más elevada, finalmente se alcanza la misma cantidad de biomasa en la fase estacionaria del cultivo.



**Figura 20.-** Consumo de glucosa y comportamiento de la concentración de biomasa para las cepas CLC6-PYKA y CLC58-168 en un cultivo lote con 50 g/L de glucosa.

Durante la fermentación en la cepa CLC6-PYKA no se requirió del consumo de base, no así para la cepa CLC58-168, en donde se requirió el consumo de base desde tempranas horas del cultivo. Esto es importante de señalar y es una característica importante para el caso de considerar escalar el proceso a un volumen de producción mayor.

La concentración final de la biomasa fue similar en ambas cepas ya que alcanzaron un valor de 12 g/L; sin embargo, debido a las claras diferencias en la tasa de consumo de glucosa, la cepa CLC58-168 alcanza este valor más rápido que la cepa CLC6-PYKA.

Al calcular los parámetros de producción de la cepa CLC6-PYKA obtenemos que la  $q_p$  es de  $0.0074 \text{ h}^{-1}$  y el rendimiento de 0.058. Es importante señalar que éste último no cambia significativamente con respecto al observado en cultivos en células en reposo (0.062). Esta característica es importante para su aplicación industrial ya que sugiere que la cepa es estable a distintas condiciones de cultivo.

Con el propósito de aumentar el título final de shikimato y del mismo modo observar el comportamiento de los parámetros de producción para la cepa CLC6-PYKA, se realizó un cultivo lote alimentado; de esta manera, al alcanzar los 12 g/L de biomasa durante la fase lote, se procede a alimentar glucosa a la misma tasa que la consume para que la acumulación dentro del reactor sea cercana a cero.

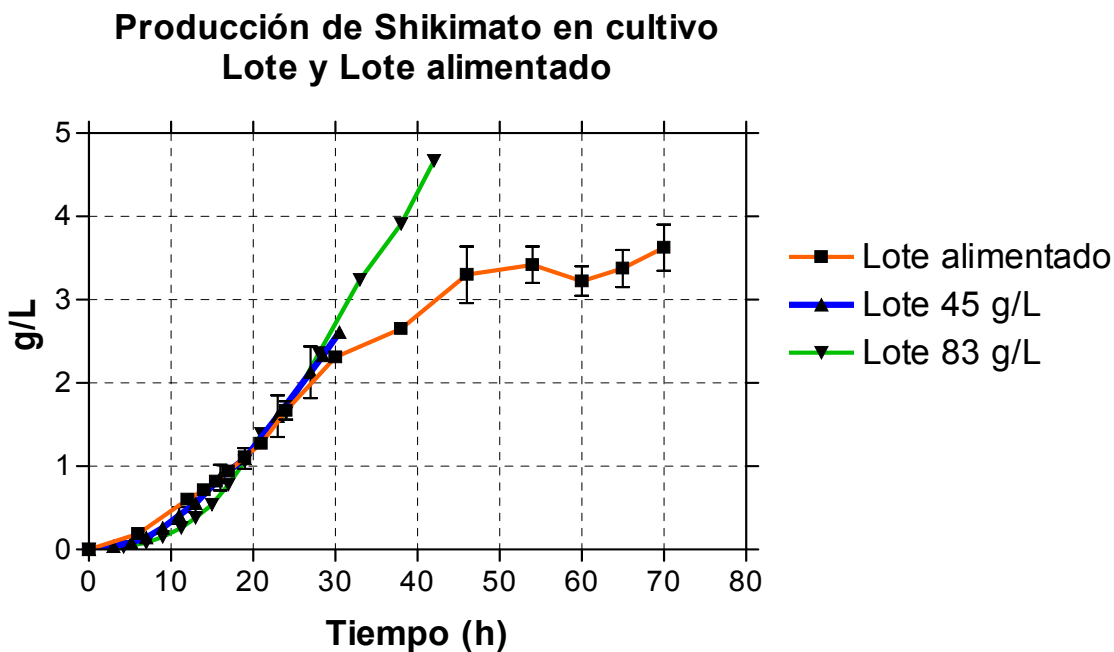
El tiempo total del cultivo fue de 70 horas, 14 de las cuales el cultivo permaneció en fase lote. Durante la alimentación de glucosa se esperaba que la tasa de acumulación de shikimato aumentara, debido a que el cultivo se encontraba en la fase estacionaria, de manera que la glucosa alimentada estuviera preferentemente utilizada en la producción de shikimato. Sin embargo, una vez que el cultivo cumple 20 horas (en donde se esperaría la fase estacionaria), continúa creciendo, alcanzando a duplicarse durante la fase de alimentación; es decir, que utiliza la glucosa alimentada preferentemente para crecimiento y no para producir shikimato. Es por eso que la acumulación de shikimato entra a una fase estacionaria a partir de la hora 30 (ver lote alimentado, Figura 21).

Los valores de  $Y_{p/s}$  y  $q_p$  fueron de 0.044 y 0.0054 respectivamente. Al comparar estos valores con los obtenidos en el sistema lote ( $Y_{p/s}$  de 0.058 y  $q_p$  de 0.0074) y recordando que en el lote alimentado la concentración de glucosa se mantuvo por debajo de 1 g/L, observamos que la cepa tiene una mayor capacidad de producción de shikimato en un sistema en donde la concentración de glucosa en todo momento es considerablemente alta. Esto puede ser atribuido a que hay más glucosa en el sistema lote, la cantidad de carbono en la glucólisis en todo momento sea mayor, aumentando la cantidad de precursores del metabolismo central y DAHP, provocando así, una mayor acumulación de shikimato.

Una vez observado que la cepa tenía un mejor comportamiento en un sistema en lote, con la finalidad de alcanzar un mayor título de shikimato y de observar si los parámetros de producción cambiaban de acuerdo a la cantidad de

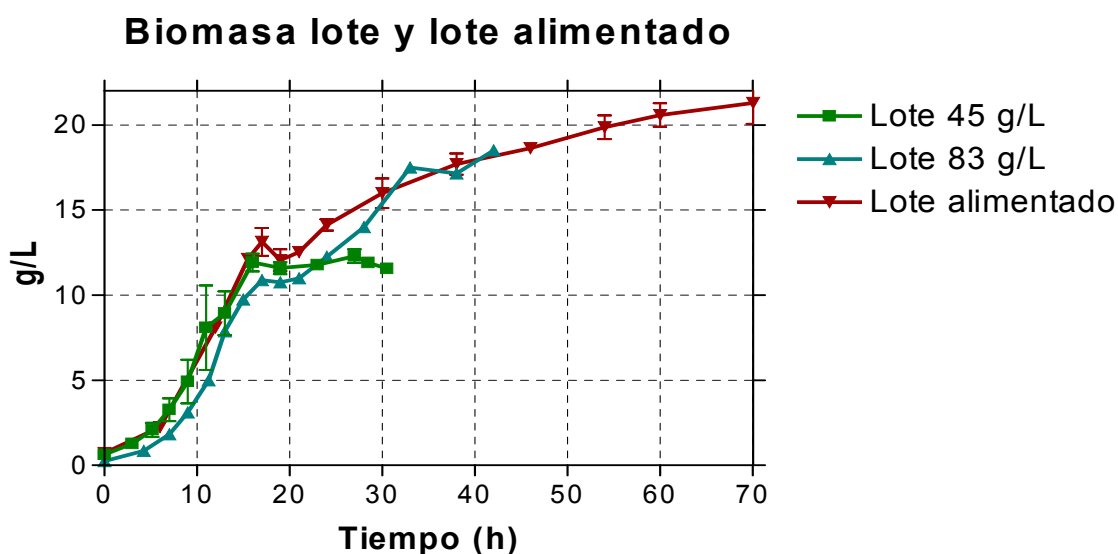
glucosa utilizada, se llevó a cabo un cultivo lote con 83 g/L de glucosa para alcanzar un título final de shikimato de 4.67 g/L en 42 horas de cultivo. El rendimiento de shikimato con respecto a la glucosa fue de 0.0575, es decir casi no varió con respecto al 0.058 obtenido del sistema lote con 45 g/L. Por el contrario, el valor de  $q_p$  aumentó un de 0.0074 a 0.0079 (6%). Este comportamiento es importante porque indica que la cepa es estable y puede ser utilizada para procesos con mayores concentraciones de glucosa, sin alterar sus parámetros de producción de shikimato.

En la figura 21 se compara el comportamiento de la acumulación de shikimato con respecto al tiempo en los 3 sistemas de cultivo utilizados. Se puede observar que durante la fase de crecimiento exponencial, la cantidad de shikimato aumenta de la misma manera en los 3 sistemas de cultivo. Sin embargo, a partir de este momento, la cantidad de shikimato acumulada va a depender de la cantidad de glucosa en el reactor, por ello es que el sistema lote (83 g/L) el que presenta una acumulación mayor de shikimato.



**Figura 21.-** Acumulación de shikimato con respecto al tiempo para las cepas CLC6-PYKA bajo distintas condiciones de cultivo.

En la Figura 22 se puede confirmar el hecho de que la glucosa administrada en la fase de alimentación del fed-batch, se utiliza preferentemente para crecer. Se observa que a partir de la hora 20, en la que se esperaba la fase estacionaria, la cepa empieza a crecer alcanzando la duplicación al final del cultivo. Esto confirma lo observado en la Figura 19, en donde se denota, para el cultivo lote alimentado, cómo disminuye la velocidad de acumulación de shikimato.



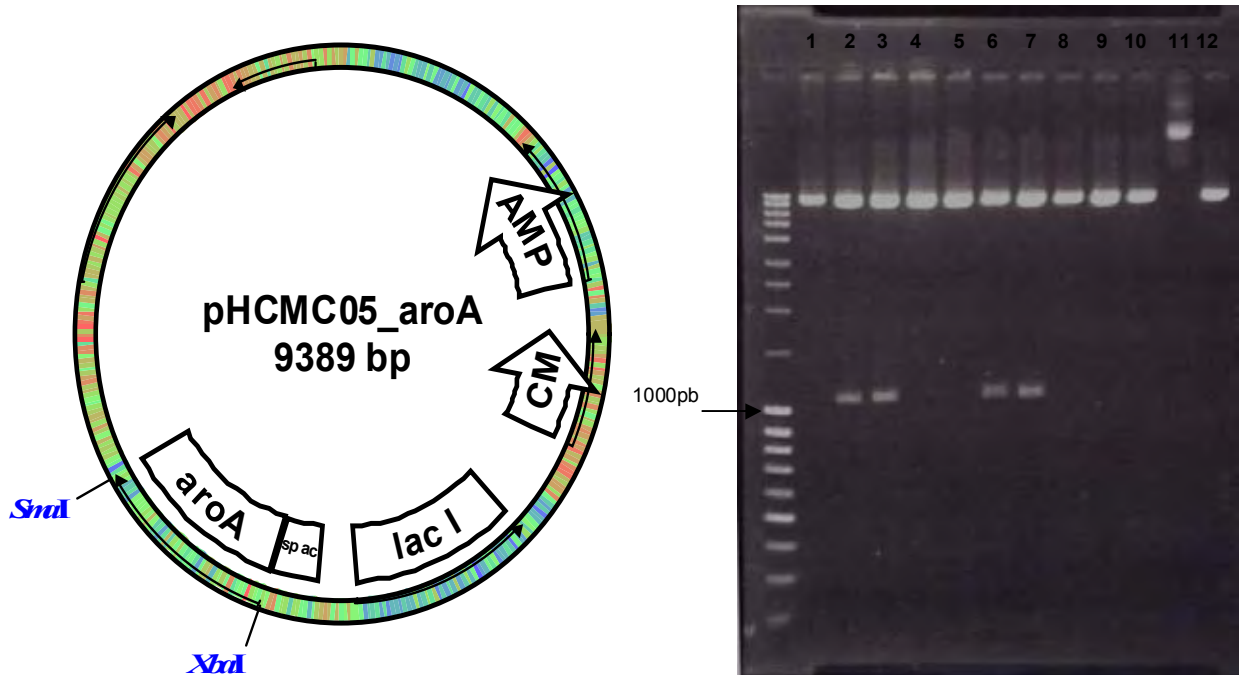
**Figura 22.-** Concentración de biomasa de la cepa CLC6-PYKA en los sistemas lote y lote alimentado.

#### **7.4 Generación de cepas de *B. subtilis* que sobreexpresan el gen *aroA* que codifica para la enzima DAHP sintasa.**

Para la generación de cepas de *B. subtilis* que sobreexpresen la enzima DAHP sintasa se clonó una copia del gen *aroA* en el vector de expresión pHCMC05, para dar lugar al vector pHCMC05\_aroA. En la Figura 23-A se muestra el mapa del plásmido construido para la expresión de dicha enzima.

La correcta clonación del gen *aroA* en el plásmido pHCMC05 se observa en la Figura 23-B. Como puede observarse, las clonas 2, 3, 6 y 7 tras digerir con XbaI-SmaI, son las que portan el gen *aroA*. Al verificar la secuencia de dichas clonas observamos que los candidatos 3 y 7 contienen una mutación sinónima en

la posición 393 (tirosina) y en la posición 750 (serina) respectivamente, mientras que los candidatos 2 y 6 poseen sustituciones que pueden influir en la actividad de la enzima. Los candidatos 3 y 7 serán los utilizados para la transformación de las cepas *aroI* generadas.



**Figura 23.-** (A) Vector construido para la expresión del gen *aroA* en cepas de *B. subtilis*. (B) gel agarosa 1% en donde se muestra la liberación del fragmento clonado (gen *aroA*) en el plásmido pHCMC05; de las clonas candidatas (1→12) las clonas 2, 3, 6 y 7 liberaron el inserto del tamaño esperado (1.1 kb)

La transformación de las cepas CLC58-168, CLC6PYKA y CLC2PTS con el plásmido que expresa la enzima DAHP sintasa de *B. subtilis* no se ha logrado realizar debido a las dificultades que presentan las cepas receptoras para entrar en estado de competencia y crecer en el medio de selección. Dichos experimentos serán planteados como perspectivas para este trabajo.

## 8. CONCLUSIONES

- La cepa de *B. subtilis* que carece de actividad de shikimato cinasa (CLC58-168) acumula ácido shikímico sin la necesidad de tener una enzima que direcciones el flujo hacia la vía de síntesis de los compuestos aromáticos, sin embargo por la cantidad de ácidos orgánicos que produce es una cepa poco atractiva para su aplicación en procesos industriales.
- La cepa de *B. subtilis* que carece de actividad del sistema PTS y shikimato cinasa (CLC2-PTS) presenta un rendimiento de shikimato con respecto a glucosa 44% más alto que el mostrado por la cepa CLC58-168, sin embargo su limitada capacidad de consumo de sustrato produce una disminución en el crecimiento que la imposibilita para su aplicación a un proceso industrial.
- La cepa de *B. subtilis* que carece de la actividad de piruvato cinasa y shikimato cinasa (CLC6-PYKA) tiene una productividad específica y un rendimiento de shikimato con respecto a glucosa 38% y 58% respectivamente, mas altos que los mostrados por la cepa CLC58-168, por lo que es una cepa con mayor aplicación en un proceso industrial.
- La acumulación de compuestos aromáticos (shikimato, DHS y DAHP) en la cepa CLC6-PYKA en cultivos de células en reposo indican que la arquitectura metabólica de esta cepa dispone de una mayor cantidad de carbono para la vía de los aromáticos que la arquitectura metabólica que se dispone en las cepas CLC2-PTS y CLC58-168.
- Al no tener una enzima que redireccione el flujo de carbono hacia la vía de los aromáticos, la producción de shikimato en la cepa CLC6-PYKA es un factor que depende directamente de la cantidad de glucosa dentro del reactor, es decir de la cantidad de carbono (glucosa) catabolizado en la glucólisis.

## **9. PERSPECTIVAS**

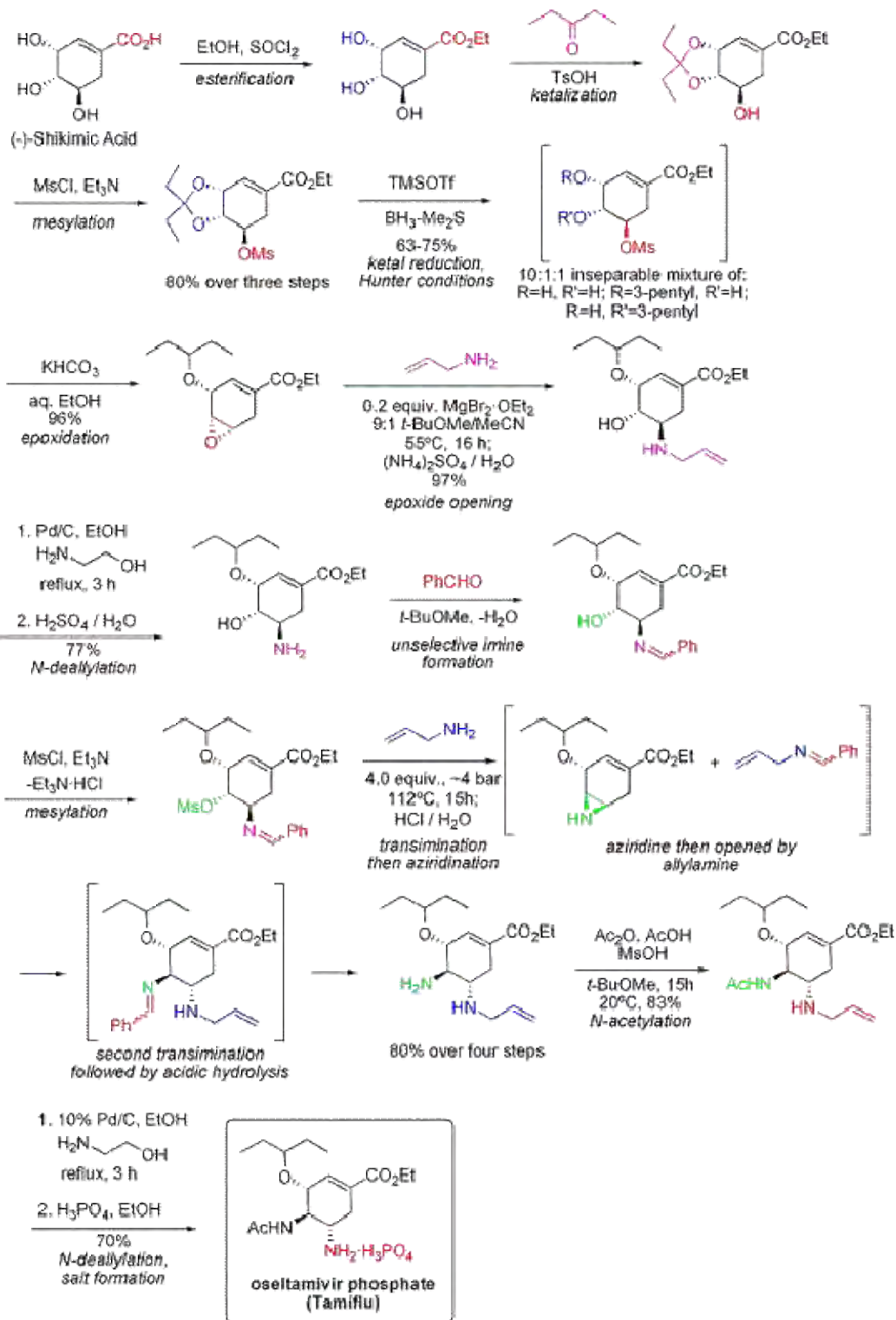
- Transformación del plásmido pHCMC05\_aroA en las cepas CLC58-168, CLC6-PYKA y CLC2-PTS y cuantificar el efecto que tiene la sobreexpresión de la enzima DAHP sintasa sobre la producción de shikimato y subproductos de la vía de los compuestos aromáticos.
- Sobreexpresión de la enzima DHQ sintasa en la cepa CLC6-PYKA y cuantificación del efecto sobre la acumulación de shikimato
- Cuantificar la cantidad de PEP intracelular en las cepas CLC2-PTS y CLC6-PYKA
- Cuantificación de transporte de glucosa en las cepas CLC2-PTS y CLC6-PYKA



## **10. ANEXOS**

### **ANEXO I**

Síntesis química de fosfato de oseltamivir a partir de ácido shikímico (Karpf M y Trussardi R. 2001).



## ANEXO II

### Condiciones de amplificación de las reacciones de PCR

Amplificación de la región adyacente derecha (IR) al gen *arol* en *B. subtilis*

- 5 µL ADN cromosomal *B. subtilis* 168 (templado)
- 1 µL primer 5ArolR (50pM)
- 1 µL primer 3-SKBS-R (50pM)
- 1 µL dNTPs 10mM
- 10µL Buffer (B) 5x (kit elongasa, contiene MgSO<sub>4</sub>)
- 1 µL Elongase enzyme Mix (Invitrogen)
- 31µL Agua

\*Condiciones de reacción

1er ciclo (una vez)	94°C	5 min
2do ciclo (35 veces)	94°C	30 seg
	58°C	45 seg
	68°C	1 min
3er ciclo (una vez)	68°C	10 min

Amplificación de la región adyacente derecha (IL) al gen *arol* en *B. subtilis*

- 5 µL ADN cromosomal *B. subtilis* 168 (templado)
- 1 µL primer 5-Arol-L (50pM)
- 1 µL primer 3-Arol-L (50pM)
- 1 µL dNTPs 10mM
- 10µL Buffer (B) 5x (kit elongasa, contiene MgSO<sub>4</sub>)
- 1 µL Elongase enzyme Mix (Invitrogen)
- 31µL Agua

\*Condiciones de reacción

1er ciclo (una vez)	94°C	5 min
2do ciclo (35 veces)	94°C	30 seg
	58°C	45 seg
	68°C	1 min
3er ciclo (una vez)	68°C	10 min

Amplificación del cassette de interrupción del gen *arol* en *B. subtilis*

7 µL ADN cromosomal *B. subtilis* 168 (templado)  
1 µL primer 5-AroI-L (50pM)  
1 µL primer 3-SKBS-R (50pM)  
1 µL dNTPs 10mM  
10µL Buffer B 5x (kit elongasa, contiene MgSO<sub>4</sub>)  
1 µL Elongase enzyme Mix (Invitrogen)  
29µL Agua

\*Condiciones de reacción

1er ciclo (una vez)	94°C	5 min
2do ciclo (35 veces)	94°C	30 seg
	58°C	45 seg
	68°C	2.5min
3er ciclo (una vez)	68°C	10 min

Amplificación del gen *aroA* de *B. subtilis* 168

5 µL ADN cromosomal *B. subtilis* 168 (templado)  
1 µL primer 5AroA (50pM)  
1 µL primer 3AroA (50pM)  
1 µL dNTPs 10mM  
5 µL Buffer 10X (kit Taq platinum, Invitrogen)  
0.5µL Taq Platinum  
1.5µL MgSO<sub>4</sub> 50mM  
35 µL Agua

Condiciones de reacción

1er ciclo (una vez)	94°C	7 min
2do ciclo (35 veces)	94°C	45 seg
	60C	1 min
	72°C	1.2min
3er ciclo (una vez)	72°C	10 min

## ANEXO III

### Soluciones y Medios de Cultivo

#### **Medio Luria Bertrani (LB) (para 1 litro)**

10g Triptona

10g NaCl

5g Extracto de levadura

Aforar con agua miliQ a 1L;

15g de bacto agar (Para medio sólido)

#### **Medio SOC (para 500mL)**

10g Triptona

2.5g Extracto de levadura

0.3g NaCl

0.1g KCl

Disolver en agua miliQ y después de esterilizar agregar:

5mL MgCl<sub>2</sub> (1M)

5mL MgSO<sub>4</sub> (1M)

#### **Sales de transformación 10X para preparar medio TBI y TBII (células competentes de *B. subtilis*)**

(para 100mL)

14g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

6g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

2g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

1g Citrato de sodio

Esterilizar por autoclave

#### **Medios de cultivo para Células en Reposo**

Medio rico (Fase generación de Biomasa). Cantidades para preparar 1L de medio:

5.32g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

6.4g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
4g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   
15g Extracto de Levadura

Agregar después de esterilizar. (debidamente esterilizadas)

40mL Glucosa 20%  
200 $\mu\text{L}$  Ácido cítrico 5%  
1mL  $\text{MgSO}_4$  40%  
15 $\mu\text{L}$   $\text{CaCl}_2$  20%  
200 $\mu\text{L}$   $\text{MnCl}_2$  2.5%  
20 $\mu\text{L}$   $\text{FeSO}_4$  15%  
192 $\mu\text{L}$  Ácido p-aminobenzóico 62mg/mL  
248 $\mu\text{L}$  Ácido p-hidroxibenzóico 48mg/mL  
248 $\mu\text{L}$  Ácido 2-3 dihidroxibenzóico 35mg/mL  
1mL L-Triptofano (4mg/mL)  
2mL L-Fenilalanina (4mg/mL)  
2mL L-Tirosina (4mg/mL)

Agregar antibiótico correspondiente. Spt (100 $\mu\text{g}$ /mL)

Medio mínimo (Fase de producción). Cantidades para preparar 1L de medio:

5.32g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   
6.4g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
4g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Agregar después de esterilizar.

40mL Glucosa 20%  
200 $\mu\text{L}$  Ácido cítrico 5%  
1mL  $\text{MgSO}_4$  40%  
15 $\mu\text{L}$   $\text{CaCl}_2$  20%  
200 $\mu\text{L}$   $\text{MnCl}_2$  2.5%  
20 $\mu\text{L}$   $\text{FeSO}_4$  15%  
Agregar el antibiótico correspondiente. Spt (100 $\mu\text{g}$ /mL)

## **Medios de cultivo para fermentaciones en lote y lote alimentado**

### Preinóculo

Medio LB suplementado con 4g/L de glucosa, Spt (100µg/mL)

### Inóculo para 1 litro

5.32g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

6.4g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

4g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

15g Extracto de Levadura

Agregar después de esterilizar.

150mL glucosa 20%

200µL Ácido cítrico 5%

1mL MgSO<sub>4</sub> 40%

15µL CaCl<sub>2</sub> 20%

200µL MnCl<sub>2</sub> 2.5%

20µL FeSO<sub>4</sub> 15%

Agregar antibiótico correspondiente. Spt (100µg/mL)

### Medio de producción para 1 litro

4.8g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

6.5g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

4g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

30g Extracto de Levadura

Agregar después de esterilizar.

200µL Ácido cítrico 5%

2.5mL MgSO<sub>4</sub> 40%

15µL CaCl<sub>2</sub> 20%

200µL MnCl<sub>2</sub> 2.5%

20µL FeSO<sub>4</sub> 15%

Agregar antibiótico correspondiente. Spt (100µg/mL)

La cantidad de glucosa depende de la fermentación, se realizaron a 45 g/L y 83g/L.

Ajustar el pH del medio a 7.1-7.2 con perlas de NaOH

## ANEXO IV

Protocolo modificado para la preparación de células competentes y transformación de cepas de *B. subtilis*

### 3 ml de medio TBI

300 µl de sales de transformación 10X (ver Anexo III)

75 µl de arabinosa o glucosa 20%

15 µl de MgSO<sub>4</sub> 1 M

60 µl de casaminoácidos 10 %

37.5 µl de triptófano 4mg/ml

2.5 ml de agua

Sembrar una colonia grande o varias pequeñas de cada cepa.

MONITOREAR LAS CELULAS A LAS 4 HORAS EN MICROSCOPIO PARA QUE LLEGUEN A ESTADO DE COMPETENCIA QUE SE CARACTERIZA POR MODIFICAR SU MORFOLOGÍA DE BACILOS A COCOS, Y GRAN MOVILIDAD EN PREPARACIONES FRESCAS.

### TB II (5ml) Medio para dilución

500 µl de sales de transformación 10x (ver Anexo III)

125 µl de arabinosa o glucosa 20%

25 µl de MgSO<sub>4</sub> 1M

50 µl de casaminoácidos 10%

6.25 µl de L-Trp 4mg/ml

3.5 ml H<sub>2</sub>O

Diluir 1-1.2 ml de células crecidas en medio TBI en 2.5 ml de medio TBII

De esta dilución tomar 600µl y agregar el DNA para transformación e incubar 1 hora a 37°C, 300 rpm.

(NOTA: la eficiencia de transformación depende de la cantidad de DNA agregado, generalmente agregar de 60 a 100µl de DNA para una mayor eficiencia).



Para el caso de que la transformación sea de un plásmido suicida, y éste vaya a inactivar algún gen de la vía de los aromáticos se recomienda que al medio de selección se le adicione glucosa a una concentración de 4 g/L.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

Báez J. L, Bolívar F y Gosset G. (2001). "Determination of 3-Deoxy-D-Arabinose-7-Phosphate Productivity and Yield from Glucose in *Escherichia coli* Devoid of the Glucose Phosphotransferase Transport System." *Biotechnology and Bioengineering*. (73) 530-535.

Beigel J and Bray M. (2008). "Current and future antiviral therapy for severe seasonal and avian influenza". *Antiviral research*. (78): 91-102.

Berry, A. (1996). "Improving production of aromatic compounds in *Escherichia coli* by metabolic engineering". *Trends in Biotechnology* (14): 250-256.

Chávez M. I, Martínez A, Bolívar F y Gosset G. (2005). "Metabolic pathway engineering for microbial production of aromatic amino acids" *Research. Advanced. In Food Science*. (5) 11-20.

Chandran S. S, Yi J, Draths K. M, Von Daeniken R, Weber W, Frost J. W. (2003). "Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid". *Biotechnology Progress*. (19): 808-814.

Deyde V. M, Xu X, Brigh R. A, Shaw M, Smith C. B, Zhang Y, Shu Y, Gubareva L. V, Cox N. J, Klimov A. I. (2007). "Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A (H3N2) and A (H1N1) viruses isolated worldwide". *Journal of Infectious Diseases*. 196 (2): 249-257.

Draths K. M, Knop D. R and Frost J. W. (1999) "Shikimic Acid and Quinic Acid: Replacing Isolation from Plant Sources with Recombinant Microbial Biocatalysis". *Journal of the American Chemical Society*. (121): 1603-1604.

FactSheet Tamiflu®. Laboratorios Hoffman-La Roche. ©La Roche Group. 17 de noviembre de 2006. URL. [http://www.roche.com/med\\_mbtamiflu05e.pdf](http://www.roche.com/med_mbtamiflu05e.pdf)

Flores S, Gosset G, Flores N, de Graaf A. A, y Bolívar F. (2002). "Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by  $^{13}\text{C}$  labeling and NMR spectroscopy". *Metabolic Engineering*. (4): 124-137

Fry B, Zhu T, Domach M. M, Koepsel R. R, Phalakornkule C, y Ataai M. M. (2000). "Characterization of Growth and Acid Formation in a *Bacillus subtilis* Pyruvate Kinase Mutant." *Applied and Environmental Microbiology*. (66) 4045-4049.

Harwood C.R. (1992). "*Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses". *Trends in Biotechnology*. (10) 247-256.

Hernández-Montalvo V, Martínez A, Hernández-Chávez G, Bolívar F, Valle F, Gosset G. (2003). "Expression of *galP* and *glk* in a *Escherichia coli* PTS mutant restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation products". *Biotechnology and Bioengineering*. (83): 687-694.

Hermann M. K and Weaver L. M. (1999). "The Shikimate Pathway". *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. (50): 473-503.

Ingham A, Zhang Y, Prideaux C. (2002). "Attenuation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by inactivation of *aroQ*". *Veterinary Microbiology*. (84): 263-273.

Iomantas Y, Abalakina E. G, Polanuer B, Yampolskaya T. A, Bachina T. A, Kozlov J. I. (2002). "Method for producing shikimic acid". US Patent. 6,436,664.

Jensen R. A. and Nester E. W. (1965). "The Regulatory Significance of Intermediary Metabolites: Control of Aromatic Acid Biosynthesis by Feedback Inhibition in *Bacillus subtilis*". *Journal of Molecular Biology*. (12): 468- 481.

Jensen R. A. and Nester E. W. (1966). "Regulatory Enzymes of Aromatic Amino Acid Biosynthesis in *Bacillus subtilis*". *The Journal of Biological Chemistry*. (241): 3373-3380

Johansson L, Lindskog A, Silfversparre G, Cimander C, Fog Nielsen K, Lidén G. (2005). "Shikimic Acid Production by a Modified Strain of *E. coli* (W3110.shik1) Under Phosphate-Limited Conditions". *Biotechnology and Bioengineering*. (92) : 541-551.

Karpf M. and Trussardi R. (2001). "New, Azide-Free Transformation of Epoxides into 1,2-Diamino Compounds: Synthesis of the Anti-influenza Neuraminidase Inhibitor Oseltamivir Phosphate (Tamiflu)". *Journal of Organic Chemistry*. 66: 2044-2051.

Knop D. R, Draths K. M, Chandran S. S, Barrer J. L, Frost J. W. (2001). "Hydroaromatic equilibrium during biosynthesis of shikimic acid". *Journal of American Chemical Society*. (123): 10173-10182.

Krämer M, Bongaerts J, Bovenberg R, Kremer S, Müller U, Orf S, Wubbolts M and Raeven L. (2003). "Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid". *Metabolic Engineering*. (5) 277-283.

Lee S.Y and Papoutsakis E.T. (1999). "Metabolic Engineering". MerceL Dekker, Inc. Primera Edición. Nueva York. EUA. pp1-7

Llewellyn D. J, Daday Arlene and Smith G. D. (1980). "Evidence for an Artificially Evolved Bifunctional 3-Deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate Synthase-Chorismate Mutase in *Bacillus subtilis*". *The Journal of Biological Chemistry*. (255): 2077-2084.

Lu J, Liao J. C. (1997). "Metabolic engineering and control analysis for production of aromatics: role of transaldolase". *Biotechnology and Bioengineering*. (53): 132-138.

Miller J. E, Backman K. C, O'Connor M. J and Hatch R. T. (1987). "Production of phenylalanine and organic acids by phosphoenolpyruvate carboxylase-deficient mutants of *Escherichia coli*". *Journal. Of Industrial. Microbiology and Biotechnology*. (2): 143-149.

Monto S. A and Whitley R. J. (2008). "Seasonal and pandemic influenza: A 2007 update on challenges and solutions". *Clinical infectious diseases*. (46) 7: 1024-1031.

Nester E. W, Jensen R. A. (1966). "Control of Aromatic Acid Biosynthesis in *Bacillus subtilis*: sequential feedback inhibition". *Journal of Bacteriology*. (91) 4: 1594-1598.

Nester W. E. (1968). "Cross Pathway Regulation: Effect of Hystidine on the synthesis and Activity of Enzymes of Aromatic Acid Biosynthesis in *B. subtilis*". *Journal of Bacteriology*. (96) 5:1649-1657.

Nguyen H. D, Nguyen Q. A, Ferreira R. C, Ferreira L. C. S, Tran L. T and Schumann W. (2005). "Construction of plasmid-based expression vectors for *Bacillus subtilis* exhibiting full structural stability". *Plasmid*. (54): 241-248.

Ogawa, T., Mori, H., Tomita, M., and Yoshino, M. (2007). "Inhibitory effect of phosphoenolpyruvate on glycolytic enzymes in *Escherichia coli*". *Research in Microbiology*. (158): 159-163

Özçelik İlknur Şenver, Pinar Çalik, Güzide Çalik, Tunçer H. Özdamar. (2004). "Metabolic engineering of aromatic group amino acid pathway in *Bacillus subtilis* for L-Phenylalanine production" *Chemical Engineering Science*. (59): 5019-5026.

Parish Tanya, Bhavna G. Gordhan, Ruth A. McAdam, Ken Duncan, Valerie Mizrahi and Neil G. Stoker. (1999). "Production of mutants in amino acid biosynthesis genes of *Mycobacterium tuberculosis* by homologous recombination". *Microbiology*. (145) 3497-3503.

Parish Tanya and Stocker Neil G. (2002). "The common aromatic amino acid biosynthesis pathway is essential in *Mycobacterium tuberculosis*". *Microbiology*. (148): 3069-3077.

Patnaik R and J C. Liao. (1994). "Engineering of *Escherichia coli* Central Metabolism for Aromatic Metabolite Production with Near Theoretical Yield". *Applied and Environmental Microbiology*. (60): 3903-3908.

Sambrook J, Fritsch E F., and Maniatis T. (1989). "Molecular Cloning: a laboratory manual". Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. USA

Simmons CP, Hodgson ALM, Strugnell RA. (1997). "Attenuation and vaccine Potential of *aroQ* mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*" *Infection and immunity*. (65): 8 3048-3056.

Sonenshein A. L, Hoch J A, Losick R. (1993). "*Bacillus subtilis* and other Gram-Positive Bacteria". American Society For Microbiology. Washington DC. 3-13 pp.

Srinivasan P. R. and Sprinson D. B. (1959). "2-keto-3-deoxy-D-arabo-heptonic acid 7-phosphate synthetase". *Journal of Biological Chemistry*. (234): 716-722.

Stephenson I, Nicholson k. G, Wood J. M, Zambon M. C y Katz J. M. (2004). "Confronting the avian influenza threat: vaccine development for a potential pandemic". *THE LANCET Infectious Disease*. (4): 499-509.

Vandeyar M.A and Zhaler A. S. (1986). "Chromosomal insertions of Tn917 in *Bacillus subtilis*". *Journal of Bacteriology*. (167) 2: 530-534.

Vaughan LM, Smith PR, Foster TJ. (1993). "An aromatic-dependent mutant of fish pathogen *Aeromonas salmonicida* is attenuated in fish and is effective as a live vaccine against the salmonid disease furunculosis". *Infection and immunity*. (61):5 2172-2181.

Vinella D, Bagny B, Jeseleau-Petit D, D'ari R y Cashel M. (1996). "Mecillinam resistance in *Escherichia coli* is conferred by loss of a second activity of the *aroK* protein". *Journal of Bacteriology*. (178); 13: 3818-3828.

Wu J, Sheflyan G Y and Woodard R. W. (2005). "Bacillus subtilis 3-deoxy-D-arabino-heptulosinate 7-phosphate synthase revisited: resolution of two long-standing enigmas". *Journal of Biochemistry*. (390): 583-590.

Young F. E. (1980). "Impact of Cloning in *Bacillus subtilis* on Fundamental and Industrial Microbiology". *Journal of General Microbiology*. (119): 1-15.

Yuki Shohachiro (1975). "The chromosomal location of the structure gene for amylase in *Bacillus subtilis*". *Japan Journal of Genetics*. (50) 2: 155-157.

Zhu T, Phalakornkule C, Koepsel R, Domach M y Atai M. (2001). "Cell growth and by product formation in a pyruvate kinase mutant of *E. coli*". *Biotechnology Progress* (17): 624-628.

Zhu T, Pan Z, Domagalski N, Koepsel R, Atai M. M y Domach M. M. (2005). "Engineering of *Bacillus subtilis* for enhanced total synthesis of folic acid". *Applied and Environmental Microbiology*. 71 (11): 7122-7129.