



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

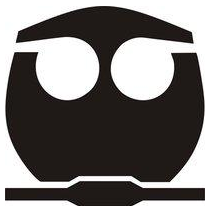
**Efecto de la clonación del gen *zwf*
sobre la producción de shikimato en
la cepa de *Escherichia coli*
PB12.SA22.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA:

Susy Beatriz Carmona Contreras



MÉXICO, D.F.

2011



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Homero Hernández Montes

VOCAL: Dra. Rebecca Elizabeth Franco y Bourland

SECRETARIO: Dr. José Adelfo Escalante Lozada

1er. SUPLENTE: Dr. León Patricio Martínez Castilla

2° SUPLENTE: M. en C. Beatriz Ruiz Villafán

Este trabajo fue realizado en el departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. José Adelfo Escalante Lozada

SUSTENTANTE:

Susy Beatriz Carmona Conteras

Agradecimientos

Se reconoce y agradece la colaboración de:

Dra. Noemí Flores Mejía por su apoyo en la parte de la realización del perfil transcriptómico por RT-qPCR.

M. en C. Georgina Hernández Chávez por su apoyo en el análisis de las muestras por HPLC.

Mercedes Enzaldo Cruz (Mechita) por el apoyo técnico (sobre todo por los antibióticos muy difíciles de preparar 😊).

Agradezco especialmente a:

A mi doctor, el Dr. Adelfo, por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo y una vez dentro, por brindarme todo su apoyo, paciencia, confianza y por seguirme aceptando a pesar del riesgo que eso conlleva.

A Ramón, por su ayuda y enseñanza en la parte de las fermentaciones, aún cuándo la ayuda se requiriera en horas inhábiles, días de descanso y hasta festivos 😊 (bueno no tan exagerado).

Se agradece el financiamiento otorgado por medio de los donativos:

PAPIIT IN224709, CONACyT 105782 y CONACyT Sector Salud 126793.

Alguna vez caminando por Copilco y a punto de chocar con un teléfono público, mi amiga Karla me dijo que mi calificación debía repartirse entre mi familia, Gonzalo y yo, la verdad es que así debió ser... pero como eso no se puede, aquí tienen su parte correspondiente del mérito ☺.

Agradecimientos

Gracias...

A Dios, porque me ama.

A mis papás a los que amo:

A mi papá Carlos Carmona por apoyarme siempre, porque hasta cierto punto gracias a él soy la mujer que soy y así me gusta.

A mi mamá Florencia Contreras, porque aunque cada vez que empezara a cabecear me mandara a dormir, me apoyó siempre, me abrazó, me encomendó a Dios, me levantó cada mañana (mami perdón por los gritos, son de mentiritas porque ni me acuerdo!! no estaba despierta todavía), me dio fuerzas y así hasta nunca terminar.

A Gonzalo (aunque muy probablemente nunca vea esto), que estuvo conmigo la mayor parte de la carrera, me hizo sentir la mujer más afortunada por algunos años y me apoyó incondicionalmente en todo cuanto estuvo a su alcance.

A mis hermanas Karla, Patricia, Mary y Denisse, a las que amo y me hacen muy feliz, que con sus múltiples formas de ser han llegado a ser ejemplos para mí (de cómo no hacer unas cosas ☺ y de cómo si hacer otras) y me han apoyado mucho, a pesar de que esté loca y mis libros sean de chicharos ☺.

A mis amigas Diana, Karla y Viridans; a mis amigos Rojo, Macedo y Joel, que han estado conmigo siempre a lo largo de toda la carrera, gracias por su amistad niños (incluye palabras de aliento, regaños, explicaciones, de las clases y de la vida, carcajadas, desveladas, por tarea y porque el chisme esta bueno... no termino, los amo)

A cada uno de mis amigos del 11 y uno que otro colado ☺: Luna Loaiza, Angélica, Sam, Luis, Sujhey, Carlos, Tomas, Lalo, Rodolfo, Anahí Mejía, Anahí Duque, Lau, etc. porque somos el mejor grupo de amigos de la mejor facultad de CU (aunque nos hagan trampa y el concurso lo hagan justo cuando vamos por las bebidas y nos ganen los

multiO), porque de cada uno he aprendido bastante, pasé los mejores momentos de mi vida y porque me hacen muy feliz. NOTA. Aquí incluyo también a los 6 de arriba.

A Edgar (que para que no se sienta el importante: estás solito porque no somos del mismo grupo social 😊 jaja), que no lo sabía (hasta ahora) pero por mucho tiempo fue el responsable de la mayor parte de mi felicidad. Gracias por aceptar la invitación de formar parte de mi vida, te quiero mucho amigo.

A Larisa y Carol que me apoyaron siempre que pudieron, porque me ofrecieron sus casas, pero lo más importante, su amistad, las quiero chamacas, aunque no choque con ustedes y no las salude.

Al tan 0 especial (y dices que no eres fresca): Alexis que a pesar de todo, fue el responsable de muchos momentos felices y desestresantes en mi estancia en el IBT, me enseñó muchas cosas de la vida que de otro modo, no hubiera aprendido.

A Ivan amigo incondicional del IBT, que le encanta burlarse de mí, pero también está cuando lo necesito. A los demás compañeros en el IBT y especialmente de mi lab. por hacer que me enamorara de este sitio (porque estoy escribiendo en mi laboratorio).

A los chicos que aunque no nos conocemos tanto, me ayudaron a pasar los momentos más difíciles: las fermentaciones 😊 en que tenía que mantenerme despierta y a pesar de ser las 3 de la mañana raro el día, en que estuve sola. En general a los amigos de toda la vida que siguen aguantándome, a todos los que, aunque quizá no mencione, han logrado colocar una sonrisa en mi rostro (a veces también la han quitado ¬¬) y me han dado ánimos en los múltiples momentos que me sentí triste y derrotada en la Fac y en este año y medio que me llevó dignearme a terminar este proyecto, que me han contado sus historias para que sepa que hay cosas peores 😊, etc. etc.; intentaré mencionarlos pero siempre yo y mi mala memoria seguro alguno faltará: Isac, Rodrigo, Jesus, Herminio, Nubia, Susana, Marquitos, Daniel, Rodrigo (Rod don Pop), Esperanza, Arturo, Héctor, David.

Por último, gracias a José (JJ), que encontró mis figurillas 😊.

A mi amigo que cuando trabajara en... no me acuerdo donde, me iba a comprar un:

--Super auto rojo

-- Mustang Susy

--Super auto rojo

--Muuustang

--Ash! que no es un super auto???

ÍNDICE GENERAL

A. RESUMEN.....	1
B. INTRODUCCIÓN.....	2
C. ANTECEDENTES.....	5
CI. Virus de la influenza.....	5
i) Morfología del virus.....	7
ii) Antivirales.....	10
CII. Ácido shikímico y vía del shikimato.....	12
CIII. Vía de las pentosas fosfato.....	17
CIV. Ingeniería de vías metabólicas.....	20
i) Ingeniería en el metabolismo central del carbono.....	20
ii) Ingeniería de la vía del shikimato.....	23
D. JUSTIFICACIÓN.....	27
E. OBJETIVOS.....	27
EI. Objetivo general.....	27
EII. Objetivos particulares.....	27
F. MATERIALES Y MÉTODO.....	28
FI. Construcción de la cepa PB12.SA23.....	28
i) Cepas y plásmidos.....	28
ii) Construcción del plásmido pTOPOaroBaroEzwf.....	29
iii) Transformación con los plásmidos PJLBaroGfbrktA y TOPOaroEaroBzwf.....	31
FII. Evaluación del efecto de la clonación del gen <i>zwf</i> en sistemas de fermentación en lote.....	33
i) Medio y condiciones de cultivo durante las fermentaciones para producción de SA.....	33
ii) Cuantificación de analitos producidos en la fermentación.....	36

FIII. Análisis del perfil de transcripción por qPCR tiempo real...	37
FIV. Cuantificación de la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.....	42
G. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
GI. Construcción de la cepa PB12.SA23.....	43
GII. Evaluación del efecto de la clonación del gen <i>zwf</i> en sistemas de fermentación en lote.....	46
GIII. Análisis del perfil de transcripción por qPCR tiempo real....	52
i) Transporte de glucosa y glucólisis.....	57
ii) Vía de las pentosas fosfato.....	58
iii) Conversión de piruvato a acetato y acetil CoA.....	59
iv) Ciclo de los ácidos tricarbóxicos y ciclo del glioxilato.	60
v) Reacciones anapleróticas y gluconeogénesis.....	60
vi) Vía del shikimato.....	61
GIV. Cuantificación de la actividad de la enzima glucosa-6- fosfato deshidrogenasa.....	62
H. CONCLUSIONES.....	63
I. PERSPECTIVAS.....	64
J. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
K. APÉNDICES.....	72
KI. APÉNDICE 1 -METODOLOGÍAS-	72
i) Extracción de ADN plasmídico -Miniprep alcalina-.....	72
ii) Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	73
iii) Preparación de células competentes.....	73
iv) Electrotransformación de células competentes.....	74
v) Preparación de gliceroles.....	74
vi) Extracción de ARN –Fenol caliente-.....	74
vii) Electroforesis de ARN.....	75
viii) Determinación de proteína por el método de Bradford....	76

KII. APÉNDICE 2 -CÁLCULOS-	73
i) Cálculo para conocer el volumen de células necesario para inocular el reactor	73
ii) Cálculo para la preparación de un patrón de 5 ng/μL de ADNc	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de las cepas y plásmidos empleados	28
Tabla 2. Medio de producción empleado por Li <i>et al.</i> (1999), para la producción de DHS y empleado en este trabajo para la producción de SA	34
Tabla 3. Composición de la solución de elementos traza. Elementos traza empleado por Li <i>et al.</i> , (1999), en la producción de DHS	34
Tabla 4 Suplementos del medio de producción	34
Tabla 5. Composición del medio de desarrollo del inóculo	36
Tabla 6. Composición del inóculo para las fermentaciones	37
Tabla 7. Velocidad específica de crecimiento (μ) y velocidad de consumo de sustrato (q_s)	48
Tabla 8. Producción de ácido shikímico y otros intermediarios de la VSHK	50
Tabla 9. Comparación de la producción de metabolitos y rendimiento para cada cepa generada	52
Tabla 10. Niveles de transcripción de las cepas PB12, PB12.SA22 y PB12.SA23 a 1 D.O. _{600nm} , creciendo en medio mineral suplementado con 25 g/L glc y 15 g/L YE	53
Tabla 11. Actividad específica de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	62

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cebadores utilizados en la amplificación de <i>zwf</i> . Diseño final de los cebadores <i>zwfRv</i> y <i>zwfFw</i>	29
Cuadro 2. Cebadores empleados en la secuenciación del plásmido <i>pTOPO aroB aroE zwf</i>	32
Cuadro 3. Secuencia de los cebadores empleados para la síntesis del ADNc y el qPCR tiempo real.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. A la izquierda una microscopia electrónica del virus de la influenza (tomado de Arias y López, 2009) y a la derecha su representación esquemática (tomado de Mendoza y Vielma, 2009). En su superficie posee tres proteínas de membrana, la Hemaglutinina (HA), Neuraminidasa (HA) y una proteína integral transportadora de calcio (M2); La proteína de matriz (M1) está adosada al interior de la envoltura lipídica asociándose con las proteínas de superficie; tiene 8 segmentos individuales de ARN viral asociados cada uno al complejo de transcripción (proteínas PB1, PB2 y PA).....	7
Figura 2. Estructura de la Ribonucleoproteína. Cada uno de los segmentos individuales de ARN viral se asocia al complejo de transcripción (proteínas PB1, PB2 y PA), formando una estructura llamada ribonucleoproteína (tomado de Portela y Digard, 2002).....	8
Figura 3. Ciclo de replicación del virus de la influenza y modo de acción de los antivirales. El virus se fija por la HA a los receptores celulares, entrando a la célula por endocitosis; la envoltura viral y la membrana del endosoma se fusionan, translocándose las RNP hacia el núcleo; los	

ARN virales se replican y se transcriben los ARN mensajeros a partir de estos; se da la síntesis de proteínas de superficie que se insertan en la membrana citoplasmática, se exportación de las RNP formadas hacia el citoplasma, se ensambla y libera por gemación la nueva partícula viral (tomado de Sarmiento *et.al.*, 2010)..... 11

Figura 4. Vía del ácido shikímico. Se indica cada uno de los intermediarios, así como los genes que codifican para las correspondientes enzimas de cada paso de la vía. *aroF*, *aroG*, *aroH*: isoenzimas DAHP sintasa; *aroB*: DHQ sintasa; *aroD*: DHQ deshidratasa, *aroE*: shikimato deshidrogenasa; *aroK*, *aroL*: shikimato cinasa I/II, *aroA*: EPSP sintasa; *aroC*: corismato sintasa; PEP:fosfoenolpiruvato; E4P: eritrosa-4-fosfato; DAHP: 3-deoxi-D-arabino-heptuluronato-7-fosfato; DHQ: 3-dehidroquinato; DHS: 3-dehidroshikimato; SA: shikimato; S3P: shikimato-3-fosfato; EPSP: 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato; CHA: corismato (modificado de Kai *et. al.*, 1999 y Knop *et.al.*2001)..... 14

Figura5. Metabolitos derivados de los intermediarios de la vía del shikimato (modificado de Krämer *et al.*, 2003)..... 15

Figura 6. Vía de las pentosas fosfato. Se muestra cada uno de los intermediarios de la vía, así como los genes que codifican para cada una de las enzimas de la misma. *zwf* : glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; *pgl*: 6-fosfogluconolactonasa; *gnd*: 6-fosfogluconato deshidrogenasa; *rpe*: ribulosa-5-fosfato-3-epimerasa; *rpiA*, *rpiB*: ribosa-5-fosfato isomerasa; *talA*, *talB*: transcetolasa; *tktA*, *tktB*: transcetolasa (modificado de Ingraham y Davis, 2006)..... 19

Figura 7. Sistemas de transporte de glucosa. Arriba: sistema PTS, transporta y fosforila varios azúcares, entre ellos la glucosa, E1 (enzima soluble no específica) y HPr (proteína acarreadora fosfohistidina) transfieren un grupo fosforil del PEP a IIA y IIB (enzimas específicas); IIB fosforila el azúcar reconocido y transportado por la proteína integral de membrana IIC; este sistema aquí se muestra inactivado. Abajo: sistema Mgl constituido de tres proteínas MglA, MglB y MglC: proteína

de unión a ATP, proteína de unión a glucosa y proteína transportadora; sistema GalP (permeasa de galactosa) proteína integral de membrana facilita la entrada de glucosa por el simporte de H ⁺ ; la glucosa internalizada por estos dos últimos sistemas es fosforilada en la vía glucolítica por la enzima glucocinasa dependiente de ATP. OmpC, OmpF y LamB constituyen porinas por las que la glucosa ingresa al periplasma en <i>E. coli</i> (modificado de Gosset 2005).....	22
Figura 8. IVM en el metabolismo central de carbono y vía del shikimato en cepas de <i>E. coli</i> PTS ⁻ Glc ⁺ para la sobreproducción de shikimato (modificado de Escalante <i>et al.</i> , 2010).....	26
Figura 9. Mapas de los plásmidos utilizados. A) pTOPOaroEaroBzwf tiene una copia de los genes <i>aroB</i> , <i>aroE</i> y <i>zwf</i> , así como genes de resistencia a kanamicina (km) y zeocina (zn). B) PJLBaroG ^{fbr} tktA contiene el gen <i>aroG</i> ^{fbr} insensible a inhibición, una copia de <i>tktA</i> y la el gen de resistencia a tetraciclina (tc).....	33
Figura 10. Sistemas de fermentación.....	35
Figura 11. Ubicación de <i>zwf</i> en el genoma de <i>E. coli</i> (modificado de Ecocyc, 2010).....	43
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del gen <i>zwf</i> amplificado por PCR. 1. Marcador de PM 1 kb Fermentas 2. Producto amplificado, gen <i>zwf</i>	44
Figura 13. Electroforesis de colonias recuperadas de la electroporación con el plásmido pTOPOaroEaroBzwf. De izquierda a derecha: Marcador de PM 1 kb Fermentas, colonias positivas. Se secuenciaron las colonias 3 y 7.....	44
Figura 14. Plásmido pTOPOaroEaroBzwf. Contiene una copia de los genes <i>aroB</i> , <i>aroE</i> y <i>zwf</i> , así como genes de resistencia a kanamicina (km) y zeocina (zn).....	45
Figura 15. Electroforesis del ADN plasmídico de la cepa PB12.SA23. De izquierda a derecha: Marcador de PM 1 kb Fermentas, ADN plasmídico de las colonias seleccionadas; se observan tres bandas	

correspondientes a los fragmentos de los plásmidos digeridos.....	46
Figura 16. Perfil de crecimiento, consumo de glucosa y producción de compuestos aromáticos de la cepa PB12.SA23. Se muestra el resultado del promedio de los datos obtenidos de tres fermentaciones independientes (para DAHP, solo es el resultado de dos) con sus correspondientes barras de error que indican la desviación estándar.....	47
Figura 17. Comparación del crecimiento de las cepas PB12.SA22 y PB12.SA23. Se muestra el resultado del promedio de los datos obtenidos de tres fermentaciones independientes para la cepa PB12.SA23 con sus correspondientes barras de error que indican la desviación estándar.....	48
Figura 18. Comparación del consumo de glucosa entre las cepas PB12.SA22 y PB12.SA23. Se muestra el resultado del promedio de los datos obtenidos de tres fermentaciones independientes para la cepa PB12.SA23 con sus correspondientes barras de error que indican la desviación estándar.....	49
Figura 19. Producción de SA, otros intermediarios aromáticos y ácido acético en la cepa PB12.SA23. Se muestra el resultado del promedio de los datos obtenidos de tres fermentaciones independientes, con sus correspondientes barras de error que indican la desviación estándar.....	50
Figura 20. Perfil transcriptómico de las cepas PB12, PB12.SA22, PB12.SA23 en medio de producción con glucosa y extracto de levadura. Se muestra de color morado los valores de expresión por arriba del nivel de la cepa silvestre y en rojo los valores que se encuentran por debajo del mismo, en negro están los valores que se mantienen al nivel de la cepa silvestre.....	56

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	Ácido desoxiribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
DAHP	3-deoxi-D- <i>arabino</i> heptulonato-7-fosfato
DHQ	3-dehidroquinato
DHS	3-dehidroshikimato
E4P	Eritrosa-4-fosfato
F6P	Fructosa-6-fosfato
G3P	Gliceraldehido-3-fosfato
Glc	Glucosa
HA	Hemaglutinina
IVM	Ingeniería de vías metabólicas
M	Proteína de la matriz
MCC	Metabolismo central del carbono
NA	Neuraminidasa
NP	Nucleoproteína
NS	Proteína no estructural
OSF	Oseltamivir fosfato
PA	Polimerasa A
PB1	Polimerasa B1
PB2	Polimerasa B2
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEP	Fosfoenolpiruvato
PP	Pentosas fosfato
PTS	Sistema de transporte de carbohidratos fosfotransferasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo
RNP	Ribonucleoproteína

SA	Ácido shikímico
SOC	Super caldo óptimo con represión catabólica
TE	Amortiguador Tris-EDTA
VSHK	Vía del shikimato
YE	Extracto de levadura
Zwf	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

A. RESUMEN

La vía del shikimato (VSHK), es la ruta común para la biosíntesis de compuestos aromáticos en bacterias y plantas principalmente; el ácido shikímico (SA), uno de los intermediarios de esta vía, ha ganado recientemente gran atención debido a que es utilizado como precursor para la síntesis química del oseltamivir-fosfato (OSF), conocido comercialmente como Tamiflu®. Este antiviral de aplicación oral es utilizado para el tratamiento de la influenza común, así como para los casos de infección por los virus H5N1, H3N2 y recientemente para el tratamiento de influenza humana A/H1N1. Ante la necesidad a escala regional o global del antiviral OSF, en el escenario de una pandemia de influenza, diferentes grupos de investigación han aplicado diversas estrategias de Ingeniería de vías metabólicas (IVM) para la sobreproducción de SA en diferentes cepas de *Escherichia coli*. En el grupo de investigación del Dr. Francisco Bolívar Zapata (Instituto de Biotecnología, UNAM), se obtuvo por IVM, una cepa sobreproductora de ácido shikímico; esta cepa, denominada PB12.SA22, produce 7.1 g SA/L con un rendimiento de 0.29 mol SA/mol glucosa. En este trabajo se continuó con la aplicación de estrategias de IVM con el objetivo de incrementar la producción y rendimiento de SA en esta cepa sobreproductora. Para este fin se evaluó el efecto de la clonación de una copia adicional del gen *zwf* de *E. coli* que codifica para la enzima glucosa-6-P-deshidrogenasa en el vector multicopia pTOPO, el cual contiene una copia de los genes *aroE* y *aroB*, con la finalidad de incrementar el flujo de carbono de la vía glicolítica a la vía de las pentosas y aumentar así la concentración del precursor eritrosa-4-fosfato (E4P) y el cofactor NADPH^+H^+ requerido en la síntesis de SA. De esta forma se obtuvo la cepa PB12.SA23 y se logró con ella un aumento en la producción de SA del 14.1 %. Se evaluó además el efecto de dicha clonación sobre el perfil transcriptómico de ambas cepas, encontrando entre otros aspectos característicos de las cepas con fondo genético PTS^-Glc^+ , que el aumento en la producción de SA en la cepa PB12.SA23, en principio, es debido al aumento en la producción del cofactor NADPH^+H^+ .

B. INTRODUCCIÓN

El ácido shikímico (SA) intermediario de la vía común de biosíntesis de compuestos aromáticos, es un compuesto de suma importancia ya que se utiliza como precursor en la síntesis de una amplia variedad de compuestos, entre los que destaca el inhibidor de la neuraminidasa del virus de la influenza: oseltamivir fosfato (OSF) [Draths *et al.*, 1999; Krämer *et al.*, 2003]; el cual, comercializado bajo el nombre de Tamiflu® y producido por Roche Pharmaceuticals, se emplea para el tratamiento de la gripe aviar H5N1 y más recientemente en el tratamiento de la influenza humana A/H1N1.

La influenza es una severa enfermedad respiratoria causante de grandes pandemias en el siglo pasado y de la primera de este siglo, siendo las especies aviares y porcinas las responsables de esto y las que han contribuido en el surgimiento de nuevas cepas con alto potencial de virulencia [Vega y Reyes, 2007], especialmente en los virus tipo A. El virus de la influenza (tipo A y B) contiene en su membrana 2 glicoproteínas: hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). La HA media la unión de la partícula viral a la superficie de la célula por medio de los receptores de ácido siálico para iniciar el proceso de infección. Luego de la replicación del virus la NA remueve los restos de ácido siálico del virus y glicoproteínas celulares para facilitar la liberación del virus y la dispersión para infectar nuevas células [Russell *et al.*, 2006]. Las distintas propiedades antigénicas de las diferentes HA y NA se emplean para clasificar los virus de la influenza tipo A en subtipos. Numerosas combinaciones de estos subtipos se encuentran en aves, hombre, cerdos y otros mamíferos.

La obtención tradicional del SA se realiza a partir del anís estrella chino de las especies *Illicium anissatum* o *Illicium verum*; sin embargo, el proceso de extracción implica ciertas limitaciones como altos costos, tiempo [Krämer *et al.*, 2003] y no representa una producción suficiente para cubrir el mercado actual en el caso de presentarse una pandemia; la alerta ante dicho riesgo ha causado una gran preocupación y se ha llegado a hablar incluso sobre el OSF como posiblemente, el único agente terapéutico disponible para combatir enfermedades

respiratorias o SARS (Síndrome Respiratorio Agudo Severo, comúnmente abreviado SRAS o SARS del inglés Severe Acute Respiratory Syndrome), lo que ha provocado la compra caótica y precipitada de dicho medicamento y con ello una baja en las reservas [Bertelli *et al.*, 2008]; por todo lo anterior es importante contar con una alternativa que permita tener una mayor disponibilidad de SA.

La obtención de SA a partir de un microorganismo modificado genéticamente representa una solución factible para el aumento de las reservas de dicho compuesto que permita satisfacer la demanda actual de Tamiflu®. En este contexto, se han aplicado diversas estrategias de ingeniería de vías metabólicas (IVM), tales como:

- i) la inactivación del sistema fosfotransferasa de transporte de carbohidratos (PTS) dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP), mediante la delección del operón *ptsHIcrr*, aumentando con ello la disponibilidad de PEP [Flores *et al.*, 1996; Chandran *et al.*, 2003], ya que dicho sistema utiliza más del 50% del PEP procedente del catabolismo de la glucosa [Postma *et al.*, 1996],
- ii) el incremento en la disponibilidad de eritrosa-4-fosfato (E4P) mediante la sobreexpresión del gen *tktA* de la vía de las pentosas fosfato [Chandran *et al.*, 2003; Escalante *et al.*, 2010],
- iii) la clonación y transformación del gen que codifica para una versión insensible a inhibición alostérica de la enzima 3-dehidro-*arabino*heptulosonato-7-fosfato sintasa (DAHPS) $AroG^{fbr}$ ($aroG^{fbr}$, feedback resistant) [Escalante *et al.*, 2010],
- iv) la sobreexpresión de genes como *aroB*, *aroE* que codifican para las enzimas DHQ sintasa y shikimato deshidrogenasa respectivamente y la inactivación de las enzimas shikimato cinasas isoenzimas I y II por interrupción de los genes *aroK* y *aroL*, que codifican para cada una de éstas respectivamente [Draths *et al.*, 1999; Escalante *et al.*, 2010].

En nuestro grupo de trabajo, tras la delección del operón *ptsHIcrr* en la cepa silvestre de *E. coli* JM101, se obtuvo la derivada PTS⁻ denominada PB11 de la que posteriormente, como resultado de un proceso de evolución adaptativa se obtuvo la cepa PB12 la cual recuperó la capacidad de crecer en glucosa [Flores *et al.*, 1996; Flores *et al.*, 2005]. Como resultado de la aplicación de las estrategias de

IVM antes mencionadas en la cepa PB12, se obtuvo la derivada PB12.SA22 sobreproductora de SA (PB12 *aroG^{fabr} tktA aroB aroE ΔaroK ΔaroL*), la cual es capaz de producir 7.1 g /L de SA con un rendimiento de 0.29 mol SA/mol de glucosa, en sistemas de fermentación en lote en reactores de 1 L, con 500 mL de medio mineral suplementado con 25 g/L de glucosa y 15 g/L de extracto de levadura [Escalante *et al.*, 2010].

Con la finalidad de aumentar la capacidad de producción de SA de esta cepa se realizó la clonación del gen *zwf* que codifica para la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Zwf) de la vía de las pentosas fosfato (PP), en un plásmido de mediano número de copias, buscando incrementar el flujo de carbono hacia esta vía y con ello el aumento de la disponibilidad del sustrato E4P. La reacción catalizada por la Zwf rinde poder reductor como NADPH, el cual a su vez puede ser empleado como cofactor de la enzima shikimato deshidrogenasa de la vía de aromáticos, lo que se espera contribuya al incremento de la producción de SA.

Con la finalidad de evaluar la productividad de la cepa obtenida denominada PB12.SA23, se realizaron fermentaciones bajo las mismas condiciones en las que se evaluó la cepa PB12.SA22.

Para corroborar la existencia de una diferencia en la transcripción de *zwf* en la cepa PB12.SA23 con respecto a sus cepas parentales JM101, PB12 y PB12.SA22; se realizó un perfil de transcripción por medio de la técnica qPCR tiempo real, donde se evaluaron además del gen en cuestión, algunos otros del metabolismo central del carbono (MCC), vía de aromáticos o vía del shikimato (VSHK), así como diversos genes de transporte. Del mismo modo se midió la actividad de la enzima Zwf para constatar que, de haber un aumento en la transcripción, se refleje en un aumento de la proteína funcional.

C. ANTECEDENTES

CI. Virus de la influenza

La influenza, enfermedad viral del sistema respiratorio altamente infecciosa, ha sido responsable de una significativa morbilidad y mortalidad tanto en las epidemias anuales, como en las numerosas pandemias que se han presentado a lo largo de la historia. Desde el siglo XVI se han documentado en promedio 3 pandemias de influenza por siglo. Durante el siglo pasado, se presentaron cuatro pandemias: la Gripe Española en 1918-1919 (H1N1) que cobró la vida de entre 20 y 50 millones de personas en todo el mundo, la Gripe Asiática en 1957-1958 (H2N2), la Gripe de Hong Kong 1968-1969 (H3N2) con 700,000 decesos y la Gripe Rusa en 1977 (H1N1) [Magano, 2009]. Ya en el siglo actual, se presentó la más reciente pandemia causada por un subtipo totalmente diferente a los presentados anteriormente, denominado A/H1N1, que provocó desde su inicio en marzo del 2009 hasta agosto del 2010, cerca de 18,500 defunciones [WHO, 2010]. La influenza se divide en tres categorías: influenza A, B y C de acuerdo con el tipo de virus que la causa, estos se diferencian en función de su material nuclear y más específicamente en función de las características antigénicas de la nucleoproteína (NP) y los antígenos proteínicos de la matriz (M). Los virus de influenza tipo A infectan una amplia variedad de aves y mamíferos y han sido responsables de las epidemias invernales de cada año, así como de las pandemias antes mencionadas; este tipo de virus tienen diferentes subtipos determinados por las proteínas de su superficie. Los virus de influenza tipo B sólo infectan humanos, pero al existir un sólo subtipo de ellos, tienen un bajo potencial para causar pandemias (hasta la fecha no han causado ninguna), aunque sí provocan enfermedades respiratorias serias. Los virus de influenza tipo C, al igual que el tipo B, sólo infectan humanos, pero causan enfermedades respiratorias moderadas y esporádicas.

Debido al potencial epidémico y pandémico, la atención de las organizaciones internacionales y nacionales para protección de la salud está puesta en los virus

de influenza tipo A, ya que además de la incidencia anual durante los meses fríos (razón por la que se conoce como influenza estacional, H3N2), en la que ha sido responsable de hasta medio millón de muertes en el mundo, después de enfermar a cerca de 500 millones de seres humanos, existe aún la posibilidad de brotes significativos con alto nivel de transmisión tanto del subtipo A/H1N1 como de los que ya venían circulando anteriormente (H5N1) [Valerio, 2010].

Los virus gripales de tipo A que actualmente circulan proceden de aves acuáticas salvajes, principalmente patos, gansos y gaviotas, que son su reservorio natural, razón por la cual se le denomina influenza aviar [Goiria *et al.*, 2007]. No todos estos virus son igualmente patógenos pero suelen mutar adquiriendo capacidad de causar infecciones de alta letalidad en las aves de corral; ya que el hombre (además del cerdo, caballos, mamíferos marinos) es un hospedero aberrante [Kern *et al.*, 2007], el virus puede infectarlo por dos mecanismos: “rearreglo de genes”, donde hay un intercambio de material genético entre virus humanos y aviares en una infección simultánea en humanos u otros mamíferos como el cerdo, así como por “mutación adaptativa”, en la que el virus, por contactos sucesivos por humanos va adquiriendo una capacidad infectiva; el contagio tiene lugar por vía respiratoria o tras contacto directo con las aves o sus excretas.

El análisis genético y el aumento en la dispersión mundial de la influenza aviar H5N1 pusieron por mucho tiempo a esta cepa como un potencial virus de posibles pandemias [Goiria *et al.*, 2007]. La primera vez que se detectó esta cepa, fue en Hong Kong en 1997 con 18 casos y 6 muertes, en seguida se registraron más epidemias en granjas de pollos, alertando sobre una posible pandemia; el brote se controló y fue en el año 2000 que este virus emergió nuevamente ocasionando una muerte entre los 3 casos presentados. Desde 2003 y hasta el 2010, se han registrado numerosos focos en varios países asiáticos tales como Vietnam, Japón, Camboya, Tailandia, Indonesia, China, Kazajstán, europeos como Rumania y los casos más recientes en el continente Africano, en Egipto.

De la epidemia surgida en marzo del 2009, que tres meses más tarde se convirtiera en la primera pandemia de este siglo, provocada por el nuevo subtipo A/H1N1, se continúan presentando hasta la fecha casos de infecciones, siendo los

más recientes en Nueva Zelanda, India y Australia; actualmente nos encontramos en el periodo de postpandemia en el cual aún se pueden presentar brotes con niveles significativos de transmisión [Valerio, 2010].

i) Morfología del virus

Los virus de la influenza (fig. 1) son retrovirus con apariencia pleomórfica y con un diámetro promedio de 120 nm, pertenecientes al grupo V de la clasificación de Baltimore (esta clasificación distribuye los virus en siete grupos fundamentales de acuerdo a la base química del genoma): virus de ARN monocatenario negativo, esto es, tiene como material genético ARN de cadena sencilla en sentido negativo (complementario al ARNm) y debe ser convertido a ARN positivo por una ARN polimerasa dependiente del ARN viral antes de la traducción; el genoma de estos virus puede ser segmentado.

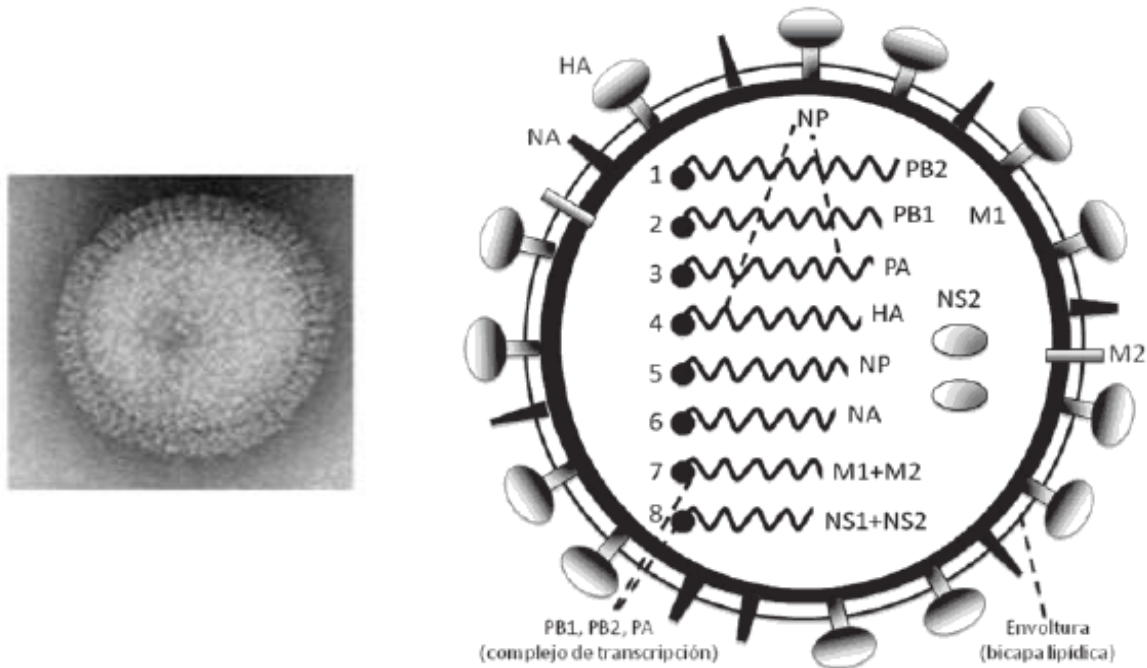


Fig. 1 A la izquierda una microscopia electrónica del virus de la influenza (tomado de Arias y López, 2009) y a la derecha su representación esquemática (tomado de Mendoza y Vielma, 2009). En su superficie posee tres proteínas de membrana, la Hemaglutinina (HA), Neuraminidasa (HA) y una proteína integral transportadora de calcio (M2); La proteína de matriz (M1) está adosada al interior de la envoltura lipídica asociándose con las proteínas de superficie; tiene 8 segmentos individuales de ARN viral asociados cada uno al complejo de transcripción (proteínas PB1, PB2 y PA).

El virus de la influenza pertenece a la familia de los *Orthomyxoviridae* (del griego *orthos*, que significa “estándar, correcto” y de *myxa*, que significa “moco, mucosidad”) que incluye aquellos virus cuyo genoma se divide en 7 u 8 fragmentos [Murray *et al.*, 2006; Mendoza y Vielma, 2009].

Los virus de la influenza A y B son virus cuyo genoma consiste en 8 segmentos cubiertos cada uno por moléculas de una nucleoproteína (NP), en una proporción de una molécula de NP por cada 20 nucleótidos constituyendo la ribonucleoproteína (RNP) de estructura helicoidal. La extremidad de cada uno de estos segmentos está a su vez asociada al complejo de transcripción/replicación viral (fig.2) [Mendoza y Vielma, 2009].



Fig. 2 Estructura de la Ribonucleoproteína. Cada uno de los segmentos individuales de ARN viral se asocia al complejo de transcripción (proteínas PB1, PB2 y PA), formando una estructura llamada ribonucleoproteína (tomado de Portela y Digard, 2002).

Cada segmento del genoma viral codifica para una proteína, a excepción de las proteínas de la matriz y las proteínas no estructurales, que se transcriben a partir de un segmento:

1. Polimerasa B2 (PB2)
2. Polimerasa B1 (PB1)
3. Polimerasa A (PA)
4. Hemaglutinina (HA)
5. Proteína de la nucleocápside (NP)
6. Neuraminidasa (NA)
7. Proteína de la matriz (M1 y M2)
8. Proteína no estructural (NS1 y NS2)

La ARN-Polimerasa es responsable de la replicación y la transcripción, y se constituye de tres regiones PB1, PB2 y PA. Tiene funciones de endonucleasa y está ligada a la ribonucleoproteína. Se asocia a los extremos del material genético para ayudar a transcribir un segmento 5'→3' en el momento en que es liberado el material genético dentro de la célula hospedera.

La HA es una glicoproteína con 2-3 sitios de glicosilación; es una proteína de fusión que tiene un empalme alternativo y sólo expone su dominio de fusión en condiciones ácidas; permite al virus trasladarse de célula a célula sin ser liberado al espacio intracelular; sirve de receptor para entrar a la célula al unirse al ácido siálico (ácido N-acetil neuramínico) e induce la introducción de las partículas virales; tiene además la capacidad de aglutinar eritrocitos, lo cual puede servir como herramienta para el diagnóstico.

La NA, tiene la función enzimática de degradar la unión entre la hemaglutinina y el ácido siálico, lo que permite al virus varias estrategias para diseminarse: los nuevos viriones producidos dentro de la célula al salir se quedan ligados a ella a nivel del ácido siálico, gracias a que la NA rompe la unión molecular, estos viriones pueden despegarse de la célula y replicarse dentro de otras; los viriones ya liberados quedan recubiertos de ácido siálico, la NA ayuda a sacar este ácido de la superficie del virión, para impedir que se agreguen entre ellos. Además de esto, el moco encontrado como barrera física en el tracto respiratorio es rico en ácido siálico, lo que hace que las moléculas de HA (y por ende el virus) queden pegadas a él, la NA rompe la unión HA-ácido siálico, liberando al virus, al tiempo que degrada dicha barrera física [Murray *et al.*, 2006].

La NP interactúa con proteínas celulares y a su vez con los ARN virales y ARN mensajeros para la construcción de nuevas partículas virales [Mendoza y Vielma, 2009].

La proteína M permite unir la cápside del virus con la bicapa lipídica lo que permite y controla la salida del virus de las células hospederas. M1 constituye la matriz, mientras que la "subproteína" llamada M2 en el caso del virus tipo A, sirve como canal de protones cuando el virus entra al endosoma, lo cual permite la disminución del pH [Murray *et al.*, 2006].

La proteína NS1 está implicada en la regulación de la expresión de los genes virales, así como en la inhibición de la síntesis de ARN mensajero, por lo tanto en la inhibición de la síntesis de proteínas por la célula infectada; NS2 exporta al citoplasma los complejos formados por los ARN virales, las RNP y M1 [Mendoza y Vielma, 2009].

Los virus tipo A se dividen en subtipos serológicos de acuerdo a la naturaleza de la HA y NA; hasta ahora se han identificado 16 subtipos antigénicos de las glicoproteínas de superficie o hemaglutininas (H1-H16) y nueve de neuraminidasa (N1-N9), con lo que pueden existir múltiples combinaciones que derivan en una alta variedad de subtipos de virus. En los humanos solo se encuentran los subtipos H1 – H3 y N1 – N2.

El hecho de contener un genoma segmentado y la carencia de ADN polimerasas que corrijan y eliminen mutaciones luego de la transcripción, facilita el desarrollo de nuevas cepas por mutación y reorganización de los segmentos genéticos entre las distintas cepas del virus; de este modo, un virus que es avirulento, puede llegar a ser virulento y un virus que infecta una sola especie, puede adquirir un rango más amplio de hospederos [Xu *et al.*, 1999]. La HA es el sitio antigénico más importante del virus, las mutaciones más importantes son en el gen que codifica para esta proteína, por ejemplo en los sitios de escisión o de glicosilación, reduciendo o inhibiendo la unión de anticuerpos neutralizantes; así como para la neuraminidasa, formando un nuevo subtipo con una población susceptible.

La infección en humanos con el virus H5N1 corrientemente causa neumonía o bronconeumonía viral seguidas de hemorragia pulmonar, distrés respiratorio, insuficiencia respiratoria aguda, e incluso una mortalidad superior al 50% de los casos, llegando en ocasiones al 80% [Goiria *et al.*, 2007].

ii) Antivirales

Actualmente se emplean en el tratamiento de la influenza dos tipos de antivirales, los inhibidores de la proteína M2, como la Amantadina (Lysovir®, symmetrel syrup; Alliance Pharmaceuticals) y la Rimantadina (Flumadine®; Forest Pharmaceuticals) que evitan la replicación del virión (fig. 3) [Burch *et al.*, 2009] y los inhibidores de la

neuraminidasa, entre los que se encuentra el Zanamivir, medicamento nebulizado comercializado bajo el nombre de Relenza por Glaxo Wellcome y el Oseltamivir, medicamento oral comercializado como Tamiflu® y producido por Gilead Sciences y F Hoffmann-La Roche [Jefferson *et al.*, 2009]. Los primeros sin embargo, no son efectivos contra la influenza tipo B y por otro lado el virus A/H1N1 resultó ser resistente a estos; los segundos, son efectivos tanto para la influenza A y B, y aunque se ha presentado resistencia, esta es baja [Burch *et al.*, 2009].

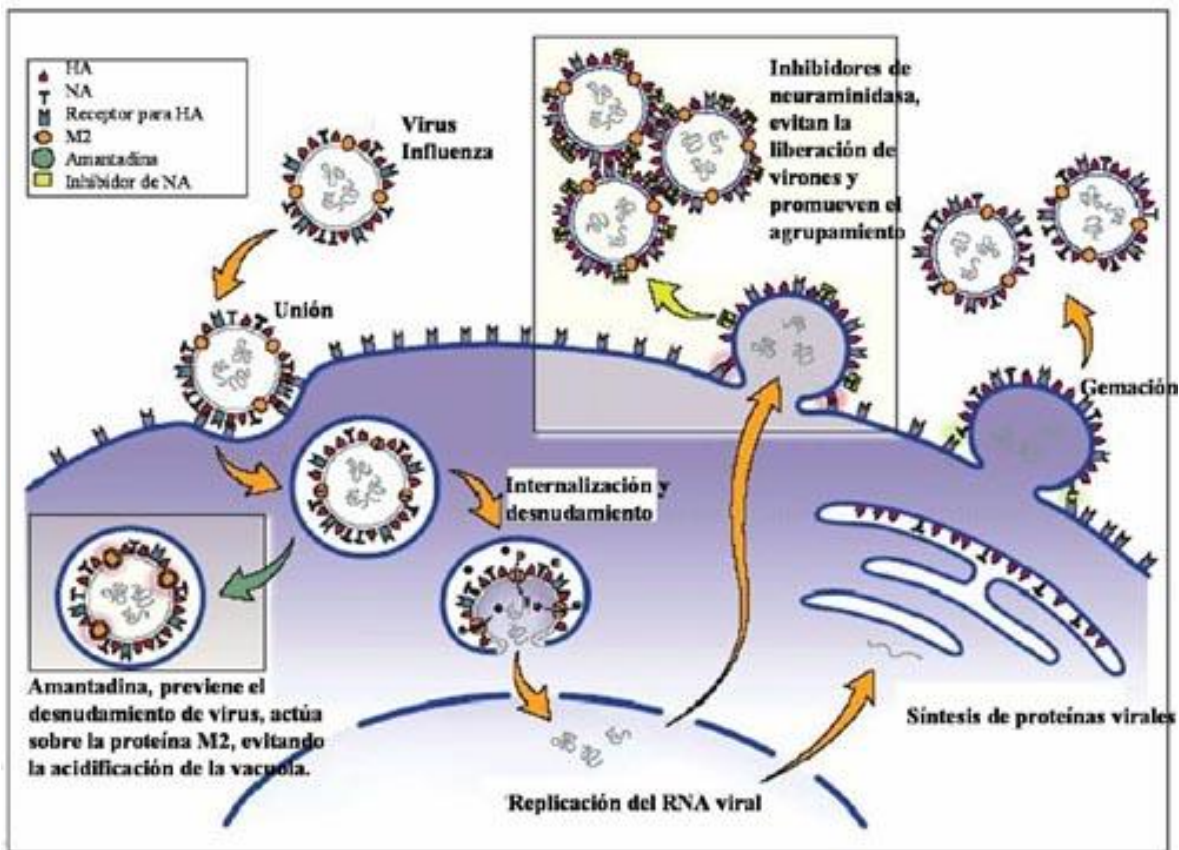


Fig. 3 Ciclo de replicación del virus de la influenza y modo de acción de los antivirales. El virus se fija por la HA a los receptores celulares, entrando a la célula por endocitosis; la envoltura viral y la membrana del endosoma se fusionan, translocándose las RNP hacia el núcleo; los ARN virales se replican y se transcriben los ARN mensajeros a partir de estos; se da la síntesis de proteínas de superficie que se insertan en la membrana citoplasmática, se exportación de las RNP formadas hacia el citoplasma, se ensambla y libera por gemación la nueva partícula viral (tomado de Sarmiento *et al.*, 2010).

En el caso particular de los inhibidores de la neuraminidasa, estos no causan modificaciones en la respuesta inmunitaria y humoral contra el virus y otros

antígenos no relacionados, sino que actúan directamente sobre las moléculas virales, en particular, como su nombre lo indica, contra la enzima neuraminidasa a la que se unen, evitando que esta enzima rompa la unión hemaglutinina-ácido siálico, por lo que el virus no puede diseminarse y se evita el crecimiento de la infección (fig.3). En cierto modo imitan el estado de transición normal de la reacción entre la enzima neuraminidasa y su sustrato [Rusell *et al.*, 2006].

El Tamiflu® ha sido aprobado como el único medicamento oral disponible tanto para la profilaxis como para el tratamiento de la influenza humana y la influenza H5N1 [Liang *et al.*, 2009], ya que tras pruebas de laboratorio ha demostrado ser efectivo, disminuyendo eficazmente y tempranamente, los síntomas ocasionados por el virus, incluyéndose así también en el tratamiento preventivo [Osores *et.al*, 2006]; la Organización Mundial de la Salud lo ha recomendado para planes de pandemia [Jefferson *et al.*, 2009].

Al suministrarse el Tamiflu®, el compuesto que interactúa directamente con la neuraminidasa es el oseltamivir carboxilato, así al ser administrado el pro fármaco como fosfato de oseltamivir, se absorbe en su totalidad por vía oral, transformándose en el metabolito activo por acción de las esterasas intestinales y hepáticas. Se distribuye fácilmente, pudiéndose encontrar en los pulmones, la pituitaria nasal, el oído medio y la tráquea. El máximo de concentración plasmática se da entre 2 y 3 horas tras su ingesta, siendo dicha concentración más de 20 veces superior a la de la pro droga, el oseltamivir. Se estima en un 75% la conversión del oseltamivir al metabolito activo, siendo la concentración proporcional a la dosis. El metabolito activo no se sigue transformando y se expulsa con la orina (90%) y las heces [Vademécum IPE bdm, 2010].

CII. Ácido shikímico y vía del shikimato

El ácido shikimico (SA) ocupa un papel central en la vía de aromáticos, la cual dirige hacia la síntesis de una amplia gama de metabolitos tanto primarios como secundarios: aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano, particularmente el grupo *p-aminobenzoato* de estos), vitaminas aromáticas (ácido fólico y vitamina K), ubiquinona, naftoquinonas, enteroquelina, alcaloides,

compuestos fenólicos y fenilpropanoides, folatos, coenzimas, fenazinas y sideróforos [Herrmann y Weaver, 1999]; es debido a la importancia de este compuesto, que esta vía sea también llamada vía del ácido shikímico o vía del shikimato.

La VSHK vincula el metabolismo de los hidratos de carbono con la biosíntesis de los compuestos aromáticos en organismos como plantas, bacterias, hongos ascomicetos y ciertos parásitos apicomplexa (esta vía sólo está presente en dichos organismos). En el tronco principal de la vía, los precursores exógenos E4P y PEP, se convierten a través de 7 reacciones enzimáticas que terminan en la síntesis de corismato, el cual es el precursor común para la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos, fenilalanina, triosina y triptófano, además de los metabolitos antes mencionados. [Herrmann y Weaver, 1999].

Las siete enzimas de la vía del shikimato fueron descubiertas por estudios realizados en bacterias; para el caso particular de *Escherichia coli*, el primer paso de la vía es la condensación de PEP y E4P que rinde 3-deoxi-D-arabino-heptulusonato-7-fosfato (DAHP) y fosfato inorgánico, esta reacción es catalizada por la enzima DAHP sintasa (DAHPS); en *E. coli* hay tres diferentes DAHP sintasas isoenzimas sujetas a inhibición por retroalimentación: AroF sensible a Tyr, AroG sensible a Phe y AroH sensible a Trp, codificadas por los genes *aroF*, *aroG*, y *aroH*, respectivamente. El segundo paso de la vía es la eliminación de fosfato al DAHP generando 3-dehidroquinato (DHQ), esta reacción es catalizada por la DHQ sintasa la cual es activada por fosfato inorgánico, que es además un subproducto de la reacción, dicha enzima es codificada por el gen *aroB*. El tercer paso es la deshidratación del DHQ para dar 3-dehidroshikimato (DHS), este paso es catalizado por la DHQ dehidratasa, que a su vez es codificada por el gen *aroD*. La cuarta reacción consiste en la reducción de DHS a SA, que es catalizada por una enzima dependiente de NADP, la shikimato deshidrogenasa codificada por el gen *aroE*. El siguiente paso de la vía es la fosforilación del shikimato para la formación de shikimato-3-fosfato (S3F) por la shikimato cinasa; *E. coli* tiene dos shikimato cinasas isoenzimas: I (AroK) y II (AroL) codificadas por los genes *aroK* y *aroL* respectivamente. La penúltima reacción de la vía es la condensación del

S3F con una segunda molécula de PEP para formar 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato (EPSP) y fosfato inorgánico, catalizada por la enzima EPSP sintasa codificada por el gen *aroA*. La séptima y última reacción de la VSHK es la trans-1,4-eliminación de fosfato de EPSP para la formación de corismato, esta reacción es catalizada por la corismato sintasa codificada por el gen *aroC* [Herrmann y Weaver, 1999] (fig. 4).

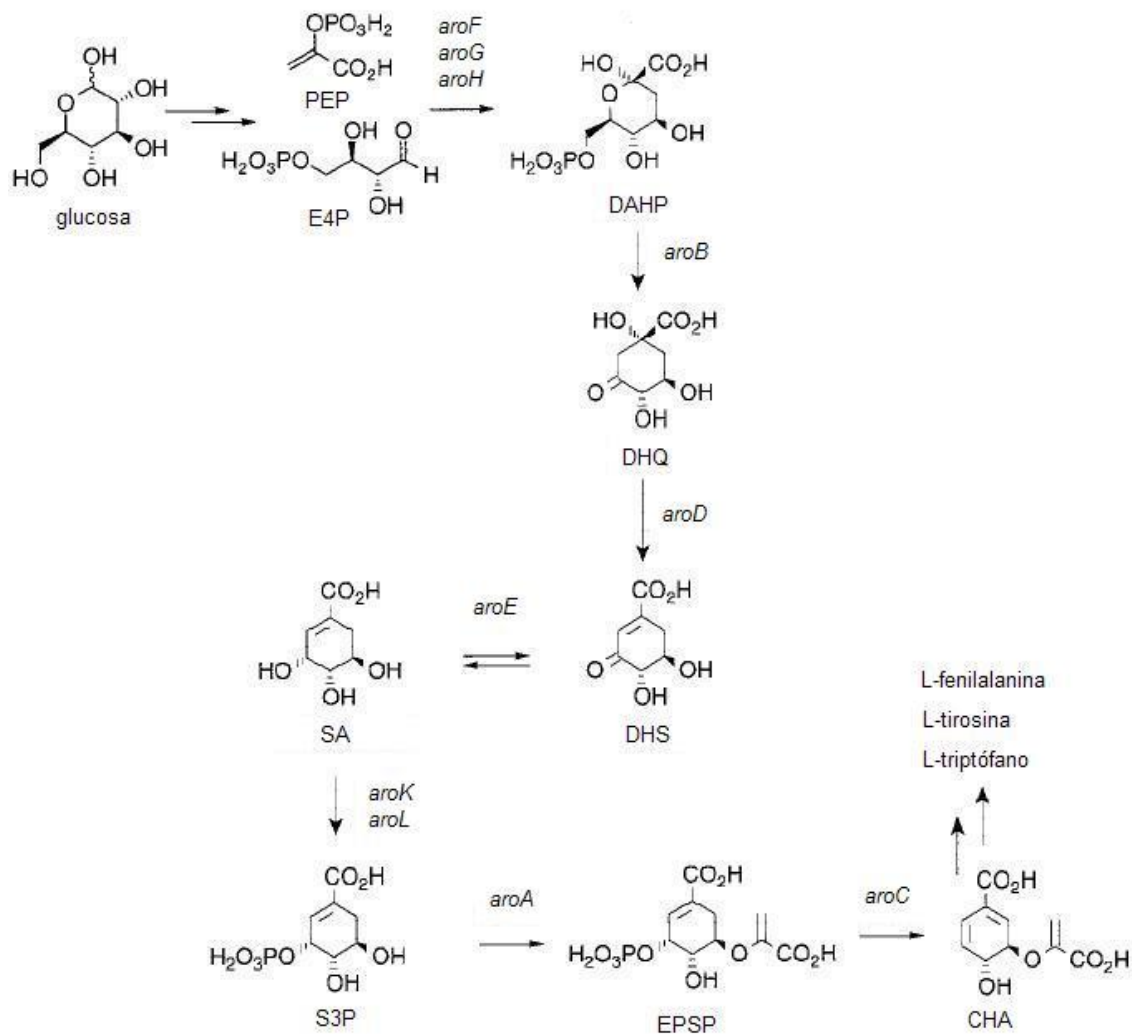


Fig. 4 Vía del ácido shikímico. Se indica cada uno de los intermediarios, así como los genes que codifican para las correspondientes enzimas de cada paso de la vía. *aroF*, *aroG*, *aroH*: isoenzimas DAHP sintasa; *aroB*: DHQ sintasa; *aroD*: DHQ deshidratasa, *aroE*: shikimato deshidrogenasa; *aroK*, *aroL*: shikimato cinasa I/II, *aroA*: EPSP sintasa; *aroC*: corismato sintasa; PEP:fosfoenolpiruvato; E4P: eritrosa-4-fosfato; DAHP: 3-deoxi-D-arabino-heptulosa-7-fosfato; DHQ: 3-dehidroquinato; DHS: 3-dehidroshikimato; SA: shikimato; S3P: shikimato-3-fosfato; EPSP: 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato; CHA: corismato (modificado de Kai *et. al.*, 1999 y Knop *et.al.*2001).

En *E. coli* la mayoría de los intermediarios de la vía constituyen un punto de partida para la síntesis de otros metabolitos, tal es el caso del DHQ y el DHS, a partir de los cuales se forman los ácidos quínico (QA) y gálico (GA), respectivamente (fig.5).

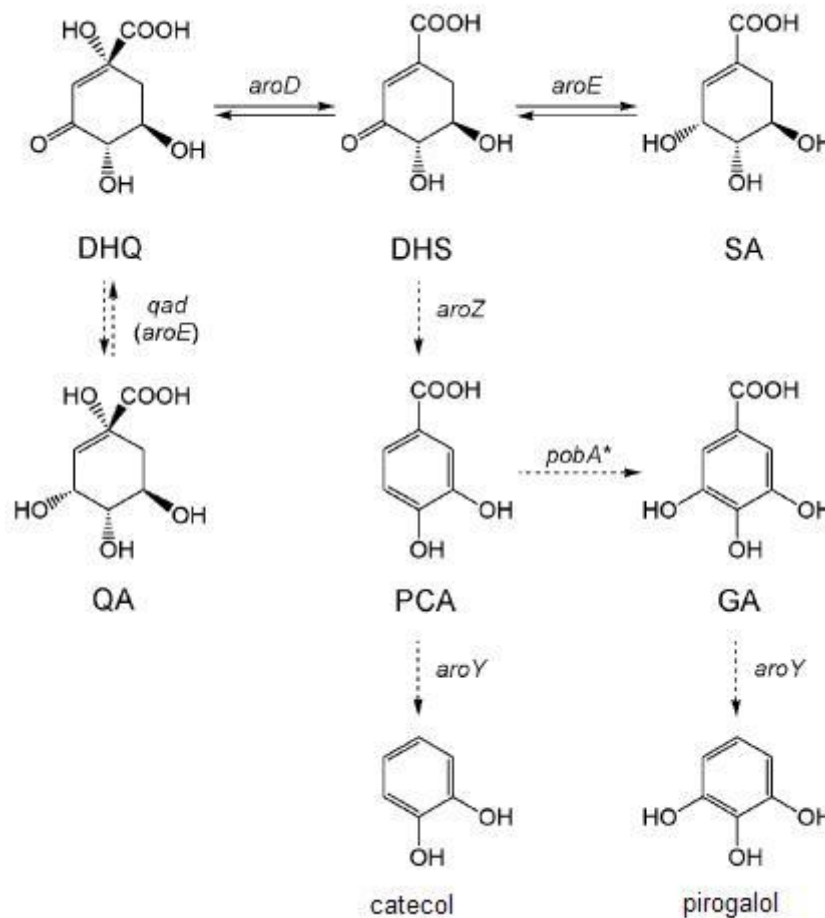


Fig. 5 Metabolitos derivados de los intermediarios de la vía del shikimato (modificado de Krämer *et al.*, 2003).

Comercialmente, el SA representa un compuesto de alto valor ya que por la alta funcionalidad de su molécula, un anillo de 6 carbonos con tres centros asimétricos y un grupo funcional ácido carboxílico, es considerado como un atractivo bloque de construcción en la síntesis de varios compuestos tales como aditivos en alimentos, alimento para animales e inyectables, entre otros, además que es posible obtenerlo enantioméricamente puro [Krämer *et al.*, 2003]; en recientes

años ha ganado importancia por ser el compuesto base para la síntesis del antiviral OSF, inhibidor de la neuraminidasa del virus de la influenza, el cual es producido por Roche Pharmaceuticals bajo el nombre comercial de Tamiflu® para el tratamiento de virus tanto de la influenza estacional A y B, así como para la influenza aviar H5N1 y A/H1N1.

El SA fue aislado por primera vez en 1885 del árbol japonés shikimino-ki (*Illicium anisatum*), actualmente se extrae de los frutos de la planta anís estrella chino *Illicium anisatum* y *Illicium verum* [Edmonds, 2005], siendo este proceso incómodo, costoso y no permite altas producciones. Con el fin de mejorar la disponibilidad del SA, una alternativa a la extracción del SA a partir de plantas, es la producción por sistemas de fermentación a partir de un microorganismo modificado genéticamente.

El Tamiflu® es elaborado a partir del SA; la mejor ruta desarrollada hasta ahora a escala industrial es la empleada por Roche y está basada principalmente como se ha mencionado, en la extracción del SA de los frutos del anís estrella chino [Liang *et al.*, 2009], planta perenne que crece solamente en algunas regiones de Asia y se cosecha solo en los meses de marzo a mayo, además que madura lentamente. La síntesis del OSF, consta de 12 pasos, que aunados a lo largo del proceso de la extracción, resulta en un proceso complicado, costoso y poco productivo (se obtienen 1.1 kg de (-) SA por cada 30 kg de planta seca) [Liang *et al.*, 2009]. Actualmente Roche emplea también procesos fermentativos con cepas de *E. coli* modificadas genéticamente para la producción de SA.

A pesar de las complicaciones en su producción los laboratorios Hoffman-La Roche tenían hasta el 2008, un nivel de producción de 400 millones de dosis al año. En caso de una pandemia, estos niveles no serían suficientes para proveer a la población mundial, lo cual se comprobó con la pandemia presentada en junio del 2009, cuando el Tamiflu® demostró ser efectivo contra el virus de la influenza A/H1N1 y la compra caótica del medicamento, disminuyó las reservas y se habló de insuficiencia del fármaco [Bertelli *et al.*, 2008]. En caso de una pandemia grave, la OMS ha dicho que probablemente 1/3 de la población se enferme (lo cual no sucedió con la pandemia causada por el virus A/H1N1) [Machado T, 2005], en un

caso de tal magnitud, las reservas de Tamiflu® existentes hasta el momento, a pesar de haber aumentado, alcanzarían a cubrir como Roche lo ha afirmado, entre el 20% y el 40% de la población de los países solicitantes del fármaco [De Ávila, 2005].

La elaboración del Tamiflu® a partir de SA, es una patente de Roche, la cual se extiende hasta el año 2016; debido al avance de la pandemia en el año 2009, esta empresa fue presionado para liberar dicha patente y que otras compañías pudieran producir el OSF, en caso de que esto suceda, o bien, que la firma entregue licencias para que otros laboratorios produzcan el fármaco, sería conveniente contar con una fuente de materia prima (SA), que permita alcanzar una producción de OSF suficiente para cubrir escenarios graves.

Diversos gobiernos y grupos de investigación en diferentes países están trabajando en diferentes proyectos encaminados a la obtención de la materia prima del OSF, el SA. Para el mejoramiento de la producción de shikimato se ha recurrido a la IVM.

CIII. Vía de las pentosas fosfato

La vía de las pentosas fosfato (PP) es una de las tres vías esenciales del metabolismo central, junto con la glucólisis y la vía Entner-Doudoroff; además de su papel como ruta de asimilación de azúcares como glucosa y pentosas, suministra en *E. coli* tres de los metabolitos precursores más importantes para las vías anabólicas de aminoácidos, vitaminas, nucleótidos y constituyentes celulares: D-ribosa-5-fosfato, sedoheptulosa-7-fosfato y D-eritosa-4-fosfato (E4P), por lo que parte del carbono captado, debe fluir a través de esta vía para satisfacer las necesidades de la célula de estos metabolitos. La vía de las PP es además una fuente importante de NADPH, necesario también para la biosíntesis [Ingraham y Davis, 2006].

Esta vía comienza con un intermediario de la glucólisis, la glucosa-6-fosfato, y termina con la formación de otros dos, la fructosa-6-fosfato (F6P) y D-gliceraldehído-3-fosfato (G3P). La vía de las PP se divide habitualmente en una parte preliminar oxidativa en la que pentosas fosfato se forman a partir de la

oxidación de la glucosa-6-fosfato, y en una parte posterior no oxidativa, donde a través de una serie de reacciones de transaldolasa y transcetolasa, las pentosas fosfato se convierte en F6P y G3P, los cuales pueden entrar a glucólisis. Esta vía es la única que permite usar como fuente de carbono D-xilosa, D-ribosa y L-arabinosa [Fraenkel, 1996].

El primer paso de la vía oxidativa es la conversión de β -D-glucosa-6-fosfato a D-glucono- δ -lactona-6-fosfato por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, codificada por el gen *zwf*, esta enzima emplea NADP^+ como cofactor, por lo que esta reacción es fuente importante de poder reductor como NADPH; la actividad de esta enzima juega un papel importante en el control de la distribución del flujo de carbono en el nodo de la glucosa-6-fosfato dirigiendo dicho flujo hacia esta vía oxidativa dependiente de NADP^+ ; la enzima 6-fosfogluconolactonasa codificada por el gen *pgl*, cataliza la reacción siguiente para dar como producto 6-fosfo-D-gluconato mismo que es transformado a D-ribosa-5-fosfato por la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa codificada por el gen *gnd*, esta última reacción es prácticamente la única reacción irreversible de la vía y al igual que la reacción catalizada por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, rinde poder reductor y representa además un punto importante en el metabolismo central del carbono ya que a partir de la ribosa-5-fosfato se pueden sintetizar compuestos importantes para la célula [Sprenger, 1995].

La parte no oxidativa de la vía comienza con la D-ribosa-5-fosfato que por un lado puede ser convertida a D-xilulosa-5-fosfato por acción de la enzima ribulosa-5-fosfato-3-epimerasa codificada por el gen *rpe*, o bien a D-ribosa-5-fosfato por la ribosa-5-fosfato isomerasa codificada por *rpi*, esta última enzima, juega un papel anabólico y catabólico en el metabolismo de la ribosa-5-fosfato, existen en *E. coli* dos ribosa-5-fosfato isomerasas, de las cuales una es constitutiva *rpiA* y otra inducible *rpiB* sobre todo cuando *E. coli* crece en ribosa. Las siguientes reacciones de la vía son catalizadas por las enzimas transcetolasa y transaldolasa codificadas por los genes *tkt* y *tal* respectivamente. La transcetolasa cataliza la transferencia reversible de un grupo ceto- entre varios sustratos, se involucra dos veces en la vía, primeramente para rendir G3P y D-septoheptolusonato a partir de la xilulosa y

ribosa 5-fosfato y posteriormente en la obtención reversible de E4P, a partir de G3P con participación de una molécula de fructosa-6-fosfato, rindiendo así también D-xilulosa-5-fosfato. En *E. coli* se encuentran presentes dos genes que codifican para enzimas con actividad transcetolasa: *tktA* y *tktB*. La transaldolasa presenta también isoenzimas: *talA* y *talB*, que catalizan la formación de eritrosa-4-fosfato y fructosa-6-fosfato, a partir de las moléculas de 3 y 7 carbonos generadas anteriormente por la transaldolasa [Sprenger, 1995].

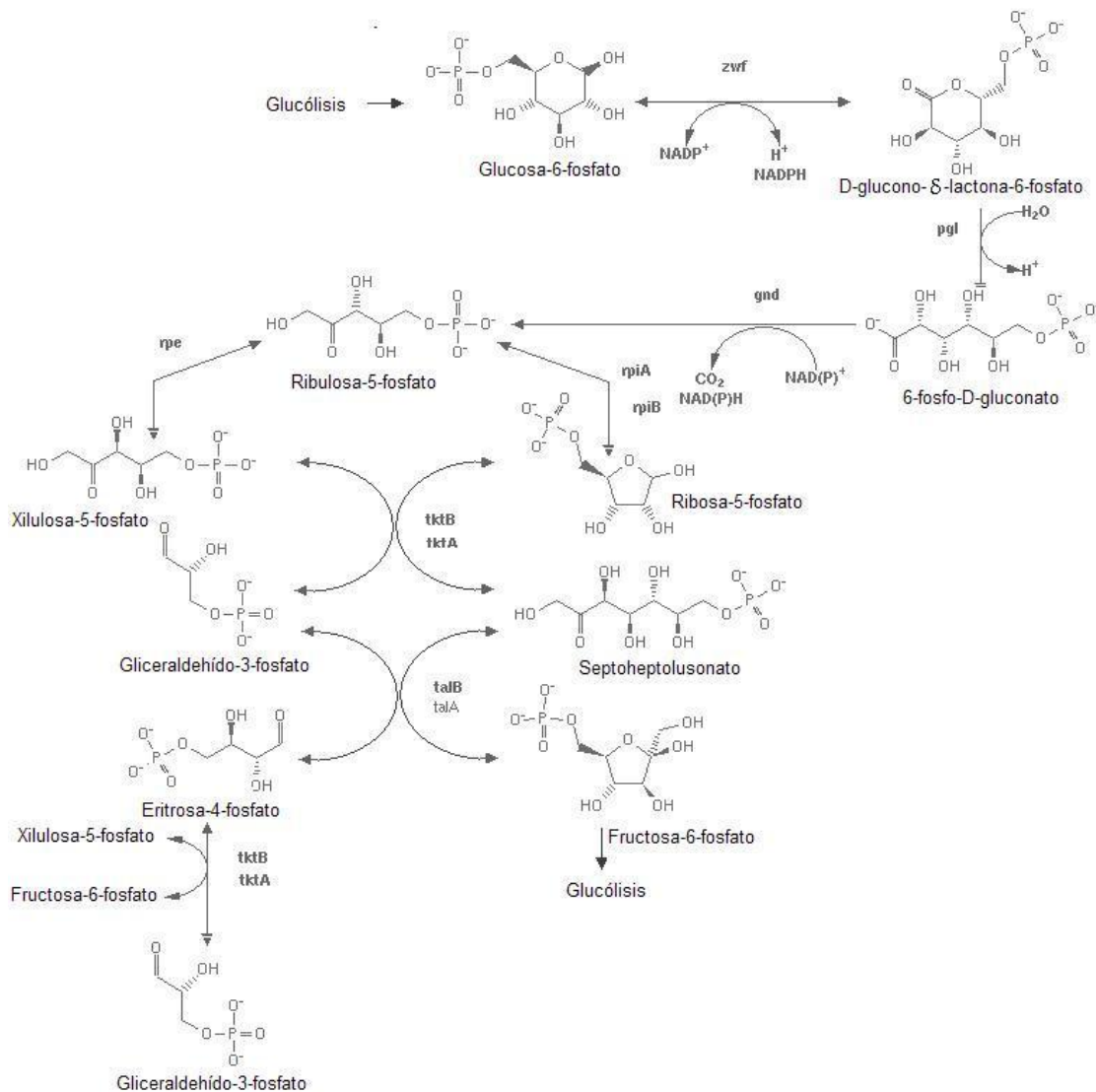


Fig. 6 Vía de las pentosas fosfato. Se muestra cada uno de los intermediarios de la vía, así como los genes que codifican para cada una de las enzimas de la misma. *zwf* : glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; *pgl*: 6-fosfogluconolactonasa; *gnd*: 6-fosfogluconato deshidrogenasa; *rpe*: ribulosa-5-fosfato-3-epimerasa; *rpiA*, *rpiB*: ribosa-5-fosfato isomerasa; *talA*, *talB*: transcetolasa; *tktA*, *tktB*: transcetolasa (modificado de Ingraham y Davis, 2006).

CIV. Ingeniería de vías metabólicas

Se ha definido la ingeniería de vías metabólicas (IVM) como el mejoramiento de las actividades celulares por manipulación de funciones enzimáticas, de transporte y regulatorias de la célula por el uso de la tecnología del ADN recombinante y en una definición más general como la modificación de la bioquímica celular por la introducción de nuevas propiedades o por modificación de las ya existentes. En general, los objetivos de la IVM se puede resumir en cuatro categorías: 1) mejoramiento del rendimiento, productividad y fisiología celular, 2) extensión del rango de sustratos, 3) eliminación o reducción de subproductos y 4) introducción de vías que dirijan hacia la formación de nuevos productos [Kern *et al.*, 2007].

En la obtención de cepas sobreproductoras de SA, diversos grupos han empleado variadas técnicas que involucran ingeniería de los circuitos regulatorios, de los transportadores que participan en la toma de carbono del medio, de las vías glucolítica, de las PP y de la vía de síntesis de aromáticos [Bongaerts *et al.*, 2001].

En el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en el grupo del Dr. Francisco G. Bolívar Zapata se han aplicado diversas estrategias basadas en los puntos antes mencionados (fig.8), llegando así a obtener la cepa de *E. coli* PB12.SA22 (PTS⁻ Glc⁺ *aroG*^{fbr} *tktA aroB aroE ΔaroK ΔaroL*) capaz de acumular 7.1 g/L de SA, con el mejor rendimiento reportado en la literatura con respecto a glucosa, correspondiente a 0.29 mol/mol [Escalante *et al.*, 2010].

Para mejorar la producción de SA, diversos grupos, han realizado las siguientes modificaciones:

i) Ingeniería en el metabolismo central del carbono

Los precursores de la VSHK, el PEP y la E4P, derivan del metabolismo central del carbono (MCC), el fosfoenolpiruvato es formado durante la glucólisis y la vía de las pentosas fosfato provee la E4P.

Incremento de la disponibilidad de fosfoenolpiruvato

El PEP es un intermediario clave involucrado en varios procesos celulares. En las cepas silvestres de *E. coli* la mayor fuente de consumo de PEP es el sistema PTS, responsable de la captación y fosforilación de la mayoría de la glucosa. Este sistema consume el 50% del PEP disponible, mientras que el 50% restante se divide en las reacciones catalizadas por la PEP carboxilasa para producir oxaloacetato, las piruvato cinasas para la producción de piruvato, la UDP-N-acetilglucosamina enolpiruvil transferasa en la biosíntesis de peptidoglicano y en la reacción catalizada por la DAHP sintasa para la síntesis de compuestos aromáticos, con 16%, 15%, 16% y 3%, respectivamente [Gosset, 2005].

Obtención de cepas PTS⁻Glc⁺. La disponibilidad de PEP hacía la VSHK aumentaría al doble si la célula empleara para internalizar la glucosa un sistema PEP-independiente; bajo este enfoque, en nuestro grupo de trabajo se han obtenido cepas PTS⁻ tras la delección del operón *ptsHI-crr* [Flores *et al.*, 1996; Flores *et al.*, 2005; Escalante *et al.*, 2010]; posteriormente, a través de un proceso de evolución adaptativa, la cepa de *E. coli* PB11 PTS⁻Glc⁻ (derivada de la cepa silvestre JM101), recuperó su capacidad de crecimiento en glucosa generando la cepa PB12 (PTS⁻ Glc⁺), cuyo fenotipo fue el resultado de la selección del transportador galactosa permeasa, GalP, sistema que no requiere de PEP y es dependiente de ATP y H⁺ (fig. 7), el cual fue empleado por la célula como alternativa para transportar la glucosa del medio, obteniendo así cepas con el fondo genético PTS⁻ Glc⁺[Flores *et al.*, 1996; Flores *et al.*, 2005].

En otros grupos, tras la delección del operón PTS se ha recurrido a la inserción de genes heterólogos, tanto para aumentar la capacidad de transporte de glucosa por la célula y recuperar con ello su capacidad de crecimiento, como para fosforilar la glucosa una vez internalizada y que pueda entrar así en el metabolismo glucolítico, aumentando la disponibilidad de PEP, tal es el caso de la expresión de los genes *glf* y *glk* que codifican para el facilitador de glucosa y la glucocinasa de *Zymomonas mobilis* respectivamente [Bongaerts *et al.*, 2001; Yi *et al.*, 2003; Chandran *et al.*, 2003]; otro ejemplo es el uso del gen *gdh* que codifica para la

enzima glucosa deshidrogenasa de *Bacillus megaterium*, donde se busca oxidar la glucosa, de modo que entre como gluconato-6-fosfato a la vía de PP y aumentar con ello la poza de E4P [Bongaerts *et al.*, 2001].

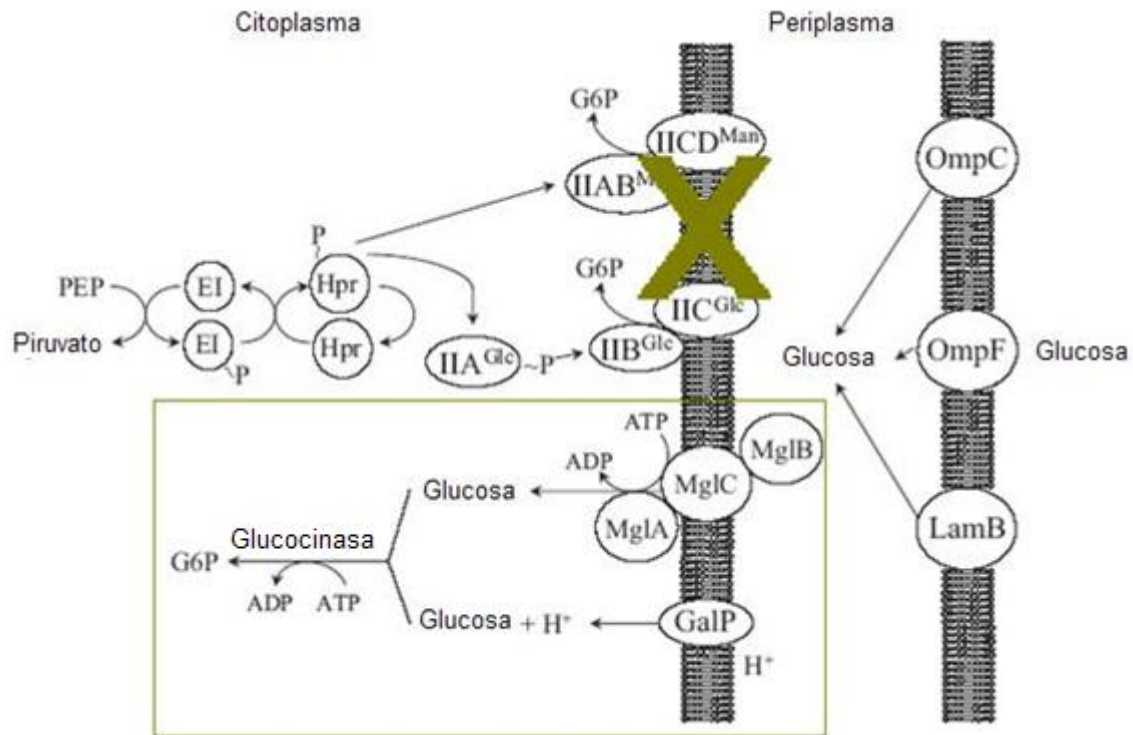


Fig. 7 Sistemas de transporte de glucosa. Arriba: sistema PTS, transporta y fosforila varios azúcares, entre ellos la glucosa, E1 (enzima soluble no específica) y HPr (proteína acarreadora fosfohistidina) transfieren un grupo fosforil del PEP a IIA y IIB (enzimas específicas); IIB fosforila el azúcar reconocido y transportado por la proteína integral de membrana IIC; este sistema aquí se muestra inactivado. Abajo: sistema Mgl constituido de tres proteínas MglA, MglB y MglC: proteína de unión a ATP, proteína de unión a glucosa y proteína transportadora; sistema GalP (permeasa de galactosa) proteína integral de membrana facilita la entrada de glucosa por el simporte de H⁺; la glucosa internalizada por estos dos últimos sistemas es fosforilada en la vía glucolítica por la enzima glucocinasa dependiente de ATP. OmpC, OmpF y LamB constituyen porinas por las que la glucosa ingresa al periplasma en *E. coli* (modificado de Gosset 2005).

Por otro lado, la célula produce también PEP por acción de las enzimas PEP sintasa codificada por el gen *pps* y PEP carboxicinas codificada por *pck*; algunos grupos de investigación, han trabajado también con algunas de estas enzimas estudiando el efecto sobre la disponibilidad del PEP. Así mismo se han probado

diversas fuentes de carbono que no involucran el PEP en su internalización en la célula [Bongaerts *et al.*, 2001; Yi *et al.*, 2002; Chandran *et al.*, 2003].

Incremento de la disponibilidad de eritrosa-4-fosfato

Una de las enzimas clave en la parte no oxidativa de la vía de las PP es la transcetolasa, codificada por el gen *tktA*, y que vincula esta vía con la glicólisis, a la vez que dirige el flujo del carbono hacia la síntesis de la E4P, permitiendo por tanto, un incremento en la concentración de éste intermediario, por esta razón, dicho gen también ha sido sobreexpresado [Bongaerts *et al.*, 2001; Knop *et al.*, 2001; Chandran *et al.*, 2003; Escalante *et al.*, 2010].

Otros grupos han trabajado con la eliminación y sobreexpresión de otros genes como *pgi* y *talA* respectivamente en la producción de compuestos aromáticos; en el caso de la eliminación de *pgi* a pesar de un significativo aumento en la producción de L-Triptófano, la velocidad de crecimiento se ve disminuida; por otro lado, la sobreexpresión de *talA*, aumentó significativamente la producción de DAHP y L-Fenilalanina [Bongaerts *et al.*, 2001].

ii) Ingeniería de la vía del shikimato

Interrupción de las shikimato cinasas I y II

Para lograr la acumulación del SA se ha interrumpido la vía del shikimato por inactivación de los genes *aroK* y *aroL*, que codifican para las isoenzimas shikimato cinasas I y II respectivamente, evitando así la fosforilación de shikimato a S3P [Draths *et al.*, 1999; Knop *et al.*, 2001; Bongaerts *et al.*, 2001; Chandran *et al.*, 2003; Johansson *et al.*, 2005; Escalante *et al.*, 2010].

Detección de enzimas limitantes en la vía del shikimato y eliminación de la inhibición alostérica de la vía.

Las enzimas de una vía metabólica que están sujetas a algún tipo de control, son consideradas como puntos limitantes para la redirección del flujo de carbono hacia la síntesis de un precursor o producto de interés. Como se ha mencionado

anteriormente, la enzima DAHP sintasa es inhibida por retroalimentación por los aminoácidos aromáticos resultantes de la VSHK, cada una de las isoenzimas se inhibe respectivamente por cada uno de los tres aminoácidos aromáticos; esto se puede evitar al sobre-expresar una DAHP sintasa resistente a inhibición alostérica (feed-back resistant, fbr -por sus siglas en inglés) [Kramer *et al.*, 2003]: AroF^{fbr}, AroG^{fbr}, AroH^{fbr}. De las tres isoenzimas, la de mayor actividad es la codificada por el gen *aroG* (DAHPS G, AroG), que contribuye con el 80% de la actividad total, teniendo la AroF el 20% de la actividad y AroH solo una mínima participación en la actividad total de la enzima, de aquí que la inhibición más importante es la que se da sobre la isoenzima AroG, por lo que su clonación dentro de un plásmido de mediano o alto número de copias puede controlar eficientemente la síntesis de DAHP al incrementar la disponibilidad de sus precursores [Bongaerts *et al.*, 2001; Johansson *et al.*, 2005; Báez *et al.*, 2007; Escalante *et al.*, 2010] independientemente de la concentración en el medio de Phe, algunos grupos han trabajado con la isoenzima AroF [Draths *et al.*, 1999; Knop *et al.*, 2001; Yi *et al.*, 2002; Chandran *et al.*, 2003; Yi *et al.*, 2003; Johansson *et al.*, 2005]. Al incrementar la síntesis de DAHP la eficiencia de la DHQ sintasa puede verse afectada ya que esta enzima no puede catalizar la conversión de DAHP a DHQ lo suficientemente rápido para evitar su acumulación, si el DAHP se acumula puede ser desfosforilado a 3-deoxi-D-*arabino*-heptulosanato (DAH) el cual interfiere con la pureza y rendimiento de la síntesis de shikimato; para superar el problema que implica la velocidad limitante de la DHQ sintasa, varios grupos de investigación han incorporado una copia adicional del gen *aroB* en plásmido o en cromosoma [Knop *et al.*, 2001; Chandran *et al.*, 2003; Sprenger, 2007; Escalante *et al.*, 2010]. La enzima shikimato deshidrogenasa está también sujeta a inhibición alostérica, al existir la acumulación de shikimato por la inactivación de las shikimato cinasas el equilibrio de las reacciones puede revertirse aumentando la formación de DHS y ácido quínico (QA), debido a la existencia de un equilibrio hidroaromático [Knop *et al.*, 2001]; la presencia de QA ocasiona problemas durante la purificación del shikimato; por medio de la sobre-expresión del gen *aroE* puede evitarse una elevada acumulación de estos metabolitos y desplazar el

equilibrio hacia la síntesis de SA [Draths *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999; Knop *et al.*, 2001; Chandran *et al.*, 2003; Escalante *et al.*, 2010].

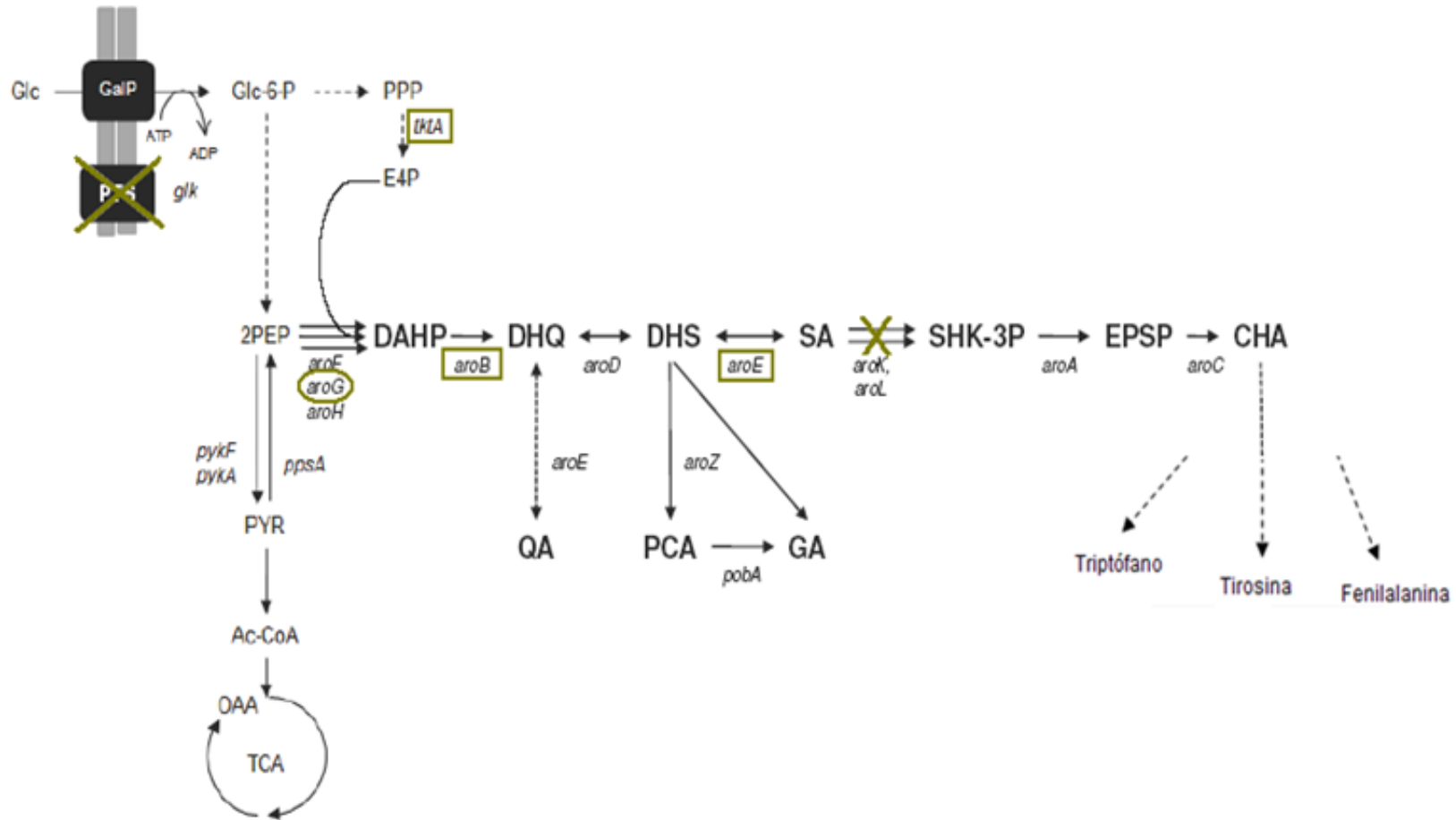


Fig. 8 IVM en el metabolismo central de carbono y vía del shikimato en cepas de *E. coli* PTS⁻ Glc⁺ para la sobreproducción de shikimato. Las X indican inactivación de reacciones por delección de genes; □ representa sobre-expresión del gen; O resalta genes insensibles a inhibición alostérica; Las flechas punteadas representan dos o más reacciones. *glk*: glucocinasa; *tktA*: transcetolasa; *aroF*, *aroG*, *aroH*: isoenzimas DAHP sintasa; *aroB*: DHQ sintasa; *aroD*: DHQ deshidratasa, *aroE*: shikimato deshidrogenasa; *aroK*, *aroL*: shikimato cinasa I/II, *aroA*: EPSP sintasa; *aroC*: corismato sintasa Glc: glucosa; GalP: permeasa de galactosa; PTS: sistema fofotransferasa de transporte de carbohidratos; Glc-6-P: glucosa 6 fosfato; PPP: vía de las pentosas fosfato; PEP: fosfoenolpiruvato; PYR: piruvato; Ac-CoA: acetil coenzima A; TCA: Ciclo de los ácidos tricarbóxicos; OAA: oxaloacetato; DAHP: 3-deoxi-D arabinohexulosonato-7-P; DHQ: 3-dehidroquinato; DHS: 3-dehidroshikimato; SA: shikimato; SHK-3P: shikimato 3 fosfato; EPSP: 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato; CHA: corismato (modificado de Escalante *et al.*, 2010).

D. JUSTIFICACIÓN:

La enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Zwf, codificada por el gen *zwf*), cataliza la primera reacción de la vía de las pentosas, ruta que a su vez, produce uno de los sustratos clave para la formación de ácido shikímico, la eritrosa-4-fosfato. La reacción catalizada por esta enzima rinde poder reductor como NADPH, el cual es consumido durante la síntesis de SA por acción de la enzima shikimato deshidrogenasa codificada por el gen *aroE*.

Con el fin de aumentar la síntesis de SA, se espera que al clonar una copia en plásmido de *zwf* y transformar a la cepa PB12.SA22, se dé un aumento en la disponibilidad de E4P.

Al existir un aumento en la disponibilidad de E4P, es probable que se presente un incremento en la demanda de NADPH (por el posible aumento en la actividad de las enzimas de la VSHK, particularmente de la shikimato deshidrogenasa), mismo que se espera, sea suministrado por la actividad de la Zwf, lo que aumenta el interés de clonar una copia adicional de dicho gen.

E. OBJETIVOS:

EI. Objetivo general.

Estudiar el efecto de la clonación en plásmido del gen *zwf* que codifica para la enzima glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa y su uso para la transformación en la cepa PB12 *aroK* *aroL*⁻, como una estrategia para incrementar la producción de shikimato.

EII. Objetivos particulares.

- Clonación del gen *zwf* en el plásmido pTOPO*aroB* *aroE* y transformación en la cepa PB12 *aroK* *aroL*⁻ pJLBaroG^{fb} *tktA* para obtener la cepa PB12.SA23.
- Caracterización de la cepa PB12.SA23 en cuanto a producción de ácido Shikímico y otros intermediarios aromáticos, consumo de glucosa, velocidad específica de crecimiento, en sistemas de fermentación en lote.

- Realizar perfiles de transcripción de genes del metabolismo central del carbono, (glucólisis, TCA, PP) y vía del shikimato, comparativamente entre las cepas productoras de SA y la cepa silvestre, creciendo en el medio de producción.
- Medición de la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa y la comparación con el perfil de transcripción obtenido para el gen que codifica para ésta.

F. MATERIALES Y MÉTODOS

FI. CONSTRUCCIÓN DE LA CEPA PB12.SA23

i) Cepas y plásmidos

Las cepas y los plásmidos utilizados en este trabajo se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Características de las cepas y plásmidos empleados.

Cepas	Características relevantes	Referencia
<i>E. coli</i> JM101	<i>supE</i> , <i>thi</i> , $\Delta(lac-proAB)$, F'	Bolívar <i>et al.</i> , 1977
<i>E. coli</i> PB12	JM101 $\Delta(ptsH-l-cr)$:: <i>kan glc</i> ⁺	Flores <i>et al.</i> , 1996
PB12.SA2	PB12 Δ <i>aroL</i> Δ <i>aroK</i> :: <i>cm</i>	Escalante <i>et al.</i> , 2010
PB12.SA22	PB12.SA2 pJLBaroG ^{fbr} <i>tkatA</i> pTOPOaroBaroE	Escalante <i>et al.</i> , 2010
PB12.SA23	PB12.SA2 pJLBaroG ^{fbr} <i>tkatA</i> pTOPOaroBaroEzwf	Este trabajo
Plásmidos		
pTOPOaroBaroE	pCR®-Blunt II-TOPO®[Invitrogen™, 3.5Kb, gen letal <i>ccdB</i> , región operadora/promotora <i>lac</i> , Km ^R , Zn ^R , origen pUC] conteniendo los genes <i>aroB</i> y <i>aroE</i>	Escalante <i>et al.</i> , 2010
pJLBaroG ^{fbr} <i>tkatA</i>	pJLBaroG ^{fbr} (<i>aroG</i> ^{fbr} bajo el control del promotor lacUV5, los genes <i>lacI</i> ^q y <i>tet</i> , resistencia a Tetraciclina y origen de replicación pACYC184) conteniendo el gen <i>tkatA</i> con su promotor nativo.	Balderas <i>et al.</i> , 2009
pTOPOaroBaroEzwf	pCR®-Blunt II-TOPO®[Invitrogen™, 3.5Kb, gen letal <i>ccdB</i> , región operadora/promotora <i>lac</i> , Km ^R , Zn ^R , origen pUC] conteniendo los genes <i>aroB</i> , <i>aroE</i> y <i>zwf</i>	Este trabajo

ii) Construcción del plásmido pTOPOaroBaroEzwf

Amplificación del gen zwf.

Se extrajo el ADN cromosomal de la cepa *E. coli* JM101, utilizando el juego de reactivos para extracción de ADN cromosomal Ultra Clean TM Microbial DNA Isolation Kit (MoBio Laboratory Inc) de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Empleando este ADN como templado, se realizó una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para amplificar el gen *zwf*, con el par de cebadores zwfFw (hacia delante) y zwfRv (hacia atrás) (Cuadro 1), que contienen los sitios de restricción para las enzimas *XhoI* y *PstI*, respectivamente; en su diseño se incluyeron un par de bases adicionales en el extremo 5', con la finalidad de asegurar la eficiencia de corte de la enzima y facilitar la reacción posterior de ligación.

Cuadro 1. Cebadores utilizados en la amplificación de *zwf*. Diseño final de los cebadores zwfRv y zwfFw.

Cebador	Secuencia
zwfRv	5'--- AAC TGCA GCC ATA AAG GAT AAG CGC AGA--- 3'
zwfFw	5' --CCG CTC GAG AAA AGC AGT ACA GTG CAC CGT-- 3'

** bases extras, ** sitio de corte de la enzima de restricción, **cebador

El par de cebadores zwfFw+zwfRv permite la amplificación de un producto de 1579 pb.

La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Robocycler Gradient 96 (Stratagene) utilizando la enzima elongase enzyme mix (Invitrogen), bajo las siguientes condiciones de reacción:

	Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	Desnaturalización	95	5
30	Desnaturalización	95	1
	Alineamiento	55	1
	Extensión	68	1
1	Extensión	68	5

La mezcla de reacción estuvo conformada por:

	Volumen (µL)
Templado	1
Amortiguador A 5X	4
Amortiguador B 5X	6
dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), [10 mM c/u]	1
Cebador Fw 0.5 mM (concentración final)	0.74
Cebador Rv 0.5 mM (concentración final)	0.15
Elongasa (Invitrogen)	0.5
H ₂ O	36.61
Total	50

Para verificar la amplificación correcta del gen *zwf* se realizó una electroforesis utilizando gel de agarosa (Sigma) al 1% a 90-120 volts y se visualizó en un analizador de imágenes (EagleEye™ II, Stratagene).

Clonación de zwf en el plásmido pTOPOaroBaroE

El gen amplificado se clonó en el plásmido pTOPOaroBaroE de mediano número de copias, para lo cual este se digirió con las enzimas *Pst* I y *Xho* I, al igual que el producto de PCR obtenido anteriormente; esto con la finalidad de llevar a cabo una ligación del producto de PCR con el plásmido con orientación dirigida. Las condiciones de digestión fueron:

	Volumen (μL)
ADN	4
Amortiguador 3 (Biolabs)*	2
Enzima (Biolabs)*	1 c/u
BSA 100X (Biolabs)	0.2
H ₂ O	11.8
Total	20

*Ambas enzimas (*Pst* I y *Xho* I), de acuerdo con el manual de enzimas de Biolabs, muestran un 100% de eficiencia de corte en este amortiguador.

La mezcla de reacción se incubó a 37°C por 2 horas después de las cuales de inactivaron las enzimas a 80°C por 20 minutos. Se llevó a cabo posteriormente la reacción de ligación del plásmido digerido con el producto de PCR bajo las siguientes condiciones, manteniendo una proporción de 3:1 plásmido: inserto:

	Volumen (μL)
Plásmido	4
Inserto	1
Amortiguador (Fermentas)	4
T4DNA Ligasa (Fermentas)	1
H ₂ O	10
Total	20

Esta mezcla se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, después de los cuales se inactivó la ligasa a 95°C por 10 minutos.

iii) Transformación con los plásmidos *PJLBaroG^{fbr}tktA* y *TOPOaroEaroBzwf*

Células electrocompetentes de *E. coli* TOP10 fueron transformadas con el plásmido *TOPOaroEaroBzwf* en un electroporador BioRad Gene Pulser y recuperadas en medio SOC con glucosa, se incubaron por 1 h a 37°C a 300 rpm y fueron seleccionadas en placas de medio LB con Zeocina (Invitrogen) (Zn) (25 ng/mL) y se incubaron a 37°C por 24 horas. De las colonias positivas se extrajo el ADN plasmídico por lisis alcalina y se comprobó la inserción del gen *zwf* en un gel de agarosa, además de mandarse a secuenciar la sección del plásmido donde se

clonó el gen. Para la secuenciación, el plásmido TOPO*aroBaroEzwf* se purificó utilizando el juego de reactivos Pure Link™ PCR Purification Kit (Invitrogen), de acuerdo a las indicaciones del proveedor y se determinó la concentración; se preparó la mezcla de reacción para secuenciación de acuerdo a las indicaciones de la Unidad de Secuenciación del IBT, UNAM: 33-50 ng de plásmido/μL (templado) y 10 pmol/μL de cebadores en un volumen máximo de templado de 15 μL y un volumen total de 16 μL. La muestra fue secuenciada en un equipo Perkin Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730 por el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing. Los cebadores empleados para la secuenciación se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Cebadores empleados en la secuenciación del plásmido pTOPO *aroB aroE zwf*

Cebadores	Secuencia
M13 Rv	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
M13 Fw	5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3'
<i>aroB</i> Fw	5'-CTG TCT GAA AAC GCT TCC CC-3'
<i>aroB</i> in Fw	5'-CCC GCA GAC GAG TGT ATA TAA-3'

Se prepararon células electrocompetentes de la cepa PB12.SA2, las cuales fueron transformadas con los plásmidos PJL*BaroG^{fbr}tktA* de alto número de copias [Balderas *et al.*, 2009] y TOPO*aroBaroEzwf* (fig. 9), se recuperaron como se describe previamente y se seleccionaron en placas de agar LB con cloranfenicol (Cm) (20 μg/mL), kanamicina (Km) (30 μg/mL), tetraciclina (Tc) (30 μg/mL) y zeocina (25 μg/mL). De las colonias que presentaban el fenotipo deseado se eligieron algunas para verificar la inserción del plásmido por tamaño en un gel de agarosa y se seleccionó una de las colonias positivas que se creció en medio LB y se almacenó a -70°C en glicerol al 50%, en relación 1:1. La cepa seleccionada fue llamada en este trabajo como PB12.SA23.

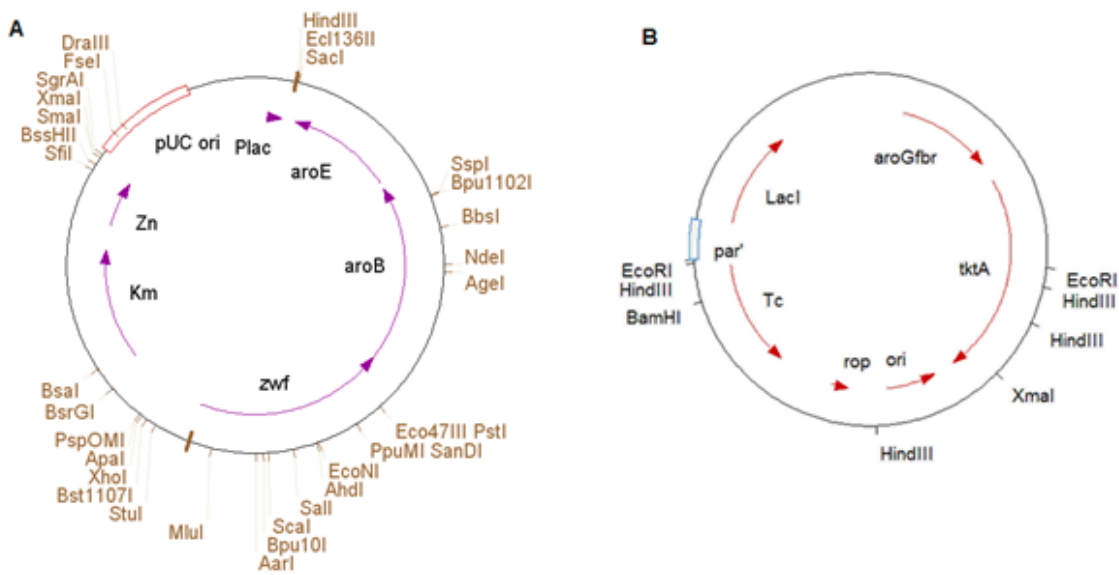


Fig. 9 Mapas de los plásmidos utilizados. A) pTOPOaroEaroBzwf tiene una copia de los genes *aroB*, *aroE* y *zwf*, así como genes de resistencia a kanamicina (km) y zeocina (zn). B) PJLBaroG^{fbr} tktA contiene el gen *aroG^{fbr}* insensible a inhibición, una copia de *tktA* y la el gen de resistencia a tetraciclina (tc).

FII. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CLONACIÓN DEL GEN *zwf* EN SISTEMAS DE FERMENTACIÓN EN LOTE SOBRE LA PRODUCCIÓN DE SHIKIMATO.

- i) Medio y condiciones de cultivo durante las fermentaciones para producción de SA.

Se realizaron fermentaciones por triplicado de la cepa PB12.SA23 en fermentadores de un litro Autoclavable Bio Reactor (Applikon) equipado con las consolas: ADI 1010 Bio controller y ADI 1025 Bio console (Applikon) para controlar la temperatura, pH, agitación y aireación. Se utilizó medio mineral [Li *et al.*, 1999] suplementado con 15 g/L de extracto de levadura (DIFCO) y 25 g/L de glucosa (J.T. Baker), además de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) como inductor a una concentración de 0.1mM, el pH del medio se ajustó a 7 con NaOH 1N. La composición del medio mineral utilizado se describe en la tabla 2.

Tabla 2. Medio de producción empleado por Li *et al.* (1999), para la producción de DHS y empleado en este trabajo para la producción de SA.

Componente	g/L
K_2HPO_4	7.5
Citrato de amonio FeIII	0.3
Ácido cítrico	2.1
H_2SO_4	1.2(mL)

El medio es suplementado además con una solución de elementos traza (tabla 3) los cuales son adicionados al inicio de la fermentación junto con el inóculo y otros elementos que se esterilizan por separado y se muestran en la tabla 4.

Tabla 3. Composición de la solución de elementos traza. Elementos traza empleado por Li *et al.*, (1999), en la producción de DHS.

Elementos traza	g/L
$(NH_4)_6(Mo_7O_{24}) \cdot 4H_2O$	0.0037
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.0029
H_3BO_3	0.0247
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.0025
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.0158

Tabla 4. Suplementos del medio de producción.

Componente	g/L
$MgSO_4$	0.2465
$CaCl_2$	0.0147
Vitamina B ₁	0.0001
Glucosa	25.0
Extracto de levadura (YE)	15.0

La glucosa se adicionó a partir de un patrón al 25%, el cual se esterilizó por filtración con el sistema de filtración Stericup Filter Unit 0.22 μ m. Así mismo, se utilizó una solución patrón de elementos traza a una concentración 1000X mientras que los patrones de $MgSO_4$ y $CaCl_2$ estaban a una concentración 1M.

Los componentes de la tabla 2, además del extracto de levadura, se disolvieron en 350 mL de agua MQ y se vertieron en el fermentador ya armado con los aditamentos necesarios para la fermentación (matraz de venteo, probeta para base, manguera de entrada de aire, electrodos de pH y oxígeno) (fig. 10), se

procedió entonces a esterilizar cada reactor por 20 minutos a 121°C y 1.15 Psi de presión. Una vez esterilizado el fermentador, se conectó a las consolas y se mantuvo bajo las condiciones de fermentación.



Fig. 10 Sistema de fermentación.

Para iniciar la fermentación, se realizó un precultivo; partiendo del glicerol a -70°C estriando en cajas de medio LB con los antibióticos requeridos por la cepa a las concentraciones necesarias, incubando a 37°C, durante 12 h. A partir de colonias aisladas, se inoculó en un matraz erlenmeyer de 250 mL con 50 mL del medio de producción (base mineral, más glucosa, extracto de levadura, elementos traza y vitamina B1 a las concentraciones ya indicadas) más los antibióticos requeridos, incubando a 37°C y 300rpm. Se midió la $D.O_{600nm}$ en un espectrofotómetro Beckman DU®-70, hasta que la $D.O_{600nm}$ se encontró alrededor de 6; al alcanzar este valor, se dejó de incubar y se realizó el cálculo del volumen necesario de inóculo para que cada fermentación comenzará en una $D.O_{600nm}$ inicial de 0.3. La composición del medio utilizado para crecer el inóculo, cuyo volumen total es de 150 mL, se describe en la tabla 5.

Tabla 5. Composición del medio de desarrollo del inóculo.

Componente	Volumen
Preinóculo	x mL del cálculo
Glucosa	50 mL
Extracto de levadura (EL)	50 mL
IPTG [0.1mM]	0.5 mL
MgSO4	1 mL
CaCl2	100 µL
Elementos traza	0.5 ml
Vitamina B1	50 µL
Antibióticos	0.5 mL de Tc y Km 0.33 mL de Cm
Medio cultivo	mL necesarios para completar 150 mL

El inóculo fue transferido a un fermentador preparado como se describió previamente para completar 500 mL de medio de producción. Cada experimento se realizó por triplicado. Los fermentadores se mantuvieron a 37°C, a pH 7.0 (controlado mediante la adición de NH₄OH 10%), con una agitación de entre 500 y 700rpm para mantener los niveles de oxígeno disuelto a no menos de 20%, la aireación fue de 1vvm (volumen de aire por volumen de medio por minuto). La duración de las fermentaciones fue de 50 h durante las cuales se tomaron muestras de 1.5 mL cada hora durante las 8 primeras horas y después de este lapso se tomaron muestras cada 6 h hasta completar las 50 h. Cada muestra se centrifugó a 12800 g para separar las células del sobrenadante, el cual se transfirió a un tubo nuevo y se congeló a -20°C para su posterior análisis. Las células se lavaron 2 veces con agua para eliminar todo el medio posible y se resuspendieron en 1.5 mL de agua MQ. De esta suspensión se midió la D.O._{600nm} para registrar el crecimiento.

ii) **Cuantificación de analitos producidos en la fermentación.**

Se midió en el sobrenadante a cada uno de los tiempos la concentración de SA, DHS, ácido gálico, ácido acético y glucosa.

La cuantificación de los primeros cuatro compuestos se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en un sistema Waters, Miliford, MA, el cual cuenta con una bomba 600E, inyector automático 717, un índice de refracción de

2410 y un detector de arreglo de diodos (996). Las muestras se corrieron en una columna Aminex HPX-87H (300x 7.8mm; 9 μ m) Bio – Rad, Hércules, CA, utilizando una fase móvil 5mM de H₂SO₄, un flujo de 0.5 mL/min y una temperatura de 50°C. La glucosa contenida en cada una de las muestras se determinó en el sistema de cuantificación de glucosa (Biochemistry Analyser YSI 2700 Select), empleando como estándares una curva patrón de glucosa de 2, 4, 6, 8, 10 y 12.5 g/L.

FIII. ANÁLISIS DEL PERFIL DE TRANSCRIPCIÓN POR qPCR TIEMPO REAL

Se realizaron por duplicado fermentaciones en lote con el medio de producción y condiciones descritas anteriormente, con las cepas PB12, PB12.SA22 y PB12.SA23 y como control, la cepa JM101.

Tabla 6. Composición del inóculo para las fermentaciones.

Componente	Volumen
Preinóculo	x mL del cálculo
Glucosa	50 mL
Extracto de levadura	50 mL
IPTG [0.1mM]*	0.5 ml
MgSO₄	1 mL
CaCl₂	100 μ L
Vitamina B1	50 μ L
Antibióticos**	0.5 mL de Tc y Km 0.33 mL de Cm
Medio cultivo	mL necesarios para completar 150 mL

*Solo en las cepas con plásmido **JM101, no requiere antibióticos, PB12 solo requiere Km.

Cuando cada cultivo llegó a una D.O._{600nm} de 1 se tomó una muestra de 50mL de medio de los que se extrajo el ARN total por el método de fenol caliente [Flores *et al.*, 2005]. Una vez extraído se comprobó su integridad por electroforesis en gel de agarosa para ARN, así mismo se cuantificó y comprobó su calidad por las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 (indican el grado de contaminación por proteínas y compuestos fenólicos) en el equipo NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific).

Para la síntesis del ADNc, el ARN extraído se trató con ADNasa, para esto se preparó la siguiente mezcla:

	Volumen (μL)
ARN	4
Amortiguador 10X (Ambion)	0.5
ADNasa (Ambion)	0.5

El coctel se incubó a 37°C por 30 min. Pasado el tiempo se agregaron 3 μL de resina (juego de reactivos Turbo DNA-free de Ambion) y se dió vortex máximo por dos minutos. Se centrifugó a 12100 g por 2 minutos a temperatura ambiente. El ARN puro se transfirió a un tubo limpio y se procedió a la síntesis del ADNc por el método de primera cadena de ADN, usando una mezcla de cebadores específicos para los genes de interés (Cebadores a, cuadro 3).

Cuadro 3. Secuencia de los cebadores empleados para la síntesis del ADNc y el qPCR tiempo real.

<u>Control interno (Housekeeping)</u>		<i>pykF</i> a	5'-TGTCTGGTGAATCCGCAAAA-3'		
<i>ihfB</i>	a	5'-GCCAAGACGGTTGAAGATGC-3'	b	5'-CTCGAGACGGCTGTTCATCA-3'	
	b	5'-GAGAAACTGCCGAAACCGC-3'	<i>aceE</i> a	5'-CGTGAAGAAGGTGTTGAGCG-3'	
<u>Genes glucolíticos</u>			b	5'-TTGCTGATACCTGTGCCTGC-3'	
<i>glk</i>	a	5'-GAAGCGGTCATTCGCGTTTA-3'	<i>aceF</i> a	5'-GTCGTATCCTGCGCGAAGAC-3'	
	b	5'-GTCATCGCCACCCAGTCAC-3'		b	5'-CAGCATGCCAGGGATACCAC-3'
<i>pgi</i>	a	5'-ACTAACGGTCAGCACGCGTT-3'	<u>Genes gluconeogénicos</u>		
	b	5'-TCAGAGAGCGGGTTATGGGT-3'	<i>gpmB</i> a	5'-GGTATTGCACTGGGATGCCT-3'	
<i>pfkA</i>	a	5'-GGAATTCCGCGACGAGAAC-3'		b	5'-TAATCCACGCGCGAAATAGA-3'
	b	5'-CCATGTAGGAACCGTCACCG-3'	<i>gapC-1</i>	a	5'-CAACGACACCATTGTTTCCG-3'
<i>fbxA</i>	a	5'-GGAAATCGAACTGGGTTGCA-3'		b	5'-TCATCGTGCCGACTTCTATCC-3'
	b	5'-CGTAATCAACGTCTTCCGGC-3'	<i>gapC-2</i>	a	5'-ATCATTGGCAGCCATTTCCG-3'
<i>tpiA</i>	a	5'-AACTCCGGCTCAGGCACAG-3'		b	5'-TTATCGTACCAGGCGACCGT-3'
	b	5'-AGCCGCCGTAATGATC-3'	<i>fbxB</i> a	5'-GTACAACACCGGGCGTCTG-3'	
<i>gapA</i>	a	5'-GGCTCCGCTGGCTAAAGTTA-3'		b	5'-GCGGGTTAGCAGCAAATGAA-3'
	b	5'-GGCCATCAACGGTTTTCTGA-3'	<i>fbp</i> a	5'-AACAGGTTGCGGCAGGTTA-3'	
<i>pgk</i>	a	5'-AGATTACCTCGACGGCGTTG-3'		b	5'-CCGAGCGAAGGATCGTAAGT-3'
	b	5'-TGGACAGGGTTTCGTCTCT-3'	<i>pfkB</i> a	5'-GTTGGCGGATGAAAATGTCC-3'	
<i>gpmA</i>	a	5'-AGGCGTAAGCGAAGCAAAAAG-3'		b	5'-AACGATACTGCTCACCGCTTG-3'
	b	5'-GGGTATGGATAGCGGTTTC-3'	<u>Producción y utilización de acetato y AcetilCoA</u>		
<i>eno</i>	a	5'-GTTTCGTCCGTATGGCAGCT-3'	<i>pflB</i> a	5'-AAGGTTCTGCAAAGCGTACA-3'	
	b	5'-GCCTTACCCAGGAAACGG-3'		b	5'-GTAAACGTGAAACACGCCCT-3'
<i>pykA</i>	a	5'-CGTTACCACGTTAGGCCAG-3'	<i>acs</i> a	5'-GTGCGTAAAGAGATTGGCCC-3'	
	b	5'-GCGAGCCGTGAGAAAAGTTC-3'		b	5'-CGCAGAATACGGCGCATAAT-3'

poxB a 5'-AAAAGCCGATCGCAAGTTTC-3'
 b 5'-GGTGAATGGCTTCTCGCTC-3'

Genes anapleróticos

maeB a 5'-TGGTTTGCATTCAAAGGC-3'
 b 5'-GAGGGTACGTTTGCCGTCAT-3'
 5'-ATAAAGGCAGTGCCTTCAGCA-3'

sfcA a 3'
 b 5'-TGCTCGTTCCGCTTGTTCTT-3'
 5'-CGGGTCTGCAACCCTGTCTA-3'

mdh a 3'
 b 5'-CGTAGGCACATTGACAACG-3'
 5'-TCAGCAGGAAACCTTCCTCAA-3'

ppsA a 3'
 b 5'-GATAAGAGATGGCGCGATCG-3'

pckA a 5'-ACATGTTTATTCGCCGAGC-3'
 b 5'-CTGTTCTTCCACTGCGGGT-3'

Genes de TCA

gltA a 5'-AGGCACGCTGGGTCAAGAT-3'
 b 5'-TAGATTGCGAGGATGCGGTT-3'

acnB a 5'-CCTGGTGTGTTGGTCCGAT-3'
 b 5'-TTACGCGAAGAACCCGTACC-3'

aceA a 5'-ACATGGGCGGCAAAGTTTTA-3'
 b 5'-AACCAGCAGGGTTGGAACG-3'

aceB a 5'-GAACTGGCTTTCACAAGGCC-3'
 b 5'-TGTGGCGTAAAATGCGTCAC-3'
 5'-CTCCAGCACAGTTTGTGCGTT-3'

glcB a 3'
 b 5'-ATTGGCATCGATTTGCAGCT-3'

icdA a 5'-GACCGAAGCGGCTGACTTAA-3'
 b 5'-GCAGTTTAGCGCCATCCATC-3'

sucA a 5'-GCGGCAAAGAAACCATGAAA-3'
 b 5'-TTCGGTGCTGGTAATGTGCA-3'

sucB a 5'-GCAGTACGGTGAAGCGTTTG-3'
 b 5'-CTTCCGGTAACGTTTCAGG-3'

lpdA a 5'-GGTGGTGCATTGTCGGTAC-3'
 b 5'-TGGATGGTCAGTGCGATGTC-3'

sdhA a 5'-GACACCGTGAAAGGGTCGG-3'
 b 5'-AGGCCCATGTGTTTCGAGTTC-3'

sdhB a 5'-TGAACGGCAAGAATGGTCTG-3'
 b 5'-GATCACCGGTAAACCTGGCA-3'

sdhC a 5'-TGGCGTATCACGTCGTCGTA-3'
 b 5'-AAAGGAGATTTTGGCGGAGC-3'

fumA a 5'-ATGTCGATCAACTGCAAGCG-3'

b 5'-GAAGCCGCCGTGTTTTTTAC-3'

fumB a 5'-GTACCCTCGGTACTGCAGCC-3'

b 5'-AGCGCTTGCTAACTTGACGG-3'

fumC a 5'-CCCTAACGACGACGTGAACA-3'

b 5'-GAGGAATGAGTTGCTTGCGC-3'
 5'-CGGGTCTGCAACCCTGTCTA-3'

mdh a 3'

b 5'-CGTAGGCACATTGACAACG-3'

Pentosas fosfato

zwf a 5'-GCACGCGTAGTCATGGAGAA-3'
 b 3'

pgl a 5'-CGGTAAACCTGGCACTCCTC-3'
 5'-ACAATGCGGGTAACGTGAGC-3'

gnd a 5'-GATATTGGCGGAATGGCAAC-3'
 5'-GATCGGCGTAGTCGGTATGG-3'

rpe a 5'-TCTTCTCACGGGAACGGTTG-3'
 b 5'-GCCAATGGTGTGAAATCCT-3'

rpiA a 5'-CAGCGAAATCAGGCACAATG-3'
 b 5'-GATGGGCGGCACTTCAGTAT-3'

rpiB a 5'-GCCTTTCATTGTACCGAGCG-3'
 5'-GAGAGGTTGATGGCGGGATT-3'

tktA a 5'-AGGTTGCTACAGACGACCG-3'
 b 3'

tktB a 5'-AGTCCTGTGGCGTGATTTCC-3'
 b 5'-AGATCAGCATGGAGCCGTG-3'

talA a 5'-CCCAAAAGACCTTGCCAAT-3'
 b 5'-AATATCAGCCATGCCCATCG-3'

talB a 5'-CTCAAATCGTACCCGGTCG-3'
 b 5'-TACAAGTCCACCAGATGGCG-3'

eda a 5'-ACCGTAGTGCCGACACTG-3'
 b 5'-GGAATCTGCGCTGCGTTAAG-3'

edd a 5'-ATCCGTGCTATCGCCAAAGA-3'
 b 5'-AACTGTGCACCCGCTTCAGT-3'

aroF a 5'-GTACCCTGATGGCACGTCT-3'
 b 5'-GCTTTGAGCAGTTCACGCAC-3'

Biosíntesis de aromáticos

aroF a 5'-CAGAATCCGTGGTTGCTCAA-3'
 b 5'-CGGTTGCTCGGAAGACTGAT-3'

aroG a 5'-GTCGGCTTCAAAAATGGCAC-3'
 b 5'-CCCCATTTGTTACGGACAG-3'

aroH a 5'-CTGCTCGATCCACGATCTCA-3'
 b 5'-AGGTGCGCATTACGATTTCC-3'

aroB a 5'-GTTATCCTCCCTGACGGCG-3'
 b 5'-ACCAGCGTAGTATCGCGACC-3'
aroD a 5'-AGCCGAAGAAATCATTGCCC-3'
 b 5'-ACGTCAGCACATCGCTGGTA-3'
aroE a 5'-AATCCGATAGCCCACAGCAA-3'
 b 5'-TCATTGATGGGTGCCAACAC-3'
ydiB a 5'-AAAAGCGGGATTGCCATTTA-3'
 b 5'-CAGTTCGCGCATTTTGAG-3'
aroK a 5'-GCACTATTGGGCGCCAGTTA-3'
 b 5'-GAAAACCCAGCCCACATCAG-3'
 b 5'-CCGGAAGAAGATTTACGGCC-3'
aroL a 3'
 b 5'-TGCGCAACTTCGCGATATAG-3'
aroA a 5'-CATATTCCTGATGCGGCGAT-3'
 b 5'-TCGGTCTCTTTAACACGCCAG-3'

5'-TGGTAATCAACTGGGCGATG-3'
aroP a 3'
 b 5'-CGGATAAAGCAGAGCAGGGA-3'
 b 5'-AGAAATTCCCACAGGTTGCG-3'
malE a 3'
 b 5'-TTCAGCCAACAGGCCAGATT-3'
 b 5'-ATTATCAAGCTGCCGCGAAA-3'
shiA a 3'
 b 5'-CAATTCGCACAGTCGTAGCG-3'
 b 5'-CATGTATTACGCGCCGAAAA-3'
galP a 3'
 b 5'-TGGCAAGTACGTTGGTCAGG-3'
lamB a 5'-AACTTCCTCTGGCGGTTGC-3'
 b 5'-ACCTGTCCAACCAATACGG-3'
 b 5'-CCAGCATGTTATTTCGGTGCC-3'
mgIB a 3'
 b 5'-AGCCTTGCGCACTACAGACA-3'

Transportadores

5'-CGTCGGCGGTTCTATCACTT-3'
ompC a 3'
 b 5'-CCGATGTAAGCAGCGGTGT-3'
 5'-TTCGCGGGTCTTAAATACGC-3'
ompF a 3'
 b 5'-AATTCTGGCAGCATATCGGTG-3'

Para lo anterior, se realizó una mezcla de reacción conformada de los siguientes elementos:

	Volumen (µL)
ARN libre de ADN	5
Cebadores*	6
Agua	1

*Mezcla de cebadores a (cuadro 3) correspondientes a los genes de interés.

Se calentó a 75°C por 5 minutos, se enfrió, se centrifugó a 12100 g por 15 segundos a temperatura ambiente y finalmente, se adicionó a la mezcla de reacción, para completar un volumen total de 20 µL:

	Volumen (μL)
Amortiguador 5X (Fermentas)	4
dNTP's 10 mM (Fermentas)	2
Inhibidor (Fermentas)	1
Retrotranscriptasa (Fermentas)	1

La reacción de síntesis de ADNc se realizó en un Termociclador GenAmp PCR System Perkin Elmer, las condiciones de la reacción fueron las siguientes:

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (min)
25	5
42	60
75	10

A partir del ADNc sintetizado, se preparó un patrón a una concentración de 5 ng/ μL el cual se empleó como templado para los ensayos de qPCR tiempo real. La reacción de qPCR se llevó a cabo en el equipo ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Perkin-Elmer Applied Biosystems) utilizando el juego de reactivos SYBR Green PCR Master Mix (Perkin-Elmer Applied Biosystems), preparando placas de 96 pozos (Micro Amp Optical 98 Well Reaction Plate Applied Biosystem) una mezcla que consistía en:

	Volumen (μL)
Syber green	6
ADNc	1
Amortiguador b (cuadro 3)	1
H ₂ O	4
Total	12

Las condiciones de amplificación fueron:

Ciclos	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (min)
1	95	10
40	95	1/4
	60	1

En cada reacción se usó el cebador correspondiente al gen a estudiar, por lo que en la placa había cinco pozos para cada gen, correspondientes a las 4 cepas en cuestión y un control sin templado y con la mezcla de reacción.

La técnica de cuantificación utilizada para analizar los datos fue el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ descrito por Livak y Shmittgen (2001). Los datos obtenidos se normalizaron utilizando el gen constitutivo *ihfB* como control interno (“housekeeping gene”) con el fin de ajustar la concentración de ADNc de cada una de las muestras, ya que se detecta el mismo nivel de expresión de este gen en todas las cepas bajo las condiciones de estudio. Para cada gen analizado, el nivel de transcripción del gen en la cepa silvestre JM101 se consideró con un valor de 1.0 y se empleó como referencia para normalizar los datos de las cepas restantes, por lo que los datos de expresión de las cepas PB12, PB12.SA22 y PB12.SA23 se reportan como valores de expresión relativa comparados con el nivel de expresión de la cepa silvestre.

Los resultados presentados son el resultado de dos mediciones independientes de qPCR de valores obtenidos a partir de ADNc generados de muestras de fermentaciones independientes.

FIV. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA.

Se realizaron fermentaciones del mismo modo que para los lotes de producción de SA y se cosecharon las células a una D.O._{600nm} de 1 y 6, tomando muestras de 5 mL que se centrifugaron a 10000 g por 15 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en amortiguador TRIS-HCl 100 mM (pH 7.5) centrifugando nuevamente bajo las mismas condiciones. La pastilla sin sobrenadante se guardó a -70°C para el posterior ensayo de actividad.

Para medir la actividad enzimática se descongeló la pastilla y resuspendió en 500 mL del mismo amortiguador. Manteniendo en hielo, las células resuspendidas se lisaron en un sonicador Ultrasonic Processor CV18, alternando ciclos de sonicación y reposo de 20 segundos cada uno, hasta completar 1 minuto con 40 segundos, inmediatamente el extracto celular se centrifugó bajo las condiciones

antes mencionadas y se separó el sobrenadante, que fue utilizado como fuente de la enzima. La actividad se midió con el protocolo descrito por Shimizu y Peng (2003), utilizando la siguiente mezcla y condiciones de reacción: 10mM MgCl₂, 1.5 mM NADP⁺ y 10 mM de glucosa-6-fosfato en amortiguador Tris-HCl 100 mM (pH 7.5). La actividad se midió por la cantidad de NADPH generado el cual absorbe a una longitud de onda de 340 nm. Las curvas de actividad y los valores de absorbancia se visualizaron en un espectrofotómetro Thermo Spectronic (BioMate 5). Para poder determinar la actividad específica, se midió la concentración total de proteína por el método de Bradford.

G. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

GI. Construcción de la cepa PB12.SA23

A partir de la cepa PB12.SA2, se generó la cepa PB12.SA23, en la que además de los genes que ya se contaban en la cepa productora PBA.SA22, se clonó el gen *zwf*.

Tomando como secuencia de referencia la región correspondiente del gen *zwf*, en el genoma de *E. coli* K12, se amplificó por PCR un producto de 1579 pares de bases (fig. 12) que incluyen 93 bp antes del codón de inicio y contienen la región promotora del gen (*soxS*, *marA* y *rob*; fig. 11) la región propia del gen y 22 bp después del codón de término.

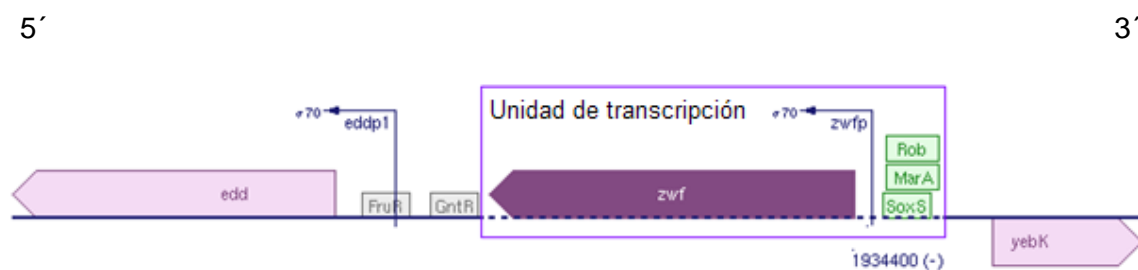


Fig. 11 Ubicación de *zwf* en el genoma de *E. coli* (modificado de Ecocyc, 2010).

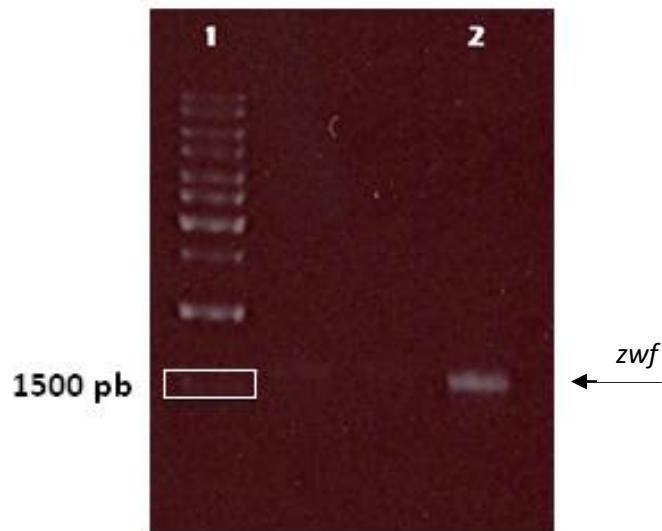


Fig. 12 Electroforesis en gel de agarosa al 1% del gen *zwf* amplificado por PCR. 1. Marcador de PM 1 kb Fermentas 2. Producto amplificado, gen *zwf*.

El producto amplificado se clonó en el plásmido pTOPOaro*EaroB*, y el plásmido generado pTOPOaro*EaroBzwf* se electroporó en células Top10 de *E. coli*. De estas células, se seleccionaron algunas que fueron capaces de crecer en medio mínimo con Zn y se seleccionaron dos de las que mostraron el tamaño correspondiente al plásmido con los tres genes en gel de agarosa, el cual es de 7754 bp (fig. 13), para verificar la construcción por secuenciación, no encontrándose ninguna mutación. Se muestra en la figura 14 el mapa del plásmido pTOPOaro*EaroBzwf*.

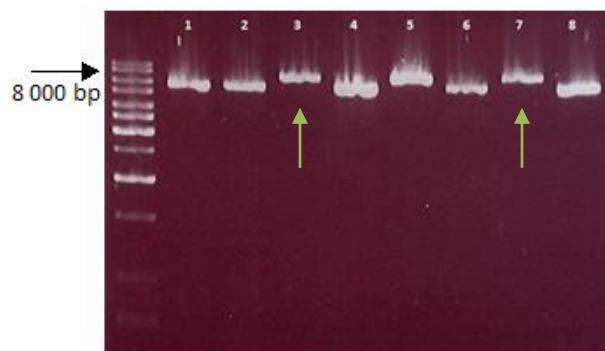


Fig. 13 Electroforesis de colonias recuperadas de la electroporación con el plásmido pTOPOaro*EaroBzwf*. De izquierda a derecha: Marcador de PM 1 kb Fermentas, colonias positivas. Se secuenciaron las colonias 3 y 7.

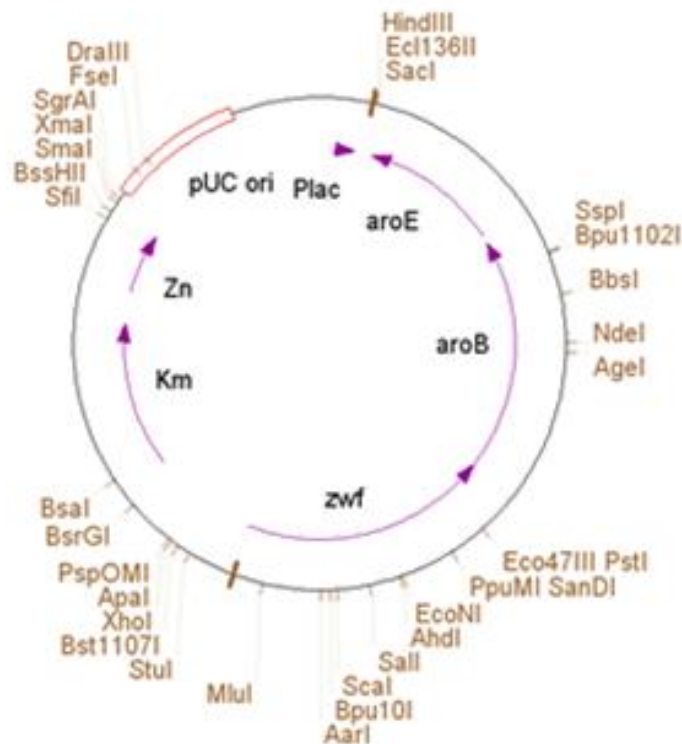


Fig. 14 Plásmido pTOPOaroEaroBzwf. Contiene una copia de los genes *aroB*, *aroE* y *zwf*, así como genes de resistencia a kanamicina (km) y zeocina (zn).

Se transformó la cepa PB12.SA2, con los plásmidos pJLBaroG^{fbr}tkatA y pTOPOaroEaroBzwf, a partir de colonias aisladas que crecieron en medio LB con antibióticos (Km, Tc, Cm y Zn). Se verificó la presencia de los dos plásmidos en gel de agarosa, tras la extracción y digestión del DNA plasmídico con la enzima de restricción *KpnI* (que tiene dos sitios de corte en el plásmido pTOPOaroEaroBzwf y uno en el plásmido pJLBaroG^{fbr}tkatA). Se observaron tres bandas de los tamaños esperados (fig. 15); una banda cercana a la banda de 10000bp del marcador de peso molecular, correspondiente al plásmido pJLBaroG^{fbr}tkatA que tiene un tamaño de 9745 bp y dos bandas del plásmido pTOPOaroEaroBzwf a la altura de las bandas de 5000 y 6000 y, 2000 del marcador, que suman un tamaño aproximado al tamaño del plásmido de 7754.

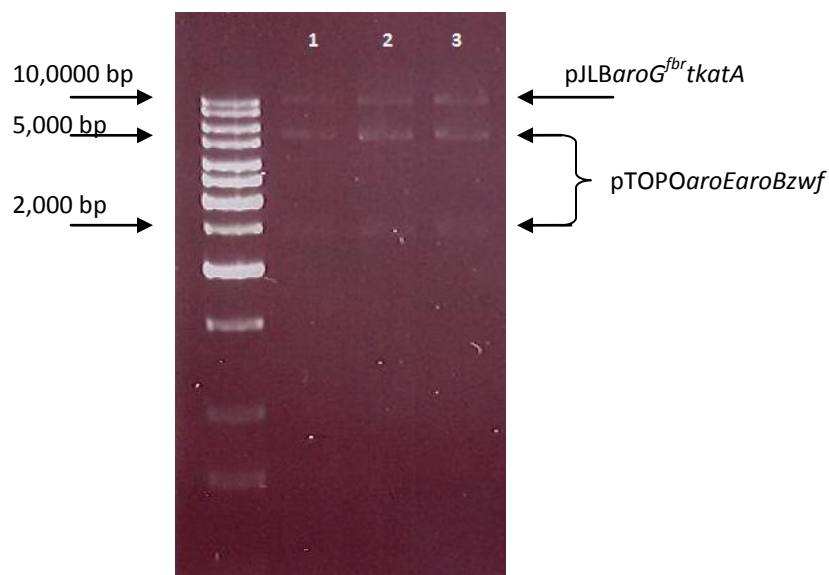


Fig. 15 Electroforesis del ADN plasmídico de la cepa PB12.SA23. De izquierda a derecha: Marcador de PM 1 kb Fermentas, ADN plasmídico de las colonias seleccionadas; se observan tres bandas correspondientes a los fragmentos de los plásmidos digeridos.

Se seleccionó una de estas colonias a partir de la cual se prepararon muestras conservadas en glicerol y se almacenaron a -70°C , esta fue la cepa utilizada para realizar los cultivos en fermentador en un volumen de 500 mL del medio de producción.

GII. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CLONACIÓN DEL GEN *zwf* EN SISTEMAS DE FERMENTACIÓN EN LOTE.

Los cultivos se realizaron en 500 mL de medio de fermentación, obteniendo el perfil de crecimiento, consumo de glucosa y producción de intermediarios aromáticos mostrados en la fig. 16.

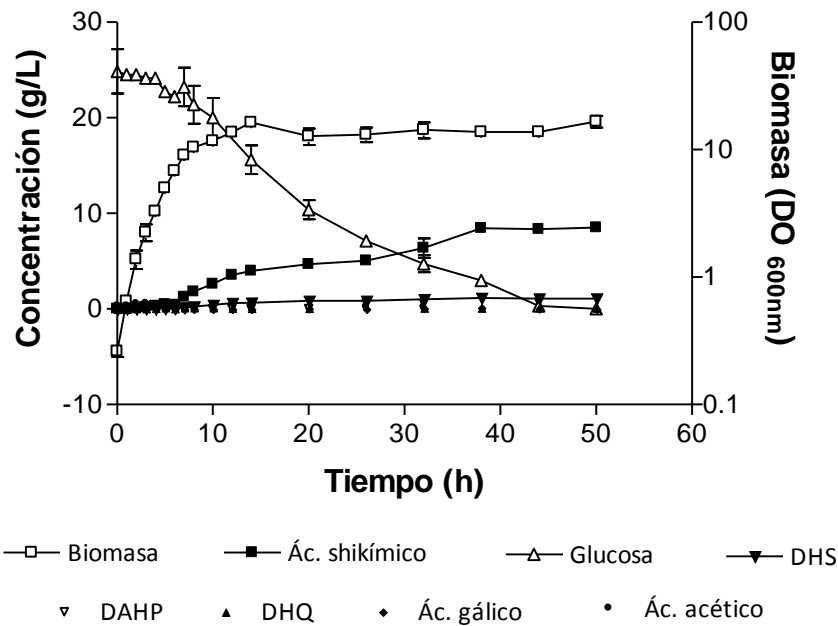


Fig. 16 Perfil de crecimiento, consumo de glucosa y producción de compuestos aromáticos de la cepa PB12.SA23. Se muestra el resultado del promedio de los datos obtenidos de tres fermentaciones independientes (para DAHP, solo es el resultado de dos) con sus correspondientes barras de error que indican la desviación estándar.

La cepa PB12.SA23 muestra un perfil característico de las cepas *aroKaroL*⁻ [Escalante *et al.*, 2010] con un crecimiento en dos etapas, caracterizada la primera por un rápido crecimiento con bajo consumo de glucosa y por una reducción en el crecimiento con elevado consumo de glucosa y producción de metabolitos durante la segunda etapa.

Dado que se busca mejorar la producción de SA, se espera que la cepa construida presente características en el medio de producción que le den ventaja sobre la actual cepa productora PB12. SA22, por lo que las comparaciones se hacen entre estas dos.

Se observa que tanto la cepa PB12.SA22 como la PB12.SA23, llegan a su máxima D.O._{600nm} cerca de las 10 horas de cultivo, momento en el que entran a fase estacionaria; la cepa PB12.SA23 presenta un menor crecimiento, la menor acumulación de biomasa puede atribuirse a un aumento en la carga metabólica como resultado de la clonación de *zwf*, sin embargo, esta disminución no es tan

drástica y concuerda con reportes donde la sobreexpresión de este gen no tiene un efecto tan marcado sobre la velocidad específica de crecimiento (μ) y esta se mantiene constante [Nicolas *et al.*, 2007]; en este caso la velocidad específica de crecimiento disminuye también (tabla 8); sin embargo no lo hace de forma considerable, tal que afecte en el hecho de ser una cepa de interés industrial (disminuye un 12 %). La μ fue determinada con los valores de biomasa de la fase exponencial de la curva de crecimiento, los valores utilizados en cada caso tuvieron un coeficiente de correlación mayor a 0.98.

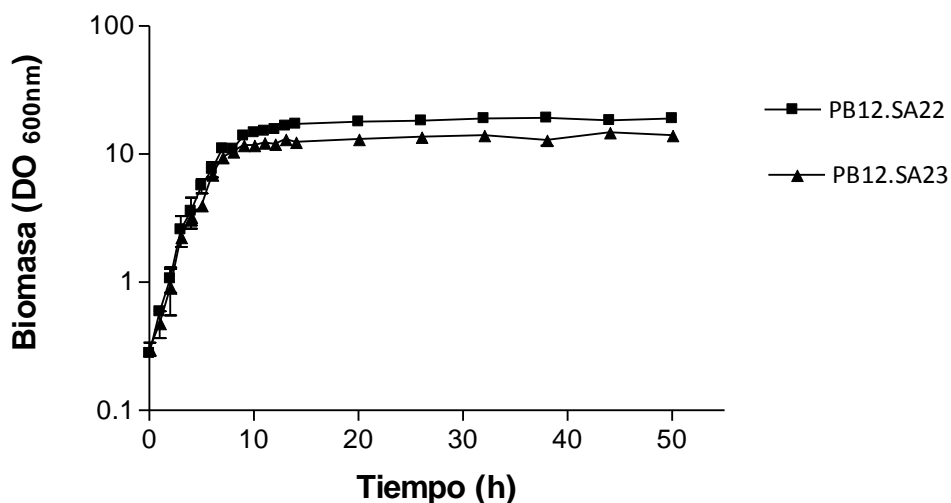


Fig. 17 Comparación del crecimiento de las cepas PB12.SA22 y PB12.SA23. Se muestra el resultado del promedio de los datos obtenidos de tres fermentaciones independientes para la cepa PB12.SA23 con sus correspondientes barras de error que indican la desviación estándar.

Tabla 7. Velocidad específica de crecimiento (μ) y velocidad de consumo de sustrato (q_s)

Cepa	μ (h^{-1})	q_s (milimol glc gDWC h^{-1})
PB12.SA22	0.42 ± 0.01	$1.93 \times 10^{-6} \pm 5.9 \times 10^{-7}$
PB12.SA23	0.37 ± 0.02	$7.68 \times 10^{-6} \pm 2.40 \times 10^{-6}$

Como se ha mencionado, se observa una relación entre el crecimiento y el consumo de glucosa; durante la fase de crecimiento el consumo de glucosa es mínimo y se aumenta la velocidad de consumo a medida que la célula entra y

avanza en la fase estacionaria hasta llegar a agotarla alrededor de las 45 horas de la fermentación (fig. 18), para la cepa PB12.SA23, a diferencia de la cepa PB12.SA22 que la termina en un menor tiempo.

Para obtener una mejor interpretación del perfil de consumo de glucosa se determinó la velocidad específica de consumo de sustrato (tabla 8); por la gráfica del perfil de consumo de glucosa, se espera un mayor valor de q_s (velocidad de consumo de sustrato) para la cepa PB12.SA22 ya que agota rápidamente la glucosa, sin embargo esto no es así, este valor es mayor para PB12.SA23, lo que puede deberse a que este valor deriva de las primeras horas de la fermentación en que el consumo es mínimo y la diferenciación clara del consumo de glucosa se hace a partir de la fase estacionaria, además de que involucra la velocidad específica de crecimiento, que en el caso de PB12.SA23 es menor.

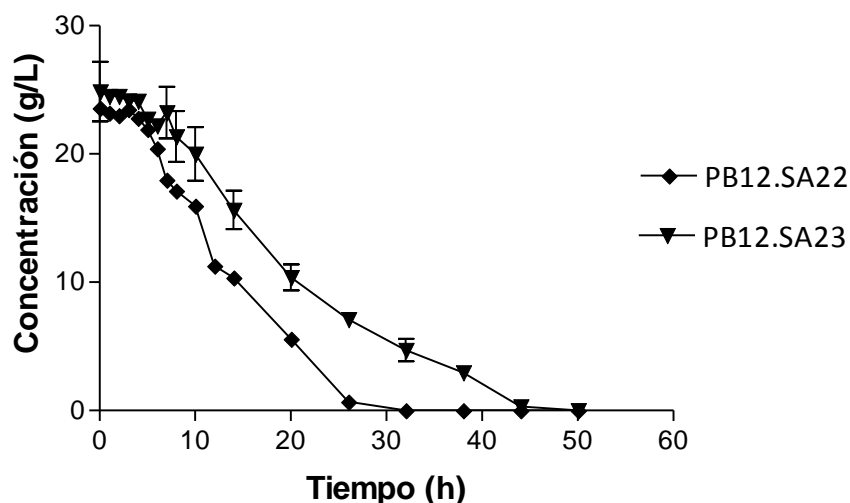


Fig. 18 Comparación del consumo de glucosa entre las cepas PB12.SA22 y PB12.SA23. Se muestra el resultado del promedio de los datos obtenidos de tres fermentaciones independientes para la cepa PB12.SA23 con sus correspondientes barras de error que indican la desviación estándar.

Se observa en la figura 16 cómo la acumulación de compuestos aromáticos comienza al tiempo que el cultivo entra en fase estacionaria y alcanzan su máximo hacia las últimas 10 horas de la fermentación. Del mismo modo se observa un aumento importante en la producción de SA cuando queda muy poca glucosa en el medio.

Se obtuvo una mayor producción de ácido shikímico en la cepa PB12.SA23 con respecto a la PB12.SA22, 8.5 g/L y 7.05 g/L respectivamente, lo que representa un incremento del 14.1 % en la producción, esto confirma parte de la hipótesis, la sobreexpresión de *zwf* provocó un aumento en la producción de SA.

Como se observa en la tabla 8, hay una disminución en la cantidad de intermediarios de la vía de aromáticos a excepción del SA; esto le confiere a la cepa una ventaja en la producción de dicho compuesto, ya que el carbono está dirigiéndose más eficientemente hasta la síntesis de SA y se presentarían menores dificultades en su extracción y purificación a partir de los caldos de cultivo.

Tabla 8. Producción de ácido shikímico y otros intermediarios de la VSHK.

Cepa	DAHP (g/L)	DHS (g/L)	SA (g/L)	GA (g/L)
PB12.SA22	0.81±0.04	1.46±0.14	7.05±0.06	0.08±0.01
PB12.SA23	0.70±0.001	1.09±0.09	8.52±0.79	0.03±0.0

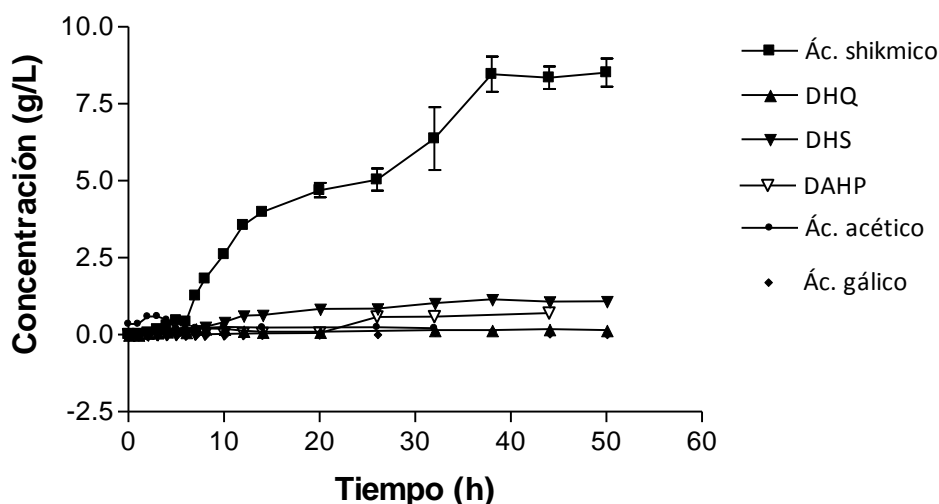


Fig. 19 Producción de SA, otros intermediarios aromáticos y ácido acético en la cepa PB12.SA23. Se muestra el resultado del promedio de los datos obtenidos de tres fermentaciones independientes, con sus correspondientes barras de error que indican la desviación estándar.

Además del incremento en la producción de SA, se observó una acumulación importante de DHS alcanzando una concentración de 1 g/L. En trabajos anteriores [Draths *et al.*, 1999; Knop *et al.*, 2001; Chandran *et al.*, 2003], se reporta una acumulación aproximada de 1 g/L de DHS por cada 5 g/L de shikimato producido en cepas con diferentes fondos genéticos. La proporción de DHS respecto a la cantidad de SA producida con la cepa PB12.SA23 mejoró respecto a lo reportado previamente, obteniendo 1 g/L de DHS por cada 8 g/L de SA aproximadamente. Se ha propuesto la generación de un equilibrio hidroaromático cuando se acumula SA en cepas sobreproductoras. Esto tiene como consecuencia una reversión en el flujo de carbono de SA hacia DHS, con la co-formación de GA y QA [Li *et al.*, 1999; Draths *et al.*, 1999; Knop *et al.*, 2001]. En este trabajo se detectó GA en concentraciones muy bajas (0.03 g/L).

El incremento en la producción de SA observado en este trabajo, sugiere que la alteración en el nodo de la enzima G6PDH (Zwf) tiene un efecto positivo, a pesar de que disminuye la velocidad de crecimiento.

Una vez determinado el consumo de glucosa y la cantidad máxima de SA, DAHP y DHS obtenida en cada fermentación, se determinaron los rendimientos máximos (Y_p/s) reportados como: mol de shikimato y mol de aromáticos / mol de glucosa (tabla 9).

La producción de SA alcanzado con la cepa PB12.SA23, es menor a la reportada en otros trabajos [Draths *et al.*, 1999; Knop *et al.*, 2001], donde los sistemas de fermentación son diferentes (sistemas con alimentación de fuente de carbono). El rendimiento con respecto a la fuente de carbono, en este caso la glucosa, es mayor para la cepa construida, lo que resulta de mayor interés en el aspecto industrial, ya que anteriormente se contaba con un rendimiento de 0.29 mol SA/ mol Glc que sobrepasaba el mejor valor reportado en la literatura por Chandran (2003) y se logró aumentar a 0.37 mol SA/ mol Glc. También se logró una mejora en el rendimiento de aromáticos totales lo cual indica un mayor flujo de carbono hacia la vía de biosíntesis de aromáticos, con un mayor aprovechamiento del mismo.

Tabla 9. Comparación de la producción de metabolitos y rendimiento para cada cepa generada.

Cepa	Rendimiento SA (mol SA/mol glucosa)	Rendimiento de compuestos aromáticos totales* (mol compuestos aromáticos/mol glucosa)
PB12.SA22	0.29	0.37
PB12.SA23	0.35	0.42

*El rendimiento de aromáticos totales incluye todos los compuestos detectados en el medio de cultivo como resultado de la actividad de la VSHK (DAHP, DHQ, DHS, SA, GA)

GIII. ANÁLISIS DEL PERFIL DE TRANSCRIPCIÓN POR qPCR TIEMPO REAL

En este trabajo se presenta por primera vez el perfil transcriptómico de algunos transportadores, del metabolismo central de carbono (glucolisis, vía de las Pentosas, TCA, ciclo del glioxilato, gluconeogénesis y metabolismo de acetato) y de la vía de síntesis de compuestos aromáticos de las cepas productoras de SA PB12.SA22 y PB12.SA23, empleando un medio rico con alta concentración de glucosa (Tabla 10, figura 20).

En términos generales, se observa un nivel de sobre expresión mayor en la cepa PB12, baja en PB12.SA22 y en la cepa PB12.SA23 se observa un incremento, aunque no recupera el nivel de expresión de la cepa PB12, con excepción de algunos genes de la vía de las pentosas, TCA, metabolismo de acetato y de la VSHK. La disminución del nivel de expresión de la mayoría de los genes analizados en las cepas productoras de SA (PB12.SA) respecto a la cepa PB12 se puede explicar como una respuesta a las modificaciones genéticas realizadas en esta cepa: inactivación de los genes *aroK* y *aroL* y también al posible efecto de carga genética por la presencia de los plásmidos *pJLBaroG^{fbr}tktA* *pTOPOaroBaroE* para la cepa PB12.SA22 y *pJLBaroG^{fbr}tktA* *pTOPOaroBaroE zwf* para el caso de la cepa PB12.SA23, respectivamente.

Tabla 10. Niveles de transcripción de las cepas PB12, PB12.SA22 y PB12.SA23 a 1 D.O._{600nm}, creciendo en medio mineral suplementado con 25 g/L glc y 15 g/L YE.

Genes	Niveles de expresión como 2- $\Delta\Delta$ CT con JM101 como valor de normalización 1.		
	PB12	PB12.SA22	PB12.SA23
Glucólisis			
<i>glk</i>	3.17 (\pm 0.08)	1.06 (\pm 0.15)	1.84 (\pm 0.33)
<i>pgi</i>	3.62 (\pm 0.12)	2.24 (\pm 0.01)	1.02 (\pm 0.17)
<i>pfkA</i>	0.27 (\pm 0.08)	0.29 (\pm 0.00)	0.22 (\pm 0.05)
<i>fbaA</i>	0.68 (\pm 0.17)	0.4 (\pm 0.03)	0.32 (\pm 0.00)
<i>tpiA</i>	0.79 (\pm 0.10)	0.53 (\pm 0.05)	0.28 (\pm 0.08)
<i>gapA</i>	1.3 (\pm 0.34)	0.3 (\pm 0.12)	0.39 (\pm 0.14)
<i>pgk</i>	0.75 (\pm 0.16)	0.36 (\pm 0.03)	0.18 (\pm 0.07)
<i>gpmA</i>	6.2 (\pm 0.75)	4 (\pm 0.70)	1.92 (\pm 0.38)
<i>eno</i>	0.66 (\pm 0.07)	0.36 (\pm 0.01)	0.28 (\pm 0.04)
<i>pykA</i>	1.49 (\pm 0.43)	0.4 (\pm 0.02)	0.52 (\pm 0.11)
<i>pykF</i>	0.42 (\pm 0.09)	0.31 (\pm 0.11)	0.42 (\pm 0.03)
<i>aceE</i>	5.66 (\pm 0.69)	3.61 (\pm 0.79)	4.73 (\pm 0.62)
<i>aceF</i>	7.41 (\pm 0.76)	4.71 (\pm 1.23)	7.14 (\pm 1.53)
<i>lpdA</i>	4.69 (\pm 0.98)	3.9 (\pm 0.98)	3.4 (\pm 1.13)
Gluconeogénesis			
<i>gpmB</i>	1.78 (\pm 0.35)	2.04 (\pm 0.41)	0.72 (\pm 0.02)
<i>gapC1</i>	1.6 (\pm 0.28)	0.72 (\pm 0.03)	1.02 (\pm 0.03)
<i>gapC2</i>	0.96 (\pm 0.22)	0.73 (\pm 0.01)	0.73 (\pm 0.02)
<i>fbaB</i>	9.56 (\pm 2.82)	9.26 (\pm 3.24)	7.86 (\pm 2.06)
<i>fbp</i>	2.3 (\pm 0.72)	2.94 (\pm 0.25)	2.52 (\pm 0.72)
<i>pfkB</i>	4.05 (\pm 1.23)	2.97 (\pm 0.30)	4.96 (\pm 0.87)
Producción y utilización de acetato y acetilCoA			
<i>pflB</i>	0.59 (\pm 0.12)	0.18 (\pm 0.02)	0.45 (\pm 0.12)
<i>acs</i>	24.59 (\pm 0.48)	8.73 (\pm 0.47)	15.72 (\pm 2.53)
<i>poxB</i>	8 (\pm 0.76)	9.46 (\pm 2.62)	8.55 (\pm 0.13)

Genes	PB12	PB12.SA22	PB12.SA23
Reacciones anapleróticas			
<i>maeB</i>	14.08 (±3.68)	4.05 (±0.87)	5.55 (±0.73)
<i>sfcA</i>	1.92 (±0.08)	1.3 (±0.24)	1.47 (±0.11)
<i>mdh</i>	6.68 (±0.69)	3.11 (±0.43)	5.78 (±0.28)
<i>ppsA</i>	100.92 (±29.73)	79.09 (±2.71)	71.06 (±18.93)
<i>pckA</i>	2.55 (±0.70)	1.54 (±0.13)	2.5 (±0.12)
Ciclo de los ácidos tricarboxílicos			
<i>gltA</i>	17.52 (±3.67)	5.85 (±0.54)	9.23 (±1.26)
<i>acnB</i>	41.04 (±12.48)	9.78 (±2.51)	14.48 (±0.64)
<i>aceA</i>	1.37 (±0.47)	1.26 (±0.25)	1.17 (±0.25)
<i>aceB</i>	1.34 (±0.11)	1.37 (±0.11)	1.58 (±0.17)
<i>glcB</i>	2.15 (±0.44)	1.71 (±0.23)	2.67 (±0.04)
<i>icdA</i>	9.94 (±0.97)	4.89 (±0.46)	7.87 (±0.50)
<i>sucA</i>	37.51 (±10.54)	19.73 (±3.65)	17.45 (±3.77)
<i>sucB</i>	13.53 (±2.57)	11.03 (±3.04)	15.17 (±2.46)
<i>lpdA</i>	4.69 (±0.98)	3.9 (±0.98)	3.4 (±1.13)
<i>sdhA</i>	105.42 (±17.49)	42.48 (±13.55)	114.57 (±1.12)
<i>sdhB</i>	120.37 (±15.88)	53.95 (±17.40)	53.17 (±11.63)
<i>sdhC</i>	102.4 (±19.46)	92.42 (±1.81)	141.17 (±18.63)
<i>fumA</i>	32.16 (±8.72)	7.42 (±1.30)	10.03 (±1.27)
<i>fumB</i>	0.68 (±0.03)	0.09 (±0.01)	0.24 (±0.09)
<i>fumC</i>	7.89 (±0.39)	6.45 (±2.35)	5.97 (±1.48)
<i>mdh</i>	6.68 (±0.69)	3.11 (±0.43)	5.78 (±0.28)
Vía de las Pentosas Fosfato			
<i>zwf</i>	1.94 (±0.30)	1.57 (±0.11)	19.92 (±1.27)
<i>pgl</i>	2.97 (±0.75)	1.7 (±0.01)	1.84 (±0.52)
<i>gnd</i>	1.24 (±0.47)	1.36 (±0.09)	1.38 (±0.04)
<i>rpe</i>	1.09 (±0.20)	0.58 (±0.04)	0.66 (±0.05)
<i>rpiA</i>	2.6 (±0.69)	1.94 (±0.64)	1.44 (±0.22)
<i>rpiB</i>	1.24 (±0.18)	0.6 (±0.23)	1.04 (±0.18)
<i>talA</i>	7.43 (±1.45)	12.12 (±3.11)	32.27 (±4.57)
<i>talB</i>	3.01 (±0.77)	0.89 (±0.01)	1.19 (±0.11)
<i>tktA</i>	1.27 (±0.07)	16.24 (±2.85)	14.9 (±4.74)
<i>tktB</i>	8.37 (±1.61)	16.06 (±2.74)	34 (±2.83)
<i>eda</i>	0.88 (±0.18)	1.13 (±0.15)	0.87 (±0.06)
<i>edd</i>	1.08 (±0.19)	0.18 (±0.06)	0.22 (±0.00)

Genes	PB12	PB12.SA22	PB12.SA23
Vía del shikimato			
<i>aroF</i>	0.86 (±0.16)	1.74 (±0.18)	1.29 (±0.04)
<i>aroG</i>	1.66 (±0.42)	20.95 (±0.43)	20.89 (±5.28)
<i>aroH</i>	2.26 (±0.51)	5 (±0.39)	3.25 (±0.37)
<i>aroB</i>	0.81 (±0.16)	3.58 (±0.59)	9.88 (±0.42)
<i>aroD</i>	1.4 (±0.12)	0.84 (±0.26)	0.89 (±0.19)
<i>aroE</i>	0.95 (±0.02)	41.88 (±0.49)	47.12 (±4.38)
<i>ydiB</i>	2.92 (±0.32)	3.32 (±0.13)	2.28 (±0.47)
<i>aroK</i>	0.34 (±0.00)	0 (±0.00)	0 (±0.00)
<i>aroL</i>	0.6 (±0.05)	0.01 (±0.00)	0 (±0.00)
<i>aroA</i>	0.76 (±0.13)	0.33 (±0.09)	0.64 (±0.12)
Genes que codifican para transportadores			
<i>aroP</i>	2.06 (±0.35)	1.12 (±0.13)	1.87 (±0.15)
<i>shiA</i>	1.45 (±0.07)	1.78 (±0.30)	1.45 (±0.33)
<i>galP</i>	21.76 (±4.98)	2.56 (±0.79)	4.08 (±0.98)
<i>lamB</i>	n.d.	0.05 (±0.00)	0.06 (±0.01)
<i>malE</i>	0.01 (±0.00)	0.12 (±0.11)	0.1 (±0.04)
<i>mglB</i>	242.04 (±9.16)	29.73 (±2.64)	43.04 (±8.52)
<i>ompC</i>	2.34 (±0.50)	1.01 (±0.24)	1.1 (±0.35)
<i>ompF</i>	n.d.	0.15 (±0.04)	0.96 (±0.16)

Se muestra como resultado, el promedio de dos mediciones independientes de RT-qPCR de valores obtenidos a partir de ADNc generados de muestras de fermentaciones independientes.

i) *Transporte de glucosa y glucólisis*

En las cepa PB12 (PTS⁻ glc⁺) la glucosa ingresa del periplasma al citoplasma principalmente por las proteínas transportadoras codificadas por los genes *galP* y *mgIB*, siendo este último el que es el principal responsable del transporte de glucosa en esta cepa bajo las condiciones de cultivo utilizadas en este trabajo a diferencia de lo observado previamente para esta cepa en cultivos en medio mineral mínimo en donde ambos transportadores poseen el mismo nivel de transcripción [Flores *et al.*, 2005] (Tabla 10; fig. 20). En las cepas PB12.SA se observa una disminución importante en el nivel de transcripción de estos dos genes respecto a la PB12, aunque en la cepa PB12.SA23 *mgIB* presenta un nivel de expresión mayor (~10X) respecto a la cepa PB12.SA22. Debido a que la única diferencia entre las cepas PB12.SA22 y PB12.SA23 es la presencia de gen *zwf* en plásmido, es probable que el incremento en el nivel de transcripción de *mgIB* y su papel principal sobre el transporte de glucosa sea resultado de esta modificación genética. Es importante considerar también que es probable que durante esta etapa del cultivo (fase exponencial), las cepas productoras PB12.SA estén utilizando preferentemente el extracto de levadura como fuente de carbono (figura 18), por lo que no se requiere un nivel de transcripción elevado de los transportadores de glucosa en las cepas productoras de SA bajo esta condición de cultivo, aunque esta situación parece presentarse únicamente en estas cepas y no en la PB12 (Tabla 10; fig. 20). De las tres porinas OmpC, OmpF y LamB, se observa un menor nivel de transcripción para LamB lo que es de esperarse, ya que esta se induce al haber una baja concentración de glucosa en el medio [Gosset, 2005], lo que aquí no sucede.

El nivel bajo de expresión de todos los genes de la glicólisis en las cepas productoras respecto a la cepa PB12, sugiere también que ésta no es requerida durante la fase exponencial de crecimiento por el uso preferencial del extracto de levadura sobre la glucosa, que empieza a ser consumida cuando la cepa entra en la fase estacionaria (fig.17 y 18).

ii) *Vía de las pentosas fosfato*

En la cepa pB12.SA23 el gen *zwf* presenta un incremento en su nivel de expresión de ~12X respecto al nivel observado para las cepas PB12 y PB12.SA22, como resultado de su clonación en el plásmido pTOPO*aroBaroE*. Esto sugiere un papel importante de la enzima *Zwf* en la canalización del carbono proveniente de la glicólisis hacia la vía de las pentosas en la cepa PB12.SA23, sin embargo, el resto de los genes de la parte oxidativa de las pentosas *pgl* y *gnd* no presentan cambios en su nivel de expresión en las cepas PB12.SA, aunque su nivel de expresión es menor son menores que los observados para la cepa PB12. Los genes de la parte no oxidativa de la vía *rpe* y *rpiA* no presentan cambios en su nivel de expresión entre las cepas productoras PB12.SA, aunque como en la glicólisis, muestran también una disminución respecto al nivel observado para la cepa PB12. El gen *rpiB* presenta un menor nivel de expresión en la cepa PB12.SA22 respecto a la PB12.SA23, en contraste, *talA* presenta un nivel de expresión mayor en las cepas PB12.SA respecto a la PB12, sin embargo, presenta un nivel de expresión diferencial entre las cepas sobreproductoras: en la cepa PB12.SA23 está sobreexpresado 3X respecto a la cepa PB12.SA22, mientras que *talB* no presenta cambios entre las cepas PB12.SA22. Las enzimas *TalA* y *TalB* ambas catalizan, respectivamente la reacción reversible de S7P a F6P y de G3P a E4P. *talA* es regulado negativamente por *ArcA*; es importante destacar en la cepa PB12, el sistema regulador de dos componentes *ArcAB* está inactivo por una mutación en *arcB*, lo que puede explicar el alto nivel de expresión de este gen [Flores *et al.*, 2005; Salmon *et al.*, 2005]. El nivel de expresión de los genes *tktA* y *tktB* es mayor en las cepas PB12.SA respecto a la PB12, sin embargo, también presentan una expresión diferencial entre las cepas productoras. Ambas cepas PB12.SA fueron transformadas con el plásmido pJLBaroG^{fbr}*tktA*, lo que explica el elevado nivel de expresión de *tktA*, sin embargo, en la cepa PB12.SA23 *tktB* presenta un nivel de expresión mayor (2X), respecto a la PB12.SA22. *tktB* se encuentra en el mismo operón que *talA* y aunque no está reportado si ambos genes están regulados negativamente por *ArcA*, es probable que sea así y esto

explique su elevado nivel de expresión en las cepas PB12.SA. Es importante mencionar que *tktB* presenta la menor actividad de transcetolasa para la síntesis de E4P [Iida *et al.*, 1993].

iii) *Conversión de piruvato a acetato y acetil-CoA*

Se observa un perfil de transcripción similar al observado para la glicólisis y la vía de las Pentosa Fosfato para los genes *aceE*, *aceF*, *pflB*, *acs* y *poxB*, implicados en la conversión de piruvato a acetilCoA: un mayor nivel de expresión para la cepa PB12 respecto a las cepas productoras. *acs* y *poxB* conforman la principal vía de producción de acetilCoA: la primera reacción es la conversión de piruvato a acetato por la enzima piruvato oxidasa codificada por el gen *poxB* y en segundo lugar la conversión de acetato en acetilCoA por la enzima acetilCoA sintetasa codificada por el gen *acs*. *poxB* presenta un nivel de expresión similar entre las cepas PB12.SA y ligeramente mayor al observado para la cepa PB12, mientras que el nivel de expresión de *acs* es mayor (~2X) en la cepa PB12.SA23 respecto a la PB12.SA22. La expresión de *acs* es inducida en presencia de acetato o propionato y tiene un papel importante cuando el acetato se utiliza como fuente de carbono, característica que presenta la cepa PB12 en medio mínimo con acetato y glucosa como fuente de carbono [Flores *et al.*, 2005], sin embargo; aunque las cepas PB12.SA producen acetato bajo las condiciones de cultivo utilizadas (figura 16), no es posible determinar con precisión si esa cantidad de acetato es responsable del elevado nivel de expresión de este gen en la cepa PB12.SA23 respecto a la PB12.SA22. Los genes que conforman el complejo de la enzima Piruvato deshidrogenasa (*aceEF-lpd*), en cepas silvestres de *E. coli* es el principal responsable de la conversión de piruvato en acetilCoA en condiciones aeróbicas y con alta concentración de glucosa [Quail *et al.*, 1994]. En la cepa PB12.SA23 estos genes se encuentran sobreexpresados respecto a la cepa PB12.SA22, lo que sugiere una mayor actividad de este complejo en esta cepa productora. De acuerdo al nivel de expresión observado para los genes *poxB*, *acs* y *aceE* En las cepas productoras de SA la síntesis de acetil-CoA sigue en las cepas PB12.SA simultáneamente la vía piruvato→acetato y piruvato →acetil-CoA, mientras que el

bajo nivel del gen *pfkB* cuyo producto, la piruvato formato liasa cataliza la conversión de piruvato a acetil-CoA se debe a que éste gen se expresa en condiciones de anaerobiosis [Sauer y Eikmanns, 2005].

iv) *El ciclo de los ácidos tricarboxílicos y ciclo del glioxilato*

La mayoría de los genes codificantes para las enzimas del TCA y del ciclo del glioxilato se encuentran sobreexpresados en mayor medida en la cepa PB12 respecto a las cepas PB12.SA (Tabla 10, figura 20), pero se observa también un nivel de expresión diferencial entre las cepas productoras, siendo al igual que en los casos anteriores, mayor para la cepa PB12.SA23 respecto a la PB12.SA22. El elevado nivel de expresión de estos genes en las tres cepas analizadas sugiere un papel importante durante esta fase de crecimiento exponencial, en la que se observó también un nivel de expresión bajo de todos los genes de la glicólisis y la mayoría de los genes de la vía de las pentosas, reforzando la hipótesis de que estas cepas utilizan de forma preferencial el extracto de levadura en el medio de cultivo para crecer durante las primeras 8 horas de cultivo (Figuras 17 y 18). Es muy probable que estas cepas estén utilizando esqueletos de carbono de este compuesto que pueden introducirse al TCA. Las diferencias de los niveles de expresión entre los genes de la vía dependen además de la capacidad de cada enzima para contender con la concentración de sustrato de cada una de estas.

v) *Reacciones anapleróticas y gluconeogénesis*

Las vías glicolítica y gluconeogénica comparten enzimas que realizan las correspondientes reacciones reversibles en uno u otro sentido, de acuerdo con las condiciones de cultivo y los requerimientos de la célula; algunas de estas enzimas están conformadas por dos o más isoenzimas, de las cuales unas están implicadas en la vía anabólica y otras en la vía catabólica. Los genes que codifican para las isoenzimas de la vía anabólica son *gpmB*, *gapC-1*, *gapC-2*, *fbaB*, *fbp* y *pfkB*; los últimos tres presentan un alto nivel de expresión en las tres cepas analizadas. La mayor expresión de *fbaB*, *fbp* y *pfkB* puede ser explicada como

resultado del suministro del G3P por parte de la vía de las PP, el cual pudiera estarse dirigiendo principalmente en la dirección anabólica de la vía.

La subexpresión de los genes glicolíticos y la alta expresión de los genes que codifican para las enzimas málicas, las enzimas de las reacciones anapleróticas, la fosfoenolpiruvato sintasa y la fosfoenolpiruvato carboxicinasa, sugieren también que la principal fuente de PEP y piruvato son esqueletos de carbono, probablemente provenientes del extracto de levadura, que entran al metabolismo a nivel del TCA, más que por parte de la vía glicolítica. Esto concuerda con los perfiles de consumo de glucosa, donde en las primeras horas este es mínimo (Figuras 15 y 16). En lo que respecta a las enzimas málicas, el principal papel de acuerdo con el mayor nivel de expresión es el realizado por la malato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺, esto puede ser debido a que se está generando una elevada cantidad de este cofactor oxidado y la célula prefiere emplear esta enzima para no romper el balance redox de la misma. El suministro de PEP de acuerdo con los datos obtenidos, se está realizando al parecer por dos vías principalmente; en primer lugar a partir de los intermediarios del TCA por acción de las enzimas malato deshidrogenasa codificada por el gen *mdh* y la enzima fosfoenolpiruvato carboxicinasa codificada por el gen *pckA*, ya que estas dos muestran una sobreexpresión elevada, con los valores más altos en PB12, seguida de PB12.SA23 y en menor medida pero no menos importante, en la cepa PB12.SA22, lo que confirma lo antes mencionado sobre un metabolismo ligeramente más activo en la cepa PB12.SA23; sin embargo, la principal vía de producción de PEP es a partir de piruvato por la enzima PEP sintasa codificada por el gen *pps*. El hecho que sea esta la principal reacción que proporciona el PEP, puede deberse a que la reacción que le antecede es la realizada por las enzimas málicas, principalmente por la dependiente de NADP⁺.

vi) *Vía del shikimato*

Se observó un alto nivel de expresión de los genes que codifican para las enzimas de ésta vía en las cepas productoras transformadas con los plásmidos pJLBaroG^{ibr} *tktA* y pTOPOaroBaroEzwf, mientras que el resto de los genes que

codifican para las demás enzimas de la vía presentan el mismo nivel de expresión en la cepa PB12 y en las cepas productoras. Es importante destacar que en la cepa PB12.SA23 el nivel de expresión de los genes *aroB* y *aroE* (clonados en el plásmido pTOPO), son mayores que los observados para la cepa PB12.SA22, mientras que *aroG* (clonado en el plásmido pJLB), presenta el mismo nivel de transcripción que en ambas cepas productoras.

GIV. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA.

De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla 12, se comprobó que el aumento en la transcripción del gen *zwf* tras la clonación del gen, para obtener la cepa PB12.SA23, se refleja en el aumento de la actividad en esta cepa de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa codificada por este gen.

Tabla 11. Actividad específica de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

Cepa	Actividad específica ($\mu\text{mol}/\text{min mg}_{\text{prot}}$)
PB12.SA22	0.1289 \pm 0.015
PB12.SA23	1.0501 \pm 0.092

H. CONCLUSIONES

La clonación del gen *zwf* en el plásmido pTOPOaroBaro y su transformación (pTOPOaroBaroEzwf) en la cepa PB12 PB12.SA2 (junto con el plásmido pJLBaroG^{fbr} tktA) generó un incremento en el nivel de expresión y actividad de este gen y de la enzima Zwf, respectivamente. Esto tuvo como consecuencia una producción de 8.52 g/L SA, lo que implica un aumento del 14.1% en su producción, con un rendimiento de 0.35 mol SA/mol Glc, con respecto a la cepa productora PB12.SA22, siendo este valor el mayor reportado para sistemas de fermentación similares al empleado en este trabajo.

Se observó también una disminución en la cantidad del intermediario DHS producido respecto a la cantidad de SA. Este resultado sugiere una eficiencia en la reacción de conversión de DHS a SA por la enzima AroE, probablemente asociado a un incremento en la disponibilidad del cofactor NADPH (requerido en esta reacción), como resultado del incremento en la actividad de la enzima Zwf.

La disminución en la proporción de DHS respecto a la cantidad de SA producido, puede tener un impacto importante en el proceso de extracción y purificación del AS a partir de los sobrenadantes de los cultivos.

La clonación de *zwf* tuvo un efecto negativo en la velocidad específica de crecimiento la cual disminuyó de 0.42 h⁻¹ a 0.37 h⁻¹, probablemente como consecuencia del incremento de la carga metabólica resultante. Sin embargo, esta disminución no afecta de manera importante la cantidad de biomasa que se alcanza en sistemas de fermentación respecto a la cepa PB12.SA22.

La clonación del gen *zwf* en plásmido y su transformación (junto con el plásmido pJLBaroG^{fbr} tktA) generó un incremento general del nivel de transcripción en la mayoría de los genes del metabolismo central de carbono analizados respecto a la cepa PB12.SA22, aunque no es posible establecer una explicación concreta para esta situación, al menos con los resultados obtenidos en este trabajo.

El análisis transcriptómico sugiere que la mayoría del PEP generado por la célula, se está dirigiendo hacia la vía de biosíntesis de aromáticos, ya que los genes codificantes para las enzimas que llevan a cabo las reacciones que proveen de

este intermediario están sobreexpresados en las cepas PB12.SA22 y (en un nivel mayor) en la PB12.SA23.

I.PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos sugieren un aumento en la cantidad de NADPH debido a la sobreexpresión de la enzima Zwf, la medición de este cofactor en los caldos de cultivo permitirá poder afirmar que efectivamente hay un aumento de este.

El alto nivel de transcripción del gen *pps* en PB12 y la disminución del mismo en las cepas con plásmidos, sugiere que la sobreexpresión adicional de éste, puede funcionar como alternativa para un aumento en la disponibilidad de fosfoenolpiruvato que se canalice hacia la síntesis de ácido shikímico.

Se han obtenido resultados interesantes tras la inactivación sencilla del gen *pykF*, [Escalante et al., 2010], como un considerable aumento en el rendimiento de aromáticos totales por el aumento en la concentración de fosfoenolpiruvato; siguiendo esta estrategia en la cepa PB12.SA23, se podría aumentar la producción de SA, con una baja producción de intermediarios indeseados.

J. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

1. Arias F, López S: **Epidemia de influenza: ¿Qué es y qué hacer?** [en línea], México, 2009, Academia de ciencias de Morelos 27/04/2009 [citado 17/07/2010] Instituto de Biotecnología, UNAM. Disponible en línea en : http://www.ibt.unam.mx/server/PRG.base?alterno:0,tipo:doc,tit:Influenza%20Porcina,dir:influenza_porcina.html,pre:ibt
2. Báez J, Flores N, Juárez K, Castillo P, Bolivar F, Gosset G: **Metabolic transcription analysis of engineered *Escherichia coli* strains that overproduce L-phenylalanine**. Microbial Cell Factories, 2007, **6**:30
3. Balderas VE, Sabido A, Silva P, Cabrera N, Hernandez G, Baez JL, Martinez A, Bolivar F, Gosset G: **Metabolic engineering for improving anthranilate synthesis from glucose in *Escherichia coli***. Microbial Cell Factories, 2009, **8**:19.
4. Bertelli AAE, Mannari C, Santi S, Filippi C, Migliori M, Giovannini L: **Immunomodulatory activity of shikimic acid and quercitin in comparison with oseltamivir (Tamiflu) in a “*in vitro*” model**. Journal of Medical Virology, 2008, **80**:741-745
5. Bolívar F, Rodríguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heynecker HL, Boyer HW, Crosa JH, Falkow S: **Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system**. Gene, 1977, **2**:95-113.
6. Bongaerts J, Krämer M, Müller U, Raeven L, Wubbolts M: **Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds**. Metabolic Engineering, 2001, **3**:289–300
7. Burch J, Paulden M, Conti S, Stock C, Corbett M, Welton N, Ades A, Sutton A, Cooper N, Elliot A, Nicholson K, Duffy S, McKenna C, Stewart L, Westwood M, Palmer S: **Antiviral drugs for the treatment of influenza: a systematic review and economic evaluation**. Health Technology Assessment 2009, **13**:1-9

-
8. Chandran S, Yi J, Draths K, Daeniken R, Weber W, Frost J: **Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid**. *Biotechnology Progress*, 2003, **19**:808-814
 9. De Ávila J: **El fármaco contra gripe aviar no se vende aquí** [en línea], México, 2011, El Universal, 19/10/2005 [citado el 23/05/2010]. Disponible en internet en: http://www2.eluniversal.com.mx/pls/impreso/noticia.html?id_notas=130979&tabla=nacion
 10. Draths K, Knop D, Frost J: **Shikimic acid and quinic acid: replacing isolation from plant sources with recombinant microbial biocatalysis**. *Journal of the American Chemical Society*, 1999, **121**:1603-1604
 11. Ecocyc: **Escherichia coli K-12 substr. MG1655. Enzyme: glucose 6-phosphate-1-dehydrogenase** [en línea], USA, 2010, Ecocyc, [citado el 15/07/2010], Biocyc. SRI International. Disponible en Internet: <http://biocyc.org/ECOLI/NEW-IMAGE?type=GENE&object=EG11221>
 12. Edmonds M: **Isolation of shikimic acid from star aniseed**. *Journal of Chemical Education*, 2005, **82**:599-600
 13. Escalante A, Calderón R, Valdivia A, De anda R, Hernández G, Ramírez O, Gosset G, Bolívar F: **Metabolic engineering for the production of shikimic acid in a evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system**. *Microbial Cell Factories*, 2010, **9**:1-12
 14. Flores N, Flores S, Escalante A, de Anda R, Leal L, Malpica R, Georgellis D, Gosset G, Bolivar F: **Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in a *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system**. *Metabolic Engineering*, 2005, **7**:70-87

-
15. Flores N, Xiao J, Berry A, Bolivar F, Valle F: **Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli***. Nature Biotechnology, 1996, **14**:620-623
 16. Fraenkel D: Glycolysis; in Neidhart FC (ed): ***Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology**, ed 2. Washington, ASM, 1996, pp 189-194
 17. Goiria J I, Dehesa F, Duñabeitia M, Arteagoitia JM, Gestal J, Badiola JJ, Fernández ML: **Mesa redonda sobre gripe aviar**, Gaceta Médica de Bilbao. 2007, **104**:105-114
 18. Gosset G: **Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system**. Microbial Cell Factories, 2005, **4**:1-11
 19. Herrmann KM, Weaver LM: **The shikimate pathway**. Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology, 1999, **50**:473-503
 20. Iida A, Teshiba S, Mizobuchi K: **Identification and characterization of the *tktB* gene encoding a second transketolase in *Escherichia coli* K-12**. Journal of Bacteriology, 1993, **175**:5375-5383.
 21. Ingraham J, Davis U: ***Escherichia coli* K-12 substr. MG1655. Pathway: pentose phosphate pathway** [en línea], USA, 2010, Ecocyc, 14/07/2006 [citado el 15/07/2010], Biocyc. SRI International. Disponible en Internet: <http://biocyc.org/ECOLI/NEW-MAGE?type=PATHWAY&object=PENTOSE-P-PWY>
 22. Jefferson T, Jones M, Doshi P, Del Mar C: **Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in healthy adults: systematic review and meta-analysis**, The British Medical Journal, 2009, 339:b5106
 23. Johansson L, Lindskog A, Silfversparre G, Cimander C, Fog K, Liden G: **Shikimic acid production by a modified strain of *E. coli* (W3110.shik1) under phosphate-limited and carbon-limited conditions**, Biotechnology and Bioengineering, 2005, **92**:541-552

-
24. Kai L, Mikola M, Draths K, Worden R, Frost J: **Fed-batch fermentor synthesis of 3-dehydroshikimic acid using recombinant *Escherichia coli***, *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, **64**:61-73
 25. Kern A, Tilley E, Hunter I, Legiša M, Glieder A: **Engineering primary metabolic pathways of industrial microorganisms**. *Journal of Biotechnology*, 2007, **129**:6–29
 26. Knop D, Draths K, Chandran S, Barker J, Daeniken R, Weber W, Frost J: **Hydroaromatic equilibration during biosynthesis of shikimic acid**. *Journal of the American Chemical Society*, 2001, **123**:10173-10182
 27. Krämer M, Bongaerts J, Bovenberg R, Kremer S, Müller U, Orf S, Wubbolts M, Raeven L: **Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid**. *Metabolic Engineering*, 2003, **5**:277-283
 28. Li K, Mikola M, Draths K, Worden R, Frost J: **Fed -batch fermentor synthesis of 3-dehydroshikimic acid using recombinant *Escherichia coli***. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, **64**:61-73
 29. Liang N, Xiao S, Kwang H, Wei L: **A short and practical synthesis of oseltamivir phosphate (Tamiflu) from (-)-shikimic acid**. *The Journal of Organic Chemistry*, 2009, **74**:3970-3973
 30. Livak K, Shmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- Δ Δ CT method**. *Methods*, 2001, **25**:402-408
 31. Machado T: **La OMS cree inevitable una pandemia: si el virus de gripe aviar y humana se mezclaran, podría causar siete millones de muertos** [en línea], Uruguay, 2011, *Revista La Onda digital*, 24/01/2005 [citado el 03/06/2010]. *La Onda digital* (219). Disponible en Internet: <http://www.laondadigital.com/laonda/LaOnda/201-300/219/a1.htm>
 32. Magano J: **Synthetic approaches to the neuraminidase inhibitors zanamivir (Relenza) and oseltamivir phosphate (Tamiflu) for the treatment of influenza**. *Chemical Reviews*, 2009, **109**: 4398–4438

-
33. Mendoza GJ, Vielma AS: **Influenza: datos biológicos y epidemiológicos claves para una mejor comprensión de la actual pandemia.** Revista de Farmacia, 2009, **51**: 46-53.
 34. Murray P. et al. **Microbiología médica** Ed. Elsevier, 5ª ed. España 2006, pp. 609-617
 35. Nicolas C, Kiefer P, Letisse F, Krömer J, Massou S, Soucaille P, Wittmann C, Lindley N, Portais JC: **Response of the central metabolism of *Escherichia coli* to modified expression of the gene encoding the glucose-6-phosphate dehydrogenase.** FEBS Letters, 2007, **581**:3771-3776
 36. Osores F, Cabezas C, Gómez J, et al: **Influenza humana y aviar: amenaza de una pandemia humana.** Acta Médica Peruana, 2006, **23**: 35-47
 37. Portela A, Digard P: **The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication.** Journal of General Virology, 2002, **83**:723–734.
 38. Postma PW, Lenger JW, Jacobson GR: Phosphoenolpyruvate carbohydrate phosphotransferase systems; in Neidhart FC (ed): ***Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology**, ed 2. Washington, ASM, 1996, pp 1149-1174
 39. Quail M, Haydon D, Guest J: **The *pdhR-aceEF-lpd* operon of *Escherichia coli* expresses the pyruvate dehydrogenase complex.** Molecular Microbiology, 1994, **12**:95-104
 40. Russell RJ, Haire LF, Stevens DJ, Collings PJ, Lin YP, Blackburn M, Hay AJ, Gamblin SJ, Skehel JJ: **The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design.** Nature, 2006, **443**:45-49

-
41. Salmon K, Hung S, Steffen N, Krupp R, Baldi P, Hatfield G, Gunsalus R: **Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12: effects of oxygen availability and ArcA.** Journal of Biology and Chemistry, 2005, **280**:15084-96
 42. Sarmiento R, Tirado R, Castro A: **Influenza humana** [en línea], México, 2010, Facultad de medicina, UNAM. [citado el 15/08/2010]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/periodico/influenza/ciclo.html>
 43. Sauer U, Eikmanns B: **The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria.** FEMS Microbiology Reviews, 2005, **29**:765-794
 44. Shimizu K, Peng L: **Global metabolic regulation analysis for *Escherichia coli* K12 based on protein expression by 2-dimensional electrophoresis and enzyme activity measurement.** Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, **61**:163–178
 45. Sprenger G: **Genetics of pentose-phosphate pathway enzymes of *Escherichia coli* K-12.** Archives of Microbiology, 1995, **164**:324-330
 46. Sprenger G: **From scratch to value: engineering *Escherichia coli* wild type cells to the production of L-phenylalanine and other fine chemicals derived from chorismate.** Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, **75**:739-749
 47. Vademécum IPE bdm: **Tamiflú** [en línea], México, 2010, Vademécum Farmacéutico IPE, 17/05/2010 [citado 17/05/2010]. Vademécum Farmacéutico IPE On-line, IPPA Completa. Disponible en Internet: <http://www.medicamentos.com.mx/Default.asp>
 48. Valerio M: **La OMS declara el fin de la pandemia de gripa A** [en línea], Madrid, 2011, El Mundo.es, Unidad Editorial Internet, S.L., 10/08/2010, [citado el 20/09/2010]. Disponible en Internet: <http://www.elmundo.es/elmundosalud/2010/08/10/noticias/1281441436.html>
 49. Vega RS, Reyes G: **El virus de la influenza,** Neumología y Cirugía de tórax, 2007, **66**:S12-S14

-
50. WHO: **Pandemic (H1N1) 2009 - update 112** [en línea], *s.l.*, 2011, World Health Organization, 6/08/2010 [citado el 20/08/2010]. Programmes and projects > Global Alert and Response (GAR). Disponible en Internet: http://www.who.int/csr/don/2010_08_06/en/index.html
 51. Xu X, Subbarao K, Cox N, Guot Y: **Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) Virus: Similarity of Its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 Outbreaks in Hong Kong.** *Virology*, 1999, **261**:15-19
 52. Yi J, Li K, Draths K, Frost J: **Modulation of phosphoenolpyruvate synthase expression increases shikimate pathway product yields in *E. coli*.** *Biotechnology Progress*, 2002, **18**:1141-1148
 53. Yi J, Draths K, Li K, and Frost J: **Altered glucose transport and shikimate pathway product yields in *E. coli*.** *Biotechnology Progress*, 2003, **19**:1450-1459

K. APÉNDICES

KI. APÉNDICE 1 -METODOLOGÍAS-

i) **Extracción de ADN plasmídico -Miniprep alcalina-**

1. Crecer un cultivo de la cepa que contenga el plásmido de interés toda la noche hasta la saturación. Tomar 1.5 mL de este cultivo en un tubo eppendorf y se centrifugar a 12800 g por 2 minutos, eliminar el sobrenadante
2. Resuspender la pastilla en 150 μ L de solución I fría y 5 μ L de ARNasa (5 mg/mL).
3. Agregar 350 μ L de la solución II (preparada al momento) y mezclar por inversión. Incubar en hielo 10 minutos.
4. Adicionar 250 μ L de la solución III fría, mezclar por inversión e incubar en hielo 30 minutos. Centrifugar a 12800 g por 15 minutos. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio y desechar la pastilla.
5. Llenar el tubo con el sobrenadante con isopropanol a temperatura ambiente y mezclar bien, centrifugar a 12800 g por 15 minutos y se desechar el sobrenadante; agregar al tubo 1 mL de etanol al 70% y mezclar por inversión.
6. Centrifugar como la primera vez y decantar el sobrenadante, evaporar el contenido del tubo a 37°C en un concentrador (Eppendorf Contrator 5301), resuspender en 50 μ L de agua MQ estéril y guardar a -20°C para su purificación.

Solución I : Tris-HCl 0.05 M, EDTA 0.05 M, Sacarosa 8%, pH 8.0

Solución II : SDS 1%, NaOH 0.2M

Solución III: Acetato de Sodio 3M pH 5.2

ii) Electroforesis de ADN en geles de agarosa

1. Preparar 40 ml de agarosa al 1% con amortiguador TBE. Una vez disuelta la agarosa (calentar para disolver), adicionar 4 μ L de bromuro de etidio.
2. Montar la cámara de electroforesis y verter la agarosa. Una vez solidificada se llenar la cámara con amortiguador TBE hasta que el nivel del mismo alcance medio cm sobre la superficie del gel.
3. Colocar en cada uno de los carriles el marcador de peso molecular, así como la mezcla de ADN a estudiar y colorante Stop Mix.
4. Conectar la cámara a un voltímetro y aplicar la corriente con el voltaje requerido.

Amortiguador TBE: Tris-Boratos-EDTA ; Tris 90mM, ácido bórico 90mM y EDTA 2.5mM a pH 8.2

Colorante Stop Mix (10 mL): urea 6g, 1mL de azul de bromofenol al 0.5% en agua, 1ml de xilen-cianol al 0.5% en agua

iii) Preparación de células competentes

1. Crecer un cultivo de la cepa de interés toda la noche en medio LB con los antibióticos necesarios.
2. Tomar 100 μ L de este cultivo e inocular con este volumen 10 mL de medio LB más antibióticos, crecer las células a 37°C con agitación. Monitorear la D.O._{600nm} del cultivo y una vez que se encuentre entre 0.5-0.9, cosechar las células.
3. Enfriar el matraz con las células en hielo por aproximadamente 5 minutos y centrifugar a 4000 g por 10 minutos a 4°C, descartar el medio.
4. Lavar la pastilla 2 veces con 100 mL de agua fría estéril y centrifugar bajo las condiciones anteriores.
5. Descartar de nuevo el sobrenadante y resuspender las células en 20 mL de glicerol frío al 10%; hacer alícuotas de 50 μ L y congelar primero en hielo seco, almacenar a continuación a -70°C.

iv) Electrotransformación de células competentes

1. Descongelar en hielo una alícuota de 50 μ L de células competentes bajo un área estéril.
2. Transferir 3 μ L de plásmido a las células competentes. Transferir esta mezcla (células competentes y DNA plasmídico) a la celda de electroporación enfriada previamente en hielo y electroporar en un electroporador BioRad Gene Pulser a 2500 volts.
3. Agregar 1 mL de medio SOC con glucosa en la celda y traspasar el contenido total de la celda a un tubo de ensaye de 13x100 e incubar 1 hora con agitación a 37°C.
4. Centrifugar las células a 12800 g por 3 minutos y resuspender en 50 μ L de medio SOC. Plaquear ese volumen en cajas de medio LB con Zn.

v) Preparación de gliceroles

1. Crecer la cepa de interés en 3 mL de medio LB con los antibióticos necesarios a 37°C al menos 12 h.
2. Transferir 1 mL del cultivo a un criovial con tapa de rosca y agregar 1 ml de glicerol al 50% estéril, dar vortex y congelar inmediatamente en hielo seco.
3. Almacenar para su uso a -70°C.

vi) Extracción de ARN –FENOL CALIENTE-

1. Al alcanzar los cultivos la D.O._{600 nm} deseada, colectar en condiciones de esterilidad 50 mL del cultivo en tubos falcon con 1 mL de ARN ladder (solución estabilizadora de ARN de Ambion).
2. Mezclar y centrifugar a 10000 g por 15 minutos a 4°C, desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 1 mL de solución I. Transferir el contenido de los tubos a tubos de 15 mL estériles y colocar a -70°C para su posterior tratamiento.

-
3. Descongelar las muestras y agregar 100 μ L de lisozima (15 mg/mL); incubar a temperatura ambiente por 10 minutos, durante este tiempo, dar vortex a las muestras por 20 segundos cada dos minutos.
 4. Agregar 2 mL de solución II y dar vortex máximo por 20 segundos, calentar las muestras a 70°C por 3 minutos (hasta que se vuelvan transparentes).
 5. Agregar 2 mL de fenol caliente (70°C) y dar vortex, calentar por tres minutos a 70°C y enfriar después en hielo, centrifugar a 10000 g por 10 minutos a 4°C.
 6. Transferir la fase acuosa (superior) a un tubo esteril y agregar 2 mL de cloroformo nuevamente, dar vortex y centrifugar, recuperar de nuevo la fase acuosa y adicionar 2 mL de una solución fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), dar vortex y centrifugar bajo las mismas condiciones.
 7. Recuperar la fase acuosa y adicionar 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M y 2 $\frac{1}{2}$ volúmenes de etanol, mezclar por inversión y centrifugar una vez más a 4°C a 10000 g por 15 minutos.
 8. Eliminar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 300 μ L de agua, transferir posteriormente todo el volumen a un tubo eppendorf.
 9. Adicionar 300 μ L de cloroformo, dar vortex y centrifugar 2 minutos a 12100 g, recuperar la fase acuosa y adicionar acetato de sodio y etanol en la proporción anterior.
 10. Centrifugar a 12100 g por 15 minutos y resuspender la pastilla luego de decantar el sobrenadante, en 500 μ L de TE.

Solución I: Sacarosa 0.3M, acetato de sodio 0.1 M, DEPC 0.1%

Solución II: SDS 2%, acetato de sodio 0.01M

vii) Electroforesis de ARN

1. Preparar agarosa al 1.2% con agua MQ, en la cantidad indicada en la tabla y fundir en el microondas.
2. Agregar amortiguador MAE 10X y dejar enfriar para agregar el formaldehído.

3. Montar la cámara de electroforesis y verter en ella la solución preparada.
4. Solidificado el gel llenar la cámara con amortiguador MAE 1X (diluir con agua MQ) hasta medio cm sobre la superficie del gel.
5. Colocar en los carriles la muestra de ARN mezclada con amortiguador de carga en una relación 1:4 respectivamente, cargar 1 μ L de muestra.
6. Conectar la cámara a un voltímetro y aplicar corriente con el voltaje necesario.

Componente	Cantidad para 50 mL
Agarosa	0.6 g
H ₂ O	39 mL
MAE 10X	5 mL
Formaldehido comercial (37%)	6 mL

Todo el material a utilizar debe ser tratado con H₂O₂ para desactivar ARNasa.

Amortiguador MAE 10X: MOPS 0.2 M, EDTA 0.01 M, Acetato de sodio 0.05 M pH 7.0

Amortiguador de carga 1.25X: Formamida desionizada , Formaldehído comercial 37%, Amortiguador MAE 10X, Glicerol 80% , BrEt 1% (10 mg/mL), Azul de Bromofenol 0.25%

viii) **Determinación de proteína por el método de Bradford**

Obtención de la recta patrón:

1. Diluir 1/5 el Reactivo Bradford (BioRad).
2. Preparar la curva patrón de albúmina bovina en un rango desde 0 hasta 1 mg/mL
3. Añadir a cada tubo 1 ml del Reactivo de Bradford diluido. Mezclar por inversión.
4. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.

5. Realizar la lectura a 595nm
6. Obtener la ecuación de la recta de regresión

Medición de proteína de las muestras:

1. A cada tubo con 20 µL de muestra, añadir 1 ml del Reactivo de Bradford diluido. Mezclar por inversión.
2. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Realizar la lectura a 595nm
4. Calcular el contenido proteico en la muestra a partir de la ecuación de la recta patrón

KII. APÉNDICE 2 -CÁLCULOS-

i) Cálculo para conocer el volumen de células necesario para inocular el reactor

Tomando en cuenta que el volumen final de cada fermentador seria de 500mL y se requiere una D.O._{600nm} inicial de 0.3:

$$\frac{500ml * 0.3}{D.Opreinoculo} = ml \quad \begin{array}{l} \text{Necesarios} \\ \text{para el inoculo} \end{array}$$

ii) Cálculo para la preparación del patrón de 5 ng/µL de ADNc

De la lectura en el Nanodrop se tienen 1,122.2 ng de ARN por µL y se emplearon 4 µL de ARN en el tratamiento con ADNasa, teniendo en total:

$$1,122.2 \frac{ng}{\mu L} \times 4\mu L = 4,488.8 ng$$

Para la síntesis del ADNc el volumen total de ARN luego de la extracción con resina, se llevó en la mezcla de reacción de PCR, a 20 µL:

$$4,488.8 ng \div 20\mu L = 224.44 \frac{ng}{\mu L}$$

Partiendo del supuesto que se prepararán 200 μL de patrón de 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ a partir del ADNc sintetizado:

$$200\mu\text{L} \times \frac{5 \text{ ng}}{\mu\text{L}} \times \frac{\mu\text{L}}{224.44 \text{ ng}} = 4.45 \mu\text{L}$$

Así, se tomarían 4.45 μL del ADNc y se completarían 200 μL con 195.55 μL de amortiguador TE, para no tomar un volumen tan pequeño, se eligió usar los 20 μL completos de la reacción de PCR, necesitando así un volumen de Amortiguador TE de:

$$20 \mu\text{L RNA} \times \frac{195.54 \mu\text{L Amortiguador}}{4.45\mu\text{L RNA}} = 878.85 \mu\text{L Buffer}$$