



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

Producción de DAHP y otros intermediarios aromáticos en una cepa de *Escherichia coli* carente del sistema PTS cuando utiliza simultáneamente diversas fuentes de carbono

T E S I S

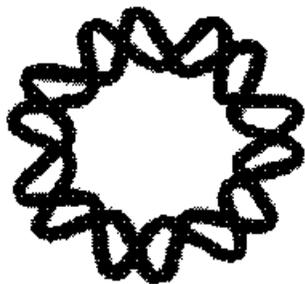
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

P R E S E N T A :

I.B.Q KARLA MARTINEZ GOMEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. FRANCISCO G. BOLÍVAR ZAPATA
INVESTIGADOR EMÉRITO





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, bajo la dirección del Dr. Francisco Gonzalo Bolívar Zapata.

Para la realización del trabajo se contó con el apoyo de CONACYT a través del proyecto 43243, de la UNAM a través de los proyectos DGAPA-PAPIIT IN220403-2, IN218402 y IN22106, así como la beca de posgrado de CONACYT y el Sistema Nacional de Investigadores (SNI).

Agradecimientos

En retrospectiva.....

Desde la infancia el ánimo y carácter inquisitivo fue en mí una constante, cultivada sin presiones por parte de tres personas importantes: Georgina, José Manuel y Aída.

A mi mamá, Gina, le agradezco principalmente por el apoyo de siempre, por las primeras lecturas de cuentos y ciencia en los libros procurados por ella. Esta tesis va dirigida a ti mamita. Papá, José Manuel, tu apoyo y entusiasmo transmitido en cada uno de mis alcances académicos que desde pequeña fue y seguirá siendo el principal motor para mí. Agradezco infinitamente, a mi tía Aída, ¿como agradecerte la ayuda y paciencia en mis primeras tareas escolares?, espero que éstas pocas líneas lo hagan.

A las "tichanilas" Renata (renacuaja), Ana Luisa (anilú) y Georgina (Gina)...¡¡¡hermanitas!!!!... por aguantarme y quererme tanto....por ser y estar siempre.....

Agradezco a Paco Bolívar, por la enseñanza y ejemplo, que no hubieran sido posibles sin la confianza que me ha tenido e infundido (incluso antes de presentar el examen de admisión al IBT), que se ha traducido en compromiso y lealtad de mi parte.

A todos los miembros del grupo Bolívar-Gosset, en particular a los Drs. Guillermo Gosset, Noemí Flores y Adelfo Escalante, por transmitirme los conocimientos que tienen sobre el tema desarrollado en ésta tesis, por enseñarme lo valioso de tener un punto de vista diferente y facilitarme la vida con la enseñanza de "tips" para que los experimentos estuvieran más rápido. A Ramón de Anda por enseñarme el uso de los fermentadores. Agradezco a Lidia Leal e Inés, aclararme las dudas que surgían durante los primeros experimentos. A Mercedes Enzaldo por su extraordinaria eficiencia.

A los comentarios y críticas de los Dres. Tonatiuh Ramírez y Edmundo Calva.

A los amigos, en especial a Ana, Karla, Luary, Lilí, Arlette, Erika, Alberto porque a sabiendas o no estuvieron apoyándome anímicamente durante estos dos años, por la camaradería, pleitos, fiestas, buenos ratos y por ser cada uno persona especial y estupenda.

A Martha Guerrero.....Mars ésta tesis no hubiera resultado tan padre sin tu ayuda... gracias por tu apoyo incondicional en momentos de estrés y euforia, por mostrarme la vida que existe en tu planeta Marte.....

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	
2.1 Importancia industrial de los compuestos aromáticos	3
2.2 Producción biológica de los compuestos aromáticos	3
2.3 Ingeniería de vías metabólicas en <i>Escherichia coli</i> y su uso en la producción de compuestos aromáticos	5
3. ANTECEDENTES	
3.1 Metabolismo de <i>Escherichia coli</i>	7
3.1.1 Anabolismo catabolismo y metabolismo central	7
3.1.2 La vía metabólica involucrada en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en <i>Escherichia coli</i>	7
3.1.3 Características de las enzimas y reacciones involucradas en la vía común de los aminoácidos aromáticos	9
a) 3-Deoxy-D-Arabinohexulosonato-7-fosfato sintasa	10
b) 3-Dehidroquinato sintasa (DHQ sintasa)	10
c) 3-dehidroshiquimato deshidratasa (DHQ deshidratasa)	11
d) Siquimato deshidrogenasa	11
e) Siquimato quinasa I y II	11
f) 5-enolpiruvilshiquimato 3-fosfato sintasa	11
g) Corismato sintasa	11
3.2 El sistema PTS en <i>Escherichia coli</i>	13
3.2.1 El transporte de carbohidratos en <i>Escherichia coli</i>	13
3.2.2 Descripción del sistema PTS	13
3.2.3 El sistema PTS y su relación con la represión catabólica	15
3.2.3.1 Mecanismo que evita la inducción específica del carbohidrato	16
3.2.3.2 Mecanismo de control transcripcional con reguladores globales	16
3.2.3.3 Cascada de señales que median la represión catabólica	17
3.3 Estrategias de la ingeniería de rutas metabólicas para una síntesis eficiente de compuestos aromáticos	18
3.3.1 Consideraciones sobre los metabolitos E4P y PEP precursores de la biosíntesis de compuestos aromáticos	18

3.3.2	Análisis de las redes y flujos metabólicos para la canalización de flujos a la vía de biosíntesis de compuestos aromáticos	18
3.3.3	Estrategias para aumentar la disponibilidad de PEP	20
a)	Eliminación del sistema PTS	20
b)	Eliminación de las piruvato cinasas (Pyk A y Pyk B)	20
c)	Reciclamiento de PYR a PEP	21
c)	Uso de azúcares no PTS	21
3.4	Características de la cepa PB12PTS ⁻ Glc ⁺	24
3.4.1	Mutaciones detectadas en la cepa PB12PTS ⁻ Glc ⁺	24
3.4.2	Caracterización metabólica y fisiológica de la cepa PB12PTS ⁻ Glc ⁺	25
3.4.3	Consideración adicional para la sobreproducción de compuestos aromáticos con la cepa PB12PTS ⁻ Glc ⁺	26
4.	HIPOTESIS	27
5.	OBJETIVOS	
5.1	Objetivo general	28
5.2	Objetivos específicos	28
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	
6.1	Cepas bacterianas y plásmidos	29
6.2	Procedimientos genéticos y técnicas de ADN recombinante	30
a)	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	30
b)	Secuencia de oligonucleótidos	30
c)	Extracción de ADN	31
d)	Transformación de ADN	31
e)	Transformación por transducción	31
f)	Mutagénesis del gen <i>aroB</i> con el método de Datsenko y Wanner	31
6.3	Condiciones de cultivo	32
a)	Composición del medio mínimo (M9).....	32
b)	Composición del medio Luria (LB)	32
c)	Composición del medio mínimo ARO	32
d)	Preparación del preinóculo	32

e) Preparación del inóculo	32
f) Cultivos en matraces Klett	33
g) Cultivos por lote en fermentador	33
h) Cultivos en células en reposo	33
6.4 Determinación de parámetros cinéticos	32
a) Cálculo de la velocidad específica de crecimiento (μ)	34
b) Cálculo de rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$)	34
c) Cálculo de consumo específico de azúcares (q_s)	34
d) Cálculo de producción específica de DAHP, DHS y SHIK	35
6.5 Métodos analíticos	35
a) Medición de absorbancia	35
b) Medición de la concentración de las fuentes de carbono	35
c) Medición de DAHP y otros intermediarios aromáticos	35

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

7.1 Crecimiento en matraz de la cepa PB12PTS ⁻ Glc ⁺ con fuentes de carbono que se metabolizan por las vías glicolíticas: Embden-Meyerhoff-Parnas, pentosas fosfato y Entner-Doudoroff	36
7.2 Crecimiento en matraz de la cepa PB12PTS ⁻ Glc ⁺ con fuentes de carbono que se metabolizan por la vía glucogénica y ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA)	36
7.3 Parámetros cinéticos de los crecimientos en fermentador de las cepas PB12PTS ⁻ Glc ⁺ y la silvestre JM101PTS ⁺ Glc ⁺ con una sola fuente de carbono	39
7.4 Parámetros cinéticos de los crecimientos en fermentador con dos fuentes de carbono de las cepas PB12PTS ⁻ Glc ⁺ y JM101PTS ⁺ Glc ⁺	40
7.5 Transformación de la cepa PB12PTS ⁻ Xyl ⁻ a PB12PTS ⁻ Xyl ⁺ y medición de patrones de consumo de azúcares	43
7.6 Inactivación del gen <i>aroB</i> en la cepa PB12PTS ⁻ Glc ⁺	45
7.6.1 Inactivación mediante transducción usando el fago P1	45
7.6.2 Interrupción de <i>aroB</i> mediante el método de Datsenko y Wanner	45
7.7 Inducción de los genes presentes en los plásmidos pRW300 <i>aroG^{fb}</i> y pCL <i>tkA</i> a varias concentraciones de IPTG, en las diferentes cepas	45
7.8 Producción de DAHP de las cepas JM101PTS ⁺ <i>aroB</i> y PB12PTS ⁻ Glc ⁺ <i>aroB</i> transformadas con los plásmidos pRW300 <i>aroG^{fb}</i> y pCL <i>tkA</i> en diferentes	

combinaciones de dos fuentes de carbono en el sistema de células en reposo.	47
7.9 Parámetros cinéticos, curvas de crecimiento y producción de intermediarios aromáticos en cultivos en fermentadores de la cepa PB12PTS ⁻ Glc ⁺ (pRW300 <i>aroG</i> ^{<i>fabr</i>} , pCL <i>tktA</i>)	53
8. CONCLUSIONES	58
9. PERSPECTIVAS	60
10. BIBLIOGRAFIA	61

1. RESUMEN

En *Escherichia coli* la vía metabólica de los aminoácidos aromáticos comienza con la condensación de fosfoenolpiruvato (PEP) y eritrosa-4-fosfato (E4P) para formar el primer intermediario de la vía, 3-Deoxy-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato (DAHP). Con la finalidad de obtener una cepa sobreproductora de compuestos aromáticos se eliminó el sistema carbohidrato de fosfotransferencia de fosfatos (sistema PTS) de una cepa de *Escherichia coli*. La cepa PB12PTS⁻Glc⁺ carece del sistema PTS y ha recuperado la capacidad de crecer en glucosa mediante un proceso de evolución adaptativa en quimiostato. Se ha demostrado que en esta cepa se puede dirigir parte del PEP hacia la vía de los aromáticos aumentando el rendimiento y productividad de aminoácidos aromáticos (Báez et al., 2004). Por otra parte, el sistema PTS (particularmente el componente EIIA^{glc}) está involucrado en la represión catabólica por glucosa (Peterkofsky et al., 1997).

Ya que la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ carece de este sistema, y que estas cepas son capaces de coutilizar glucosa y otras fuentes de carbono (Flores et al., 2005). En este trabajo se demostró la capacidad de la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ de metabolizar simultáneamente dos fuentes de carbono: glucosa-arabinosa, glucosa-glicerol, y glucosa-gluconato. Esta cometabolización de fuentes de carbono le permite a la cepa metabolizar más moles de carbono respecto a glucosa como única fuente de carbono y aumentar su velocidad específica de crecimiento (μ). Se analizaron los efectos de la coutilización de las fuentes mencionadas sobre el consumo específico de fuentes de carbono (q_s), productividad específica de DAHP, DHS y SHIK (q_{DAHP} , q_{DHS} , q_{SHIK}), así como en el rendimiento del primer intermediario aromático DAHP (Y_{DAHP}) y otros intermediarios de la vía de los aminoácidos aromáticos. Los estudios fueron realizados en el sistema de **células en reposo** (células que no dirigen precursores hacia biomasa pero son metabólicamente activas) y **cultivo por lote**. En el sistema de células en reposo se usó a la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ *aroB*, transformada con plásmidos para redirigir el flujo de PEP y E4P (pRW300 *aroG^{fbr}* y pCL*tktA*), esta estrategia permite que el DAHP sea una medida directa del flujo de carbono dirigido hacia la vía de los aminoácidos aromáticos. Los resultados en este sistema, indican que existe un aumento sensible en la productividad respecto a glucosa cuando la cepa utiliza arabinosa o cuando ésta coutiliza dos fuentes de carbono (hasta un 200% en glucosa-glicerol). El aumento podría deberse al aumento de la q_s y/o por el aumento de las pozas de E4P y PEP. Por otro lado los rendimientos que se obtienen en este sistema pueden ser del 100% del máximo teórico (Arabinosa, Gluconato y Glucosa-Acetato) o cercano a este.

Basados en los resultados anteriores, se eligieron a la arabinosa y las mezclas glucosa-arabinosa y glucosa-glicerol para ser estudiados en fermentación por lote en biorreactores. Los

estudios de crecimiento y producción en fermentador indican que la cepa PB12PTS⁻ (pRW300 $aroG^{fbr}$, pCL $tktA$) tiene un aumento importante (respecto a glucosa) en la q_{DAHP} (400%), q_{DHS} (143%), y q_{SHIK} y rendimiento (60% del teórico máximo) cuando coutiliza glucosa y glicerol. Es importante mencionar que en esta mezcla no se detecto formación de ácido acético como subproducto a lo largo de la fermentación, lo cual es de suma importancia en bioprocesos. Por otro lado, en arabinosa y la mezcla glucosa-arabinosa la cepa tiene un rendimiento similar a glucosa aunque la productividad es superior. Sin embargo en estas fuentes de carbono se detecto la formación de acido acético en cantidades superiores que la glucosa.

Lo anterior indica el papel esencial de la enzima bidireccional, transcetolasa $tktA$. Cuando la cepa PB12PTS⁻Glc⁺(pRW300 $aroG^{fbr}$, pCL $tktA$) crece en arabinosa y la mezcla arabinosa-glucosa existe un aumento de las pozas de ribulosa-5-fosfato por lo que las transcelosas (A y B) dirigen los flujos de carbono hacia la vía de Embden-Meyerhoff-Parnas y por tanto hacia la formación de acido acético a partir de PYR. Sin embargo, cuando la cepa crece en la mezcla glucosa-glicerol, existe un aumento en las pozas de fructosa-6-fosfato (F6P) y gliceraldehído-3-fosfato, por lo que la transcetolasa A dirige el flujo hacia las pentosas fosfato lo cual permite un aumento de E4P. Lo anterior junto a la disponibilidad de PEP vía la glicólisis pudiera permitir que la producción de compuestos aromáticos sea mayor en la mezcla glucosa-glicerol. De acuerdo a los resultados, se puede afirmar que mediante la alimentación de fuentes de carbono coutilizables no solo se aumentan las pozas de diversos metabolitos sino también se ha logrado modificar los flujos del metabolismo central hacia la vía aromática.

Por ultimo, la capacidad de *Escherichia coli* de coutilizar fuentes de carbono en ausencia del sistema PTS pudiera tener interesantes propiedades comerciales, particularmente la mezcla glucosa-glicerol; a partir de la cual se puede generar un proceso optimizado para la producción de compuestos aromáticos y para realizar subsiguientes estudios.

2. INTRODUCCION

2.1 Importancia industrial de los compuestos aromáticos.

Entre los derivados de los aminoácidos aromáticos (figura 1), se encuentran el ácido adípico, materia prima del nylon 6,6, así como del poliuretano y resinas de poliéster. Las fibras hechas a partir del nylon 6,6 son duras y resistentes a abrasión, razones por las cuales son usadas por la industria manufacturera de neumáticos y calzado. La L-fenilalanina es la materia prima del edulcorante *Aspartame*. El volumen de producción de este compuesto es aproximadamente 15,000 toneladas por año (Mueller et al., 2003). Sin embargo se espera que el mercado crezca en 2-4% anualmente (ACHEMA, 2006). El L-triptófano es utilizado primordialmente como aditivo de alimentos de animales; sin embargo, también se usa en pastillas antidepresivas y somníferos. Este sector demandó 300 toneladas en 2004. La L-tirosina se usa como materia prima para la síntesis de L-DOPA, medicamento en contra del Parkinson. La demanda de este aminoácido fue de 100 toneladas en 1996. El shiquimato es la materia prima para sintetizar el *Tamiflu*® (Roche) el agente usado contra la influenza y gripe aviar. El Tamiflu inhibe la actividad neuraminidasa de una de las dos proteínas de superficie de los virus de la influenza. El mercado del Tamiflu pudiera exceder el billón de dólares. El ácido dehidroshiquimico (DHS), un derivado natural de la ruta común de los aminoácidos aromáticos, es un potente antioxidante de alimentos superior o igual a los existentes en el mercado (Chang et al; 2003). Para culminar, el saborizante vainillina, tiene una demanda apenas debajo de la fenilalanina, de 14,000 toneladas al año.

2.2 Producción biológica de los compuestos aromáticos.

El efecto invernadero, el empobrecimiento de las reservas de petróleo, la implantación de tecnologías limpias y la deseada sustentabilidad que incluye la biodegradabilidad de los productos, ha impulsado que muchos sectores de la industria química estén en busca de los beneficios de usar materiales renovables. La biotecnología tiene el potencial de producir muchos compuestos que hoy se producen químicamente. Sin embargo, la meta es tener procesos rentables que además de disminuir severamente costos de inversión, también disminuyan la demanda energética y las emisiones peligrosas. Por lo anterior se han celebrado acuerdos internacionales, como la declaración de Río y otros acuerdos posteriores, entre países, donde se comprometieron a la búsqueda de un crecimiento sustentable. Actualmente varios productos aromáticos se sintetizan a partir del fenol, cuya producción anual fue de 5×10^9 toneladas en el año 2001. El fenol, es un compuesto derivado del cumeno, se sintetiza por varios procesos aunque el método predominante es la oxidación de Hock. El fenol a su vez es

producido a partir del benceno, que es un derivado del petróleo. Aproximadamente 20% de la producción global de benceno se dirige a la manufactura del fenol. La exposición al benceno, ha sido vinculada a varios tipos de cáncer. Con la finalidad de aminorar los costos económicos, ecológicos y sociales del uso del benceno, se han orientado estudios para usar a microorganismos, entre ellos *Escherichia coli*, para la producción de compuestos aromáticos. Uno de los principales retos de este enfoque biotecnológico es lograr que un microorganismo sintetice compuestos aromáticos con alto rendimiento y productividad respecto a la fuente de carbono utilizada.

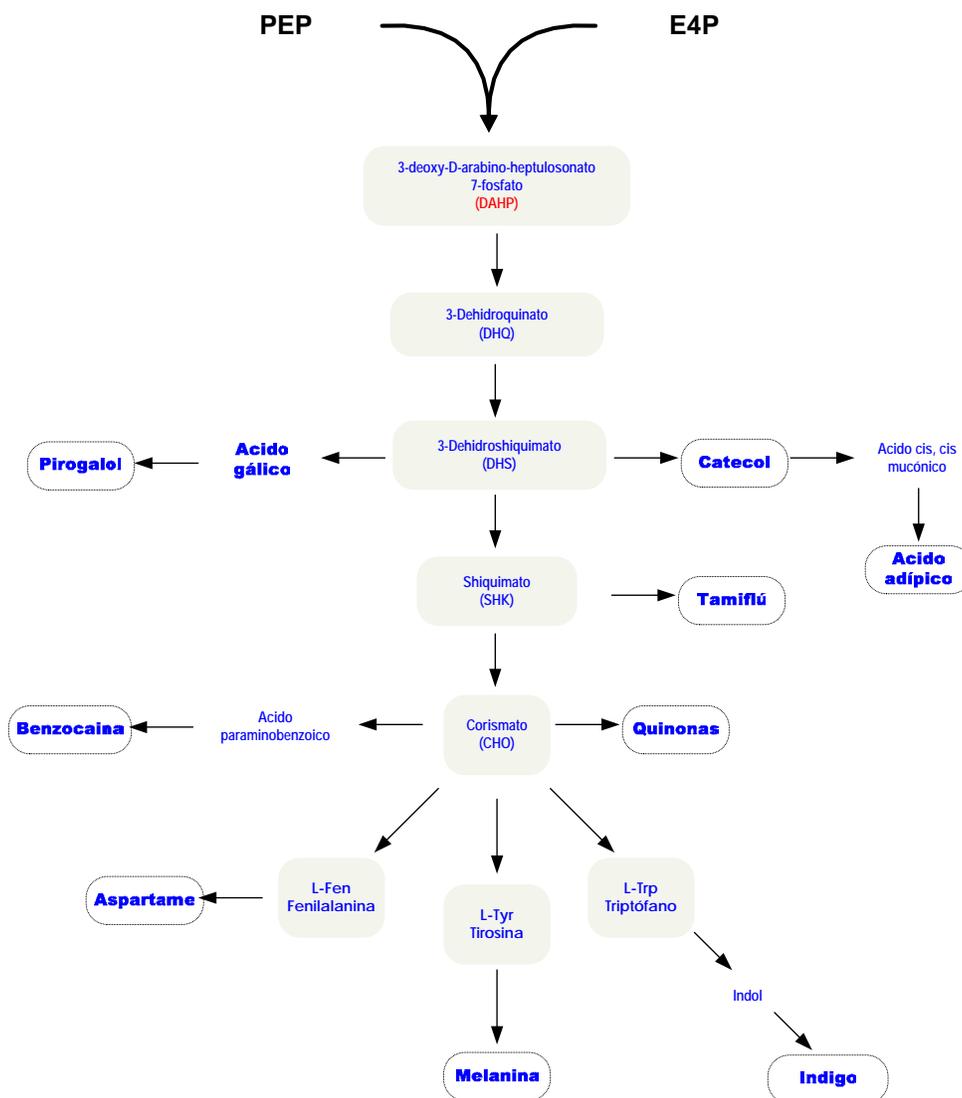


Figura 1. Algunos de los productos derivados de la vía de biosíntesis los compuestos aromáticos. Los metabolitos en gris son intermediarios de la vía y los compuestos en blanco son los productos comerciales.

2.3 Ingeniería de vías metabólicas en *Escherichia coli* y su uso en la producción de compuestos aromáticos.

Para lograr altos rendimientos y buenas productividades se ha recurrido a varias estrategias de la ingeniería de vías metabólicas (IVM). La IVM es la modificación racional de reacciones bioquímicas o la introducción de una nueva en un organismo, con el propósito de que sintetice un compuesto de interés o que posea cierta propiedad celular (Bailey, 1991). En el caso de los compuestos aromáticos, después de eliminar las inhibiciones por retroalimentación de las enzimas de la vía y amplificar su expresión, el máximo rendimiento teórico se puede obtener modificando el metabolismo central de *Escherichia coli* para redirigir el flujo del fosfoenolpiruvato (PEP) y eritrosa-4-fosfato (E4P). El PEP y E4P son los compuestos precursores de los metabolitos aromáticos y provienen de diferentes vías metabólicas (glicólisis y pentosas fosfato, respectivamente). Al condensarse, estos dos metabolitos dan origen al primer intermediario de la vía, el 3-D-arabinoheptulonato-7-fosfato (DAHP). El PEP es un intermediario clave del metabolismo central y cuando una cepa silvestre crece en glucosa su mayor consumidor es el sistema PTS. Este sistema consume la mitad del PEP producido por la glicólisis (Postma, 1996), por lo que el rendimiento de aromáticos en cultivos con glucosa está limitado. Solamente el 3% del PEP se utiliza en la biosíntesis de aminoácidos en las cepas silvestres de *Escherichia coli*, cuando crecen en glucosa como única fuente de carbono. Con el propósito de hacer accesible una mayor concentración de PEP para la biosíntesis de compuestos aromáticos, se decidió deletar el operón *ptsHlcr* que codifica para las enzimas comunes de PTS (EI, HPr) y el transportador específico de glucosa (EIIA^{glc}) en cepas silvestres de *Escherichia coli*. Flores y col. (1996) reportaron la construcción de las cepas PB11 y NF6 sin el sistema PTS, derivadas de las silvestres JM101 y PB103 respectivamente, las cuales crecen muy lentamente en glucosa ($\mu = 0.1 \text{ hr}^{-1}$). A partir de estas cepas se obtuvieron por evolución adaptativa en quimiostato cepas capaces de crecer rápidamente en glucosa. De la cepa NF6 se obtuvo la cepa NF9 con la cual se demostró que se produce DAHP con un rendimiento cercano al 19% en ciertas condiciones de crecimiento. De la cepa PB11PTS⁻Glc⁻ se derivó la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ que es capaz de crecer en glucosa con una $\mu = 0.4 \text{ hr}^{-1}$. Esta cepa utiliza a la permeasa de galactosa (GalP) y la glucocinasa para fosforilar la glucosa. Se ha demostrado que las cepas PTS⁻Glc⁺ tienen la capacidad de acumular intermediarios aromáticos con mayor eficiencia y productividad que sus correspondientes cepas silvestres (Flores et al., 1996 y Báez et al., 2000). Sin embargo, la eliminación del sistema PTS tiene consecuencias pleiotrópicas en

la célula. Por ejemplo, la enzima $EIIA^{glc}$ está involucrada en el mecanismo de represión catabólica por glucosa, en donde se convierte en el sensor y mediador de ella. Se ha demostrado que cepas PTS^- han perdido la represión catabólica glucosa sobre arabinosa y conservan la represión de glucosa sobre xilosa (Hernández-Montalvo et al., 2001). Se han estudiado los efectos de esta ausencia parcial de represión catabólica y se ha demostrado que las cepas $PB11PTS^-Glc^-$ y $PB12PTS^-Glc^+$ son capaces de coutilizar glucosa y acetato incrementando sus μ con respecto a glucosa. Además la cepa $PB11PTS^-Glc^+$ es capaz de coutilizar glucosa y otras fuentes de carbono (Flores et al., 2005a y Flores et al., 2005b). Sin embargo, no se ha realizado un estudio detallado del potencial de esta propiedad de las cepas PTS^- con represión catabólica modificada en la producción de compuestos aromáticos. Por lo anterior en este trabajo se analizan los efectos de la ausencia del sistema PTS sobre la pérdida de la represión catabólica en la coutilización de fuentes de carbono. También se analizó el impacto de esta cometabolización en la producción del DAHP y de otros intermediarios aromáticos. El estudio se realizó en dos sistemas: cultivo de células en reposo y en cultivo en fermentador.

3. ANTECEDENTES

3.1 Metabolismo de *Escherichia coli*.

3.1.1 Anabolismo, catabolismo y metabolismo central.

Una célula de *Escherichia coli* está conformada por agua (70%) y el resto del peso seco de la célula lo componen las macromoléculas: ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), proteínas, lípidos y carbohidratos. Los precursores bioquímicos para la síntesis de estos compuestos, son de bajo peso molecular, se usan rápidamente por lo que son constantemente suplementados por síntesis bioquímica a partir de glucosa u otras fuentes de carbono. Las reacciones que ocurren en una célula pueden clasificarse como siguen (Neidhardt et al., 1990).

- Las reacciones catabólicas, producen los precursores metabólicos necesarios para la biosíntesis a partir de las fuentes de carbono. También generan energía libre de Gibbs en forma de ATP, la cual es usada en la biosíntesis, polimerización y reacciones de ensamblaje.
- Las reacciones de energía producen poder reductor para biosíntesis.
- Las reacciones de ensamblaje o anabólicas son las reacciones que permiten la síntesis de macromoléculas a partir de metabolitos, el transporte a lugares especificados y finalmente, su asociación para formar estructuras celulares tales como pared celular, membranas, núcleo, etc. Existen vías metabólicas específicas en la célula, involucradas en la biosíntesis de compuestos particulares. Cada una consiste de reacciones secuenciales que llevan a la síntesis de metabolitos adicionales de construcción.

La glicólisis es la suma de todas las reacciones bioquímicas por la cual la glucosa y otras fuentes de carbono son convertidas en piruvato; esto es posible por la participación de las siguientes vías: Embden-Meyerhof-Parnas, pentosas fosfato y Entner-Doudoroff. En general estas vías metabólicas confluyen en la formación de gliceraldehído-3-fosfato, compuesto que está comprometido en la formación de piruvato. El piruvato se convierte en punto de enlace entre la glicólisis y el ciclo de los ácidos tricarbónicos (figura 2).

3.1.2 La vía metabólica involucrada en la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos en *Escherichia coli*.

La vía metabólica de la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos consiste en una vía común llamada también vía del shiquimato (SHIK) y en las vías terminales. La vía común fue elucidada por Davis y Prinson en 1971. Esta vía inicia con la condensación aldólica irreversible de E4P y PEP, la cual da origen al DAHP y termina con el corismato (CHO) (figura 3A). Después del compuesto anterior, inician las llamadas vías terminales que permiten la biosíntesis de L-triptófano (L-trp), L-tirosina (L-tyr) y L-fenilalanina (L-phe) (figura 3B).

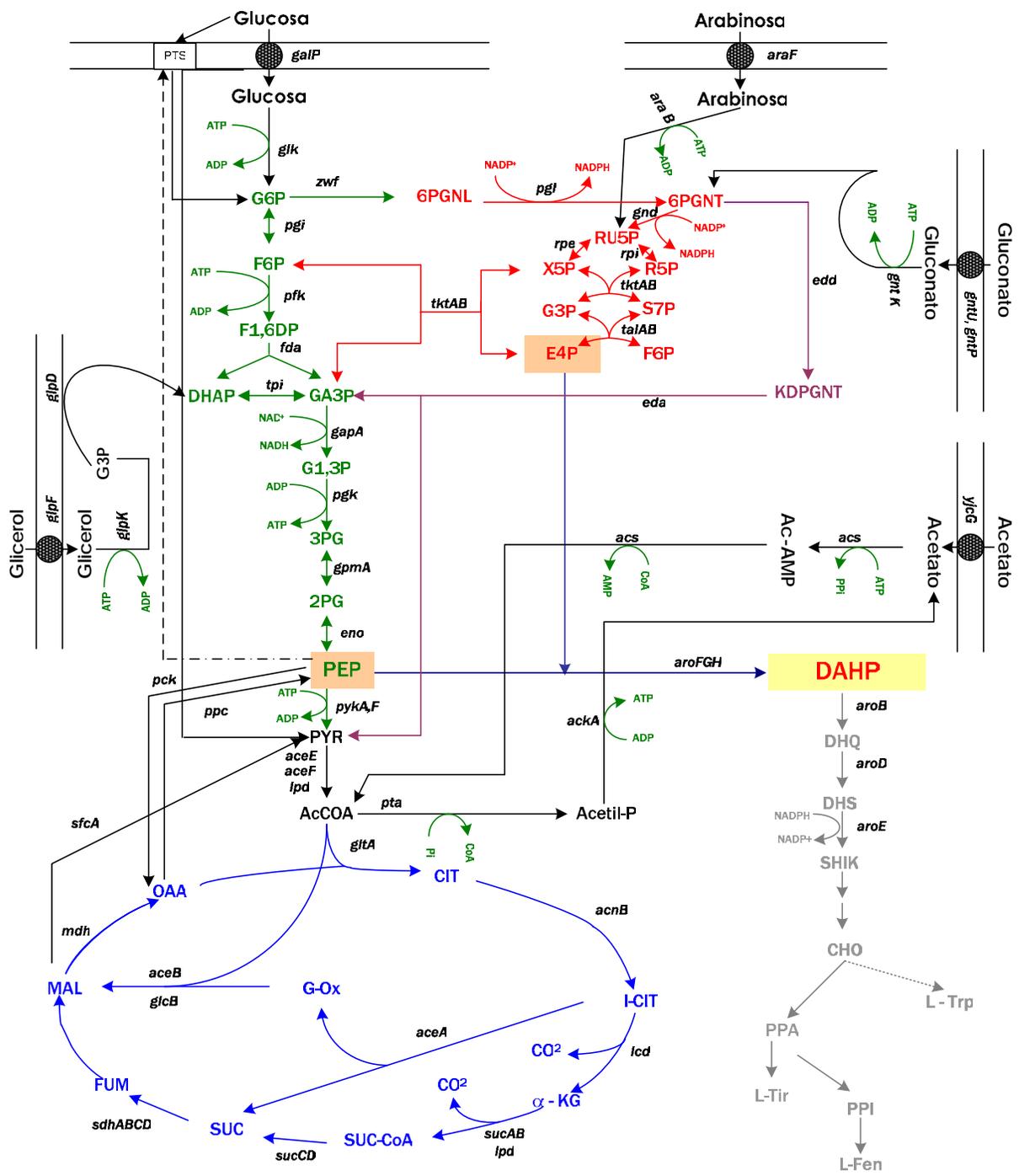


Figura 2. Metabolismo central de *Escherichia coli* con las vías catabólicas de las diferentes fuentes de carbono y su relación con la vía de síntesis de los aminoácidos aromáticos.

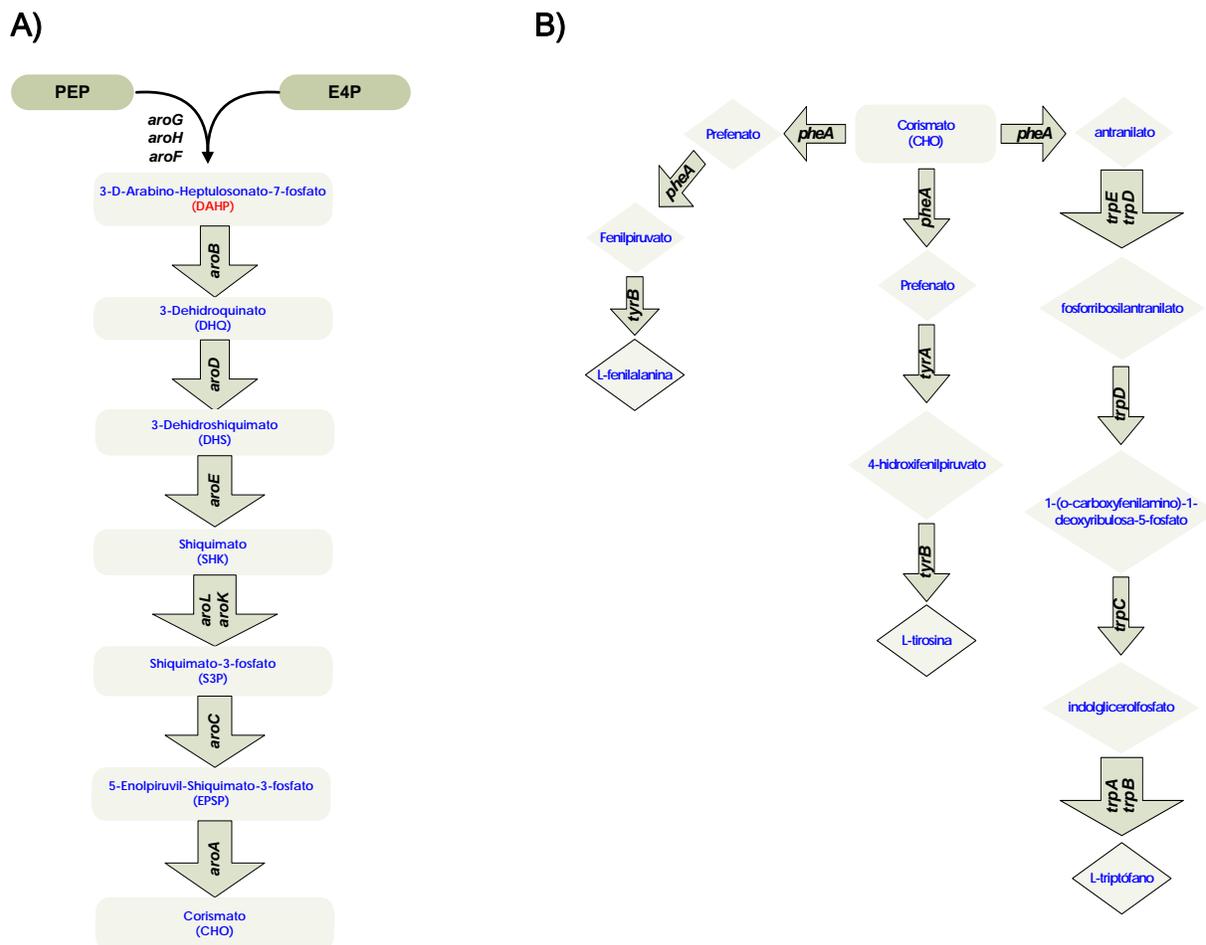


Figura 3. A) Intermediarios de la vía común de los aminoácidos aromáticos y genes que codifican para las enzimas que catalizan la reacción B) Lo mismo que A pero de las vías terminales de los aminoácidos aromáticos.

3.1.3 Características de las enzimas y reacciones involucradas en la vía común de los aminoácidos aromáticos.

a) 3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonato 7- fosfato Sintasa.

La primera enzima de la vía cataliza la condensación de la E4P y PEP, la cual da origen al DAHP y fosfato inorgánico. La estructura del DAHP fue identificada como 1-carboxi-2-deoxi- α -D-glucosa-6-fosfato (Garner G.C y Hermann K.M, 1984). La forma piranosa del compuesto y la reacción que le da origen se muestra en la figura 4a. En *Escherichia coli* existen tres isoenzimas que catalizan la formación de DAHP (Zurawsky et al. 1981, Tribe et al 1976), las cuales se denominan AroG, AroF y AroH. Estas enzimas están codificadas por sus genes estructurales

homólogos (*aroG*, *aroF*, *aroH*), los cuales están localizados en diversas regiones del genoma (Blattner et al., 1997). Cada una es sensible de inhibición por su aminoácido aromático específico; la primera es retroinhibida por L-fenilalanina (0.1 mM), la segunda por L-tirosina (0.1 mM) y la última por L-triptófano. Sin embargo, AroH es parcialmente inhibida por triptófano para asegurar un constante suplemento de corismato para la síntesis de otros compuestos aromáticos.

Adicionalmente los genes *aro* son regulados transcripcionalmente por represión, los cuales son ejercidos por los productos de los genes *tyrR* y *trpR*. El gen *trpR* codifica para la proteína represora TrpR, la cual es un dímero que se activa cuando dos moléculas de triptófano se unen a ella, apartando la orientación de las hélices de la proteína de tal manera que se ajusta a las cavidades mayores del DNA. Esta es la manera en que TrpR regula la transcripción de *aroH*. Por otro lado TyrR puede actuar como represor o como activador. Para actuar como represor necesita de la presencia de tirosina y ATP; así los dímeros de la proteína hexamerizan y actúan sobre los promotores de los genes *aroF* y *aroG*. Cabe mencionar que *in vivo*, el mecanismo regulatorio más importante es la retroinhibición de las DAHP sintasas, como demostró la resonancia magnética nuclear no invasiva de células de *Escherichia coli* (Ogino et al., 1982). En una cepa silvestre de *Escherichia coli* la actividad total de las DAHP sintasas es distribuida en las tres enzimas. Se sabe que AroG es un homotetrámero y que es responsable del 80% de la actividad total. Mientras que AroF y AroH son homodímeros que participan con el 20 % y 1% de la actividad total, respectivamente (Herrmann et al., 1983).

b) 3-Dehidroquinato Sintasa (DHQ sintasa).

La DHQ sintasa, es la segunda enzima de la vía y cicla irreversiblemente al DAHP, liberando fosfato, y formando el compuesto 3-dehidroquinato (DHQ) (figura 4b). Esta enzima codificada por el gen *aroB*, es monomérica (p.m 39,000 Da), requiere de NADH y de cobalto para su actividad. La DHQ sintasa parece estar expresada constitutivamente y no es reprimida por ningún aminoácido aromático ni por corismato; tampoco parece ser inducida por DAHP. La DHQ sintasa es activada por fosfato inorgánico producto de su reacción. La forma piranosa del DAHP parece ser su sustrato (Garner G.C y Hermann K.M, 1984). A pesar de que se ha calculado que la actividad específica de la DHQ sintasa es cinco veces más que la necesaria para los requerimientos de aminoácidos aromáticos de células con un tiempo de duplicación de una hora, cuando se sobreexpresa una DAHP insensible a retroinhibición por Tyr, existe acumulación de DAHP por lo cual esta enzima es limitante para la producción de compuestos aromáticos (Ogino et al., 1982). Debido a lo anterior, en varios estudios de producción de aminoácidos aromáticos el gen *aroB* es mutado para que el DAHP acumulado sirva como medida del carbono comprometido a la vía aromática (Liao et al., 1994; Báez et al., 2001).

c) 3-Dehidroshiquimato deshidratasa (DHQ deshidratasa).

El tercer paso de la vía consiste en la deshidratación del DHQ para formar 3-dehidroshiquimato (DHS, figura 4c) e introduce el primer doble enlace del anillo aromático por medio de una base de Schiff, en la cual la lisina-170 sirve como el donador amino. Esta enzima conocida también como dehidrocinasa, es un dímero con una subunidad de 26,000 Da codificada por el gen *aroD*. Esta enzima parece estar expresada constitutivamente y su *K_m* in vitro es de 44mM.

d) Shiquimato deshidrogenasa.

Esta enzima cataliza la reducción de DHS a shiquimato (figura 4d). Esta enzima es una deshidrogenasa dependiente de NADPH, tiene un peso molecular de 29,000 Da y está codificada por el gen *aroE*. La *K_m* de la enzima por shiquimato es de 55 mM. El gene *aroE* se expresa constitutivamente.

e) Shiquimato quinasa I y II.

El quinto paso de la vía del shiquimato, lo catalizan las shiquimato cinasas I y II; ambas catalizan la formación de shiquimato 3-fosfato (S3P), a partir de shiquimato y ATP (figura 4e). Estas isoenzimas, son monómeros con un pm de 19,500 Da pero solo comparten el 30% de identidad. Ambas enzimas pueden funcionar in vitro; la isoenzima II (*aroL*) tiene una *K_m* de 200 mM y la de la isoenzima I (*aroK*) es de 5 mM. La expresión de la shiquimato cinasa II está controlada sinérgicamente por los represores Trp y Tyr. Particularmente cuando las células están limitadas por L-Tyr y L-Trp, o cuando el regulador *tyrR* esta inactivo, la síntesis de la shiquimato cinasa II se eleva diez veces.

f) 5-enolpiruvilshiquimato 3-fosfato sintasa.

En el sexto paso de la vía del shiquimato, una segunda molécula de PEP es utilizada en la vía. El PEP se condensa con S3P para generar 5-enolpiruvilshiquimato 3-fosfato (EPSP) y fosfato inorgánico (figura 4f). Esta reacción es catalizada por la EPSP sintasa (*aroA*), una enzima monomérica de 48,000 Da de p.m. La *K_m* para PEP y S3P es de 16 y 2.5 mM respectivamente.

g) Corismato sintasa.

El séptimo paso y último de la vía común es la trans-eliminación-1,4 del fosfato de EPSP para producir CHO (figura 4g). En esta reacción, el segundo de tres dobles enlaces del benceno se introduce. La reacción es catalizada por la corismato sintasa y requiere de la flavina reducida como cofactor. Esta enzima es sensible al oxígeno.

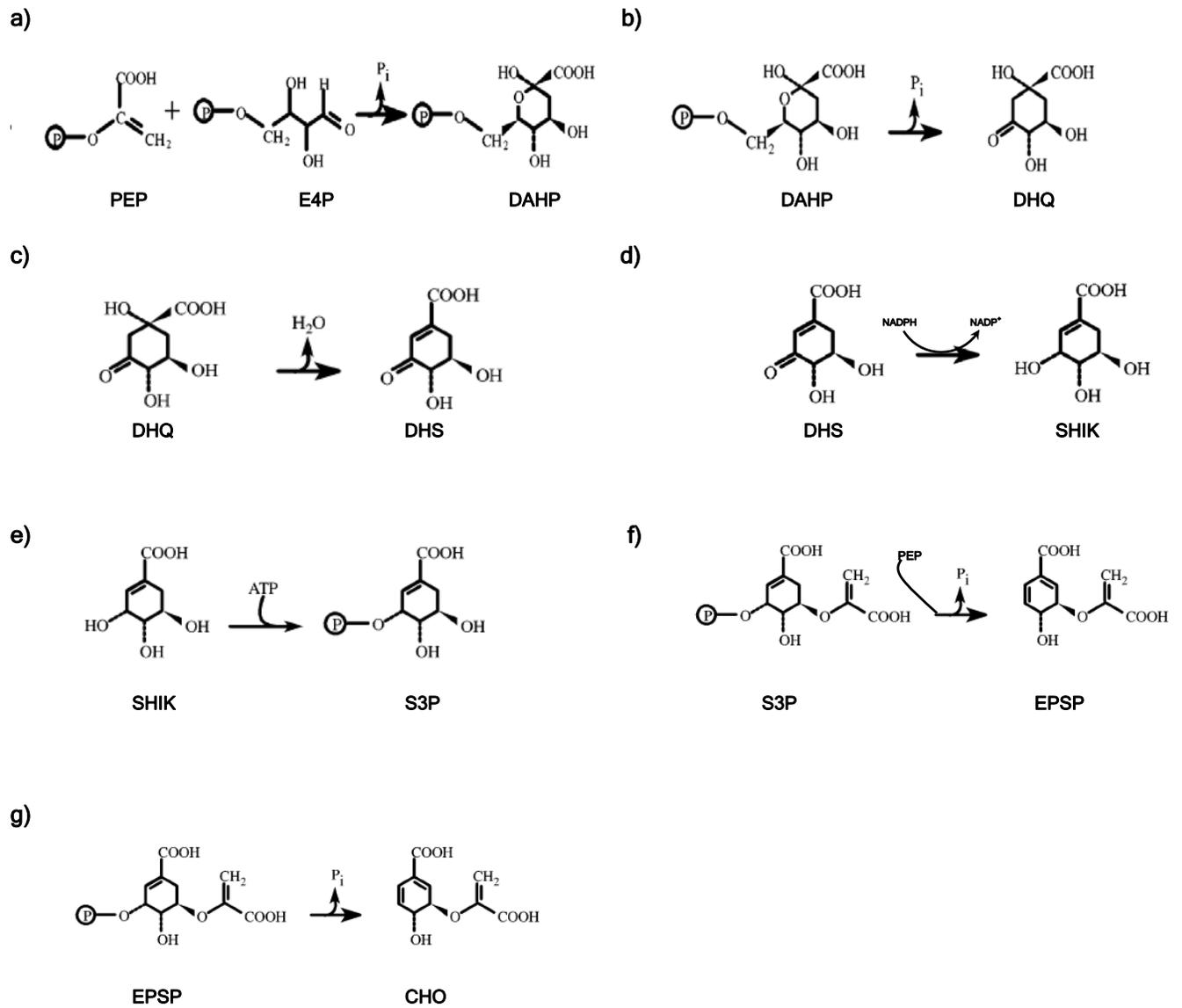


Figura 4. Precursores metabólicos involucrados en las diferentes reacciones de la vía común de los aminoácidos aromáticos.

3.2 El sistema PTS en *Escherichia coli*.

3.2.1. El transporte de carbohidratos en *Escherichia coli*.

Los carbohidratos presentes en el medio de cultivo deben cruzar dos barreras hidrofóbicas antes de ser metabolizados, debido a que *Escherichia coli* y otras bacterias gram-negativas presentan dos membranas rodeando su citoplasma. Estas son llamadas membrana externa y membrana del citoplasma. El espacio entre estas dos membranas es el periplasma. Para controlar los flujos de entrada y salidas de moléculas a través de estas barreras la célula sintetiza proteínas que forman canales. Así, la membrana externa contiene aproximadamente 10^5 canales llamadas porinas (Nikaido et al., 1979). Las proteínas OmpC y OmpF son las porinas más abundantes durante el crecimiento en condiciones de laboratorio ya que son los principales canales de entrada de la glucosa en concentraciones mayores de 0.2 mM (Nikaido et al. 1985., Death et al. 1993); sin embargo cuando la glucosa está presente en concentraciones submicromolares se induce la síntesis de otra porina de la membrana externa llamada LamB, esta porina también puede transportar maltosa, maltodextrinas y varios carbohidratos. La difusión de los azúcares a través de las porinas es un proceso pasivo. Para que los carbohidratos crucen del periplasma a la membrana citoplasmática es necesario un transporte activo (figura 5). El transporte de carbohidratos con fosforilación concomitante es realizado por el sistema PTS. Por el contrario, los carbohidratos que son internalizados en una forma no fosforilada necesitan quinasas para fosforilarlos antes de metabolizarse y las permeasas responsables del transporte son llamadas de forma general permeasas no-PTS.

3.2.2 Descripción del sistema PTS.

El sistema PTS está involucrado en el consumo y fosforilación concomitante de varios carbohidratos y algunos alcoholes (tabla 1). Dentro la familia de transportadores el sistema PTS pertenece al grupo de los translocadores. Este sistema está ampliamente distribuido en bacterias y ausente en organismos del grupo Archaea y Eucariotes (Postma et al. 1996., Saier et al. 2000). El sistema PTS en *Escherichia coli* consiste de:

- Dos proteínas generales de PTS; enzima I (EI) y la proteína acarreadora HPr rica en histidinas, codificadas por los genes *ptsHI*. Estas proteínas participan en la fosforilación de todos los carbohidratos tipo PTS.
- Permeasas azúcar-específicas de PTS, también llamadas enzimas II (EII); *Escherichia coli* cuenta con 21 complejos enzimáticos tipo II para el transporte de diferentes azúcares. Por ejemplo, para el transporte de glucosa se requiere del componente soluble IIA (EIIA^{glc}) y la proteína IICB que consta de un dominio soluble y un dominio integral de membrana. Estas proteínas están codificadas en los genes *crr* y *ptsG* respectivamente.

Una característica esencial del sistema PTS es que la cadena de transferencia del grupo fosfato empieza con la donación del grupo fosforil por el PEP a la enzima EI, procede vía HPr y de ahí el grupo fosfato es donado al transportador carbohidrato específico, que para el caso del transporte de glucosa consta de la enzima hidrosoluble EIIA^{glc} y finalmente a la enzima EIIBC (figura 5). Los carbohidratos fosforilados son metabolizados inmediatamente. El sistema PTS está involucrado también en los procesos de represión catabólica y quimiotaxis, en *Escherichia coli*. Las cepas que tienen mutado los componentes EI y HPr no pueden crecer en ningún sustrato PTS (Postma, et al 1987). Sin embargo, ya que el sistema EII es específico para cada sustrato, las mutantes carentes de este componente son incapaces de crecer en el sustrato específico de la enzima. También se ha reportado que cepas carentes del sistema PTS son capaces de crecer en sustratos no PTS, esto es debido a la regulación que ejerce el componente EII en el metabolismo, el cual se discutirá adelante (Postma, et al 1987).

Tabla 1. Enzimas EII / EIII y sustratos del sistema PTS

Enzima II/III	Sustrato
II ^{Nag}	<u>N-acetilglucosamina</u>
II ^{Glc} / III ^{Glc}	<u>Glucosa</u> , metil α -glucósido, α -glucósido, tioglucosa glucosamina, sorbosa, manosa, 2-deoxyglucosa
II ^{Man} / III ^{Man}	<u>Manosa</u> , glucosa, 2-deoxyglucosa, fructosa, N-acetilglucosamina, metil- α -glucósido.
II ^{Fru} / III ^{Fru}	<u>Fructosa</u> , glucosa, sorbosa, xilitol
II ^{Gat}	<u>Galactitol</u> , glucitol
II ^{Gut} / III ^{Gut}	Glucitol, galactitol, manitol, fructosa
II ^{Mtl}	Manitol, glucitol
II ^{Bgl}	β -glucósidos, glucosa, metil- α -glucósido
II ^{Scr} / III ^{Glc}	Sacarosa
II ^{Lac}	Lactosa
II ^{Sor}	Sorbosa
II ^{Dha}	Dihidroxiacetona

las rutas alternativas de catabolismo, altera las actividades de reguladores específicos, o participa en la activación de proteínas de control global, tales como la proteína activadora de genes catabólicos (CAP, por sus siglas en inglés; también nombrada CRP). A continuación se presentan los mecanismos de represión catabólica mencionados y su relación con el sistema PTS, particularmente con el componente EIIA^{glc}.

3.2.3.1 Mecanismo que evita la inducción específica del carbohidrato.

Este mecanismo también es llamado exclusión de inductor. Cuando un sustrato tipo PTS, como la glucosa está presente en el medio, el grupo fosfato proveniente de PEP es donado finalmente al azúcar entrante, por lo que la enzima EIIA^{glc} se encuentra predominantemente en su estado no fosforilado. Esta forma de la enzima se une a las permeasas no PTS, y como consecuencia se inhibe el transporte y la formación de los inductores de estos azúcares, por ejemplo alolactosa para la inducción de *lac*. Debido a la falta de inductores específicos, los operones respectivos permanecen en estado reprimido. Además la enzima EIIA no fosforilada también se puede unir al glicerol quinasa evitando la formación de glicerol 3-fosfato, el inductor de los genes catabólicos de glicerol (Postma et al., 1993). Por otro lado el estado fosforilado de EIIA^{glc} (EIIA^{glc}-P) previene su unión a las proteínas blanco. Este tipo de mecanismo es el que ocurre en los llamados carbohidratos no PTS entre ellos lactosa, melobiosa, maltosa y glicerol.

3.2.3.2 Mecanismo de control transcripcional con reguladores globales.

En *Escherichia coli*, la proteína CRP activa la transcripción de mas de 100 promotores involucrados en el metabolismo de fuentes de carbono alternativas a la glucosa. CRP en algunos casos está involucrado en mecanismos de represión. El proceso de activación de la transcripción por CRP es la siguiente: la proteína CRP, es un homodímero, que tiene un cambio conformacional cuando se une a su efector alostérico AMPc y por lo tanto se une eficientemente a secuencias específicas localizadas cerca o dentro de promotores para regular la trascipción (Zheng et al, 2004). Así que la regulación global por CRP depende de la cantidad intracelular de AMPc y a su vez de los niveles de CRP. Los niveles de AMPc son controlados por la actividad de la adenilato ciclasa (Cya), y la actividad de esta enzima se inhibe por EIIA^{glc}, mientras que EIIA^{glc}-P es un activador de Cya (Postma et al., 1993). Hasta hace muy poco, el papel de EIIA^{glc}-P como activador de Cya estaba basado principalmente en argumentos genéticos, sin embargo Young-Ha y col. (2006) lograron demostrar que solamente el componente EIIA^{glc} del sistema PTS interactúa con Cya. En este estudio se descubrió que el estado no fosforilado y fosforilado del componente EIIA^{glc} puede interactuar con Cya, sin embargo ambos estados de fosforilación no ejercen regulación sobre la actividad de Cya. Solamente en presencia del extracto de *Escherichia coli* el componente EIIA^{glc}-P ejerce actividad sobre Cya. Los autores proponen que

la regulación de Cya es en conjunto EIIA^{glc}-P y un factor regulatorio presente en el extracto que aún se desconoce.

Se ha reportado que CRP también controla la expresión de genes estructurales de reguladores globales como Fis (Nasser et al., 2001) o contribuyendo a la selectividad del factor σ (Colland et al., 2000). Además varios reguladores de genes glicolíticos y gluconeogénicos y genes relacionados con el metabolismo de la glucosa son controlados por otros factores transcripcionales: Cra (FruR) y Mlc (Saier et al., 1996).

3.2.3.3. Cascada de señales que median la represión catabólica.

De la descripción anterior es obvio que el estado de fosforilación de EIIA^{glc} es lo que determina muchas respuestas regulatorias en *Escherichia coli*. De hecho ya que EIIA^{glc} y EIIA^{glc}-P son parte de la cadena PEP-PTS, los defectos en cualquiera de las dos componentes abolirá la represión catabólica en *E.coli*. La relación EIIA^{glc} / EIIA^{glc}-P se ajusta de acuerdo a la disponibilidad del azúcar considerando el transporte por PTS. Por ejemplo cuando la glucosa es transportada, el grupo fosforil de EIIA^{glc}-P es enviado al azúcar entrante vía EIICB^{glc}, el principal transportador de glucosa de PTS. De igual manera cualquier azúcar PTS podría afectar indirectamente el estado de fosforilación de EIIA^{glc} drenando los grupos fosfatos al azúcar entrante. Este escenario, no provee una explicación para la fuerte represión catabólica de carbohidratos no PTS tales como glucosa-6-fosfato. Sorprendentemente, la glucosa 6-fosfato y varios azúcares no PTS causan la defosforilación de EIIA^{glc} en varios grados (Hogema et al., 1998). Para explicar este resultado inesperado, varios autores proponen que la relación PEP/piruvato está involucrado en el control del estado de fosforilación de EIIA^{glc}. La relación PEP/piruvato está influenciado por el metabolismo de carbohidratos. Si la enzima EIIA^{glc}-P es un efector de la adenilato ciclasa, la defosforilación de EIIA^{glc} resulta en una baja producción de AMPc. Sin embargo la relación de cantidad de AMPc a EIIA^{glc}-P no están correlacionados (Hogema et al., 1998). Estos resultados cuestionan el modelo regulatorio simplificado (Notley McRobb, 1997). En este sentido también están los resultados de Flores et al 2005a, que demostraron que en la cepas PTS⁻, parece que existe suficiente AMPc para inducir la expresión de muchos genes y operones regulados por este metabolito. En *Escherichia coli*, pareciera que existe un factor adicional para la regulación de la adenilato ciclasa que pudiera estar supliendo el papel del componente EIIA^{glc} en cepas PTS⁻ el cual no se conoce (Flores et al., 2005; Flores et al., 2007).

3.3 Estrategias de ingeniería de rutas metabólicas para una síntesis eficiente de compuestos aromáticos.

3.3.1 Consideraciones sobre los metabolitos E4P y PEP precursores de la biosíntesis de compuestos aromáticos.

La velocidad y rendimiento de la producción de un metabolito está limitada en última instancia por la capacidad de canalizar los flujos metabólicos del metabolismo central hacia la vía biosintética deseada (Liao et al., 1996). El primer objetivo para la producción de compuestos aromáticos es la redirección de E4P y PEP hacia DAHP. Esto se logra aumentando la actividad de la primera enzima de la vía. Debido a que las DAHP sintasas son inhibidas en actividad y concentración, se deduce la importancia de trabajar con versiones de las DAHP sintasas insensibles a retroinhibición y que puedan ser sobreexpresadas. Con ese objetivo, los trabajos realizados por Draths y col. (1992), resaltaron la necesidad de sobreexpresar la DAHP sintasa insensible a inhibición por fenilalanina *aroG^{fb}* (fbr, feedback resistant). Sin embargo, la alteración de esta enzima tiene un efecto marginal en el rendimiento y productividad de DAHP. Por otro lado, varios estudios han reportado que la E4P es limitante en la velocidad de síntesis de DAHP, pero no es la limitante del rendimiento, en cultivos con glucosa (Draths et al 1992, Patnaik et al 1994 (a,b)). Lo anterior se confirmó mediante análisis estequiométricos, como se muestra más adelante. Por otro lado, aunque la transaldolasa (TalA) en principio tendría la misma función para generar E4P en cultivos con glucosa, se ha establecido que es menos eficiente que la transcetolasa A (TktA) para aumentar la productividad de DAHP (figura 2), (Flores et al., 1996; Lu y Liao., 1997).

3.3.2 Análisis de las redes y flujos metabólicos para la canalización de flujos a la vía de biosíntesis de compuestos aromáticos.

El segundo acercamiento es mediante el análisis de la red metabólica de interés, con un enfoque estequiométrico. Lo anterior permite evaluar los flujos óptimos y sub-óptimos y determinar los genes dispensables (Schuster y Schuster., 1993). Los productos de los genes dispensables son en un principio aquellos que compiten por el metabolito de interés y por tanto limitan el redireccionamiento de los flujos. Es importante resaltar que el análisis estequiométrico no toma en cuenta necesariamente la regulación implícita en un sistema fino como lo es el metabolismo central. Por tanto no predice la extensión de los cambios fisiológicos del organismo al eliminar algún gen. Lo anterior es particularmente cierto en el caso de modificaciones al metabolismo central, que provee de precursores y energía para la biosíntesis. Por lo anterior ciertos cambios en el metabolismo causan severas perturbaciones fisiológicas.

Los análisis de los flujos metabólicos planteados para la vía aromática, se basaron en trabajos realizados por Schuster y Schuster (1993), los cuales fueron adaptados primeramente por Liao y

col. (1996). Usando este acercamiento, se examinaron las reacciones que convierten las fuentes de carbono en compuestos aromáticos. Como se ha mencionado, el primer paso comprometido es la formación de DAHP; entonces, el objetivo es la canalización y condensación efectiva de E4P y PEP en este compuesto. En la figura 6 puede observarse que por cada dos moléculas de PEP generadas de la vía glicolítica, al menos una molécula de PEP es usada para transportar la glucosa a través del sistema PTS. El PEP se convierte en piruvato (PYR), después de que es desfosforilado para transportar a la glucosa. Así que de la inspección y análisis cuantitativo de las vías, resulta que el máximo rendimiento de DAHP a partir de glucosa es 43%. Por el contrario, evitando el flujo de PEP a piruvato el rendimiento podría incrementarse al doble (86%). Para reducir el flujo de PEP hacia compuestos no deseables se pueden usar varias estrategias como: a) usar mutantes carentes del sistema PTS b) usar azúcares tipo no PTS (xilosa, arabinosa), c) reciclar el piruvato a PEP y d) evitar la formación de PYR vía las piruvato cinasas (PyK A,F). En la figura 7 se muestra la distribución de flujos para varias de las alternativas anteriores.

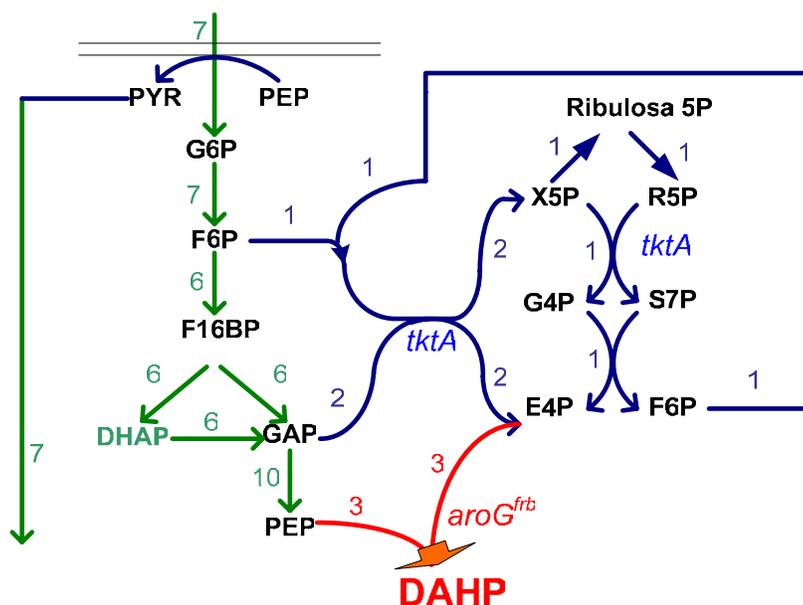


Figura 6. Vía óptima y distribución de flujos para convertir glucosa a DAHP con el sistema PTS activo. Los números representan el valor de los flujos (en moles) a partir de cada compuesto.

3.3.3 Estrategias para aumentar la disponibilidad del PEP.

a) Eliminación del sistema PTS.

Como se ha mencionado, el mayor consumidor de PEP es el sistema PTS, ya que por cada dos moles producidas de PEP a partir de glucosa el sistema PTS utiliza una mol de PEP para translocar y fosforilar la glucosa en glucosa 6-fosfato. Ya que en una cepa silvestre de *Escherichia coli* el PEP es utilizado primariamente para el transporte de glucosa y por varias otras rutas biosintéticas, el rendimiento de la producción de los aminoácidos aromáticos está limitado por la relativamente baja disponibilidad de PEP. Como ya ha sido señalado, partiendo de la necesidad de disponer de más PEP para la ruta de biosíntesis de compuestos aromáticos se han construido y caracterizado cepas carentes del sistema PTS ($\Delta ptsHlcr::kan$) (Flores et al, 1995; Flores et al, 1996; Flores et al, 2002; Flores et al., 2007) figura 7c. Se demostró que la delección de PTS, tiene efectos positivos en la redirección hacia DAHP en una cepa que sobreexpresaba solamente *tktA* y *aroG^{fb}* (Flores et al, 1996). La cepa anterior acumula tres veces más DAHP que la cepa parental que tiene activo el sistema PTS. Por otra parte un estudio realizado por Báez y col (2000), en un sistema de células en reposo con glucosa como fuente de carbono, con cepas isogénicas PTS⁺ y PTS⁻ que acumulan DAHP (cepas *aroB*), se obtuvo un 83% del rendimiento teórico con la cepa PTS⁻ y con una productividad 1.7 veces mayor. Es importante hacer notar que la delección del sistema PTS tiene efectos pleiotrópicos en la célula, que sólo se pueden comprender si se contempla y comprende el papel importante y global de este sistema en la regulación celular.

b) Eliminación de las piruvato cinasas (Pyk A y Pyk B).

En condiciones normales de crecimiento, el flujo glicolítico se dirige a la formación de piruvato a partir de PEP, por medio de las dos piruvato cinasas Pyk A y Pyk F presentes en *Escherichia coli* que tienen papeles diferentes cuando se crece en glucosa (Ponce et al., 1985) figura 2. Un estudio por resonancia magnética nuclear realizado por Flores y col. (2002), demostró que una cepa silvestre de *Escherichia coli* dirige 23% del PEP formado hacia PYR por medio de las Pyk's. Por otro lado en una cepa carente del sistema PTS, las PYK's pueden llegar a dirigir hacia PYR el 73% del PEP producido. El estudio realizado por Gosset y col (1996), abordó el efecto de las mutaciones de *pykA*, *pykF*, y de ambos genes, sobre la acumulación de DAHP, en cepas que tenían funcional o no el sistema PTS. Los experimentos llevados a cabo en cultivos por lote con medio rico con glucosa, demostraron que la eliminación de ambas piruvato cinasas en un fondo PTS⁻, junto a la sobreexpresión de *tktA* y *aroG^{fb}*, se obtenía 3.4 veces mas acumulación de DAHP por peso seco de células que la cepa con el mismo fondo pero con las Pyk's activas. Por otra parte estudios realizados con una cepa con fondo PTS⁻ PykA⁻ PykF⁻ en

medio mínimo en un sistema de células en reposo indica que la inactivación de ambas enzimas aumenta el consumo específico de glucosa y sin embargo no aumenta la producción de L-fenilalanina. Lo anterior probablemente es debido a que la cepa en ausencia de las Pyk no genera suficiente ATP a través de la vía de los ácidos tricarboxílicos (TCA) (Cortázar, 2005).

c) Reciclamiento del PYR a PEP.

La enzima gluconogénica fosfoenolpiruvato sintetasa (PEP sintetasa, Pps) convierte piruvato en fosfoenolpiruvato, con el gasto de dos enlaces de alta energía del ATP. Esta enzima es necesaria en cultivos con piruvato, lactato o acetato como fuentes de carbono. La sobreexpresión de esta enzima (30 veces) en una cepa silvestre de *Escherichia coli* en cultivo en lote causa inhibición del crecimiento de la célula (Patnaik et al, 1992; Patnaik et al 1996). Esto aparentemente es debido a que se genera un ciclo fútil, ya que el sistema PTS sensa altas concentraciones de PEP estimulando al doble el catabolismo de glucosa, saturando el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), y consecuentemente generando subproductos como piruvato y acetato. Para evitar el fenómeno anterior, Liao y col (1994), realizaron el estudio con una cepa silvestre, en un sistema de células en reposo. La coexpresión de *pps*, *tktA* y *aroG^{fb}* aumentaron el rendimiento de DAHP (90% del teórico) en cultivos con glucosa. Por otro lado Yi y col. (2003) sobreexpresaron los genes anteriores en una cepa mutante del sistema PTS, y sobreexpresando el facilitador de glucosa (Glf) de *Zymomonas mobilis* en cultivo en batch logrando una producción con un rendimiento de 90% de DAHP. Los estudios anteriores confirmaron que la disponibilidad PEP es limitante en el rendimiento. Una de las desventajas de sobreexpresar *pps* es que impone una carga metabólica adicional a la célula.

d) Uso de azúcares no PTS.

La internalización de azúcares no PTS como arabinosa y xilosa es mediada por permeasas de alta afinidad dependientes de ATP. Una vez traspasada la membrana citoplásmica los azúcares son fosforilados por cinasas específicas para cada azúcar, a expensas de ATP. La arabinosa y xilosa, tienen un rendimiento molar teórico de DAHP del 71%, aún sin reciclamiento del piruvato. Uno de los primeros estudios para analizar la producción de precursores de la vía con azúcares no PTS, fue el realizado por Patnaik y col. (1994). Estos estudios fueron realizados en un sistema de células en reposo y con el gen *aroB* inactivo. Esta cepa por lo tanto acumula DAHP en el medio. Fue demostrado que en presencia de xilosa, y con la sobreexpresión de *aroG^{fb}* se alcanzó el máximo teórico (71%). La sobreexpresión de los genes que codifican para las enzimas Pps y TktA no tuvieron efecto en rendimiento y tampoco en la productividad. Aunque se esperaba que Pps no tuviera ningún efecto, la falta de sobreexpresión de *tktA* para el aumento de DAHP, fue un hecho inesperado. Aparentemente al usar xilosa como fuente de carbono, existe

una mejor distribución del carbono entre PEP y E4P. Un estudio realizado por Li y col. (1999), comparando el rendimiento de compuestos aromáticos (DHS, DHQ, DAH y ácido gálico) en cultivos por lote alimentado y sobreexpresando solamente *aroG^{fb}* confirmaron que en estas condiciones el rendimiento es mayor en arabinosa y xilosa respecto a glucosa. La sobreexpresión de *aroG^{fb}* y *tktA* aumentaron el rendimiento solamente en el cultivo con glucosa.

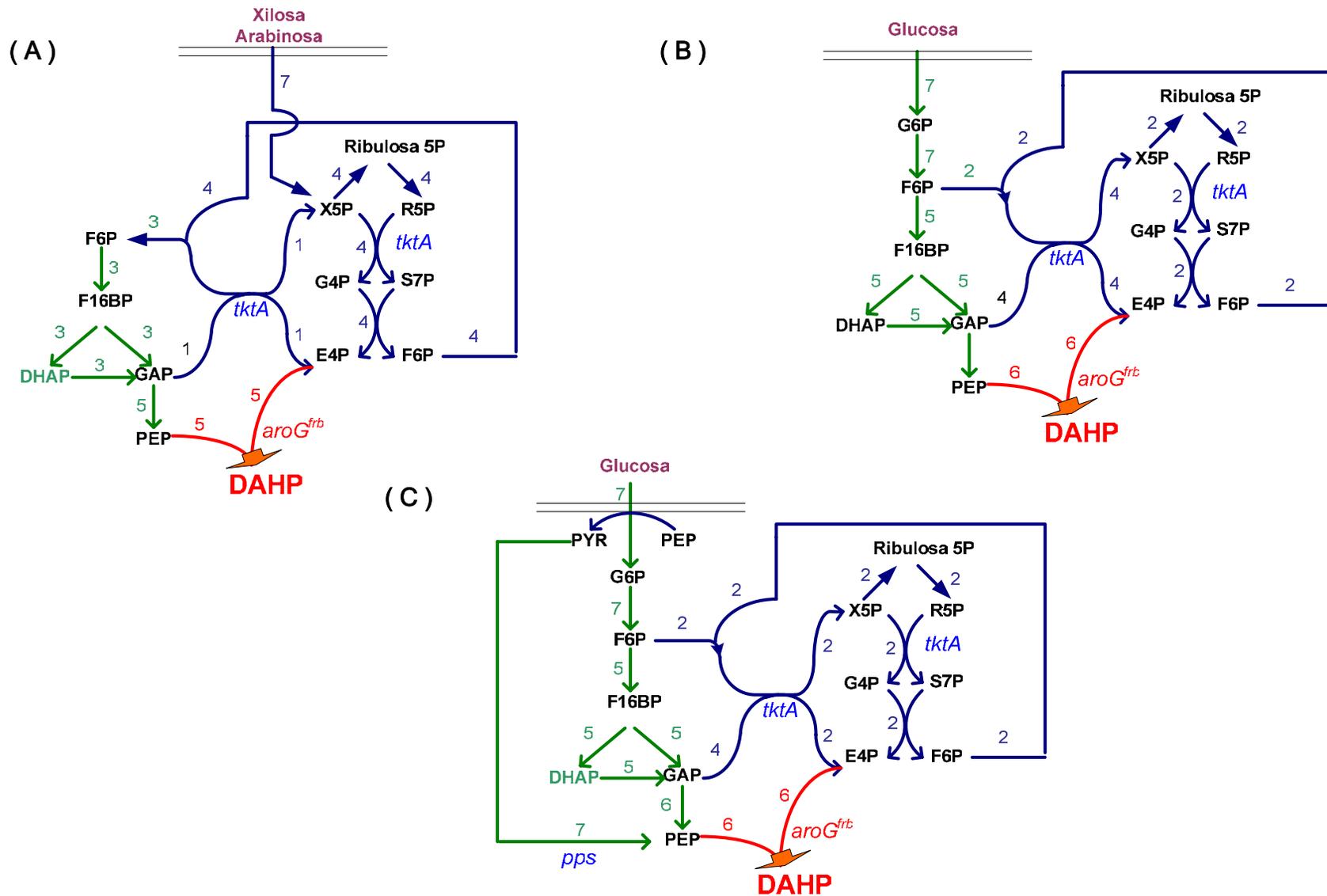


Figura 7. Vías óptimas y distribución de flujos para la producción de DAHP empleando varias alternativas.: A) Empleando azúcares tipo no PTS. arabinosa o xilosa. B) Empleando glucosa con el sistema PTS inactivo. C) Lo mismo que B pero con PTS activo y reciclamiento de PYR a PEP mediante sobreexpresión de *pps*.

3.4 Características de la cepa PB12PTS⁻Glc⁺.

La cepa PB12PTS⁻Glc⁺ es la usada en este estudio. Como se ha mencionado, esta cepa se obtuvo a partir de PB11PTS⁻Glc⁻ por el método de adaptación evolutiva en quimiostato. La cepa PB12PTS⁻Glc⁺ ha recuperado la capacidad de crecer en glucosa ($\mu = 0.42 \text{ hr}^{-1}$), pero crece a menor velocidad que la cepa silvestre JM101 ($\mu = 0.71 \text{ hr}^{-1}$) (Flores et al, 1995). Una caracterización preliminar de la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ demostró que utiliza GalP y Glk para transportar y fosforilar la glucosa. Sin embargo en la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ existen mutaciones que permiten incrementar los niveles de transcrito para los genes *glk* y *pgi* que codifican para las enzimas glucoquinasa (Glk) y fosfoglucosa isomerasa (Pgi) encargadas de transformar glucosa en fructosa 6-fosfato y como consecuencia de esto la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ tiene capacidad de dirigir mayor flujo de esqueletos de carbono a la vía de la glucólisis. Esta cepa tiene al menos tres mutaciones que le permite este nuevo fenotipo (Flores et al., 1996; Flores et al., 2002; Flores et al., 2005a).

3.4.1 Mutaciones detectadas en la cepa PB12PTS⁻Glc⁺.

Una de las mutaciones seleccionadas fue en *arcB*, que cambió un residuo de Tyr por uno de Cys en la segunda región transmembranal de la proteína codificada en este gen (Flores et al., 2004). Esta mutación podría estar afectando la autofosforilación de ArcB, por lo cual esta proteína podría estar uniéndose deficientemente a las regiones reguladoras. Lo anterior es congruente con una ligera sobreexpresión de los genes de TCA en la cepa PB12PTS⁻Glc⁺. Cabe recordar que el sistema ArcA-ArcB es un sistema de dos componentes que reprime la transcripción de genes involucrados en la respiración aeróbica y activa operones que codifican para enzimas microaeróbicas o fermentativas en respuesta a las condiciones redox. En el metabolismo central, ArcA reprime la expresión de genes del ciclo de TCA y del ciclo de glioxilato (“shunt de glioxilato”) en condiciones de limitación de oxígeno. En condiciones de crecimiento anaerobio, ArcB se autofosforila y cataliza la transfosforilación de ArcA; en ese estado ArcA reprime los genes regulados por esta proteína. En crecimiento aeróbico, la forma oxidada de las quinonas inhibe la fosforilación de ArcB (Georgellis et al., 2002). Otra mutación detectada en la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ fue en el gen *rpoS* (Flores et al., 2007). Este gen codifica para el factor sigma S que está involucrado en la transcripción de varios genes que se expresan en fase estacionaria y/o en condiciones de limitación de glucosa. Por otra parte el compuesto ppGpp es una molécula señalizadora que refleja el estado energético de la célula; bajos niveles de ppGpp generan una serie de señales que indican una limitación de nutrientes y por tanto la transcripción de éstos por *rpoS*. En este gen se detectó una mutación puntual que genera un codón de paro lo cual genera un péptido incompleto. Sin embargo esta mutación sería

parcialmente suprimida por el gen *supE* el cual suprime codones de tipo ambar (Fores et al., 2007). Lo anterior explicaría la expresión de los genes dependientes de RpoS en la cepa PB12PTS⁻Glc⁺; los cuales sin embargo; no son tan altos como en la cepa PB11PTS⁻Glc⁺. Además, hay otra mutación en PB12PTS⁻Glc⁺ que eleva los niveles de expresión de los genes (3X a 4X) *spoT*, *ggp* y *ppa*, involucrados en el metabolismo del ppGpp (Flores et al., 2007). Se sugiere que esta mutación se seleccionó durante la evolución adaptativa para crecer más rápidamente en glucosa y probablemente para modificar posteriormente la concentración de ppGpp de tal manera que se esté reflejando una condición menos estresada pero aún no óptima (Flores et al., 2007).

3.4.2 Caracterización metabólica y fisiológica de la cepa PB12PTS⁻Glc⁺.

El estudio de Flores y colaboradores (2002), utilizando espectroscopia por resonancia magnética nuclear (NMR) demostró que los flujos de carbono en la PB12PTS⁻Glc⁺ con respecto a la cepa la cepa progenitora PB11PTS⁻ y la silvestre eran diferentes. En particular en el primer paso de la glicólisis donde la cepa PB12 PTS⁻Glc⁺ tiene un flujo de 93.1% comparado con la cepa silvestre de 76.6%. Entre otros cambios relevantes en los flujos de carbono se encuentran: la reducción de 22.3% a 5.3% en el primer paso del brazo oxidativo de la pentosa 5 fosfato de la cepa mutante con respecto a la silvestre. En la PB12 PTS⁻Glc⁺ el brazo de síntesis de la ribosa 5- fosfato es compartido con la fosfogluconato-deshidrogenasa (Pgd) y el brazo no oxidativo de las pentosas fosfato. Por otro lado el flujo de piruvato a acetil coenzima A aumentó dos veces en la PB12 PTS⁻Glc⁺ con respecto a la silvestre. Normalmente, mientras que en la cepa mutante hay ausencia del flujo a través de la enzima fosfoenolpiruvato carboquinasa (Pck) en la cepa silvestre es de 7.7%. El trabajo de Flores y colaboradores, (2005a) relacionado con el análisis del transcriptoma de 100 genes de la cepa demuestra que en PB12 PTS⁻Glc⁺ existe un conjunto de genes cuya transcripción ha sido incrementada con relación a la cepa silvestre. Entre estos genes se encuentran como ya se señaló *glk*, *pgi* y varios genes del ciclo de las ácidos tricarboxílicos (TCA) y del shunt de glioxilato. Como en el caso de la cepa PB11PTS⁻, se ha realizado también un transcriptoma de esta cepa, utilizando todo el genoma. Sin embargo, los datos no son tan claros a diferencia de PB11PTS⁻Glc⁺, se encuentra en análisis actualmente (Flores, S., comunicación personal), y no se conoce, aparte de los 100 genes analizados por RT-PCR, que genes adicionales se encuentran sobrepresados, en particular los relacionados con la utilización de fuentes secundarias de carbono en presencia de glucosa.

3.4.3 Consideración adicional para la sobreproducción de compuestos aromáticos con la cepa PB12PTS⁻Glc⁺.

En este trabajo se tuvo como objetivo primordial evaluar las posibles ventajas de que la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ metabolizará las fuentes de carbono por diversas vías. Para una breve revisión de los puntos de entrada de los diferentes sustratos usados en el estudio ver la figura 2. Consideramos que la coutilización permitiría el aumento directo de las pozas de E4P y PEP, los metabolitos derivados del metabolismo central de *Escherichia coli* importantes para la producción de los compuestos sintetizados en la vía aromática. Sin embargo, como parte de la estrategia general de la sobreproducción de compuestos aromáticos fue necesario sobreproducir a la enzima que cataliza la condensación de E4P y PEP (AroG^{fbt}) la cual esta clonada en el plásmido pRW300^{aroG^{fbt}}. Esta enzima además tiene la ventaja de ser insensible a retroinhibición por fenilalanina. Por otra parte también fue necesario sobreproducir a la transcetolasa A, ésta enzima cataliza la condensación de F6P y GA3P para producir E4P y X5P. La transcetolasa A esta clonada en el plásmido pCL^{tktA}. Por lo tanto en los estudios de producción de DAHP, DHS y SHIK se transformaron a las cepas con los plásmidos mencionados.

4. HIPOTESIS

La cepa PB12PTS⁻Glc⁺ (pCL*tkA*, pRW300*aroG^{br}*) en la cual no existe represión catabólica por glucosa, pudiera aumentar su productividad y/o rendimiento en la síntesis de DAHP si fuentes de carbono de 3, 5 y 6 carbonos se incorporan como intermediarios de las vías Embden Meyerhof Parnas, pentosas fosfato y ácidos tricarbónicos y se coutilizan con glucosa, modificando y redirigiendo los flujos del metabolismo central hacia la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Analizar la capacidad de las cepas PB12PTS⁻Glc⁺(pCL*tktA*, pRW300*aroG^{fb}*) y PB12PTS⁻Glc⁺*aroB*(pCL*tktA*, pRW300*aroG^{fb}*) para consumir simultáneamente glucosa con otra(s) fuentes de carbono, y determinar su efecto sobre el rendimiento y productividad en la síntesis de DAHP e intermediarios aromáticos en células en reposo y en fermentador.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Definir las fuentes de carbono que coutiliza la cepa PB12PTS⁻Glc⁺, seleccionar aquellas mezclas en las que se encuentre un aumento en la μ .
- Comparar y confirmar la coutilización de fuentes de carbono a través de la determinación de los patrones de consumo de éstas en las cepas JM101PTS⁺ y PB12PTS⁻Glc⁺. Además evaluar en estas fermentaciones los parámetros cinéticos : rendimiento de biomasa (Y_x/s), el consumo específico de las fuentes de carbono (q_s), producción de ácido acético.
- Definidas las fuentes de carbono que la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ mejor haya coutilizado, determinar en un sistema de células en reposo, con la cepa PB12PTS⁻Glc⁺*aroB*(pCL*tktA*, pRW300*aroG^{fb}*) los siguientes parámetros cinéticos: consumo de específico de fuentes de carbono, rendimiento ($Y = \text{DAHP}/\text{fuentes de carbono}$), productividad específica de DAHP (q_P).
- Usando también la cepa PB12PTS⁻Glc⁺(pCL*tktA*, pRW300*aroG^{fb}*), evaluar los parámetros cinéticos de producción de compuestos aromáticos en fermentadores, en las mezclas de fuentes de carbono cuya mejor productividad y/o rendimiento se hayan obtenido en el sistema de células en reposo.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Cepas bacterianas y plásmidos.

Las cepas utilizadas para la determinación de los patrones de consumo y parámetros cinéticos en fermentador fueron la cepa silvestre JM101PTS⁺ y su derivada PB12PTS⁻Glc⁺. La cepa utilizada para el estudio de células en reposo fue la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ pero mutada en el gen *aroB*. Las características relevantes de las cepas y plásmidos están descritas en las tablas 2 y 3.

Tabla 2. Plásmidos usados en el estudio.

Plásmidos	Características relevantes	Referencias
pRW300	<i>aroG</i> ^{fb} bajo el control del promotor <i>lacUV5</i> inducible con IPTG; porta gen de resistencia a tetraciclina. Origen de replicación del plásmido pBR322.	Bolívar et al., 1977 Gosset et al., 1996
pCL <i>tk</i> A	<i>tk</i> A bajo el control de su promotor constitutivo; porta gen de resistencia a espectinomicina. Origen de replicación pACYC184.	Draths et al., 1996
pKD46	Contiene los genes <i>exo</i> , <i>bet</i> y <i>gam</i> de la recombinasa del fago λ. Promotor inducible por arabinosa (pBAD).	Datsenko y Wanner., 2000
pKD3	Porta gen de resistencia a cloramfenicol flanqueado por regiones FRT.	Datsenko y Wanner., 2000

Tabla 3. Cepas de *Escherichia coli* usadas en el estudio.

Cepa	Características relevantes	Referencias
JM101	<i>supE</i> , <i>thi</i> , $\delta(lac-proAB)$, F'	Bolívar et al., 1977
PB12	Proviene de la cepa PB11PTS ⁻ Glc ⁻ que es a su vez derivada de la cepa JM101. Tiene el mismo genotipo que JM101, excepto que tiene deletado el operón <i>ptsH/crr</i> y es Glc ⁺ .	Flores et al., 1996
PB12 <i>aroB</i> ⁻	La mismas que PB12, excepto que además tiene mutado el gen <i>aroB</i> .	Este trabajo

6.2 Procedimientos genéticos y técnicas de ADN recombinante.

a) **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Las reacciones de PCR se realizaron de acuerdo a las recomendaciones para la enzima Platinum Taq-DNA polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, C.A, USA) .Las reacciones se realizaron en el equipo Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer, Pomona, C.A, USA).

b) **Secuencia de oligonucleótidos:** Las secuencia de oligonucleótidos para la mutación del gen *aroB* (DAB1 y DAB2) se diseñaron de acuerdo a las recomendaciones de Datsenko y Wanner (2000) tal y como se muestra en la tabla 4. Las bases escritas en cursivas son aquellas homologas al gen *aroB*, las bases escritas en negritas son homologas al plásmido pKD46 (ver más adelante mutagénesis gen *aroB*). SAB1 y SAB2 son las secuencias de oligonucleótidos usadas para la comprobación de la mutación en el gen *aroB*.

Tabla 4. Oligonucleótidos usados en el estudio.

Nombre	Secuencia
DAB1 (Forward)	5'- <i>GAT GAT CAA AGC GCT AAA GTG GTT GCA AAC CAG ATT</i> <i>ATT CAC TGT GTA GGC TGG AGC TGC TTC G</i> -3'
DAB2 (Reverse)	5'- <i>GTC TTC TGG TTT GAA TTC ATC CAT TTA ACA CCC CAC</i> <i>TAA AAG CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG</i> -3'
SAB1 (Forward)	5'-GAT CTG CGG TTC GCC ACG TT-3'
SAB2 (Reverse)	5'- CAC CGC CGC GTG AAG TTC TGG -3'

c) Extracción de ADN. Para comprobar la mutación del gen *aroB* se extrajo el ADN cromosomal de las cepas candidatas de acuerdo a las instrucciones de QIAGEN Mini-isolation kit (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA).

d) Transformación por ADN. Las cepas se transformaron usando el método de electrotransformación (Sharma y Schimke., 1996).

e) Transformación por transducción.

Las derivadas *Xyl*⁺ y *aroB* de la cepa PB12PTS⁻Glc⁺, fueron obtenidas por transducción con el fago P1 (Silhavy et al., 1984) usando a la cepa ATCC47002 y ATCC47002::*cat* respectivamente como donadoras. El gen *aroB* está interrumpido con un cassette que confiere resistencia a cloramfenicol, por lo cual se aislaron transductantes en medio Luria y se seleccionaron a las mutantes capaces de crecer con cloramfenicol a 30 µg/ml. A estas cepas se le hicieron dos pruebas. La primera fue una prueba fenotípica, ya que estas cepas deben ser incapaces de crecer en medio mineral con glucosa sin aminoácidos aromáticos. Las cepas seleccionadas no pueden crecer en este medio sin suplemento de estos aminoácidos. Adicionalmente se realizó un PCR con los oligonucleótidos que son complementarios a los extremos del gen que codifica para la resistencia a cloramfenicol. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa, y se obtuvo un fragmento de un tamaño de 1200 pb de la región interrumpida que era lo esperado (no se presentan datos).

f) Mutagénesis del gen *aroB* con el método de Datsenko y Wanner.

Este método para interrumpir genes de *Escherichia coli* fue desarrollado por Kirrill A. Datsenko y Barry L. Wanner (2000). El procedimiento utiliza la recombinasa del fago λ, la cual es sintetizada en un plásmido de bajo número de copias (pKD46) curable por temperatura e inducida bajo el control de un promotor inducible por arabinosa. El gen que se desea reemplazar se selecciona con un gen de resistencia a cloramfenicol que es generado por PCR utilizando oligonucleótidos que tienen aproximadamente 36 nucleótidos homólogos al gen que se desea remover y nucleótidos con secuencias de homología plásmido pKD46. Los oligonucleótidos utilizados para este procedimiento han sido descritos y se presentan en la tabla 4. La cepas JM101PTS⁺Glc⁺ y PB12PTS⁻Glc⁺ fueron transformadas con el plásmido PKD46, el cual tiene un cassette de resistencia a ampicilina (Ap^r). Se platearon éstos cultivos en cajas de Luria con ampicilina a una concentración de 200 µg/ml. Se aisló una colonia de cada cepa y se hicieron electrocompetentes en medio SOB con 0.1mM de arabinosa. Estas células electrocompetentes fueron transformadas con el producto de PCR antes mencionado, el cual tiene una secuencia homóloga a los extremos del gen *aroB* y también el gen de resistencia a Cm. Las células transformadas se dejaron recuperar durante 3 horas a 30°C y posteriormente fueron plateadas

en cajas con Cm 30 $\mu\text{g/ml}$ (Cm³⁰) y se incubaron toda la noche a 42°C. De las colonias resistentes a cloramfenicol se resembraron 10, y se le hicieron pruebas de resistencia a ampicilina (Amp²⁰⁰) y Cm (Cm³⁰). Se seleccionaron aquellas colonias que fueron resistentes a Cm y sensibles a Amp. A estas colonias seleccionadas se le hicieron pruebas de PCR con oligonucleótidos (SAB1, SAB2) que están a 200 pb de los extremos del gen *aroB*. De las colonias seleccionadas, fue elegida una por cada cepa candidata que tenía el tamaño de producto deseado (aproximadamente 1221 pares de bases, datos no mostrados). Los productos de PCR fueron secuenciados y los resultados de la secuenciación indicaban que en lugar del gen *aroB* se encontraba el cassette de Cm^r en las derivadas de ambas cepas.

6.3 Condiciones de cultivo.

a) Composición del medio mínimo M9.

El medio mínimo M9 contiene los siguientes compuestos por litro: Na₂HPO₄ (6 gr), KH₂PO₄ (3 gr), NaCl (0.5 gr), NH₄Cl (1 gr), MgSO₄ (2 mM), CaCl₂ (0.1 mM), Vit B1(0.01 gr) y la(s) fuente(s) de carbono a la concentración indicada posteriormente para matraces klett y fermentadores.

b) Composición del medio Luria (LB).

El medio Luria contiene los siguientes compuestos por litro: 10 gr de triptona, 5 gr de extracto de levadura, 10 gr NaCl, 1.5% de bacto agar.

c) Composición del medio mínimo ARO.

El medio mínimo ARO contiene los siguientes compuestos por litro: K₂HPO₄ 14gr, KH₂PO₄ 16gr, NH₄SO₄ 5gr, MgSO₄ 1gr. Para la preparación del preinóculo el medio ARO fue suplementado con 15 gr/L de extracto de levadura. Las células en reposo fueron resuspendidas en medio ARO adicionado con L-tirosina (8 mg/L), L-triptófano (4 mg/L), L-fenilalanina (8 mg/L), ácido paraminobenzoico (62 mg/L), ácido dihidroxibenzoico (35 mg/L) y ácido parahidroxibenzoico (2 mg /L). La(s) fuente(s) de carbono se ajustaron a la concentración indicada en el inciso h.

d) Preparación del preinóculo.

Se tomó una asada proveniente de un congelado en glicerol de cada cepa y se inoculó en tubos de ensaye con 3 ml de medio LB. En el caso de la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ se adicionó al medio (Km) a una concentración final de 30 $\mu\text{g/ml}$. Los tubos se incubaron toda la noche a 37°C.

e) Preparación del inóculo.

El inóculo se preparó en matraces con baffles con 50 ml de M9-glucosa (2 gr/L) y Km (30 $\mu\text{g/ml}$). A este medio le fue inoculado 200 μl del preinóculo, el cual fue incubado a 37°C por 12 horas aproximadamente.

f) Cultivos en matraces Klett.

Las cinéticas de crecimiento se realizaron en matraces klett bafleados de 125ml. El volumen de trabajo fue de 20 ml de medio M9 y 2 gr/L de la fuente de carbono; cuando se usaban dos fuentes de carbono se le agregaba 1 gr/L de cada fuente. Los cultivos se iniciaron con una densidad de 10 klett. Se usó la incubadora marca Brinkmann 1100 (N.Y., USA). Los cultivos se agitaron a 300 rpm y a una temperatura de 37°C. Las mediciones de densidad óptica se realizaron cada hora con el nefelómetro Klett Summerson (N.Y, USA).

g) Cultivos por lote en fermentador

Los cultivos en fermentador se realizaron por duplicado en fermentadores de un litro marca Applikon (Autoclavable Bio Reactor) equipado con las consolas siguientes: ADI 1010 BioControler y ADI 1025. Las fermentaciones iniciaron con una densidad óptica de 0.1 (600 nm). El medio usado fue M9 con 4 gr/L de las fuentes de carbono seleccionadas. En los cultivos con dos fuentes de carbono se usaron 2 gr/L de cada fuente de carbono. El IPTG se agregó al inicio de la fermentación a una concentración final de 0.1 mM. Las condiciones del cultivo se mantuvieron a una temperatura de 37°C, la agitación a 600 rpm y el pH a 7 ajustado con NH₄OH (2%). Para calcular las μ y patrones de consumo de las fuentes de carbono, se tomó muestra cada hora, midiendo la densidad óptica en espectrofotómetro a 600 nm y centrifugando muestras para análisis posterior de las fuentes de carbono y compuestos aromáticos por HPLC.

h) Cultivo de células en reposo.

El sistema de células en reposo se ha aplicado a nivel de estudios teóricos de producción y bioprocesos de varios compuestos entre ellos: DAHP, fenilalanina, ácido láctico, acetoina y nisina. En este sistema las células se mantienen sin crecimiento pero en estado metabólico activo. Desde el punto de vista de bioproceso el sistema tiene varias ventajas para el escalamiento. Por otro lado, a nivel de estudios teóricos, es un sistema relativamente simple para evaluar la producción de metabolitos en “cuasi-estado estable”, es decir, los nutrientes y las condiciones ambientales tienen un cambio mínimo. En este estudio se decidió usar las cepas PB12PTS⁻Glc⁺*aroB*(pRW300*aroG*^{*fab*}, pCL*tktA*) y JM101*aroB*(pRW300*aroG*^{*fab*}, pCL*tktA*) para analizar la producción de DAHP en virtud de que estas cepas tienen bloqueada la vía de biosíntesis de aromáticos, así la cantidad de DAHP es proporcional al flujo de carbono dirigido hacia la vía aromática.

Los inóculos de las cepas PB12PTS⁻Glc⁺*aroB*(pRW300*aroG*^{*fab*}, pCL*tktA*) y JM101*aroB*(pRW300*aroG*^{*fab*}, pCL*tktA*) fueron crecidos durante 12 horas en medio mineral ARO, con extracto de levadura (15 gr/L) y glucosa (10 gr/L) y se cosecharon al final de la fase logarítmica. Estos inóculos, se centrifugaron y lavaron dos veces con medio mineral, y fueron resuspendidos en medio mínimo ARO a una densidad óptica (600nm) entre 4 y 3. Al medio le fue adicionado

tirosina (8 mg/L), triptófano (4 mg/L) , fenilalanina (8 mg/L) , ácido paraminobenzoico (62 mg/L), ácido dihidroxibenzoico (35 mg/L) y ácido parahidroxibenzoico (2 mg /L). Este experimento se realizó en matraces de 250 mL con baffles; el volumen de trabajo fue de 50mL. Se utilizaron 7.5 gr/lt de todas las fuentes de carbono, excepto en las mezclas de fuente de carbono que se usaron 3.5 gr/L de cada fuente. La composición del medio ARO no permite la formación de biomasa y por tanto el crecimiento, manteniendo a las “células en reposo”. Sin embargo, las células siguen activas metabólicamente y pueden canalizar el carbono hacia la biosíntesis de compuestos aromáticos (Liao et al., 1994 y Báez et al., 2000).

Las células en reposo se trataron con IPTG después de 1 hora de iniciada la fermentación. El IPTG se adicionó a una concentración de 0.1 mM, excepto en la prueba de inducción a varias concentraciones del inductor. Se tomaron muestras de 1 mL cada dos o tres horas, se determinó la densidad óptica con espectrofotómetro a 600 nm, se centrifugó la muestra y se guardó el sobrenadante para analizar por HPLC las fuentes de carbono y el DAHP. El análisis de DAHP fue realizado con el ensayo del ácido tiobarbitúrico.

6.4 Determinación de parámetros cinéticos.

a) Cálculo de la velocidad específica de crecimiento (μ).

La μ fue calculada en la fase logarítmica con la ecuación de crecimiento $X_t = X_0 e^{\mu t}$, donde

X_t = biomasa (gr/L) al tiempo t

X_0 = biomasa inicial (gr/L)

μ = velocidad específica de crecimiento

t = tiempo (hr)

Las μ fueron determinadas ajustando los datos de biomasa contra el tiempo con regresión exponencial, los coeficientes de correlación siempre fueron iguales o mayores a 0.98.

b) Cálculo de rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$)

El rendimiento de biomasa ($Y_{x/s}$) fue estimado como el coeficiente de regresión lineal de la concentración de la concentración de biomasa (gr/L) contra la concentración de sustrato (mmolC de sustrato(s) / L) (glucosa, arabinosa, glicerol, xilosa y las mezclas correspondientes) (s). Los coeficientes de correlación siempre fueron mayores 0.97.

c) Cálculo de consumo específico de azúcares (q_s)

La velocidad específica de consumo de fuentes de carbono (q_s) fue determinada como la relación de μ y $Y_{x/s}$.

d) Cálculo de producción específica de DAHP, DHS y SHIK.

La producción específica de DAHP, DHS y SHIK (q_{DAHP} , q_{DHS} , q_{SHIK}) fue determinada calculando por cada producto el rendimiento producto/ biomasa ($Y_{\text{prod}/X}$) y multiplicando cada una por el valor de μ . correspondiente.

6.5 Métodos analíticos.

a) Medición de absorbancia.

La densidad óptica (600nm), absorbancia de la coloración obtenida con el ensayo del ácido tiobarbitúrico (549 nm) y absorbancia del NAD^+ (340 nm) generado por el ensayo de medición del gluconato (ver inciso b), fueron medidos con el espectrofotómetro Lambda 11 Perkin Elmer, Pomona, CA. La DO_{600} fue convertida a paso seco usando la relación $1 \text{ DO} = 0.37 \text{ gr/L}$ de biomasa seca.

b) Medición de la concentración de las fuentes de carbono.

Las concentraciones de fuentes de carbono y metabolitos producidos fueron determinados por cromatografía líquida a alta presión (HPLC) con una columna Aminex HPX-87H (300 X 7.8 mm; $9\mu\text{M}$), Bio Rad, CA, USA. La fase móvil fue H_2SO_4 5mM con un flujo de 0.5 ml/min y a una temperatura de 50°C . La D-glucosa, L-arabinosa, L-xilosa, D-glicerol y ácido acético fueron medidos por arreglo de fotodiodos a 210nm. El D-gluconato fue medido con el kit enzimático D-Gluconic acid/D-Glucono-d-lactone (Boehringer-Mannheim/ R-Biopharm).

c) Medición de DAHP y otros intermediarios aromáticos.

Las concentraciones de SHIK y DHS determinadas por HPLC con una columna Aminex HPX-87H (300 X 7.8 mm; $9\mu\text{M}$), Bio Rad, CA, USA. La fase móvil fue H_2SO_4 5mM con un flujo de 0.5 ml/min y a una temperatura de 50°C . La medición de DAHP es conocida como la técnica del ácido tiobarbitúrico. La técnica fue desarrollada por Srinivasan y Sprinson en 1959, y se basa en la coloración rosa que desarrolla el β -formilpiruvato (derivado del DAHP) al reaccionar con el periodato de sodio. La absorbancia de la coloración rosa es medida a 549 nm. y el valor de la concentración de DAHP se determina con la siguiente fórmula:

$$\text{Abs}_{549} \times 334 \times \text{dilución} = \text{nanomoles DAHP/ml de sobrenadante.}$$

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1 Crecimiento en matraz de la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ con fuentes de carbono que se metabolizan por la vías glicolíticas: Embden-Meyerhoff-Parnas, pentosas fosfato y Entner-Doudoroff.

La cepa PB12PTS⁻Glc⁺ se creció en glucosa, arabinosa, glicerol, gluconato y xilosa. Se obtuvo una μ en glucosa de 0.40 hr^{-1} , lo cual está de acuerdo a varios de los reportes anteriores (Flores et al., 1996; Flores et al., 2004). Las μ en arabinosa y gluconato fueron mayores que en glucosa (0.52 hr^{-1}) y la μ en glicerol fue de 0.40 hr^{-1} . La cepa no creció cuando se suplementó como fuente de carbono a la xilosa. Adicionalmente, se creció a la cepa en glucosa combinada con los azúcares no PTS en los que era capaz de crecer. La cepa PB12PTS⁻Glc⁺ incrementa su μ en las combinaciones de azúcares con relación a la cepa crecida solo en glucosa (tabla 5). Las μ determinadas son el resultado de cinco fermentaciones independientes con una desviación estándar (DS) de 0.03. En las curvas de crecimiento no se observa fase diaúxica aparente. Por otra parte se realizaron curvas de crecimiento con mezclas de dos azúcares no PTS, arabinosa-glicerol y gluconato-glicerol. La diauxia no fue aparente en ambas condiciones al menos en la fermentación realizada en matraces Klett (figura 8).

7.2 Crecimiento en matraz de la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ con fuentes de carbono que se metabolizan por la vía gluconogénica y ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA).

Se hicieron curvas de crecimiento de la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ en malato, succinato, citrato, piruvato y glutamato como únicas fuentes de carbono y combinadas con glucosa. Las μ se reportan en la tabla 6. Las μ determinadas son el resultado de cuatro fermentaciones independientes con una DS de 0.03. En las curvas de crecimiento con doble fuente de carbono no se detectó fase diaúxica aparente, la μ disminuye con respecto al crecimiento en glucosa en el caso de citrato y glutamato ($0.35, 0.36 \text{ hr}^{-1}$), en el resto de las fuentes de carbono las μ mantienen en $0.39\text{-}0.42 \text{ hr}^{-1}$. De experimentos realizados con glucosa y piruvato a dos diferentes concentraciones se obtuvo un ligero decremento en la μ (tabla 6). También se realizó una curva de crecimiento con mezclas de tres fuentes de carbono, glucosa, arabinosa y piruvato a varias concentraciones y los resultados se muestran también en la tabla 6. Considerando que la μ de la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ en arabinosa es de (0.50 hr^{-1}) y la μ en glucosa-arabinosa de (0.55 hr^{-1}), la presencia de piruvato disminuye la μ en arabinosa y glucosa-arabinosa. Se sabe que la ausencia del operon *ptsHIcrr* causa la incapacidad de crecer en sustratos que son intermediarios de TCA (Neidhart., 1987). Lo anterior debido a que éstas mutantes tienen un

nivel residual de síntesis de AMPc que no es suficiente para que se expresen los operones de las siguientes fuentes de carbono: succinato, citrato, malato y glutamato.

Tabla 5. Velocidades específicas de crecimiento (μ) de la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ en varias fuentes de carbono que se metabolizan por las vías glicolíticas.

FUENTE DE CARBONO	μ (hr ⁻¹)	FUENTES DE CARBONO	μ (hr ⁻¹)
Glucosa	0.40	Gluc-Arabinosa	0.55
Glicerol	0.40	Gluc-Gluconato	0.53
Arabinosa	0.52	Gluc-Glicerol	0.48
Xilosa	0.00	Glicerol-Arabinosa	0.46
Gluconato	0.50	Glicerol-Gluconato	0.40

Tabla 6. Velocidades específicas de crecimiento (μ) de la cepa de la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ en varias fuentes de carbono que se metabolizan por las vías glicolíticas, gluconeogénicas y TCA.

FUENTES DE CARBONO	gr/L (de cada fuente)	μ (hr ⁻¹)
Succinato	2.00	0.09
Acetato	2.00	0.10
Malato	2.00	0.09
Citrato	2.00	0.09
Glc-Cit	1,1	0.36
Glc-Mal	1,1	0.37
Glc-Suc	1,1	0.37
Glc-Acet	1,1	0.48
Glucosa-Piruvato	1,1	0.39
Glucosa-Piruvato	1.5, 0.5	0.42
Arabinosa-Piruvato	1,1	0.40
Arabinosa-Piruvato	2, 0.25	0.38
Ara-Gluc-Pir	1,1,1	0.38
Ara-Gluc-Pir	1,1,0.5	0.37
Ara-Gluc-Pir	1,1,0.25	0.37

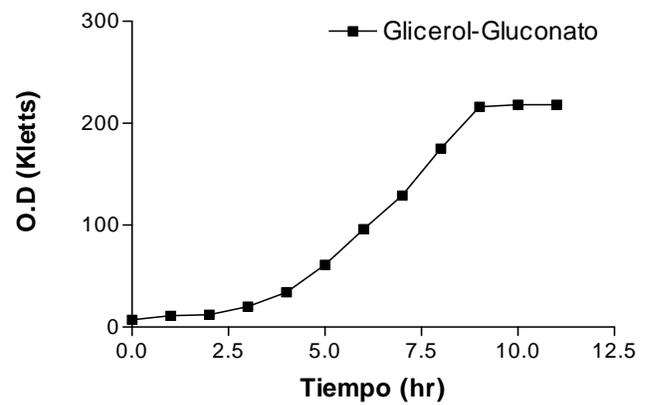
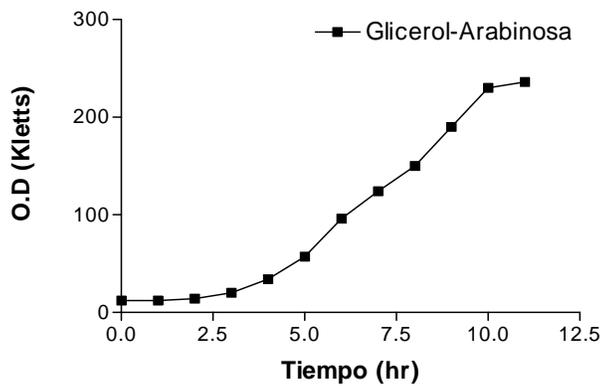
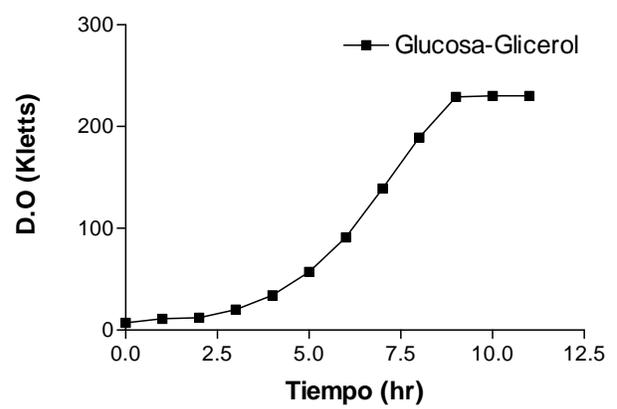
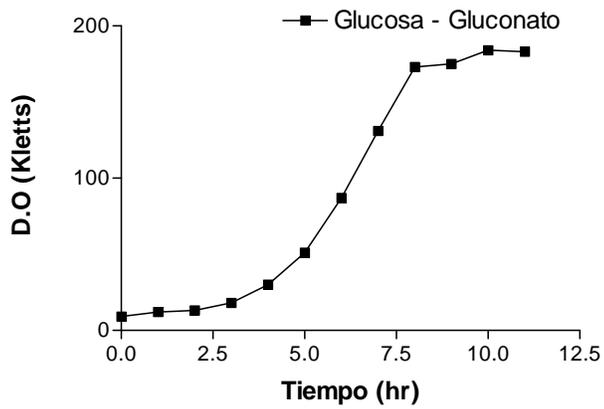
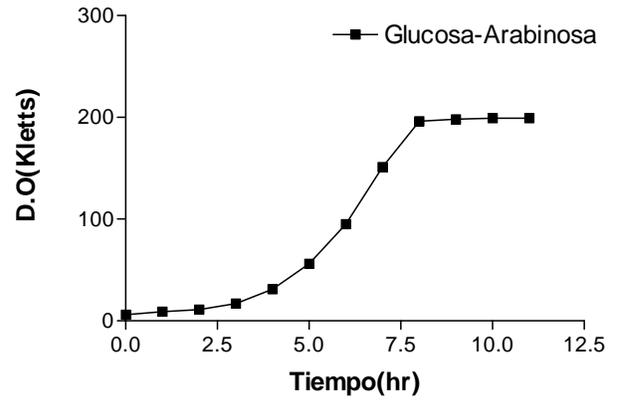
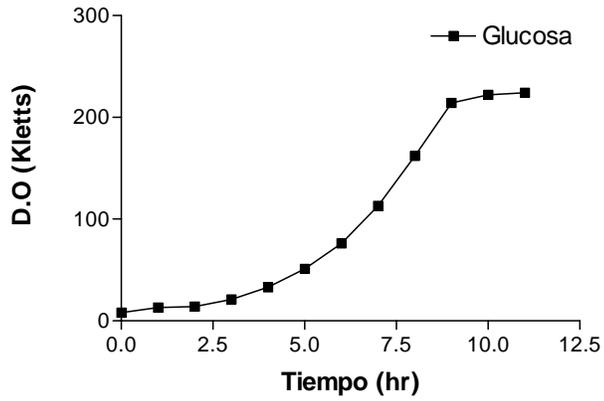


Figura 8. Curvas de crecimiento de la cepa PB12PTS^{Glc} en diferentes fuentes de carbono.

7.3 Parámetros cinéticos de los crecimientos en fermentador de las cepas PB12PTS⁻Glc⁺ y la silvestre JM101PTS⁺Glc⁺ con una sola fuente de carbono.

Desde el punto de vista biotecnológico la determinación del rendimiento de las μ y de asimilación de fuente de carbono (q_s) son de importancia ya que es un reflejo del estado fisiológico del cultivo y es un parámetro de proceso importante. Por lo anterior se determinaron los anteriores parámetros cinéticos de las cepas JM101PTS⁺Glc⁺ y PB12PTS⁻Glc⁺ crecidas en fermentador una sola fuente de carbono tal y como se señala en la sección 6.4.

La μ de la cepa PB12PTS⁻Glc⁻ es menor que la silvestre JM101 aún en los azúcares no PTS. La μ en arabinosa de la cepa PTS⁻ es de 0.5 hr⁻¹, mientras que el de la cepa parental es de 0.68 hr⁻¹; es decir su μ se redujo en un 26%. En el caso del glicerol la μ de la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ fue de 0.32 hr⁻¹ y en la cepa parental fue de 0.47 hr⁻¹. Adicionalmente la cepa silvestre crece en xilosa ($\mu=0.37$ hr⁻¹), mientras que la cepa PTS⁻ perdió la capacidad de crecer en este sustrato. Los resultados (tabla 6) anteriores son congruentes con la disminución de la q_s de las fuentes de carbono de la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ respecto a la cepa JM101PTS⁺. Sin embargo, cabe recalcar, que el rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$) es siempre mayor en la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ y la producción de ácido acético es menor que en la cepa silvestre. Los parámetros cinéticos de crecimiento son el resultado de dos crecimientos en fermentador independientes; las DS de las fermentaciones son de 0.042. Como se había señalado anteriormente una cepa carente del sistema PTS puede afectarse en su μ aún en fuentes de carbono no PTS, esto tal vez debido a la ausencia de la enzima EIIA^{glc} que pudiera afectar los niveles de AMPc intracelular. Sin embargo en la cepa PB11PTS⁻Glc⁻ parental de la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ pareciera haber suficiente AMPc (Flores et al., 2005a).

Tabla 7. Parámetros cinéticos de la cepas JM101PTS⁺ y PB12PTS⁻Glc⁺ en una sola fuente de carbono crecidas en fermentador.

FUENTE DE CARBONO	JM101PTS ⁺			PB12PTS ⁻ Glc ⁺		
	μ (hr ⁻¹)	Y _{x/s}	q _s (mmol C/ gr. p.seco biomasa *hr)	μ (hr ⁻¹)	Y _{x/s}	q _s (mmol C/ gr. p.seco biomasa *hr)
Glucosa	0.72	0.34	71.88	0.42	0.50	24.50
Arabinosa	0.68	0.15	155.84	0.50	0.27	62.50
Glicerol	0.47	0.33	43.90	0.32	0.32	37.17
Gluconato	0.69	0.15	80.00	0.51	0.32	42.50

7.4 Parámetros cinéticos de los crecimientos en fermentador con dos fuentes de carbono de las cepas PB12PTS⁻Glc⁺ y JM101PTS⁺Glc⁺.

La inexistencia de una fase diaúxica en crecimiento en matraces además del aumento en la μ (μ mayor a 0.4 +/- 10%) fue indicativo de una posible cointilización de los azúcares del medio de cultivo como previamente se había reportado para el caso de la mezcla glucosa-acetato (Flores et al., 2005). Por lo tanto, de las cinéticas de crecimiento en matraces se seleccionaron las mezclas de azúcares que en principio serían cointilizadas por la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ y la cepa silvestre JM101PTS⁺Glc⁺. Para este análisis se eligieron las siguientes mezclas: glucosa-arabinosa, glucosa-glicerol, glucosa-gluconato y glicerol-arabinosa. Las tres primeras se seleccionaron porque en estas combinaciones se obtuvieron mayores μ . La combinación de dos fuentes de carbono no PTS arabinosa-glicerol fue elegida porque en los matraces no siempre era evidente una fase diauxica. La cepa PB12PTS⁻Glc⁺ consume simultáneamente los carbohidratos de las mezclas glucosa-arabinosa y glucosa-gluconato (figura 9A). En el caso de la mezcla glucosa-glicerol el consumo de glicerol se retarda en las primeras dos horas de crecimiento. Por otro lado, el patrón de consumo de arabinosa-glicerol es diferente a los anteriores ya que la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ consume primeramente arabinosa y después glicerol (figura 9B), es decir la arabinosa reprime catabólicamente a glicerol, lo cual demuestra que la represión catabólica por azúcares tipo no PTS sigue presente en esta cepa. De acuerdo con lo esperado, la cepa parental JM101PTS⁺Glc⁺, tiene un consumo secuencial de los azúcares, consumiendo primero aquella fuente de carbono que mantiene la mayor μ . Debido a la alta μ de la cepa JM101PTS⁺Glc⁺, particularmente en la mezcla de glucosa y arabinosa, es difícil estimar eficazmente los parámetros cinéticos, así como el rendimiento de la segunda fuente de carbono, por lo que los datos cinéticos correspondientes a la segunda fuente de carbonos son aparentes. La fuente preferida de carbono es glucosa ($\mu = 0.72 \text{ hr}^{-1}$), posteriormente arabinosa ($\mu = 0.64 \text{ hr}^{-1}$) y al final glicerol ($\mu = 0.38 \text{ hr}^{-1}$) (figura 9A). En el caso de JM101PTS⁺Glc⁺, crecida en la mezcla arabinosa y glucosa, es de llamar la atención que el consumo de arabinosa comienza aún antes de que la glucosa se haya consumido totalmente del medio de cultivo, es decir que la velocidad de respuesta es la más rápida en condiciones de limitación de la fuente de carbono preferencial. En el caso de glucosa y glicerol el consumo de la segunda fuente comienza después de media hora de acabada la glucosa, al igual que en el caso de arabinosa y glicerol. El tiempo de consumo en JM101 de las tres combinaciones de azúcares es menor respecto al tiempo de consumo de los mismos por PB12PTS⁻Glc⁺, contrario a lo reportado en otras cepas PTS⁻Glc⁺ (Hernández-Montalvo; 2001). Sin embargo, esta menor velocidad de consumo también está ligada a una menor generación de ácido acético y un mayor rendimiento de biomasa/fuente de carbono (tabla 8). La cantidad de ácido acético total producido depende de la combinación de azúcares utilizada y también de la cepa. En general la cepa PTS⁺ produce más

ácido acético en las mismas fuentes de azúcares, aunque la excepción es la mezcla arabinosa-glucosa, donde ambas cepas alcanzan la misma concentración final de ácido acético (figura 9A). Una característica de la q_s de la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ en glucosa es que es menor a la cepa parental. Adicionalmente los azúcares no PTS estudiados se transportan a mayor velocidad que la propia glucosa, de lo anterior se deduce que la ventaja de cointilizar dos fuentes de carbono es la introducción de mas moles de carbono por unidad de tiempo cuando crece en glucosa (ver tablas 7 y 8). Los parámetros cinéticos de crecimiento son el resultado del promedio de dos crecimientos independientes en fermentador; las DS son de 0.050. También es importante hacer mención que la q_s de las fuentes cointilizadas tienen valores que están en un rango muy pequeño (35.50 a 40.80), lo cual indica que las capacidades de transporte de cointilización no son arbitrarias y están aparentemente controladas por la misma capacidad metabólica de la cepa.

Tabla 8. Parámetros cinéticos de las cepas JM101PTS⁺ y PB12PTS⁻Glc⁺ en mezclas de dos fuentes de carbono.

FUENTE DE CARBONO	JM101PTS ⁺			PB12PTS ⁻ Glc ⁺		
	μ (hr ⁻¹)	Yx/s	q_s (mmol C/ gr. p.seco biomasa*hr)	μ (hr ⁻¹)	Yx/s	q_s (mmol C/ gr. p.seco biomasa*hr)
Glucosa-arabinosa	0.72-0.64	0.59-0.32	40.68-7.64	0.55	0.48	38.19
Glucosa-glicerol	0.72-0.45	0.55-0.38	43.11-8.55	0.5-0.20	0.45-0.55	38.23-9.24
Glucosa-gluconato	0.72-0.33	0.59-0.42	70.33-2062	0.32	0.35	40.80
Glucosa-acetato	0.71-0.06	_____	44.90-7.30	0.51	_____	35.50

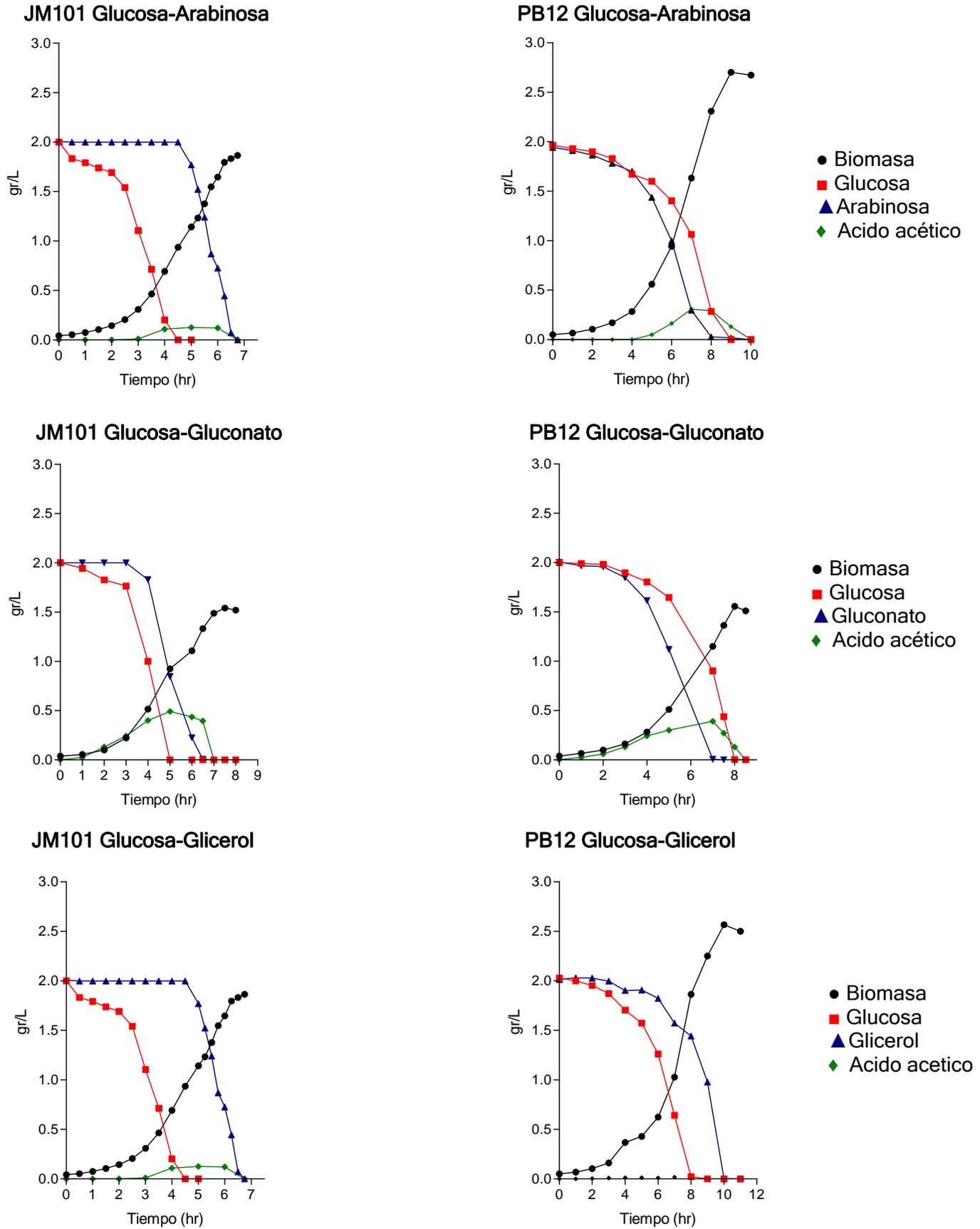
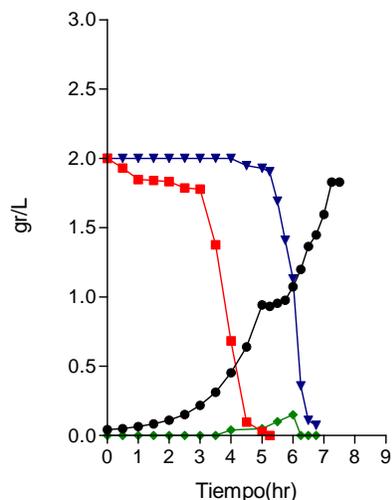


Figura 9A. Patrón de consumo y curva de crecimiento en fermentador en mezclas de dos fuentes de carbono de la cepas JM101PTS⁺Glc⁺ y PB12PTS⁻Glc⁺.

JM101 Arabinosa-Glicerol



PB12 Arabinosa-Glicerol

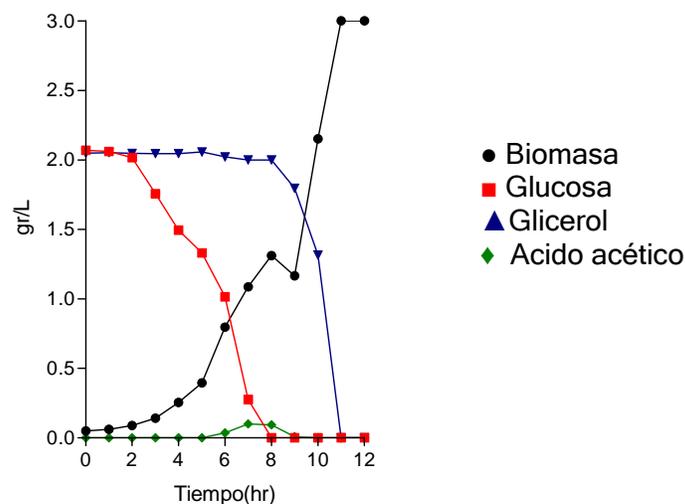


Figura 9B. Patrón de consumo y curvas de crecimiento en fermentador de las cepas JM101 PTS⁺Glc⁺ y PB12PTS⁻Glc⁺ en arabinosa y glicerol.

7.5 Transformación de la cepa PB12PTS⁻Xyl⁻ a PB12PTS⁻Xyl⁺ y medición de patrones de consumo de azúcares.

Los estudios de crecimiento en matraces de la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ en xilosa demostraron que la cepa no poseía la capacidad de crecer en este sustrato. Con la finalidad de que la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ recuperara la capacidad de crecer en xilosa, se le hizo la transferencia del gen Xyl⁺ por transducción usando el fago P1. La cepa donadora fue la ATCC47002. Se aislaron colonias de PB12PTS⁻Glc⁺ que pudieron crecer en M9-xilosa. A cepas candidatas se les hicieron pruebas de crecimiento en glucosa, xilosa y arabinosa. Se eligió a una candidata Xilosa⁺, la cual creció a una (μ) de 0.4, 0.30 y 0.52 hr⁻¹ en glucosa, xilosa y arabinosa respectivamente. Es claro que la incapacidad de crecer en xilosa de la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ no se debe a la ausencia del sistema PTS. Por otro lado, la μ en glucosa y arabinosa se mantiene en la cepa PB12PTS⁻Xyl⁺ por lo tanto es poco probable que el gen necesario para crecer en xilosa sea del metabolismo central. El gen que recuperó función podría ser alguno de los que codifican para transportador de xilosa (*xyIFGH*), la xilosa isomerasa (*xyIA*) o su respectiva quinasa (*xyIB*). A este respecto, se ha reportado que el *xyIB* contiene en su secuencia ocho guaninas (GGGGGGGG), el cual es un sitio altamente mutable en cepas sometidas a un proceso de presión selectiva (Funchain., et al 2000). Probablemente este gen es el que mutó en PB12PTS⁻Glc⁺, sin embargo se sugiere hacer un estudio de secuenciación del mencionado gen para comprobar dicha hipótesis.

Ya que los residuos agroindustriales más abundantes son los de bagazo de caña y la composición porcentual de los hidrolizados son xilosa (75%), arabinosa (10%) y glucosa (15%), se evaluó el patrón de consumo de estos tres azúcares en la mencionada proporción en la cepa PB12PTS⁻Xyl⁺, con el fin de analizar las condiciones en las cuales se utilizan estos hidrolizados. La concentración total de azúcares fue de 3.4 gr/L. En la tabla 9, se observa las concentraciones iniciales de cada uno de los azúcares. De acuerdo a los patrones de consumo de carbohidratos, la glucosa y arabinosa se consumen simultáneamente mientras que la xilosa es consumida en una segunda fase que corresponde con la terminación de los otros azúcares. En la curva de crecimiento se observa las dos fases de crecimiento y una fase lag intermedia de 2 horas; la μ de la primera fase es de 0.55 hr⁻¹ y de 0.33 hr⁻¹ para la segunda fase. Los datos indican que en la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ si hay represión catabólica por la mezcla glucosa-arabinosa sobre xilosa. Posteriormente se realizó una curva de crecimiento de la cepa PB12PTS⁻Xyl⁺ en matraces con una mezcla de glucosa y xilosa. La curva de la figura 10B muestra la inflexión en la curva de crecimiento lo que corresponde a un crecimiento diauxico, lo cual indica también que la glucosa reprime a la xilosa.

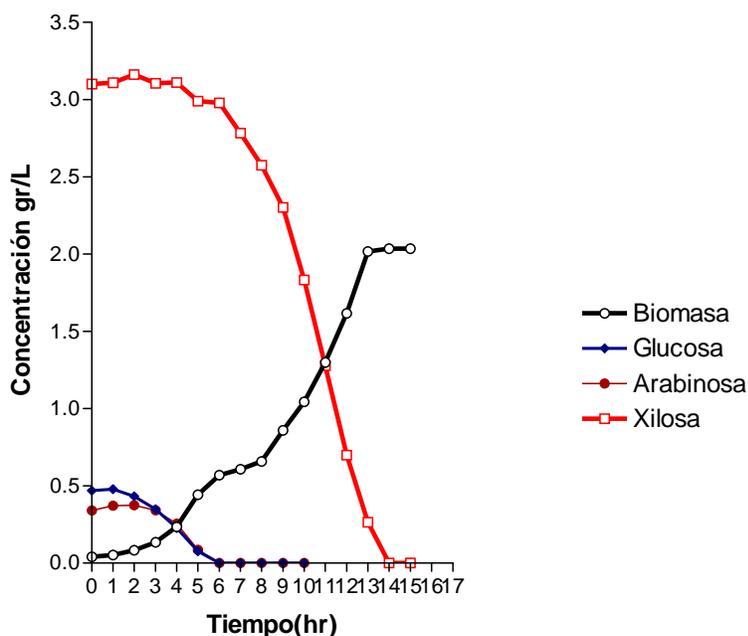


Figura 10A. Curvas de crecimiento y consumo de azúcares de cepa PB12PTS⁻Xyl⁺ en una mezcla de glucosa, arabinosa y glucosa.

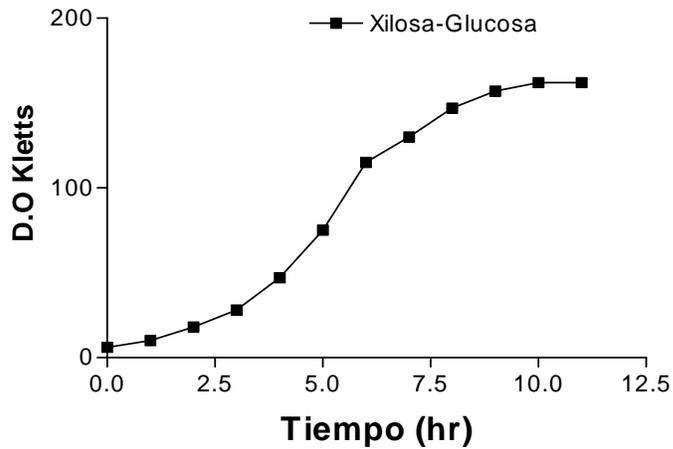


Figura 10B. Curvas de crecimiento de la cepa PB12PTS^{Xyl}⁺ en una mezcla de glucosa y xilosa.

Tabla 9. Consumo de una mezcla de arabinosa, xilosa y glucosa por la cepa PB12PTS^{Xyl}⁺

Tiempo (hr)	Arabinosa (gr/L)	Glucosa (gr/L)	Xilosa (gr/L)
0	0.39	0.52	2.54
1	0.38	0.48	2.52
2	0.36	0.46	2.51
3	0.33	0.40	2.49
4	0.30	0.29	2.48
5	0.16	0.13	2.42
6	0.03	0.00	2.28
7	0.00	0.00	2.16
8			2.07
9			1.86
10			1.48
11			1.04
12			0.65
13			0.00
14			0.00

7.6 Inactivación del gen *aroB* en la cepa PB12PTS^{Glc}⁺.

7.6.1 Inactivación mediante transducción usando el fago P1.

Con la finalidad de que la cepa PB12PTS^{Glc}⁺ tuviera interrumpido el gen *aroB* que codifica para la segunda enzima de la vía de los aminoácidos aromáticos (3-dehidroquinato sintasa), y así acumular DAHP, fue necesario transducir la secuencia de este gene interrumpido presente

en la cepa donadora ATCC47002 *aroB::cat* a la cepa PB12PTS⁻Glc⁺. Una prueba preliminar del consumo de fuentes de carbono, reveló que la arabinosa no estaba siendo consumida en el sistema de células en reposo, sino solamente la glucosa. Este es un evento no reportado con anterioridad. Una probable explicación a este comportamiento podría tener origen en el evento de transducción. Es importante mencionar que en el gen *aroB* se encuentra en un operón junto con otros ocho genes. Es de llamar la atención que dentro de este operón se encuentra el gen *rpe*. Este gen codifica para la ribulosa epímera que es la primera enzima que participa en el metabolismo de arabinosa y xilosa. Por tanto, si la cepa donadora tuviera defectuoso este gen es probable que lo haya transferido a cepa receptora junto con el gen de interés. La otra probabilidad es que la mutación del gen *aroB* tenga un efecto polar sobre la transcripción de los genes adyacentes a éste, sin embargo ésta posibilidad no ha sido reportada.

7.6.2 Interrupción del gen *aroB* mediante el método de Datsenko y Wanner.

Utilizando el método de Datsenko y Wanner que se menciona en la sección 6.2, se aislaron cepas *aroB*⁻ a partir de las cepas PB12PTS⁻Glc⁺ y JM101PTS⁺Glc⁺. Es importante mencionar que la cepa PB12PTS⁻Glc⁺*aroB*⁻ no puede crecer en medio mínimo con glucosa a menos que se le suplemente de los aminoácidos y vitaminas aromáticas. Cuando se suplementan en exceso estos compuestos en medio mínimo con glucosa la cepa PB12PTS⁻Glc⁺*aroB*⁻ puede crecer a una μ 0.34 hr⁻¹; sin embargo tiene una fase de retardo (lag) de 10 horas. Lo anterior indica que la cepa *aroB*⁻ tendrá un crecimiento menor que la cepa que expresa el gen *aroB* (experimentos realizados en este trabajo y comunicación personal de la estudiante de doctorado Inés Chávez).

7.7 Inducción de los genes presentes en los plásmidos pRW300*aroG^{fbr}* y pCL*tktA* a varias concentraciones de IPTG, en las diferentes cepas.

Con la finalidad de conocer la concentración de IPTG adecuado para la expresión de los genes *tktA* y *aroG^{fbr}* contenidos plásmidos pRW300 y pCL respectivamente, se realizó el estudio de producción de DAHP con células en reposo (ver sección 6.3) a varias concentraciones de IPTG (0.05, 0.1, 0.5 y 1 mM) con las cepas JM101PTS⁺*aroB*⁻ y PB12PTS⁻Glc⁺*aroB*⁻ transformadas con ambos plásmidos pRW300*aroG^{fbr}* y pCL*tktA*. La concentración de células utilizada fue de 3.5 densidades ópticas (aprox. De 1.3 gr/L de células). La mayor productividad de DAHP en la cepa PTS⁻ se obtuvo a una concentración de 0.1mM de IPTG; a mayores concentraciones la productividad decae hasta en un 50% (tabla 10). Por otra parte también el rendimiento es mayor a 0.1 mM de IPTG. Por otro lado la mayor productividad en la cepa PTS⁺ fue a 0.5 mM de IPTG (tabla 10); sin embargo la productividad está muy por debajo de la cepa PTS⁻. La productividad y rendimiento de la cepa PB12PTS⁻Glc⁺*aroB*⁻ (pRW300*aroG^{fbr}*, pCL*tkt*) en glucosa y sin tratamiento es de 0.23 mmol DAHP/ gr. células*hr y 0.20(mol/mol) respectivamente. La

productividad y rendimiento de la cepa JM101Glc⁺aroB⁻(pRW300aroG^{fb}r, pCLtkt) en glucosa y sin tratamiento es de 0.008 mmol DAHP/ gr. células*hr y 0.005 (mol/mol) respectivamente. Es importante mencionar que los valores obtenidos para la cepa silvestre y la derivada PTS⁻ son congruentes con los reportados para otras cepas (Báez et al., 2000).

Tabla 10. Productividades y rendimientos de DAHP la cepas PB12PTSGlc⁺aroB⁻(pRW300aroG^{fb}r, pCLtktA) (a) y JM101PTS⁺aroB⁻(pRW300aroG^{fb}r, pCLtktA) (b) a diferentes concentraciones de IPTG. (DS = 0.10).

a)

IPTG (mM)	Productividad específica (mmol DAHP/ gr. p. seco célula *hr)	Rendimiento (Yx/S)
0.05	0.450	0.260
0.10	0.460	0.500
0.50	0.260	0.350
1.00	0.210	0.390

b)

IPTG (mM)	Productividad específica (mmol DAHP/ gr. p. seco célula *hr)	Rendimiento (Yx/S)
0.05	0.012	0.008
0.10	0.013	0.010
0.50	0.018	0.011
1.00	0.015	0.008

7.8 Producción de DAHP de las cepas JM101PTS⁺aroB⁻ y PB12PTS⁻Glc⁺aroB⁻ transformadas con los plásmidos pRW300aroG^{fb}r y pCLtktA en diferentes combinaciones de dos fuentes de carbono en el sistema de células en reposo.

Como se señaló en materiales y métodos en este estudio se decidió usar las cepas PB12PTS⁻Glc⁺aroB⁻(pRW300aroG^{fb}r, pCLtktA) y JM101aroB⁻(pRW300aroG^{fb}r, pCLtktA) para analizar la producción de DAHP por la propiedad del sistema de células en reposo y además estas cepas tiene bloqueada la vía de biosíntesis de aromáticos, así la cantidad de DAHP es proporcional al flujo de carbono dirigido hacia la vía aromática. Las fuentes de carbono utilizadas fueron glucosa, arabinosa, acetato, glicerol y gluconato a una concentración aproximada de 7.0 gr/L cuando se utilizaron como única fuente de carbono. Se eligieron las mezclas de glucosa-arabinosa, glucosa-acetato, glucosa-glicerol y glucosa-gluconato para evaluar el efecto de la coutilización de estas tres fuentes de carbono sobre la productividad y rendimiento de DAHP. La figura 11 muestra la utilización de las diferentes fuentes de carbono y de la producción de DAHP. En todas las fuentes de carbono se indujo con 0.1 mM de IPTG. Las concentraciones de cada fuente de carbono fue de 3.5 gr/L en las mezclas de fuentes de carbono. Las fermentaciones se hicieron por triplicado, DS 0.085. Es importante mencionar que el análisis de HPLC indicó que las fuentes de carbono estaban siendo coutilizadas, en este sistema, por lo

cual la hipótesis del gen defectuoso transcrito fue la correcta. El rendimiento teórico en glucosa y arabinosa ha sido calculado por Liao y col. en (1996), realizando una inspección cuidadosa de las vías involucradas y un cálculo de flujos involucrados en la producción de DAHP (figura 7). Esta inspección es bastante aceptada para el cálculo de rendimientos debido a que las vías involucradas en la producción de DAHP no son complejas. Los máximos teóricos son aquellos alcanzados en una situación en donde no existen precursores metabólicos que sean dirigidos a la formación de biomasa, como es el caso del sistema de células en reposo (Liao et al., 1996). Debido a que no hay reportes del rendimiento máximo de DAHP cuando se usan glicerol, acetato y gluconato como fuentes de carbono, fue calculado el rendimiento teórico mediante el proceso sugerido por Liao y col. (1996) (figura 12). Por otra parte, la fórmula práctica de calcular el **rendimiento máximo teórico en dos fuentes de carbono** es la sugerida por Li y Frost (1999).

Rendimiento teórico máximo en dos fuentes de carbono =

$$\left[\text{Rendimiento teórico en glucosa} \right] \left[\text{Relación molar de glucosa consumida} \right] + \left[\text{Rendimiento teórico segunda fuente} \right] \left[\text{Relación molar de segunda fuente} \right]$$

Tabla 11. Parámetros cinéticos en la producción de DAHP de la cepa PB12PTSGlc⁺aroB (pRW300aroG^{fabr}, pCLtktA) en células en reposo en varias fuentes de carbono y mezclas.

Fuente(s) de carbono (F.C)	qDAHP (mmol DAHP/gr. p.seco cél *hr)	qs (mmol F.C/ gr peso seco cél hr)	Yreal (mmol DAHP/ mmol F.C)	Yteórico (mmol DAHP/ mmol F.C)	(Yreal/Yteórico)*100
Glucosa	0.42	0.4	0.56	0.86	65%
Arabinosa	0.95	0.67	0.71	0.71	100%
Acetato	0.00	0.00	0.00	0.21	-----
Gluconato	0.50	1.19	0.50	0.50	100%
Glicerol	0.36	4.68	0.13	0.42	30%
Glucosa-Arabinosa	0.95	1.55	0.74	0.81	91%
Glucosa-Acetato	0.67	2.91	0.32	0.32	100%
Glucosa-Glicerol	1.36	2.62	0.41	0.67	61%
Glucosa-Gluconato	0.76	1.14	0.41	0.69	60%

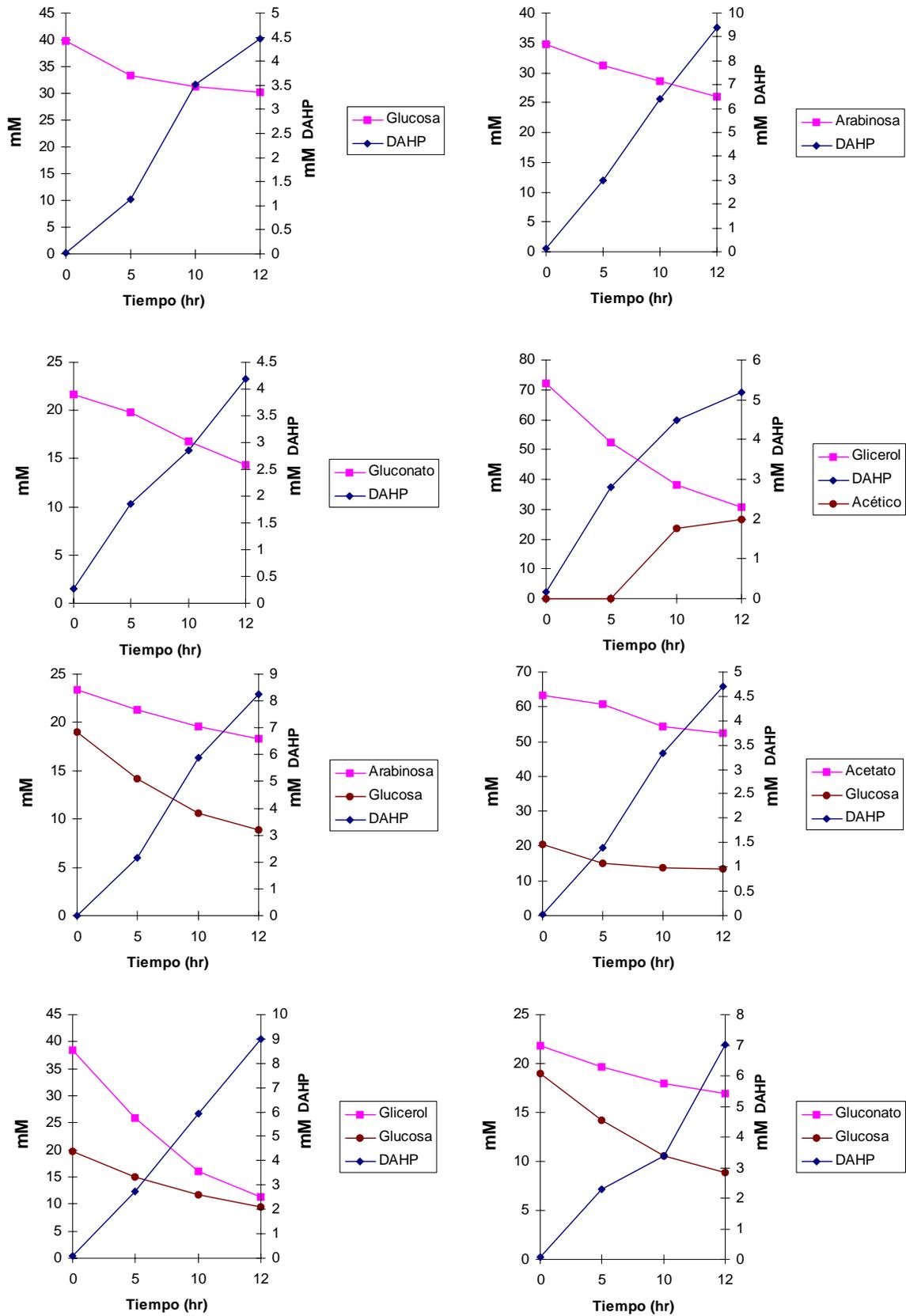


Figura 11. Consumo de diferentes fuentes de carbono y producción de DAHP en células en reposo de la cepa PB12PTSGlc⁺aroB(pRW300aroG^{fbr}, pCLtktA).

De acuerdo a los resultados que se muestran en la tabla 11, los rendimientos más altos en una sola fuente de carbono son en arabinosa y gluconato (100% del teórico). El rendimiento en glucosa es del 65% del teórico. La productividad específica de DAHP (mmolDAHP/gr p.s de células* hr) aumenta significativamente respecto a glucosa en arabinosa 0.95, glucosa-arabinosa 0.95 y glucosa-glicerol 1.37. La mayor productividad en estas fuentes de carbono puede ser resultado del mayor q_s , ya que se sabe que q_s y productividad están correlacionados. Sin embargo, glicerol tiene mayor q_s y similar productividad de DAHP que glucosa, aunque también tiene mayor producción de ácido acético (figura 11). Lo anterior indica que la cepa PB12PTS $Glc^+ aroB$ (pRW300 $aroG^{fbr}$, pCL $tktA$) posiblemente incrementa el flujo glicolítico cuando utiliza al glicerol como única fuente de carbono para aumentar así el flujo de Acetil-Coenzima A (AcCoA) para alimentar a TCA generando suficiente ATP, NADH y NADPH por la demanda de la sobreexpresión de los plásmidos pRW300 $aroG^{fbr}$ y pCL $tktA$. Lo anterior concuerda con reportes acerca de aumentos de flujo hacia AcCoA en cultivos crecidos en glicerol y sobreexpresando $tktA$ (Jung M et al., 2004).

Aunque no existen reportes de alto rendimiento en arabinosa en un sistema de células en reposo (100% teórico, tabla 11), se tienen reportes de alta productividad y rendimiento en xilosa con cepas PTS $^+$ (Liao, 1996). Lo anterior es atribuido a que existe una mejor distribución de PEP y E4P cuando se usa xilosa como fuente de carbono. Ya que arabinosa y xilosa son isómeros, ambos comparten el punto de entrada al metabolismo central (X5P) (figura 7a) y por lo tanto lo anterior podría explicar el alto rendimiento en arabinosa. A este respecto también se ha demostrado que cultivos en reposo con xilosa como fuente de carbono no necesitan la sobreexpresión de $tktA$. Sin embargo la cepa PB12PTS $Glc^+ aroB$ (pRW300 $aroG^{fbr}$, pCL $tktA$) si necesita la sobreexpresión de $tktA$ aún en arabinosa y arabinosa-glucosa como fuentes de carbono, ya que la productividad y rendimiento se disminuye a la mitad sin la sobreexpresión de $tktA$ (datos no mostrados).

Lo anterior indica que cuando la cepa metaboliza a la arabinosa aumentan las pozas de pentosas fosfatadas (figura 2), los cuales son sustrato de las transcetolasas (A y B) y transaldolasas (A y B) las cuales mandan el flujo hacia la vía EMP, lo anterior aumentaría el flujo hacia PEP y posteriormente a PYR. Lo anterior concuerda con la detección de un aumento de piruvato en el medio de cultivo (datos no mostrados). Cabe recordar que la cepa PB12PTS Glc^+ tiene ya un alto flujo glicolítico y tiene sobreexpresados varios genes glicolíticos en cultivos en glucosa (Flores et al., 2002; Flores et al., 2004). Por otra parte los rendimientos y productividades en la cepa silvestre JM101 $aroB$ transformada con los plásmidos (pRW300 $aroG^{fbr}$, pCL $tktA$) están muy por debajo de la cepa PB12PTS $Glc^+ aroB$ (pRW300 $aroG^{fbr}$, pCL $tktA$); (las fermentaciones se hicieron por triplicado. DS= 0.10). Lo cual indica que la sobreexpresión de $tktA$ y $aroG^{fbr}$ son insuficientes para redirigir el flujo de PEP

hacia la vía de aromáticos aún en azúcares no PTS. Lo anterior es contrario a lo reportado para otras cepas silvestres (Liao, 1996) (tabla 13). Esto confirma que la ausencia de PTS y probablemente las mutaciones en *rpoS* y *arcB* y el incremento en la expresión de *spoT* y *gpp* son favorables para aumentar la productividad en todas las fuentes de carbono en la cepa PB12PTSGlc⁺*aroB*(pRW300*aroG^{fbr}*, pCL*tktA*).

Tabla 12. Parámetros cinéticos en la producción de DAHP de la cepa JM101PTS⁺*aroB* (pRW300*aroG^{fbr}*, pCL*tktA*) en células en reposo.

Fuente de carbono (F.C)	qDAHP (mmol DAHP/gr p. seco cél *hr)	qs (mmol fuente de carbono/ gr p. seco cél* hr)
Glucosa	0.017	2.26
Arabinosa	0.027	0.08
Acetato	<0.01	-----
Gluconato	<0.01	-----
Glicerol	<0.71	-----

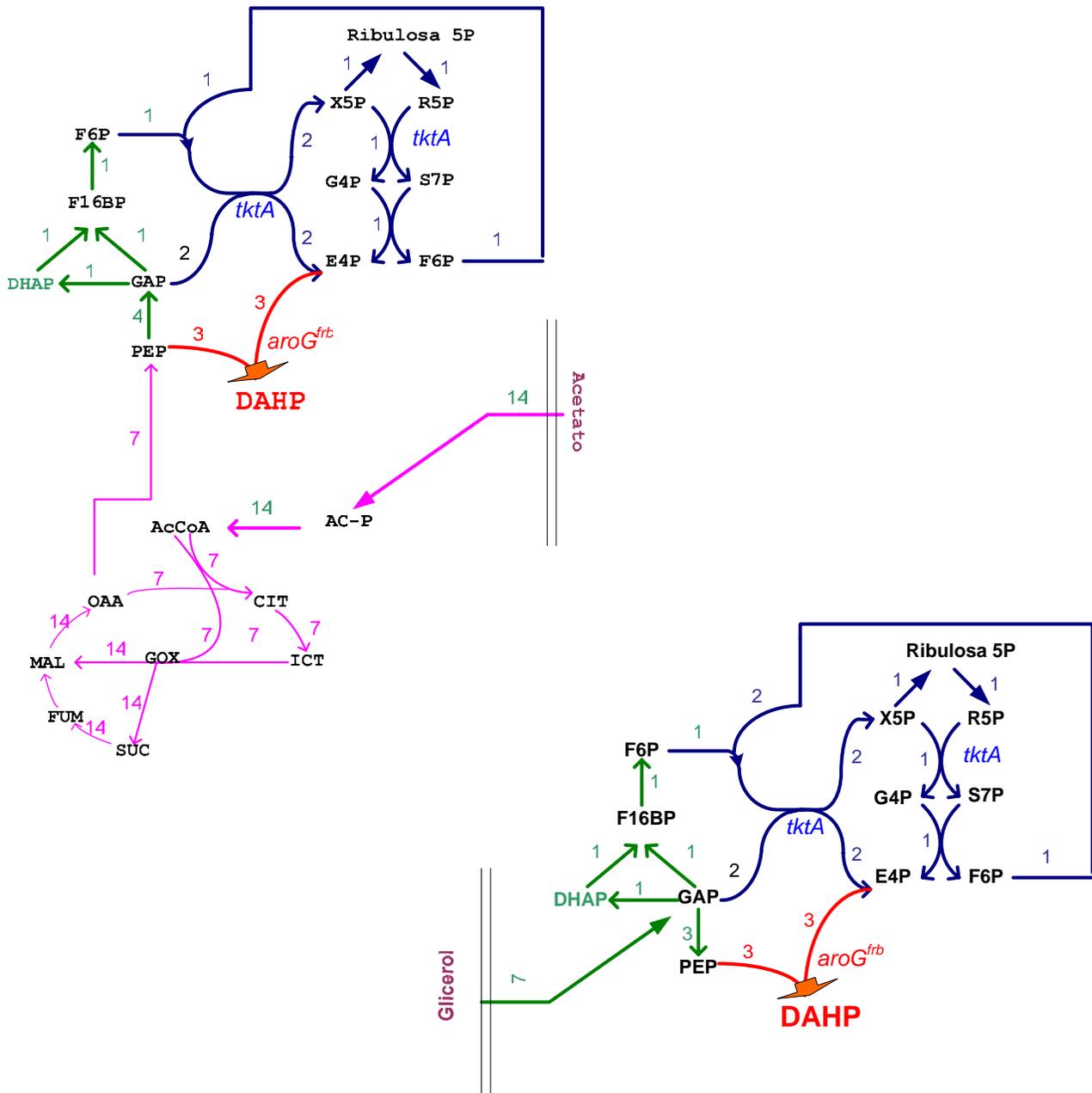


Figura 12. Cálculo del rendimiento máximo teórico cuando se utilizan acetato y glicerol como fuentes de carbono. El rendimiento es igual a la relación de las moles dirigido hacia DAHP sobre las moles totales fuente de la fuente de carbono.

7.9 Parámetros cinéticos, curvas de crecimiento y producción de intermediarios aromáticos en cultivos en fermentadores de las cepa PB12PTS⁻Glc⁺(pRW300 $aroG^{fbr}$, pCL $tktA$).

Con la finalidad de evaluar la producción de aromáticos en un cultivo tipo lote, la cepa PB12PTS⁻Glc⁺(pRW300 $aroG^{fbr}$, pCL $tktA$) fue crecida en el fermentador conforme a las condiciones señaladas en la sección de materiales y métodos. Se eligieron como fuentes de carbono a estudiar: arabinosa y las mezclas glucosa-arabinosa y glucosa-glicerol, debido a que en estas combinaciones fue en donde mayor rendimiento y/o productividad de DAHP se obtuvo en el sistema de células en reposo. Es importante mencionar que los plásmidos de la cepa fueron inducidos con IPTG (0.1mM) desde el inicio de la fermentación. La producción de DAHP, DHS y SHK fue tomada como medida indirecta de la canalización de carbono hacia la vía de aromáticos. Es importante mencionar que no se trabajó con la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ $aroB$ (pRW300 $aroG^{fbr}$, pCL $tktA$), ya que como se mencionó la μ de esta cepa se reduce aún en exceso de aminoácidos y vitaminas aromáticas. Además, se buscó analizar la capacidad de producir compuestos aromáticos en presencia del producto $aroB$ para demostrar que el flujo de carbono hacia la vía de biosíntesis de compuestos aromáticos estaba siendo incrementada en las condiciones de fermentador utilizadas. La tabla 13 además de las figuras 13 y 14 muestran que la cepa PB12PTS⁻Glc⁺(pRW300 $aroG^{fbr}$, pCL $tktA$) disminuye su μ en todas las fuentes de carbono respecto a su crecimiento sin plásmidos (tablas 6, 7 y 13). En la combinación arabinosa-glucosa la μ disminuye de 0.55 a 0.42 hr⁻¹. La disminución de la μ es mayor en glucosa-glicerol (de 0.32 a 0.13 hr⁻¹) con una fase de retardo (fase lag) de 15 hr aproximadamente. En glucosa la reducción de la μ es de 0.42 hr⁻¹ a 0.32 hr⁻¹; sin embargo tiene una fase lag de 25 horas. Todas las cepas empiezan a acumular DHS y SHIK a partir de una densidad óptica aproximada de 0.70 (figura 13 y 14). En todas las fuentes de carbono el rendimiento biomasa/sustrato(s) (gr/gr) disminuyó respecto a la cepa sin plásmidos (tablas 6,7,13), lo cual podría ser consecuencia de la redirección de los flujos de carbono y de la sobreproducción de de las proteínas TktA y AroG^{fbr}. Aunque la μ fue mayor en arabinosa y arabinosa-glucosa también lo es la producción de ácido acético (0.6 y 0.4 gr/L respectivamente). Lo anterior podría ser consecuencia de la actividad concertada de las transcetolasas (A y B) que envían el flujo de pentosas hacia glicólisis y las enzimas glicolíticas que envían éste flujo hacia glicólisis aumentando las pozas de PYR saturando TCA y por lo tanto las enzimas Acka y Pta convierten este PYR a ácido acético. El mayor rendimiento de producción de compuestos aromáticos se presentó en la cepa crecida en la mezcla glucosa-glicerol. En esta combinación, la cepa tiene un rendimiento de compuestos aromáticos tres veces mayor que en glucosa, lo cual es atractivo para un sistema de producción considerando también que la glucosa y el glicerol son compuestos de bajo costo. También la productividad de DAHP es aproximadamente cuatro veces respecto a glucosa. Además no se produjo ácido acético durante la fermentación.

Sin embargo, la μ es muy baja y la fase lag muy larga.

Tabla 13. Parámetros cinéticos y de producción de intermediarios aromáticos de la cepa PB12PTS⁻ Glc⁺(pRW300 *aroG*^{fbr}, pCL *tktA*) crecida en fermentador y en varias fuentes de carbono.

FUENTE DE CARBONO	μ (hr ⁻¹)	Y _{x/s}	q _s (mmol C/ gr. p.seco biomasa*hr)	qDAHP (mmol C/ gr. p.seco biomasa*hr)	qDHS (mmol C/ gr. P.seco biomasa*hr)	qSHIK (mmol C/ gr. P.seco biomasa*hr)	Y _{Arom} (mmol C aromaticos/ mmol C fuente(s) de carbono)
Glucosa	0.32	0.30	18.68	1.78	0.48	0.04	0.12
Arabinosa	0.42	0.27	50.00	0.51	0.22	0.10	0.10
Glucosa-arabinosa	0.42	0.27	47.00	5*	0.50	0.30	0.12
Glucosa-glicerol	0.13	0.10	13.87	9.43	1.17	0.54	0.36

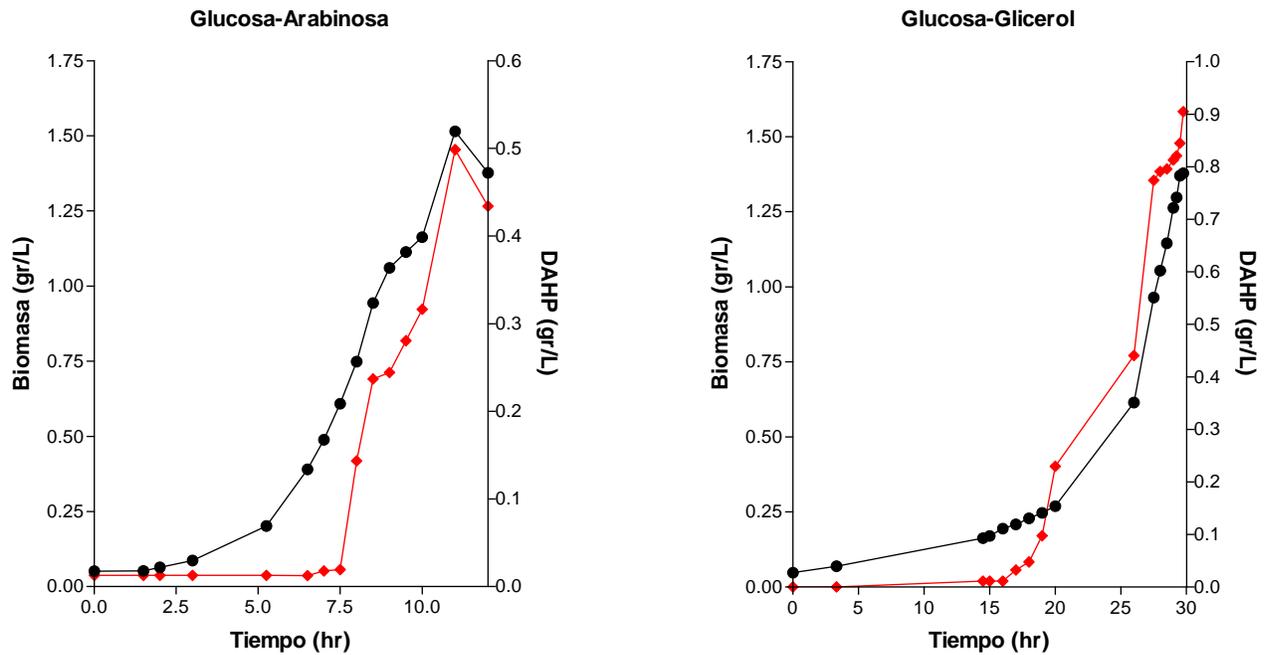
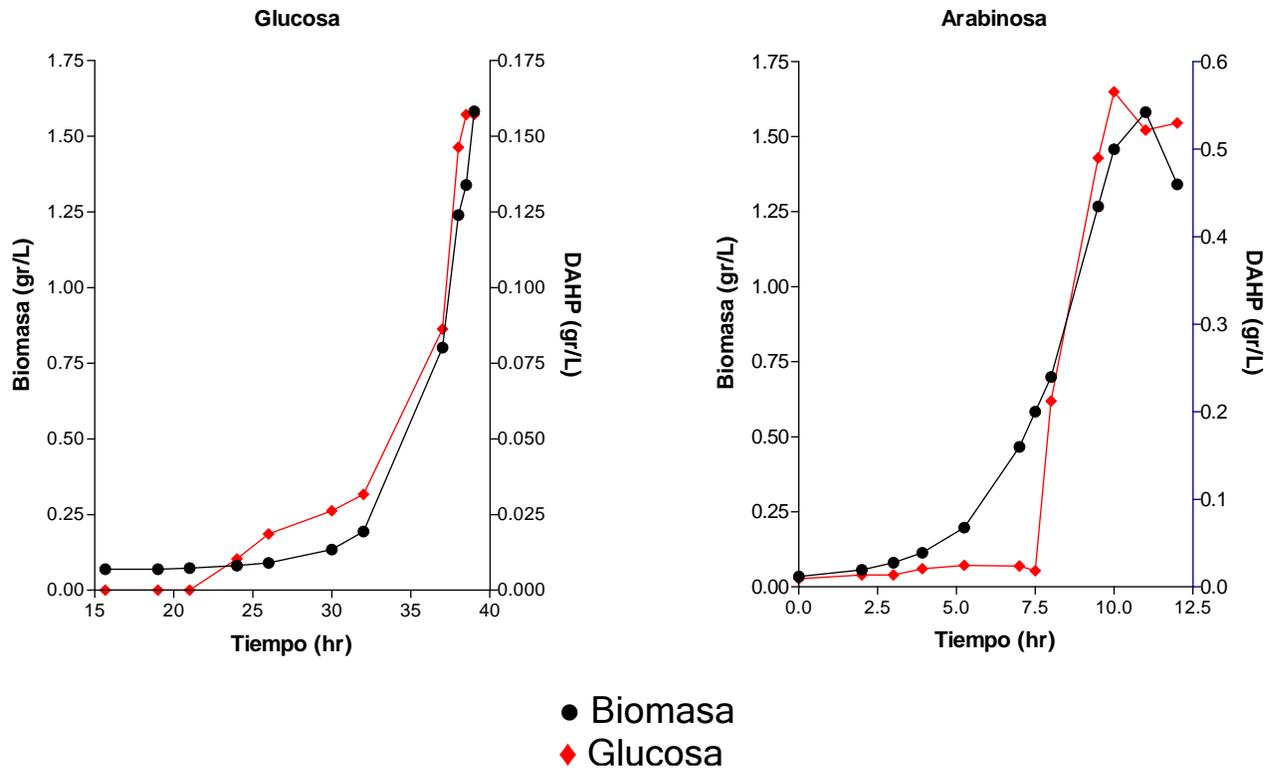
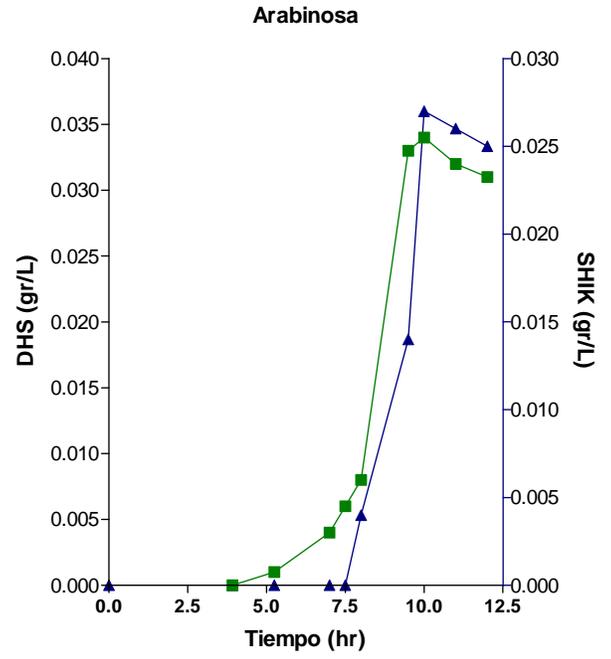
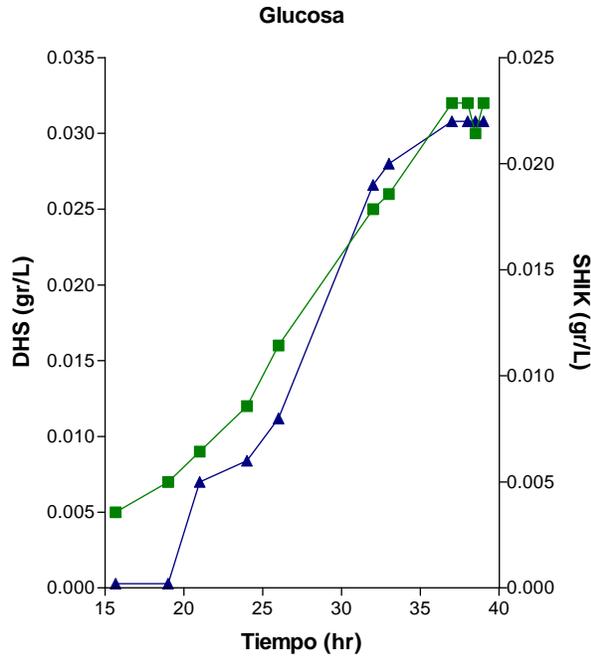


Figura 13. Curvas de crecimiento y producción de DAHP de la cepa PB12 *pRW300aroG^{fabr}, pCLtktA*) en varias fuentes de carbono.



▲ DHS
■ SHIK

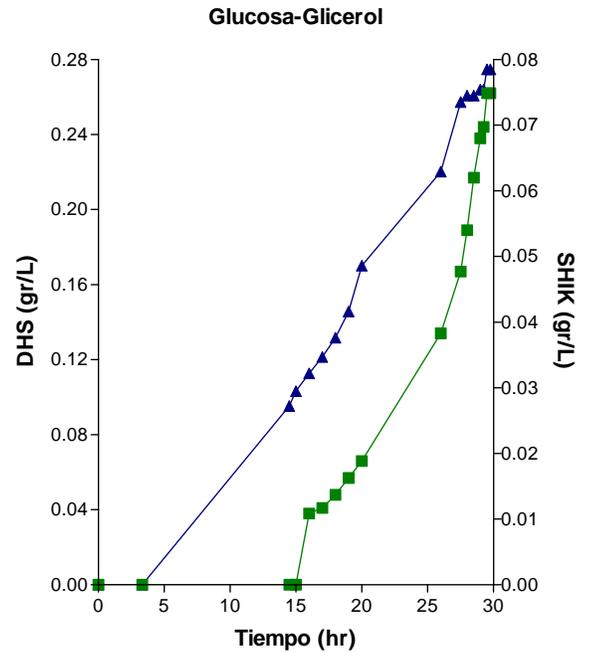
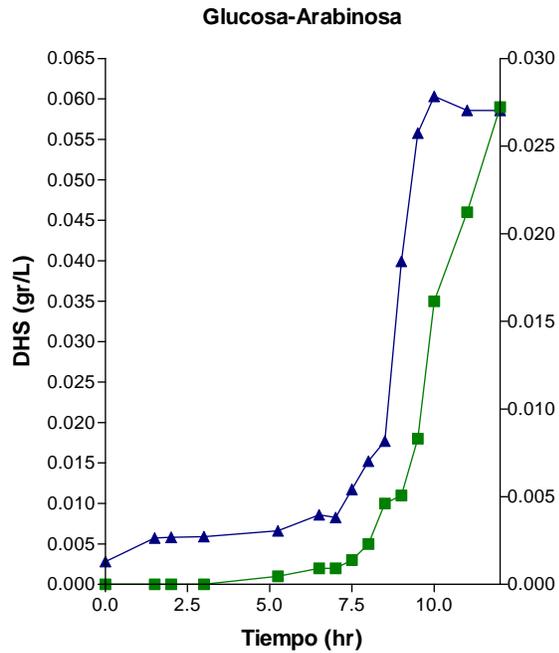


Figura 14. Curvas de producción de DHS y SHIK de la cepa PB12 pRW300 $aroG^{fbr}$, pCL $tktA$) en varias fuentes de carbono.

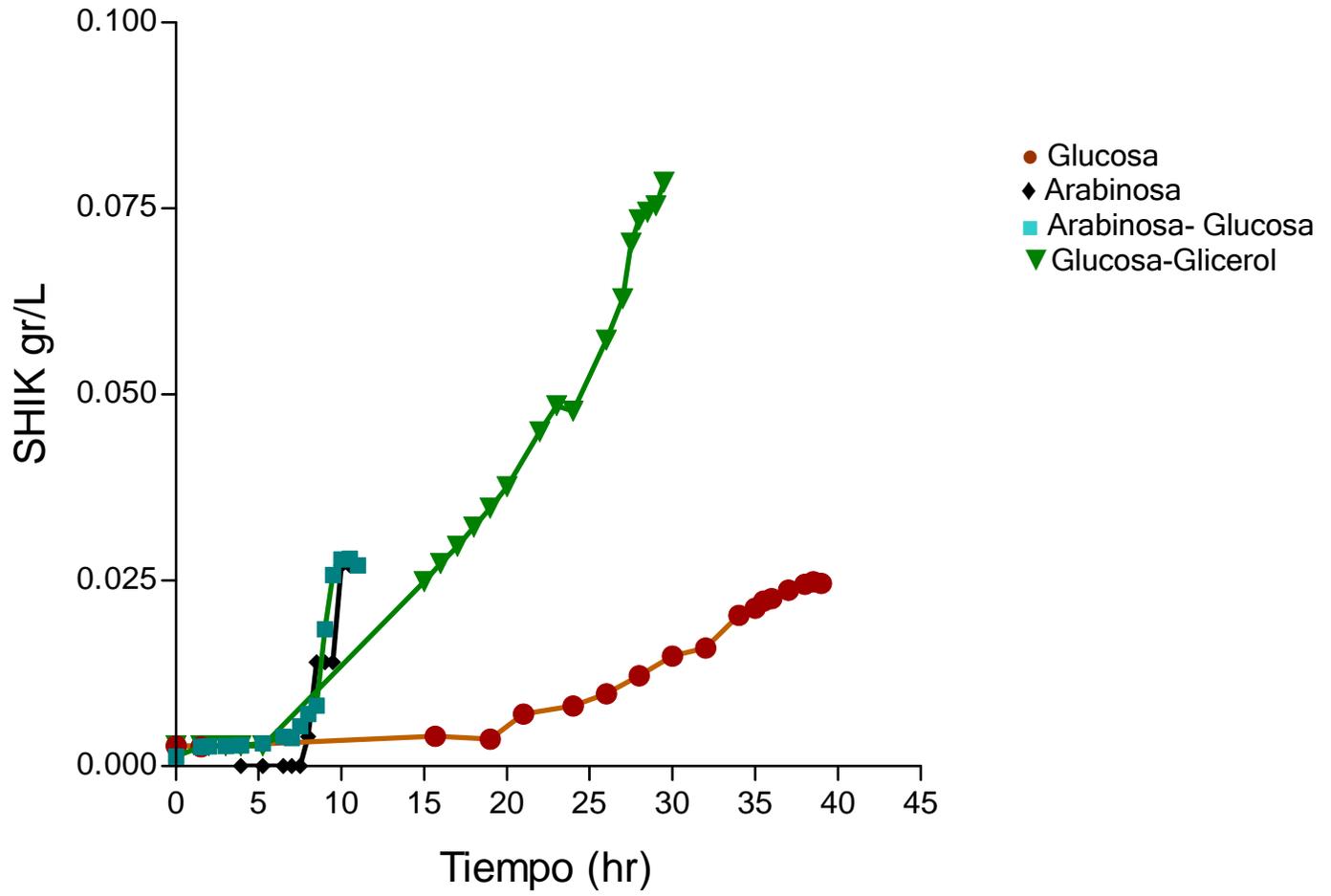


Figura 15. Curva de producción de SHIK en diferentes fuentes de carbono de la cepa PB12 (pRW300 $aroG^{fbr}$, pCL $tktA$).

8. CONCLUSIONES

1. La ausencia del sistema PTS provoca una disminución en la μ en la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ crecida en glucosa y otras fuentes de carbono tipo no PTS, esto permite la cointilización de varias fuentes de carbono por la ausencia de represión catabólica mediada por EIIA^{glc}. Los patrones de consumo demuestran que la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ puede cointilizar dos fuentes de carbono simultáneamente. De todas las mezclas probadas solamente fueron cointilizadas las mezclas glucosa-glicerol, glucosa-gluconato, glucosa-arabinosa.
2. La cointilización de fuentes de carbono le permite a la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ metabolizar más mmolesC por unidad de tiempo, e incrementar su μ . Lo anterior es favorable para contender con una limitación carbono/energía aún presente en la cepa aunque a menor nivel que la cepa parental PB11PTS⁻Glc⁻. Los datos sugieren que la cepa cointiliza glucosa con aquella fuente de carbono glicolíticas con mayor q_s que glucosa.
3. La cepa PB12PTS⁻Glc⁺ está limitada en su crecimiento en todos los sustratos gluconeogénicos y aparentemente solo cointiliza la mezcla glucosa-acetato. Por otra parte esta cepa no ha perdido la represión catabólica ejercida por los azúcares tipo no PTS (como lo demuestra la represión catabólica de arabinosa sobre glicerol) aún cuando la cepa ha estado sometida a una condición de limitación de fuente de carbono. Se construyó la derivada de la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ capaz de utilizar xilosa. Sin embargo, la presencia de glucosa ejerce represión catabólica sobre la utilización de xilosa. Lo anterior indica que el mecanismo responsable de este efecto no depende del sistema PTS.
4. El sistema de células en reposo demostró que la cointilización de fuentes de carbono es favorable para aumentar la productividad de DAHP en la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ *aroB*⁺ (pRW300*aroG*^{fabr}, pCL*tktA*). La productividad específica de DAHP (moles DAHP/gr. p.s célula*hr) aumenta respecto a glucosa en todas las mezclas de fuentes de carbono, por ejemplo de 0.42 en glucosa a 0.95 en arabinosa-glucosa y a 1.36 en glucosa glicerol. La cepa PB12PTS⁻Glc⁺ *aroB*⁺ (pRW300*aroG*^{fabr}, pCL*tktA*) tiene mayor rendimiento y productividad en todas las fuentes de carbono (muy cercanos al teórico) respecto a la cepa JM101PTS⁺Glc⁺ *aroB*⁺ (pRW300*aroG*^{fabr}, pCL*tktA*) lo cual indica que la ausencia del sistema PTS (y probablemente las mutaciones seleccionadas en la presión selectiva) son favorables para disminuir la rigidez del metabolismo central y redirigir el flujo de PEP hacia la vía de biosíntesis de aminoácidos aromáticos. Es importante mencionar que no hay reportes previos de estudios de producción de compuestos aromáticos en el sistema de células en reposo con cepas cointilizando de fuentes de carbono.
5. Los estudios de crecimiento en fermentador con la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ transformada plásmidos pRW300*aroG*^{fabr} y pCL*tktA* e inducida con IPTG 0.1mM, indican que el aumento de

productividad específica de DAHP aumenta (respecto a glucosa) en glucosa-arabinosa (de 1.78 a 5) y glucosa-glicerol (de 1.78 a 9.43). El mayor rendimiento (molC/molC) de aromáticos/fuente(s) de carbono es en glicerol-glucosa (36%). La cepa PB12PTS⁻Glc⁺ (pRW300 $aroG^{fbr}$ y pCL $tktA$) es capaz de acumular hasta 2.19 gr/L de DAHP y 0.50 gr/L de DHS en la mezcla glucosa-glicerol (aprox. 60% rendimiento gr/gr). Lo anterior es importante porque la cepa sigue produciendo todos los compuestos aromáticos importantes para su crecimiento incluyendo los aminoácidos L-trp, L-tyr y L-phe. Es interesante señalar que los valores de rendimiento de DAHP de la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ (pRW300 $aroG^{fbr}$, pCL $tktA$) son similares a los reportados por la cepa NF9 (pRW5 $aroG^{fbr}$, $tktA$) (Flores et al., 1996), cuando utiliza glucosa como única fuente de carbono. Sin embargo, los valores aumentan aproximadamente 3X cuando se usa la mezcla glucosa-glicerol como fuente de carbono. Además los valores reportados para la cepa NF9 son en medio enriquecido.

6. Para la producción de aminoácidos aromáticos u otros compuestos de interés como SHIK resultan importantes estos datos ya que la producción de estos compuestos en concentraciones mayores se podrían alcanzar inactivando los genes que codifican para otras enzimas y así bloquear uno o varios pasos metabólicos acumulando el metabolito anterior, como es el caso de $aroB$ para incrementar la producción de DHS. Además, la sobreexpresión de otros genes específicos para la producción de ciertos metabolitos también se podría considerar. Finalmente, como se he señalado, la utilización de medios enriquecidos usando diferentes condiciones pudiera incrementar la producción de compuestos aromáticos (Frost et al., 1992).
7. La inducción de los plásmidos con IPTG desde el inicio de la fermentación causa una reducción de la μ de la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ en todas las fuentes de carbono. La velocidad de crecimiento de la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ en glicerol se reduce de (0.49 a 0.13 hr⁻¹); existe también una fase lag muy larga (15 hr) en estas condiciones de alta productividad. Por otra parte la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ no produce ácido acético como subproducto. Lo anterior unido a los altos y productividades de aromáticos indica que posiblemente la sobreproducción de TktA está dirigiendo las pozas de G3P y F6P hacia E4P y X5P, mientras que AroG^{fbr} condensa el PEP y la E4P hacia DAHP.

9. PERSPECTIVAS

- Estudiar varias alternativas de optimización de la producción a nivel fermentador como por ejemplo: inducir los genes presentes en los plásmidos a diferentes puntos de la fermentación. Analizar en fermentador otras mezclas de fuentes de carbono que fueron estudiadas en células en reposo. Finalmente analizar el uso de medios de cultivo parcialmente enriquecidos para buscar un incremento en la producción y productividad de aminoácidos aromáticos. El propósito es aumentar la producción y la productividad de compuestos aromáticos pero buscando reducir las fases lag y aumentar la μ sin producir acético.
- Comprender de manera más detallada el metabolismo celular cuando se utilizan fuentes de carbono mediante el análisis de transcriptoma, proteoma y metaboloma del metabolismo central de las cepas productoras y con ello tener mejores herramientas para optimizar la producción de aromáticos.
- Analizar la conveniencia del aislamiento de cepas que utilizan glucosa y xilosa o bien de cepas que utilicen más eficientemente la xilosa.

10. BIBLIOGRAFÍA

- ACHEMA, 2006. 28th International Exhibition-Congress on Chemical Engineering, Environmental Protection and Biotechnology. Frankfurt am Main Germany. May 15-19.
- Aiba, H. 1985. Transcription of the *Escherichia coli* adenylate cyclase gene is negatively regulated by cAMP-cAMP receptor protein. J Biol Chem. 260: 3060-3070.
- Chang, Y.C., Almy, E. A., Blamer, G. A., Gray, I. A., Frost, J. W., Strasburg, G. M. 2003. Antioxidant Activity of 3-Dehydroshikimic acid in Liposomes, Emulsions, and Bulk Oil." J. Agric. Food Chem. 51: 2753.
- Báez, J.L., Bolívar, F., Gosset, G., 2001. Determination of 3-deoxy-Darabino-heptulosonate 7-phosphate productivity and yield from glucose in *Escherichia coli* devoid of the glucose phosphotransferase transport system. Biotechnol. Bioeng. 73, 530-535.
- Báez -Viveros, J.L., Osuna, J., Hernández-Chávez, G., Soberón, X., Bolívar, F., Gosset, G., 2004. Metabolic engineering and protein directed evolution increase the yield of L-phenylalanine synthesized from glucose in *Escherichia coli*. Biotechnol. Bioeng. 87: 516-524.
- Bailey, J.E. Toward a science of metabolic engineering. 1991. Science. 252:1668-75.
- Blattner FR, Plunkett G III, Bloch CA, Perna NT, Burland V, et al. 1997. The complete genomic sequence of *Escherichia coli* K-12. Science 277: 1453-74.
- Bostford, J.L., Harman, J.G. 1992. Cyclic AMP in prokaryotes. Microbiol Rev. 56: 100-122.
- Cortázar, Adriana., 2005. Efecto de la inactivación de las piruvato cinasas en la producción de intermediarios aromáticos. Tesis de Maestría.
- Colland, F., Barth, M., Hengge-Aronis, R. and Kolb, A. 2000. σ factor selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase: role for CRP, IHF and Lrp transcription factors. EMBO J. 19: 3028-3037.
- Datsenko, K.A., and Wanner, B.L (2000). One step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc. Natl. Acad Sci USA 97: 6640-6645.

- Dayan, J., and D. B. Sprinson. 1971. Enzyme alterations in tyrosine and phenylalanine auxotrophs of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 108:1174-1180.
- Death A., Notley L., Ferenci T., 1993. Derepression of LamB protein facilitates outer membrane permeation of carbohydrates into *Escherichia coli* under conditions of nutrient stress. *J. Bacteriol.* 175:1475-483.
- Draths KM., 1992. Biocatalytic synthesis of aromatic form D-glucose: the role of transketolase. *J Am Chem Soc.* 114: 3956-3962.
- Epstein, W., Rothman-Denes, LB., and Hesse, J. 1975. Adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate as mediator of catabolite repression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 72: 2300-2304.
- Flores, N., 1995. Master Degree Thesis. Construction and characterization of *Escherichia coli* strains lacking PTS. Institute of Biotechnology, UNAM, Mexico.
- Flores, N., Xiao, J., Berry, A., Bolívar, F., Valle, F., 1996. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* 14, 620-623.
- Flores, N., de Anda R., Flores, S., Escalante A., Hernández, G., Martínez A., Ramírez, O., Gosset, G., Bolívar F. (2005b). Role of pyruvate oxidase in *Escherichia coli* strains lacking of phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *J. of Mol. Microbiol. and Biotech.* 8: 209-221.
- Flores, N., Escalante A., de Anda R., Báez-Viveros J.L., Merino E., Franco B, Georgellis Dimitri., Gosset G., and Bolívar F. (2007). New insights on the role of the sigma factor RpoS as revealed in *Escherichia coli* strains lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *J. of Mol. Microbiol. and Biotech.*
- Flores, S., Gosset, G., Flores, N., de Graaf, A.A., Bolívar, F., 2002. Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by ¹³C labeling and NMR spectroscopy. *Metab. Eng.* 4, 124-137.
- Flores, S., Flores, N., De Anda R., González, A., Escalante A., Gosset, G and Bolívar F., 2005a. Nutrient scavenging stress response in a *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenol

- piruvate: carbohydrate phosphotransferase system as explored gene expression profile. *J. Mol Microbiol Biotechnol.* 10(1):51-63.
- Frankel, DG., 1996. Glycolysis. In: Neidhart, F.C. (Ed.), *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, 2nd ed. ASM, Washington, DC, USA, pp. 189-196.
 - Frost, J.W. 1992. Enhanced production of common aromatic pathway compounds. Patent US 5, 168,056.
 - Garner CC, Herrmann KM. 1984. Structural analysis of 3-deoxy-D-arabino- heptulosonate 7-phosphate by ¹H and natural-abundance ¹³C-n.m.r. spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 132:317-22.
 - Georgellis, D., Kwon, O., Lin, E.C., Wong, S.M., Akerley, B.J., Georgellis. 2001. Quinones as the redox signal for the Arc two-component system of bacteria. *J Bacteriol.* 183(24):7206-12.
 - Goldenbaum, P.E., and Dobrogosz, WJ. 1968. The effect of cyclic 3',5'-AMP on catabolite repression of β -galactosidase synthesis in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 33: 828-833.
 - Gosset, G., Yong-Xiao, J., Draths, KM. 1996. A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol.* 17(1):47-52.
 - Hernández-Montalvo, V., Valle F., Bolívar F., Gosset, G., 2001. Characterization of sugar mixtures utilization by an *Escherichia coli* mutant devoid of the phosphotransferase system. *Appl Microbiol Biotechnol.* 57:186-191.
 - Herrmann, K. M., and R. L. Somerville (Ed.). 1983. *Amino Acids: Biosynthesis and Genetic Regulation*. Addison-Wesley Publishing Co., Reading, Mass.
 - Hogema BM., Arents JC., Inada T., Aiba H., van Dam K and Postma PW (1997). Catabolite repression by glucose 6-phosphate, gluconate and lactose in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 24: 857-867.
 - Hogema, BM., Arents, JC., Bader, R., Eijkemans, K., Yoshida, H., Takahashi, H., Aiba, H. and Postma, PW. 1998 Inducer exclusion in *Escherichia coli* by non-PTS substrates : the role of the

- PEP to pyruvate ratio in determining the phosphorylation state of enzyme IIA^{Glc}. *Mol. Microbiol.* 30: 487-498.
- Inada, T., Kimata, K., and Aiba, H. 1996. Mechanism responsible for glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*: challenge to the cAMP model. *Genes Cells.* 1: 293-301.
 - Ishizuka, H., Hanamura, A., Kunimura, T., and Aiba, H. 1993. A lowered concentration of cAMP receptor protein caused by glucose is an important determinant for catabolite repression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 10. 341-350.
 - Joseph, E. Bernsley, C., guiso, N., and Ullman, A. 1982. Multiple regulation of the activity of adenylate cyclase in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* 185: 262-268.
 - Li K., Frost J.W. 1999. Microbial Synthesis of 3-Dehydroshikimic Acid: A Comparative Analysis of D-Xylose, L-Arabinose, and D-Glucose Carbon Sources. *Biotechnol. Prog.* 15: 876-883.
 - Lu, J. L., and Liao, J.C.,1997. Metabolic engineering and control analysis for production of aromatics-role of transaldolase. *Biotechnol and Bioeng.* 53: 132-137.
 - Liao, J. C., Chao, Y. P., Patnaik, R. 1994. Alteration of the biochemical valves in central metabolism of *Escherichia coli*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 745: 21-34.
 - Monod, J. 1942. *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes.* 2nd edn. Paris: Hermann.
 - Mueller, U., Huebner S., 2003. Economic aspects of amino acid production. *Advances in Biochemical Engineering, Biotechnology.* Vol. 79, 141-170.
 - Nasser, W., Schneider, R., Travers, A. and Muskhelishvili, G., 2001. CRP modulates *fis* transcription by alternate formation of activating and repressing nucleoprotein complexes. *J. Biol. Chem.* 276, 17878-17886.
 - Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., and Schaechter, M., 1990. *Physiology of the bacterial cell. A molecular approach.* Sunderland: Sinauer Associates.
 - Nikaido, H., Nakae T., 1979. The outer membrane of Gram-negative bacteria. *Adv Microb Physiol.* 20:163-250.

- Nikaido, H., Vaara M.,1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev.* 49:1-32.
- Notley-McRobb, L., Death, A. and Ferenci, T. 1997. The relationship between external glucose concentration and cAMP levels inside *Escherichia coli*: implications for models of phosphotransferase-mediated regulation of adenylate cyclase. *Microbiology* .143: 1909-1918.
- Ogino, T., C. Garner, J. L. Markley, and K. M. Herrmann. 1982. Biosynthesis of aromatic compounds: ¹³C NMR spectroscopy of whole *Escherichia coli* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:5828-5832.
- Okinaka, RT., and Dobrogosz, WJ., 1966. Enhanced catabolite repression in *Escherichia coli* by growth on combined substrates. *J. Bacteriol.* 92: 526-527.
- Perlman, RL., De Crombrughe, B., and Pastan, I. 1969. Cyclic AMP regulates catabolite and transient repression in *E. coli*. *Nature.* 223: 810-812.
- Patnaik, R., Liao, J. C. 1994. Engineering of *Escherichia coli* central metabolism for aromatic metabolite production with near theoretical yield. *Appl. Env. Microbiol.* 60: 3903-3908.
- Patnaik, R., Roof, W. D., Young, R. F., Liao, J. C. 1992. Stimulation of glucose catabolism in *Escherichiu coli* by a potential futile cycle. *J. Bacteriol.* 174 7527-7532.
- Patnaik, R., Spitzer, R. G., Liao, J. C. 1995. Pathway engineering for production of aromatics in *Escherichia coli*: Confirmation of stoichiometric analysis by independent modulation of AroG, TktA, and Pps activities. *Biotechnol. Bioeng.* 46: 361-370.
- Peterkofsky, A., Reizer, A., Reizer, J., Gollop, N., Zhu, P., and Amin N (1993). Bacterial adenyl cyclases. *Prog. Nucleic Acids Res.Mol. Biol,* vol(44): 31-65
- Ponce, E., Flores, N., Martinez, A., Valle, F., and Bolivar, F., 1995. Cloning of the two pyruvate kinase isoenzyme structural genes from *Escherichia coli*: the relative roles of these enzymes in pyruvate biosynthesis. *J Bacteriol.* 177(19):5719-22.

- Postma, PW., Lengeler, JW. 1985. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev.* 49: 232- 269.
- Postma, PW., Lengeler, JW., Jacobson, GR., 1993. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev.* 6: 543-594.
- Postma, PW., Lengeler, JW., Jacobson, GR., 1996. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems. In: Neidhardt, F.C. (Ed.), *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, 2nd ed. ASM Press, USA, pp. 1149-1174.
- Pittard, AJ. 1996. Biosynthesis of aromatic amino acids. In: Neidhardt FC, Curtiss R III, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE, editors. *Escherichia coli and Salmonella, cellular and molecular biology*. Washington, DC: Am Soc Microbiol. p 458-484.
- Saier, MH., Ramseier, TM. and Reizer J. 1996. Regulation of carbon utilization. In *Escherichia coli and salmonella: Cellular and Molecular Biology* . 2nd ed. ASM Press, USA, pp. 1325-1343.
- Saier, MH. 2000. Vectorial metabolism and the evolution of transport systems. *J Bacteriol.* 182:5029-5035.
- Stemmer WPC. 1994. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* 370:389-391.
- Stephanopoulos, G. (1999). Metabolic fluxes and metabolic engineering, *Metabolic Engineering* 1:1-11.
- Stülke, J. and Hillen, W. (1999) Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 195-201.
- Tribe, D. E., H. Camakaris, and J. Pittard. 1976. Constitutive and repressible enzymes of the common pathway of aromatic biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: regulation of enzyme synthesis at different growth rates. *J. Bacteriol.* 127:1085-1097.
- Wanner, BL., Kodeira, R., and Neidhardt, FC. (1978). Regulation of *lac* operon expression: reappraisal of the theory of catabolite repression. *J Bacteriol.* 136: 947-954.

- Yi J, Draths K.M and Frost J.W. 2002. Modulation of phosphoenolpyruvate expression increases shikimate pathway product yields in *E. coli*. *Biotechnol. Prog.* 18(6):1141-1148.
- Yang, JK., Bloom, RW., and Epstein, W. 1979. Catabolite and transient repression in *Escherichia coli* do not require enzyme I of phosphotransferase system. *J. Bacteriol* 38: 275-279.
- Young-Ha Park, Byeong R. Lee, Yeong-Jae Seok, and Alan Peterkofsky (2006). *In Vitro* Reconstitution of Catabolite Repression in *Escherichia coli*. *J. of Biol. Chem.* 281(10): 6448-6454.
- Zheng D., Constantinidou C., Hobman, J.L., and Minchin Stephen D. (2004). Identification of the CRP regulon using *in vitro* and *in vivo* transcriptional profiling. *Nuc. Acids Res.* 32(19): 5874-5893.
- Zurawski, G., R. P. Gunsalus, K. D. Brown, and C. Yanofsky. 1981. Structure and regulation of *aroH*, the structural gene for the tryptophan-repressible 3-deoxy-D-*arabino*-heptulosonic acid-7-phosphate synthetase of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 145:47-73.