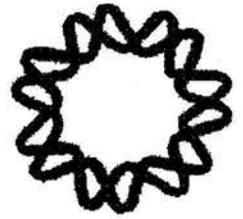




INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

00551



**"Construcción de cepas recombinantes
de *Escherichia coli* productoras del
biosurfactante monoramnolípido de
Pseudomonas aeruginosa"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A
IQ Natividad Cabrera Valladares

Cuernavaca, Mor.

Agosto 2004.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

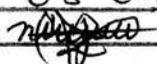
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

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

NOMBRE: Natividad Cabrera
Valladares

FECHA: 31 08 04

FIRMA: 

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Gloria Soberón Chávez en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para la realización del mismo se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca de maestría No. 138521

Agradecimientos:

A la Dra. Gloria Soberón Chávez por permitirme realizar mi trabajo de tesis bajo su asesoría, por compartir sus conocimientos, por su confianza, por su apoyo, paciencia y amistad.

A mis tutores: Dra. Gloria Soberón Chávez, Dr. Guillermo Gosset Lagarda y Dr. Leobardo Serrano Carreón, por su gran ayuda a mi formación académica, por su valiosa participación y aportaciones durante el desarrollo del proyecto.

A la Dra. Clarita Olvera Carranza, por compartir sus conocimientos, por su incondicional apoyo y por su valiosa amistad.

A los integrantes de mi comité revisor: Dra. Esperanza Martínez Romero, Dra. Gloria Soberón Chávez, Dra. Guadalupe Espín Ocampo, Dr. Guillermo Gosset Lagarda y Dra. Clarita Olvera Carranza, por el tiempo y sus valiosas sugerencias hechas en esta tesis.

A mis excompañeros Soberones: Clarita, Luis, Leandro, Agustino, Rosalba, Gerardo, Rafael, Renato, Rebeca, Katy, Jesús y Alma por su amistad y algunos por su apoyo experimental.

A mis excompañeros Espines: Chinthia, Josefina, Soledad, Daniel, Miguel, Socorro, Raúl, Martín, Arístides, Judith, Gabriel e Isaac por su amistad.

A los señores Maricela Izquierdo y Eduardo Juárez por su invaluable ayuda durante la realización del proyecto.

A mis compañeros de laboratorio Bolívar-Gosset, por su amistad, por su compañía y ayuda.

A mis amigos: Leandro, Víctor, Saida, Claudia, Patricia, Rocío, Carmen, Inés, Monserrat, Lidia, Humberto, Odón y Alfredo por su compañía y cariño.

A Isidro, Marina, Juan Carlos, Sandro, Rigo, Maricela, Amparo, Sadrita, Luisito, Marianita, Carlitos, Tania y Jose Antonio por todo su amor y apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de mi vida.

ÍNDICE.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
1 RESUMEN	1
2 INTRODUCCIÓN	3
2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
2.2 Biosurfactantes, su origen microbiano y su función fisiológica.....	4
2.3 Producción de biosurfactantes.....	7
2.4 Estructuras moleculares de los ramnolípidos.....	10
2.5 Propiedades fisicoquímicas de los ramnolípidos.....	11
2.6 Aplicación potencial de los ramnolípidos.....	12
2.7 Precursores de los ramnolípidos.....	13
2.8 Biosíntesis de los ramnolípidos de <i>P. aeruginosa</i>	17
2.9 Genética de la biosíntesis de ramnolípidos.....	19
2.10 Perspectivas de los ramnolípidos.....	21
3 ANTECEDENTES	23
3.1 Expresión de los genes <i>rhlAB</i> de <i>P. aeruginosa</i> en hospederos heterólogos.....	23
4 HIPÓTESIS.....	25
5 OBJETIVOS	25
5.1 Objetivo general	25
5.2 Objetivos particulares.....	25
6 MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
6.1 Material Biológico.....	26
6.2 Medios de cultivo.....	28
6.3 Condiciones de cultivo.....	28
6.4 Procedimientos genéticos y técnicas de DNA recombinante.....	29
6.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	30
6.6 Análisis de DNA cromosomal, de plásmido y cósmidos por hibridización Southern.....	30
6.7 Screening de colonias por hibridización.....	31
6.8 Cruzas para transferencia de cósmidos por conjugación.....	31

6.9 Ensayo para determinar la actividad enzimática de dTDP-D-glucosa 4,6-deshidratasa (RmlB).....	32
6.10 Integración de los genes <i>rhlAB</i> en el cromosoma de <i>E. coli</i>	34
6.11 Construcción del plásmido pTRML4.	36
6.12 Construcción del cósmido pCRML4.	36
6.13 Determinación analítica de ramnolípidos.	37
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
7.1 Producción de monoramnolípidos por <i>E. coli</i> HB101(pUO94) en medio de cultivo PPGAS con glucosa y ramnosa como fuentes de carbono.....	38
7.2 Identificación y aislamiento del operón <i>rmlBDAC</i> de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	42
7.3 Análisis de expresión de los genes <i>rmlBDAC</i> de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en <i>E. coli</i>	44
7.4 Construcción de cepas de <i>E. coli</i> para producir monoramnolípidos de <i>P. aeruginosa</i>	45
7.4.1 Construcción de la cepa <i>E. coli</i> HB101(pNCV460, pUO94).....	46
7.4.2 Producción del biosurfactante monoramnolípidos por la cepa <i>E. coli</i> HB101(pNCV460, pUO94) en medio de cultivo LB y PPGAS.....	47
7.4.3 Construcción de la cepa <i>E. coli</i> HB101(pRML4, pUO94).	50
7.4.4 Efecto del IPTG y del tiempo de inducción sobre la producción de monoramnolípidos por la cepa <i>E. coli</i> HB101(pNCV460, pUO94).	51
7.4.5 Producción de monoramnolípidos por la cepa <i>E. coli</i> HB101(pNCV460, pUO94) en medio mineral con glucosa y ácido oleico como fuentes de carbono	53
7.4.6 Construcción de las cepas <i>E. coli</i> W2190 y <i>E. coli</i> R203	56
7.4.7 Construcción de las cepas W2190(pNCV460), W2190(pRML4), R203(pNCV460), R203(pRML4):.....	59
7.4.8 Construcción de la cepa <i>E. coli</i> HB101(pTRML4, pUO94).....	61
7.4.9 Construcción de la cepa <i>E. coli</i> HB101(pCRML4, pUO94).....	62
8 DISCUSIÓN GENERAL.....	64
9 CONCLUSIONES	65
10 PERSPECTIVAS.....	67
11 REFERENCIAS.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 2.1 Tipos de cinéticas de fermentación para la producción de biosurfactantes.....	8
Figura 2.2. Estructuras de los ramnolípidos R1, R2, R3 y R4 de <i>P. aeruginosa</i>	11
Figura 2.3 Vía general de biosíntesis del precursor dTDP-L-ramnosa.....	15
Figura 2.4 Diagrama de biosíntesis de ramnolípidos.....	18
Figura 2.5 Representación esquemática de los genes <i>rhl</i>	21
Figura 6.1 Integración de los genes <i>rhlABR</i> en las cepas de <i>E. coli</i> W3110 y RR1	35
Figura 7.1 Cultivos de <i>E. coli</i> HB101 con el plásmido pUO94.....	39
Figura 7.2 Cromatograma de monoramnolípidos obtenidos de cultivos de <i>E. coli</i> HB101(pUO94) con ramnosa como fuente de carbono.....	40
Figura 7.3 Operón de los genes <i>rmlBDAC</i> de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	42
Figura 7.4 Identificación de los genes <i>rmlBDAC</i> en <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	43
Figura 7.5 Autorradiografía de la cepa recombinante <i>E. coli</i> HB101(pUO94, pNCV460).....	47
Figura 7.6 Cultivos de <i>E. coli</i> HB101(pNCV460, pUO94) en LB y PPGAS.....	48
Figura 7.7 Cromatograma de monoramnolípidos obtenidos de cultivos de <i>E. coli</i> HB101(pNCV460, pUO94) en LB y suplementados con ramnosa y ácido oleico.....	49
Figura 7.8 Sustratos de la enzima ramnosiltransferasa 1 (Rt1)	56
Figura 7.9 Identificación de los genes <i>rhlAB</i> en <i>E. coli</i> , por hibridización tipo southern	58
Figura 7.10 Cultivos de <i>E. coli</i> R203(pNCV460), <i>E. coli</i> R203(pRML4), <i>E. coli</i> HB101(pUO94, pNCV460), <i>E. coli</i> W2190(pNCV460), <i>E. coli</i> W2190(pRML4) en LB	60

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 2.1 Surfactantes de origen biológico.....	5
Tabla 2.2 producción microbiana de ramnolípidos por <i>P. aeruginosa</i>	9
Tabla 6.1 Cepas bacterianas utilizadas y construidas durante este trabajo.....	26
Tabla 6.2 Plásmidos y cósmidos utilizados y construidos durante este trabajo.....	27
Tabla 6.3 Cruzas triparentales de <i>E. coli</i> utilizando el plásmido ayudador pRK2013	32
Tabla 6.4 Ensayo de la enzima dTDP-D-glucosa 4,6-deshidratasa (RmlB).....	33
Tabla 7.1 Identidad a nivel de aminoácidos de los genes <i>rmlBDAC</i> de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 contra diferentes bacterias gram negativas.	42
Tabla 7.2 Actividad de la enzima dTDP-D-glucosa 4,6 deshidratasa (RmlB) en <i>E.coli</i> HB10 y con los genes <i>rmlBDAC</i> de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	45
Tabla 7.3 Producción de monoramnolípidos por la cepa <i>E. coli</i> HB101(pNCV460, pUO94) en medio de cultivo LB y suplementado con ramnosa y ácido oleico.....	49
Tabla 7.4 Producción de monoramnolípidos por la cepa <i>E. coli</i> HB101(pRML4, pUO94) en medio de cultivo LB y suplementado con ramnosa y ácido oleico.....	51
Tabla 7.5 Efecto del IPTG y tiempo de inducción sobre la concentración de proteínas y monoramnolípidos obtenidos de <i>E. coli</i> HB101(pNCV460, pUO94) en medio de cultivo LB ...	52
Tabla 7.6 Proteínas y monoramnolípidos obtenidos de <i>E. coli</i> HB101(pNCV460, pUO94) en medio de cultivo M9 con glucosa y ácido oleico como fuentes de carbono.....	54

1 RESUMEN

Los ramnolípidos son glicolípidos, formados por una o dos moléculas de ramnosa unidas a una o dos moléculas de ácidos β -hidroxidecanoicos. Por su estructura anfipática los ramnolípidos son considerados como agentes activos de superficie. Estas moléculas tienen propiedades similares a los surfactantes obtenidos químicamente es decir, reducen la tensión superficial e interfacial tanto de soluciones acuosas como de mezclas de hidrocarburos. Además tienen numerosas ventajas sobre los surfactantes químicos por ejemplo, son menos tóxicos y más biodegradables. La producción de ramnolípidos es una característica única de *Pseudomonas aeruginosa*; en cultivos líquidos con glucosa como fuente de carbono produce principalmente mono y diramnolípidos. Su biosíntesis se lleva a cabo en dos reacciones secuenciales catalizadas por las enzimas ramnosiltransferasa 1 (Rt1) y ramnosiltransferasa 2 (Rt2) respectivamente, utilizando desoxi-timidina-difosfo-L-ramnosa (dTDP-L-ramnosa) como donador del grupo ramnosil y el ácido β -hidroxidecanoico o monoramnolípidos como receptor. Sin embargo, una desventaja es que *P. aeruginosa* es patógeno oportunista de humanos, además presenta una regulación compleja relacionada con la síntesis de este biosurfactante, por lo que la producción industrial de ramnolípidos es difícil. Toda esta problemática ha orientado a la investigación hacia fuentes alternativas de producción encaminadas a superar estas condiciones. Por esta razón en nuestro laboratorio estamos interesados en transferir la capacidad de producir ramnolípidos a bacterias inocuas.

En el presente trabajo se estudió la producción de monoramnolípidos en *Escherichia coli* mediante la coexpresión de los genes *rhlAB* y *rmlBDAC* de *P. aeruginosa*. Los genes *rhlAB* codifican para la enzima Rt1, los genes *rmlBDAC* codifican las enzimas necesarias para la síntesis de dTDP-L-ramnosa. Estos últimos genes se identificaron y se aislaron a partir de un banco de cósmidos de *P. aeruginosa* PAO1 por hibridación en colonia. El cósmido aislado se denominó pNCV460 éste se transformó a *E. coli* HB101 y se determinó la actividad de la enzima RmlB, ésta fue mayor en un 60% con respecto a *E. coli* HB101. Los genes *rmlBDAC* se expresaron bajo su propio promotor en *E. coli* HB101. Se obtuvieron varias cepas de *E. coli* (HB101, RR1, W3110) transformadas con plásmidos que llevan los genes *rhlAB* y *rmlBDAC* y algunas veces con los genes *rhlAB* integrados en el cromosoma de *E. coli*. En matraz, se encontró que todas las cepas producen monoramnolípidos en tres medios de cultivo diferentes; Luria Bertani (LB), Medio mineral (M9) con glucosa como fuente de carbono y PPGAS, el cual

es bajo en fosfatos y tiene glucosa como fuente de carbono (este medio está diseñado para la producción de ramnolípidos de *P. aeruginosa*). Además en algunas situaciones el medio mineral (M9) se suplementó con ácidos grasos de cadena larga como fuente de carbono única o con glucosa. Los resultados obtenidos nos sugieren que es posible la producción de monoramnolípidos en cepas de *E. coli*, cuando se incrementó la concentración de dTDP-L-ramnosa. Respecto a los β -hidroxiácidos, la enzima Rt1 además de usar ácidos grasos libres como ya se ha reportado, también puede utilizar ácidos grasos unidos a la proteína acarreadora de grupos acilo (ACP) si consideramos que son drenados de la vía general de biosíntesis de los ácidos grasos cuando la cepa crece en medio mineral (M9) con glucosa como fuente de carbono y por último unidos a coenzima A (CoA) cuando la cepa crece en medio mineral (M9) con ácidos grasos de cadena larga como fuente de carbono, en este caso los sustratos son drenados de la degradación de ácidos grasos.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria gram negativa perteneciente a la rama γ de las proteobacterias, misma a la que pertenecen las enterobacterias (Pace, 1997; Woese, 1987). Dentro del género *Pseudomonas* se encuentran algunas otras especies como *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae* y *P. alcaligenes*. *P. aeruginosa* se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza ya que crece en el suelo, pantanos y hábitats marinos, así como en plantas y tejidos animales. Además esta bacteria se adhiere a superficies húmedas, formando una especie de agregados de colonias llamado biopelícula “biofilms” (Stover, *et al.*, 2000). También se encuentra en centros hospitalarios, lo cual representa un problema importante de salud para una población numerosa de enfermos especialmente, pacientes con cáncer, quemados, transplantados y con diabetes mellitus. En este grupo de pacientes, *P. aeruginosa* es responsable de infecciones tales como neumonía y septicemia (Fergie, *et al.*, 1994; Bergen y Shelhamer, 1996). Una vez que la infección se establece en estos pacientes, *P. aeruginosa* produce una serie de compuestos tóxicos extracelulares (exotoxina A y S, fosfolipasas C, ramnolípidos y proteasas como elastasa LasB y elastasa LasA) que causan daño tisular extenso, invasión en el torrente sanguíneo y diseminación. Otro grupo poblacional altamente susceptible a infecciones crónicas por *P. aeruginosa* está formado por enfermos de fibrosis quística (George, 1987; Govan y Deretic, 1996; Pier, 1985). *P. aeruginosa* coloniza muy eficientemente el tracto respiratorio de estos pacientes, y a medida que progresa la infección se seleccionan derivados mucoides de la bacteria que producen grandes cantidades del exopolisacárido alginato. Como se observa *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista difícil, ya que esta bacteria presenta una resistencia natural muy alta a distintos antibióticos y a desinfectantes (Van Delden e Iglewski, 1998; Stover, *et al.*, 2000). A pesar de esto algunas cepas de *P. aeruginosa* son importantes desde el punto de vista biotecnológico, sobre todo en el área ambiental debido a que son capaces de degradar compuestos hidrocarbonados tanto alifáticos como aromáticos (Maier y Soberón-Chávez, 2000). Actualmente se conoce la secuencia completa del genoma de *P. aeruginosa* PAO1 (6.3 Mbp), el tamaño de su genoma es relativamente grande con respecto al de otras bacterias ya secuenciadas (Stover, *et al.*, 2000).

2.2 Biosurfactantes, su origen microbiano y su función fisiológica.

Los surfactantes son moléculas anfipáticas tienen un extremo hidrofílico y otro hidrofóbico. Su estructura les permite que se orienten en la interface de fluidos con diferentes grados de polaridad tales como hidrocarburos/agua o aire/agua lo que permite reducir la tensión superficial e interfacial de estas mezclas y la formación de emulsiones donde los hidrocarburos pueden solubilizarse en agua o el agua puede solubilizarse en hidrocarburos. Estas características les confieren propiedades de detergentes, emulsificantes, formadores de espuma y dispersantes lo cual hace a los surfactantes productos químicos con aplicaciones versátiles. Los hay de origen químico y biológico, actualmente la mayoría de los surfactantes son derivados del petróleo. Sin embargo, el interés en los surfactantes de origen biológico mejor conocidos como biosurfactantes se ha incrementado debido a su diversidad, la posibilidad de su producción a través de la fermentación y su aplicación potencial en la protección del medio ambiente. La recuperación de petróleo crudo, cuidado de la salud y procesamiento industrial de alimentos son otras aplicaciones de los biosurfactantes. Además, éstos tienen numerosas ventajas sobre los surfactantes químicos por ejemplo, son menos tóxicos y más biodegradables; presentan mayor compatibilidad con el medio ambiente y mayor capacidad espumante así como alta selectividad y actividad específica a temperaturas extremas, pH y salinidad y tienen la ventaja de ser sintetizados a partir de fuentes renovables (Desai y Banat, 1997).

Los biosurfactantes se clasifican principalmente de acuerdo a su composición química y origen microbiano. Su extremo hidrofílico, está formado de aminoácidos o péptidos que pueden ser aniónicos o catiónicos; mono, di, o polisacáridos; y el extremo hidrofóbico, está formada de ácidos grasos saturados o insaturados (hidroxi). En la tabla 2.1 se presentan las principales clases de biosurfactantes. Entre los biosurfactantes más conocidos están los glicolípidos de los cuales, los ramnolípidos son los mejor conocidos.

Tabla 2.1 Surfactantes de origen biológico (Desai y Banat 1997).

Biosurfactante	Organismo
Glicolípidos	
Ramnolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Trehalolípidos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Mycobacterium sp.</i>
Sofrolípidos	<i>Torulopsis bombicola</i> <i>Torulopsis apicola</i> <i>Torulopsis petrophilum</i>
Celobiolípidos	<i>Ustilago zaeae</i> , <i>Ustilago maydis</i>
Lipopéptidos y Lipoproteínas	
Péptido-lípido	<i>Bacillus licheniformis</i>
Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Polimixinas	<i>Bacillus polymyxa</i>
Acidos grasos, Lípidos neutros y Fosfolípidos	
Acidos grasos	<i>Corinebacterium lepus</i>
Lípidos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolípidos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes polímeros	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Manan-lípido-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Carbohidrato-proteína-lípido	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Debaryomyces polymorphus</i>
Proteína PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Los biosurfactantes se dividen en moléculas de bajo peso molecular (glicolípidos y lipopéptidos), los cuales disminuyen la tensión superficial e interfacial y en moléculas de alto peso molecular (polisacáridos, proteínas, lipopolisacáridos, lipoproteínas o mezclas complejas de estos biopolímeros), éstos son más prácticos en la estabilización de emulsiones aceite en agua. Dada la diversidad de los biosurfactantes, es muy difícil generalizar sobre su papel natural (Rosenberg y Ron, 1999). Sin embargo, su función principal es permitir a los microorganismos crecer en sustratos inmiscibles en agua a través de la reducción de la tensión superficial, de esta forma los sustratos son más disponibles para su consumo y metabolismo (Fiechter, 1992).

A través de la secreción de biosurfactantes al medio de crecimiento, los microorganismos que cuentan con sustratos no polares como única fuente de carbono, aseguran el suministro de fuente de carbono para mantenerse y crecer. Esta hipótesis está basada en el hecho de que algunos microorganismos que utilizan hidrocarburos producen cantidades reducidas de biosurfactantes cuando crecen en sustratos solubles en agua. Se ha comprobado que el crecimiento de *P. aeruginosa* en n-alcanos podría ser acelerado al agregar pequeñas cantidades de ramnolípido al medio de crecimiento (Sung-Chyr, 1996).

Existe evidencia que varios biosurfactantes están involucrados en la adherencia celular la cual brinda gran estabilidad bajo condiciones ambientales hostiles y de virulencia, en desorción celular para encontrar nuevos habitats para sobrevivir, en efectos antagonistas hacia otras bacterias en el ambiente (Desai y Banat, 1997). Los fosfolípidos aniónicos tienen un papel crítico en la inserción de proteínas a membrana como toxinas (Leenhouts, *et al.*, 1995). Se ha demostrado que varios biosurfactantes, principalmente lipopéptidos y glicolípidos tienen actividad de biocidas. Esta actividad tiene una conexión directa con sus propiedades anfipáticas. La mayoría de los biosurfactantes antibióticos como ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* y surfactina producida por *B. subtilis* funcionan como antibióticos solubilizando los componentes principales de membranas celulares. Estos antibióticos liberados en el medio de cultivo logran que los microorganismos tengan una mejor oportunidad de sobrevivencia en un ambiente alterado (Sung-Chyr, 1996). Otras funciones asociadas a los ramnolípidos son su participación en el deslizamiento en superficies semisólidas "swarming" probablemente con el objetivo de emigrar hacia ambientes con suficientes nutrientes y así colonizar su ambiente natural (Köhler, *et al.*, 2000). Por otro lado los ramnolípidos junto con la fosfolipasa C de *P. aeruginosa* en forma sinérgica actúan en la ruptura de lípidos y lecitina. Ambos contribuyen a la invasión del tejido y su necrosis por sus efectos citotóxicos. Dada la estructura de los ramnolípidos, se cree que éstos solubilizan los surfactantes de los pulmones, haciéndolos más accesibles a su rompimiento por la acción de la fosfolipasa C. La pérdida de estos surfactantes origina atelectasia asociada con infecciones crónicas en los pulmones y una eventual insuficiencia pulmonar. Los ramnolípidos

también inhiben el transporte mucociliar y función ciliar en el epitelio respiratorio en humanos (Van Delden e Iglewski, 1998). Un nuevo papel propuesto de los ramnolípidos es su participación en el mantenimiento de los canales abiertos formados en “biofilms” (Davey, *et al.*, 2003).

2.3 Producción de biosurfactantes.

Las especies microbianas son importantes en la determinación de la estructura y rendimiento de los biosurfactantes. Sin embargo, existen otros factores que afectan la producción de biosurfactantes como son fuentes de carbono, limitaciones nutricionales y parámetros físicos y químicos como pH, temperatura y aereación. La fuente de nitrógeno y su concentración así como la relación C:N son factores que afectan de manera importante la síntesis de biosurfactantes. El hierro, magnesio, calcio, fosfatos y concentración de sales de potasio también afecta la síntesis de biosurfactantes (Fiechter, 1992).

En la figura 2.1 se muestran los siguientes patrones de producción de biosurfactantes a través de la fermentación; 1) producción asociada al crecimiento, 2) producción bajo condiciones limitantes de crecimiento, 3) producción por células en reposo o inmovilizadas y 4) producción con suplementación de precursores (Desai y Banat, 1997).

En la producción de biosurfactantes asociados al crecimiento, existe una relación paralela entre la utilización del sustrato, el crecimiento y la producción del biosurfactante (figura 2.1A). Aquí la fuente de carbono juega un rol importante para la producción del biosurfactante. La producción bajo condiciones limitantes de crecimiento se caracteriza por un incremento en el nivel de biosurfactante como resultado de la limitación de uno o mas componentes del medio (figura 2.1B). A partir de este sistema de fermentación se logró una sobreproducción de ramnolípidos por *P. aeruginosa* solamente durante la fase estacionaria de crecimiento debido a la limitación de nitrógeno, la limitación de cationes multivalentes como Fe^{++} , Mg^{++} o Ca^{++} incrementaron la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas sp.* (Kosaric, 1993). La

producción por células en reposo o inmovilizadas es un tipo de producción de biosurfactantes en el cual no hay multiplicación celular. Aquí, las células utilizan la fuente de carbono para la síntesis de biosurfactantes, como se ilustra en la figura 2.1C. La producción de ramnolípidos por *Pseudomonas* sp. y *Pseudomonas* CFTR-6, soforolípidos por *T. bombicola* y lípidos de celobiosa por *U. maydis*, son ejemplos de este tipo de producción. Se logró un incremento significativo en la producción de biosurfactantes con la adición de sus precursores al medio de cultivo tanto lipofílicos como carbohidratos, los cuales tienen efecto en el tipo de glicolípido formado (Desai y Banat, 1997).

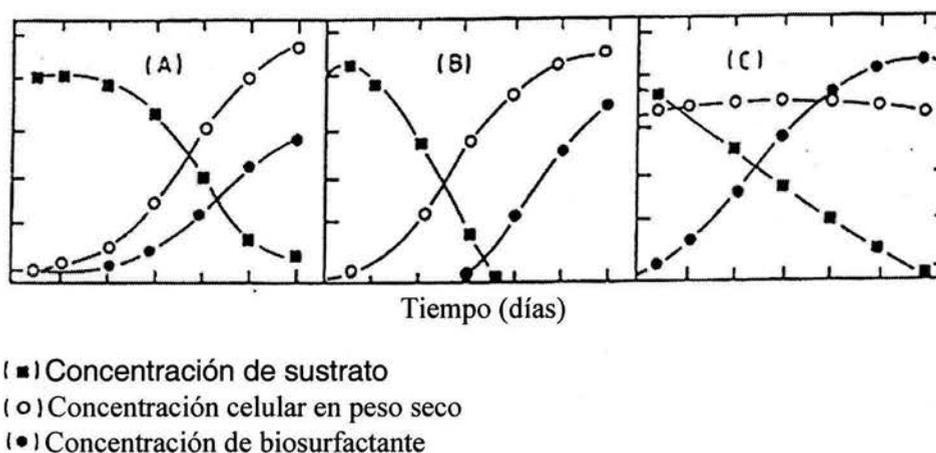


Figura 2.1 Tipos de cinéticas de fermentación para la producción de biosurfactantes. A) Producción asociada al crecimiento, B) Producción bajo condiciones limitadas de crecimiento y C) Producción de biosurfactantes por células en reposo o inmovilizadas.

Para la sobreproducción de ramnolípidos por *P. aeruginosa*, se han utilizado varias fuentes de carbono como glicerol, glucosa, etanol, manitol, n-alcanos y aceite de oliva. Algunas fuentes de nitrógeno adecuadas son amonio e iones nitrato. Una precondition esencial para la sobreproducción de los ramnolípidos es la limitación de uno o mas componentes del medio de

cultivo y un exceso de la fuente de carbono (Kosaric, 1993). Estas condiciones se mantienen a través de los siguientes métodos de producción: a) cultivos por lote o cultivos por lote alimentado bajo condiciones limitantes de crecimiento, b) cultivos por lote con células en reposo, c) producción semicontinua con células inmovilizadas y d) cultivos continuos y producción con células libres, la tabla 2.2 resume algunos de estos cultivos en matraces y birreactores (Lang-Wullbrandt, 1999).

Tabla 2.2 producción microbiana de ramnolípidos (RL) por *Pseudomonas* sp. Condiciones generales: cultivos en matraces o en birreactores, medios minerales o complejos, 28-37 °C; pH 6.0-7.5. ND no determinado.

Cepa	Fuente de carbono (g/l)	RL (g/l)	$Y_{p/s}$ (g/g)	X (g/l)	$Y_{p/x}$ (g/g)	t (h)	Pv (g/l h)	Referencia
<i>P. aeruginosa</i>	Glicerol (30)	2.5	0.083	ND	ND	96	0.026	Jarvis y Johnson 1949
<i>P. aeruginosa</i>	Glicerol (30)	2.0	0.067	ND	ND	120	0.016	Hauser y Karnovsky 1954
<i>P. aeruginosa</i> KY 4025	n-parafina (90)	8.5	0.094	ND	ND	144	0.059	Itoh, <i>et al.</i> , 1971; Suzuki e Itoh, 1972.
<i>P. sp</i>	n-parafina (50)	14.0	0.280	ND	ND	120	0.117	Yamaguchi, <i>et al.</i> , 1976
<i>P. sp</i> MUB	n-C14/15 (20)	2.9	0.145	3.4	0.85	48	0.060	Wagner, <i>et al.</i> , 1983
<i>P. sp</i> DSM 2874	n-C14/15 (80)	12.8	0.160	21.0	0.61	180	0.071	Syldatk, <i>et al.</i> , 1985a
<i>P. aeruginosa</i> UI 29791	aceite de maíz (75)	46.0	0.613	12.0	3.83	192	0.240	Linhardt, <i>et al.</i> , 1989; Daniels, <i>et al.</i> , 1988
<i>P. aeruginosa</i> 44T1	aceite de olivo (20)	7.65	0.382	6.0	1.28	72	0.106	Robert, <i>et al.</i> , 1989
<i>P. aeruginosa</i> 44T1	aceite de olivo (20)	9.0	0.450	ND	ND	120	0.075	Parra, <i>et al.</i> , 1990
<i>P. aeruginosa</i> 44T1	aceite de olivo (20)	10.0	0.500	4.2	2.38	110	0.091	Manresa, <i>et al.</i> , 1991
<i>P. sp.</i> JAMM	aceite de olivo (24)	1.40	0.058	ND	ND	150	0.009	Mercadé y Manresa, 1994
<i>P. aeruginosa</i> DSM 7108	aceite de soya (125)	78.0	0.624	ND	ND	167	0.467	Lang S., y Wullbrandt D., 1999
<i>P. aeruginosa</i> DSM 7107	aceite de soya (163)	112	0.687	ND	ND	264	0.424	Giani, <i>et al.</i> , 1997
<i>P. aeruginosa</i> BS2	suero de la leche (20)	1.78	0.089	1.6	1.11	44	0.040	Babu, <i>et al.</i> , 1996
<i>P. aeruginosa</i> BS2	sacarosa (20)	1.85	0.093	1.5	1.23	44	0.042	Babu, <i>et al.</i> , 1996
<i>P. aeruginosa</i> GL1	glicerol (30)	5.8	0.193	2.8	2.07	150	0.038	Arino, <i>et al.</i> , 1996
<i>P. sp.</i> BOP100	etanol (30)	3.0	0.100	1.0	3.00	120	0.025	Osman, <i>et al.</i> , 1996
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3924	etanol (35)	32.0	0.582	3.4	9.41	168	0.190	Matsufuji, <i>et al.</i> , 1997
<i>P. aeruginosa</i> UW-1	aceite de canola (60)	24.3	0.405	ND	ND	216	0.113	Sim, <i>et al.</i> , 1997

2.4 Estructuras moleculares de los ramnolípidos.

Los ramnolípidos están formados por una o dos moléculas de ramnosa unidas a una o dos moléculas de ácidos β -hidroxialcanoicos de longitud variable en su cadena. Combinaciones de estos grupos generan mezclas complejas de ramnolípidos.

Bergström y colaboradores (1946) los encontraron por vez primera. Sin embargo, la relación molar de ambos componentes fue elucidada por Jarvis y Johnson (1949), quienes demostraron una unión glicosídica entre las dos moléculas de ácido graso β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato con dos moléculas de ramnosa en cultivos de *P. aeruginosa* con glicerol como fuente de carbono. A esta estructura molecular se le conoce como diramnolípido, R2 ó Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ (figura 2.2). El ramnolípido L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (monoramnolípido, R1 o Rha-C₁₀-C₁₀), se aisló de cultivos de *P. aeruginosa* KY4025 con n-alcanos (mezclas de fracciones C₁₂, C₁₃ y C₁₄) como fuente de carbono (figura 2.2), (Itoh, *et al.*, 1971). Los ramnolípidos R3 y R4 se identificaron a partir de cultivos con células en reposo de *Pseudomonas* sp. DSM 2874, (Syldatk, *et al.*, 1985a, b) éstos son diferentes a R1 y R2 porque tienen una molécula de ácido β -hidroxidecanoato (figura 2.2). Además, Déziel y colaboradores (1999) identificaron y cuantificaron 28 tipos de ramnolípidos semejantes producidos por la cepa de *P. aeruginosa* 57RP con manitol o naftaleno como fuentes de carbono (Déziel, *et al.*, 1999). Algunos de estos ramnolípidos ya han sido identificados por otros autores (Rendell, *et al.*, 1990; Manso Pajarron, *et al.*, 1993; Koster, *et al.*, 1994; Arino, *et al.*, 1996; Déziel, *et al.*, 1996; Bosch, *et al.*, 1989). Sin embargo, los tipos de ramnolípidos que se producen mas abundantemente en cultivos líquidos con glucosa como fuente de carbono son los mono y diramnolípidos (R1, R2).

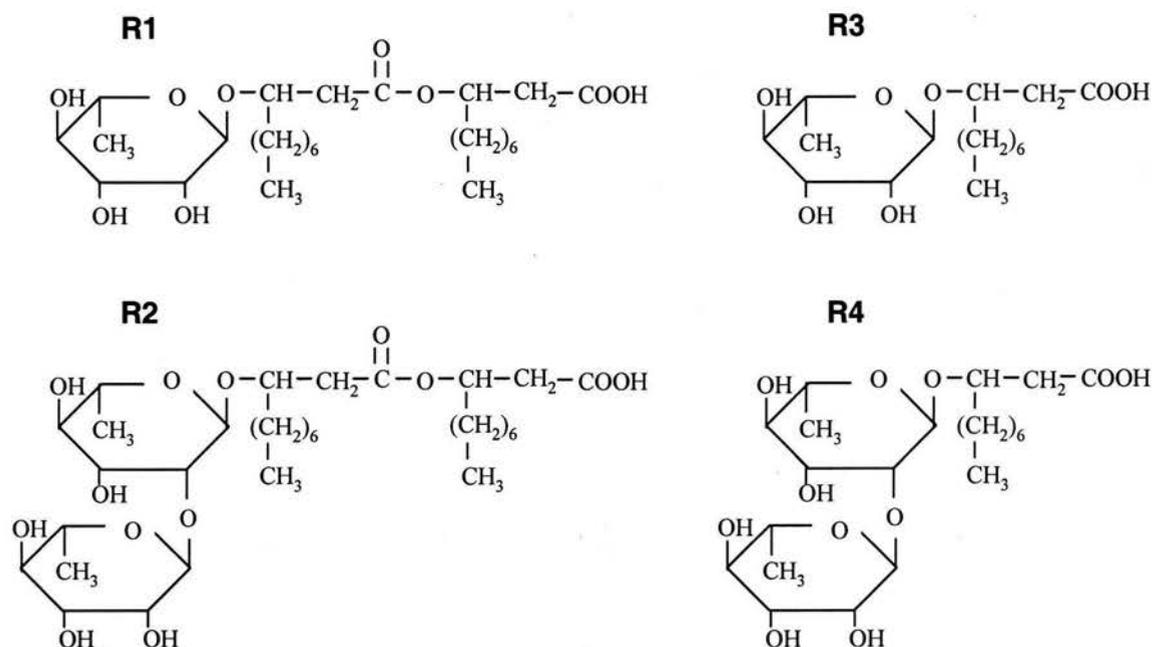


Figura 2.2. Estructuras de los ramnolípidos R1, R2, R3 y R4 de *P. aeruginosa* (tomado de: Edwards y Hayashi, 1965; Itoh, *et al.*, 1971; Syltatk, *et al.*, 1985 a, b).

2.5 Propiedades fisicoquímicas de los ramnolípidos.

Desde que son excretados al medio ambiente extracelular los ramnolípidos, reducen la tensión superficial de los cultivos. Los ramnolípidos reducen la tensión superficial del agua de 72 mN m^{-1} a valores por debajo de 30 mN m^{-1} y la tensión interfacial de sistemas agua-aceite de 43 mN m^{-1} a valores por debajo de 1 mNm^{-1} . Cuando un surfactante es adicionado a sistemas aire-agua o aceite-agua, a medida que se incrementa la concentración se observa una reducción en la tensión superficial hasta alcanzar un valor crítico; arriba de este valor las moléculas anfífilicas asociadas tienden fácilmente a formar estructuras supramoleculares como micelas, bicapas y vesículas. Este valor es conocido como concentración micelar crítica (CMC). La CMC depende de la solubilidad de un surfactante en una solución acuosa y se usa para determinar su eficiencia. Los ramnolípidos son emulsionantes ya que contribuyen a la estabilización de emulsiones aceite en agua. En estudios recientes se demostró que emulsiones de n-alcános (C_{10} - C_{18}), alquenos (C_{14} - C_{16}), compuestos aromáticos (tolueno, 2 metilnaftaleno, etc.), aceite crudo, queroseno, aceite de

cacahuete y aceite de oliva en sistemas acuosos pueden ser estabilizados por ramnolípidos, la pérdida de su estabilidad fué solamente de 5%-25% después de 24 horas, dependiendo del sustrato hidrofóbico (Lang-willbrandt, 1999).

2.6 Aplicación potencial de los ramnolípidos.

Los ramnolípidos son biosurfactantes con una gran variedad de aplicaciones potenciales tanto en biorremediación como en la industria. Los accidentes de descarga de hidrocarburos en los mares y en las zonas costeras son un problema mundial. Los ramnolípidos se han utilizado en el sitio del accidente y a nivel de laboratorio. Estos estudios mostraron un efecto positivo en medidas preventivas y en tratamientos posteriores. Sin embargo, pruebas de toxicidad de ramnolípidos dieron valores menores de IC_{50} con respecto a otros glicolípidos microbianos sobre algunos organismos marinos. Por otro lado, son mas biocompatibles que los surfactantes químicos convencionales. La contaminación en suelos es extensa, va desde desechos industriales, hidrocarburos aromáticos, aceites crudos, productos de refinería, pesticidas hasta metales pesados. Pruebas de ramnolípidos para su uso en la remediación de suelos mostraron efectos positivos en la remoción de aceite en arena, pero no pueden asistir la degradación de éste por microorganismos en sistemas reales. Respecto a la descontaminación de áreas con metales pesados, los ramnolípidos forman complejos con iones de Pb^{2+} , Zn^{2+} y Cd^{2+} . La máxima capacidad de unión en una relación molar fue de 0.2 Cd^{2+} /ramnolípidos.

Se han realizado varios estudios de actividad biológica de los ramnolípidos. Por ejemplo; los ramnolípidos 1 y 2 restringen el crecimiento de *B. subtilis* a concentraciones de 10-35 μgml^{-1} (IC_{50}), respecto al cuidado de las plantas y sus plagas, se han usado los ramnolípidos para mejorar la humedad de la superficie de sus hojas, probablemente por una separación de la capa cerosa hidrofóbica, estos glicolípidos también muestran efectos antifitovirales para las combinaciones virus/huésped del virus del mosaico de tabaco/*Nicotiana glutinosa* y virus X de papa/*Nicotiana tabacum*. Monoramnolípidos y diramnolípidos purificados mostraron actividad

zoosporica en especies de fitopatógenos: *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora capsici* y *Plasmopara lactucaeradicis*. A concentraciones de 5-30 $\mu\text{g ml}^{-1}$, ambos ramnolípidos detuvieron la motilidad y lisaron toda la población zoóspora en un minuto. Esto sucede probablemente por una intercalación de los glicolípidos en la membrana plasmática con su subsecuente destrucción (Lang-willbrant, 1999).

2.7 Precursores de los ramnolípidos.

Los sustratos precursores para la síntesis de ramnolípidos; la dTDP-L-ramnosa y el ácido β -hidroxidecanoico provienen del metabolismo central de carbono y de la vía general de síntesis de ácidos grasos.

La L-ramnosa y la L-fucosa son los miembros más representativos del grupo de las desoxihexosas y forman parte de polisacáridos, lipopolisacáridos, glicoproteínas y oligosacáridos en bacterias, plantas y animales (Glaser, 1963). La L-ramnosa es de interés particular porque se encuentra como componente en la membrana externa de muchos microorganismos patógenos. En *P. aeruginosa*, la dTDP-L-ramnosa es donador del grupo ramnosil para la síntesis de los ramnolípidos y también es precursor de la L-ramnosa en la síntesis de lipopolisacáridos (LPS), (figura 2.3). El lipopolisacárido de *P. aeruginosa* es típico de bacterias gram negativas, está formado por el lípido A, una región interna "core" y por unidades de antígeno O. *P. aeruginosa* produce simultáneamente dos formas diferentes de lipopolisacáridos denominados banda A y banda B (Rivera, *et al.*, 1988; Lam, *et al.*, 1989). El antígeno común o banda A se compone de un homopolímero de D-ramnosa (Arsenaul, *et al.*, 1991). La ramnosa en el antígeno común tiene configuración D mientras que la ramnosa que se encuentra en el antígeno O del lipopolisacárido, también denominado banda B para ciertos serotipos de *P. aeruginosa* así como en otras bacterias gram negativas, tiene configuración L (Rochetta, *et al.*, 1999).

La dTDP-L-ramnosa se sintetiza a partir de α -D-glucosa-1-fosfato mediante una serie de reacciones. En *Xanthomonas campestris*, que son bacterias gram negativas de la familia *Pseudomonadaceae* al igual que *P. aeruginosa* y en otras bacterias gram negativas (*Salmonella typhimurium* y *E. coli*) las enzimas que catalizan las reacciones a dTDP-L-ramnosa son codificadas por los genes organizados en el operon *rfaABCD*. Varios autores han reportado la

caracterización molecular de estos genes (Jiang, *et al.*, 1991; Marumo, *et al.*, 1992; Koplin, *et al.*, 1993; Zhang, *et al.*, 1993; Klena y Schnaitman, 1993; Clarke, *et al.*, 1992; Macpherson, *et al.*, 1995, Marolda, *et al.*, 1995). En *P. aeruginosa* se requiere de cuatro enzimas RmlA, RmlB, RmlC y RmlD (figura 2.3) para la síntesis de dTDP-L-Ramnosa a partir de α -D-glucosa-1-fosfato y desoxitimidinatrifosfato (dTTP). Estas enzimas presentan alto porcentaje de identidad con los genes *rfaABCD*. La reacción de síntesis inicia con la glucosa-1-fosfato timidiltransferasa (proteína codificada por el gen *rmlA*) que une un dTTP a la molécula de α -D-glucosa-1-fosfato liberando un pirofosfato y formando la dTDP-D-glucosa. Posteriormente, la dTDP-D-glucosa se deshidrata por la dTDP-D-glucosa 4,6-deshidratasa (proteína codificada por el gen *rmlB*) para formar el compuesto de dTDP-6-desoxi-D-xilo-4-hexulosa, la cual es epimerizada en el carbón tres y cinco por la dTDP-6-desoxi-D-xilo-4-hexulosa 3,5-epimerasa (proteína codificada por el gen *rmlC*). El paso final es la reducción acoplada con NADPH para formar la dTDP-L-ramnosa catalizada por la dTDP-6-desoxi-L-lixo-4-hexulosa-4-reductasa (proteína codificada por el gen *rmlD*), (Glaser y Kornfeld, 1961; Allard, *et al.*, 2000). En *P. aeruginosa* como en otras especies bacterianas estos genes están organizados en un operón, el cual se denomina *rmlBDAC* (Olvera, 2000; Rahim, *et al.*, 2000).

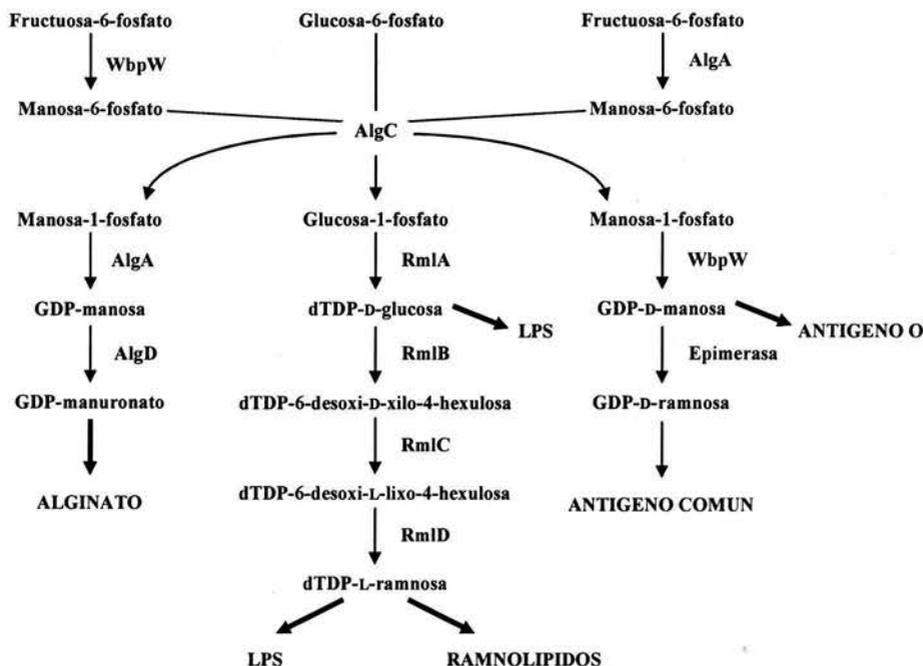


Figura 2.3 Vía general de biosíntesis del precursor dTDP-L-ramnosa, GDP-D-ramnosa, GDP-manosa y GDP-ácido manurónico, y su relación en la producción de alginato, lipopolisacáridos (LPS) y síntesis de ramnolipidos (tomado de Olvera, *et al.*, 1999).

La producción de alginato y lipopolisacáridos son factores de virulencia importantes en *P. aeruginosa*. El alginato es un exopolisacárido producido por *P. aeruginosa* durante infecciones en los pulmones de los pacientes con fibrosis quística (Govan y Deretic, 1996; Pier, 1985). La genética molecular de la biosíntesis del alginato ha sido ampliamente estudiada (May y Chakrabarty, 1994). La ruta biosintética del alginato se lleva a cabo a partir de la fructosa-6-fosfato a GDP-manosa, con manosa-6-fosfato y manosa-1-fosfato como intermediarios (figura 2.3). La enzima clave en esta vía es la GDP-manosa deshidrogenasa (codificada por el gen *algD*), la cual convierte la GDP-manosa a GDP-ácido manurónico, precursor directo en la síntesis de alginato. La GDP-mannosa además de ser precursor en la síntesis de alginato también es precursor de la GDP-D-ramnosa, éste es monómero del antígeno común o banda A (figura 2.3). La enzima WbpW es homóloga a la enzima AlgA (enzima bifuncional fosfomanosa isomerasa-GDP-manosa pirofosforilasa) y está involucrada en la síntesis del antígeno común o banda A (Rochetta, *et al.*, 1998). Así la biosíntesis de ramnosa tiene pasos en común con la vía de síntesis de al menos dos polisacáridos (figura 2.3). El gen *algC* codifica la enzima

fosfomanomutasa que cataliza la conversión de manosa-6-fosfato a manosa-1-fosfato. Esta enzima también tiene actividad fosfoglucomutasa y está involucrada en la síntesis de lipopolisácaridos (Coyne, *et al.*, 1994), ya que participa en la biosíntesis de glucosa y ramnosa, necesarias en la formación de la región interna “core”. En nuestro laboratorio, Clarita Olvera Carranza demostró que la actividad de AlgC es esencial en la producción de ramnolípidos gracias a su actividad de fosfoglucomutasa (figura 2.3), por generar glucosa-1-fosfato, precursor de dTDP-glucosa y finalmente de dTDP-L-ramnosa (Olvera, *et al.*, 1999). Así, en *P. aeruginosa* la proteína AlgC tiene un papel fundamental en la producción de alginato, ramnolípidos y lipopolisácaridos, tres características asociadas a su virulencia, aunque la producción de cada uno de estos compuestos está asociada a una regulación completamente diferente desde el punto de vista genético y ambiental.

Por otro lado, los ácidos polihidroxicanoicos (PHAs) son macromoléculas estructuralmente lineales sintetizadas por muchas bacterias gram negativas. Estos compuestos son acumulados intracelularmente a niveles tan altos que alcanzan el 90% de su peso celular seco. Algunos PHAs de origen bacteriano muestran propiedades similares a algunos plásticos comunes como el polipropileno sólo que éstos tienen la propiedad de ser biodegradables. La composición de los monómeros de los PHAs depende de la especificidad de la enzima PHA sintasa (enzima que cataliza la unión entre los monómeros) hacia los sustratos, las fuentes de carbono disponibles en los medios de cultivo, y las rutas metabólicas involucradas en la producción de PHAs (Rehm y Steinbüchel, 1999). Los tioésteres (R)- β -hidroxiacil coenzima A (β HA-CoA), son sustratos para la enzima PHA sintasa, éstos son alimentados de varias vías metabólicas tales como la degradación y biosíntesis de los ácidos grasos, esta última en forma indirecta debido que los sustratos deben ser (β HA-CoA).

P. aeruginosa sintetiza y acumula grandes cantidades de PHAs y ramnolípidos, los cuales contienen partes lipídicas que se derivan de la biosíntesis de ácidos grasos. Se ha demostrado que (R)- β -hidroxidecanoil-CoA es sustrato *in vitro* para la PHA sintasa de *P. aeruginosa* (Qi, *et al.*, 2000), de tal forma que para servir como sustrato para la PHA sintasa, el (R)- β -hidroxiacil-ACP, intermediario de la biosíntesis de los ácidos grasos, debe ser convertido a su correspondiente derivado CoA. Recientemente se identificó y caracterizó una transacilasa PhaG de *P. putida* que cataliza la transferencia de (R)- β -hidroxidecanoil-ACP a CoA (Rehm, *et al.*, 1998). Así que, PhaG relaciona la biosíntesis de los ácidos grasos con la biosíntesis de PHAs.

En nuestro laboratorio, Jesús Campos García comprobó que en *P. aeruginosa* el gen *rhlG* está específicamente involucrado en la síntesis del β -hidroxiácido de los ramnolípidos (Campos, *et al.*, 1998). El gen *rhlG* se identificó por homología con el gen *fabG* de *E. coli* con un 36% de identidad a nivel de sus aminoácidos. Este gen codifica para una β -cetoacil reductasa. Se propone que RhlG cataliza la reducción de β -cetodecanoilester-ACP dependiente de NADPH, el cual es un intermediario de la biosíntesis de los ácidos grasos, obteniéndose β -hidroxidecanoil-ACP, un probable precursor para la biosíntesis de ramnolípidos (figura 2.4). El producto del gen *rhlG* juega un rol importante en el suministro de los precursores de PHAs pero no es esencial para su síntesis. *E. coli* no es capaz de acumular PHAs de forma natural. Sin embargo, se ha demostrado que cepas recombinantes de *E. coli* S17-1 coexpresando los genes que codifican para la PHA sintasa (*phaC1*) de *P. aeruginosa* y la transacilasa PhaG de *P. pútida* con gluconato como fuente de carbono y triclosán como inhibidor de la enoil-ACP reductasa (Fab I), con el objetivo de generar intermediarios de la biosíntesis de ácidos grasos, acumuló de 2 a 3 % de PHAs de su peso celular seco (Rehem, *et al.*, 2001). Por otra parte, también existen estudios donde se demuestra que intermediarios de la beta-oxidación de los ácidos grasos también son utilizados para la síntesis de PHAs y que el β -hidroxidecanoil-CoA es el principal sustrato para la PHA sintasa (*phaC1*) de *P. aeruginosa* ya que cepas recombinantes de *E. coli* LS1298 (*fadB*) llevando el gen *phaC1* producen más del 20 % de PHAs de su peso celular seco a partir de dodecanoato como fuente de carbono (Langenbach, *et al.*, 1997).

2.8 Biosíntesis de los ramnolípidos de *P. aeruginosa*.

Los primeros estudios de la síntesis de ramnolípidos por *P. aeruginosa* se realizaron *in vivo* con varios precursores marcados radiactivamente como glicerol- α -C¹⁴, glicerol- β -C¹⁴ y acetato-1-C¹⁴ (Hauser y Karnovsky, 1954, 1956, 1958) y con extractos enzimáticos por Burger y colaboradores (1963, 1966). Estos últimos propusieron una ruta de biosíntesis para los mono y diramnolípidos de *P. aeruginosa* ATCC 7700 (figura 2.4). En esta vía, la síntesis se lleva a cabo en dos reacciones secuenciales con la transferencia de un grupo ramnosil, cada una es catalizada por las enzimas Rt1 y Rt2 respectivamente, utilizando dTDP-L-ramnosa como donador del grupo ramnosil y el ácido β -hidroxidecanoico o L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato como el receptor.

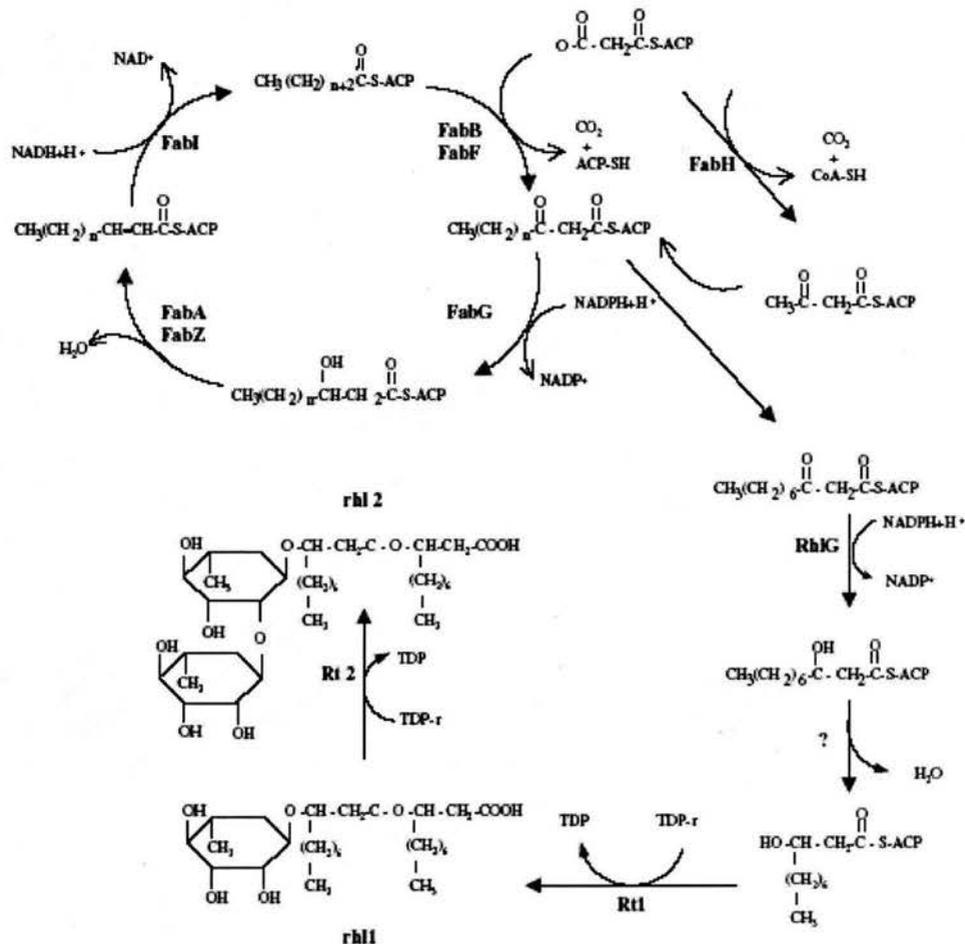


Figura 2.4 Diagrama de biosíntesis de ramnolípidos que incluye la representación esquemática de la vía de biosíntesis de los ácidos grasos y el papel de la proteína RhlG en la producción de ramnolípidos. El ciclo de síntesis de los ácidos grasos inicia con FabH que requiere acetyl-CoA y malonil-ACP para formar acetoacil-ACP. Los ciclos posteriores inician con la condensación de malonil-ACP con acil-ACP, catalizado por FabB y FabF. En el segundo paso, el β-cetoéster es reducido a un β-hidroxiacil-ACP, catalizado por FabG. El tercer paso en el ciclo es catalizado por FabA y FabZ. El cuarto y último paso es la conversión de trans-2-enoil-ACP a acil-ACP, una reacción catalizada por FabI. TDP-r: dTDP-L-ramnosa; Rtl1 y Rtl2: ramnosiltransferasa 1 y 2, respectivamente; rhl1 y rhl2: mono y di ramnolípidos, respectivamente (Tomado de Campos, *et al.*, 1989).

Dado que existen varios tipos de ramnolípidos de cadena hidrocarbonada variable, las enzimas Rtl1 y Rtl2 parecen no ser altamente específicas para su sustrato en la parte hidrofóbica. La enzima Rtl1 está codificada por los genes *rhlA* y *rhlB*. Ochsner y colaboradores (1994b) propusieron que la proteína RhlA es necesaria para la estabilización de RhlB (subunidad catalítica de la enzima Rtl1) en la membrana citoplásmica. Sin embargo, estudios recientes basados en la homología con PhaG podrían indicar que RhlA probablemente está involucrada en

la biosíntesis de dímeros de ácidos β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoatos, intermediarios en síntesis de PHAs y de ramnolípidos (Rehm, *et al.*, 1998; Déziel, *et al.*, 2003). Actualmente se sabe que el gen *rhlC* codifica para la Rt2. Esta enzima presenta homología con otras ramnosiltransferasas necesarias para la síntesis de lipopolisacáridos. Sin embargo, el gen *rhlC* no está involucrado en la síntesis de lipopolisacáridos (Rahim, *et al.*, 2001).

2.9 Genética de la biosíntesis de ramnolípidos.

Cuando *P. aeruginosa* alcanza una densidad celular alta produce y secreta al medio de cultivo ramnolípidos preferentemente cuando ésta crece en sustratos hidrofóbicos como hidrocarburos o bajo condiciones de limitación de nitrógeno (Pearson, *et al.*, 1997) o de fosfato (Zhang y Miller, 1992). La síntesis de ramnolípidos en *P. aeruginosa* está regulada por un fenómeno de respuesta colectiva en bacterias denominado “detección de quórum” (quorum sensing), este fenómeno está controlado básicamente por dos genes que son regulados por separado. Un gen codifica para la enzima que sintetiza moléculas autoinductoras y el otro para una proteína reguladora. Este sistema es utilizado por un número amplio de bacterias para regular la transcripción de un grupo de genes, en función de su densidad celular. Es decir, cuando el cultivo alcanza una densidad celular suficiente, la bacteria incrementa la producción de moléculas autoinductoras (N-acil-homoserina lactonas), éstas se difunden al medio y cuando se alcanza una concentración umbral, ocurre la activación genética (Fuqua, *et al.*, 1996, Fuqua y Greenberg, 1998, Salmond, *et al.*, 1995).

P. aeruginosa posee al menos dos sistema de detección de quórum, *las* y *rhl* (Latifi, *et al.*, 1995; Ochsner, *et al.*, 1994a, 1994b; Ochsner y Reiser 1995; Pearson, *et al.*, 1995, 1997; Pesci, *et al.*, 1997). En el primero, el producto del gen *lasI* sintetiza la molécula autoinductora N-(3-oxododecanoil)-L-HSL (Pearson, *et al.*, 1994), la cual interactúa con LasR para activar la transcripción de genes de virulencia como *lasB*, *lasA*, *toxA* y *lasI* (Gambello y Iglewski, 1991; Gambello, *et al.*, 1993; Seed, *et al.*, 1995; Toder, *et al.*, 1991, 1994; Passador, *et al.*, 1993). El sistema RhlI/RhlR activa la expresión de los genes involucrados en la síntesis de ramnolípidos y piocianina (Ochsner, *et al.*, 1994a; Ochsner y Reiser 1995; Latifi, *et al.*, 1996). Los estudios genéticos de la síntesis de ramnolípidos fueron hechos por Ochsner y colaboradores (1994a, 1994b; 1995; Ochsner y Reiser 1995). Su estrategia consistió en el estudio de complementación genética de cepas mutantes 65E12, UO287, UO299 y UO391 derivadas de *P. aeruginosa* PG201,

la cepa 65E12 no produce ramnolípidos en medio mínimo con hexadecano como fuente de carbono (Koch, *et al.*, 1991). La región que complementó las mutantes está formada por los genes *rhlABRI*, su organización se describe en la figura 2.5. La enzima Rt1 es clave para la síntesis de monoramnolípidos, está compuesta de dos subunidades codificadas por los genes *rhlAB* que están organizados en un operón (Ochsner, *et al.*, 1994b), los genes *rhlR/rhlI* forman el sistema de “detección de quórum” (quorum sensing), actúan como reguladores de la expresión del operón *rhlAB*, del gen *rhlC* que codifica para la enzima Rt2, enzima clave para la síntesis de diramnolípidos y otros genes (Ochsner, *et al.*, 1994a; Ochsner y Reiser 1995; Rahim, *et al.*, 2001; Brint y Ohman, 1995). RhlA y RhlB son proteínas con una masa molecular de 32.5 kDa y 47 kDa respectivamente. Se sugiere que RhlA es una proteína de membrana interna, mientras que RhlB es una proteína que posee por lo menos dos posibles dominios de adhesión a membrana, por lo que se piensa que la proteína RhlB se ancla a la membrana interna. La proteína RhlC tiene una masa molecular de 35.9 kDa, ésta presenta una región hidrofóbica, lo cual indica que es una proteína unida a membrana interna. Tomando en cuenta la localización subcelular de ambas enzimas Rt1 y Rt2, se sugiere que la producción de ambos mono y diramnolípidos y su secreción están acopladas (Rahim, *et al.*, 2001).

Un esquema de la síntesis de ramnolípidos en *P. aeruginosa* regulada por el sistema de “detección de quórum” (quorum sensing), se presenta en la figura 2.5. Cuando el cultivo alcanza una densidad celular suficiente, *P. aeruginosa* responde produciendo N-(3-butiril)-L-HSL, producto de la enzima sintetasa de autoinductor RhlI (Pearson, *et al.*, 1995; Ochsner y Reiser 1995), ésta se difunde al medio y cuando alcanza una concentración umbral se une al activador transcripcional, RhlR (Ochsner, *et al.*, 1994). Este complejo se une al ADN en una secuencia consenso denominada caja *las* localizada cuesta arriba del promotor de *rhlA* y así activa la transcripción del operón *rhlAB* dando como resultado la síntesis de monoramnolípidos (Pearson, *et al.*, 1997). En el caso de la síntesis de los diramnolípidos, la enzima Rt2 codificada por el gen *rhlC* se encarga de producir este glicolípido a partir de dTDP-L-ramnosa y monoramnolípidos (figura 2.5).

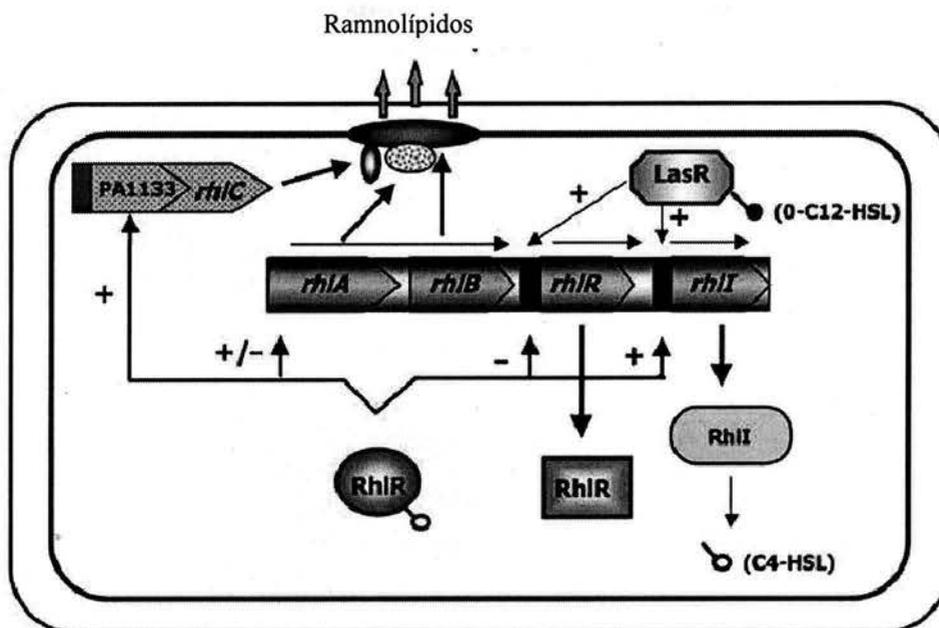


Figura 2.5 Representación esquemática de los genes *rhl* y la regulación de los genes que codifican para la Rt1 (*rhlAB*) y Rt2 (*rhlC*) así como su localización celular. Los signos + y - se refieren al efecto de la regulación transcripcional de RhIR.

2.10 Perspectivas de los ramnolípidos.

Debido a sus propiedades interesantes, los ramnolípidos podrían tener aplicaciones potenciales en el futuro. Respecto a su uso para propósitos de limpieza actualmente es imposible, a pesar de las ventajas de éstos, la economía de los procesos biotecnológicos es menos rentable que los métodos químicos. El costo de los ramnolípidos en fermentaciones cuya escala es de 20-100m³ es de U.S.\$20-25/Kg. En comparación con los costos para grandes volúmenes de productos, tales como etoxilatos o alquilpoliglicosidos, de las industrias químicas surfactantes están en el rango de U.S.\$1-3/Kg. Por su actividad biológica, podrían ser utilizados como agentes antifitopatogénicos y como adyuvantes en inmunología. Además, son fuente importante del carbohidrato ramnosa, el cual se libera por hidrólisis ácida, es de interés como unidad estructural quiral para la síntesis de agentes tensoactivos o como transportador hidrofílico para el transporte

de drogas insolubles en humanos y como un precursor para saborizantes de alta calidad (Langwillbrandt, 1999).

3 ANTECEDENTES

3.1 Expresión de los genes *rhlAB* de *P. aeruginosa* en hospederos heterólogos.

Actualmente no existe ningún reporte sobre una cepa de *E. coli* capaz de producir ramnolípidos de *P. aeruginosa*. Sin embargo, Ochsner y colaboradores después de aislar y caracterizar los genes *rhlABRI*, no tuvieron éxito en la biosíntesis de ramnolípidos en *E. coli* DH5 α al expresar los genes *rhlAB* clonados en los plásmidos pUO101 y pUO98 (*rhlAB* bajo sus elementos regulatorios *rhlR* y *rhlI*, *rhlAB* bajo el control del promotor *tac*, respectivamente), *E. coli* DH5 α (pUO98) presentó actividad de la enzima Rt1 (2.5 U ml⁻¹), pero no produjo ramnolípidos (Ochsner, *et al.*, 1994b). Por otra parte también cuantificaron la producción en otras bacterias (Ochsner, *et al.*, 1995), las cepas hospederas que utilizaron fueron *P. aeruginosa* PG201, *P. fluorescens* ATCC 15453, *P. oleovorans* GPo1, *P. putida* KT2442. Los resultados que obtuvieron fueron que en *P. aeruginosa* PG201 (pUO101) la actividad de la enzima Rt1 aumentó así como su producción de ramnolípidos un 30%, *P. fluorescens* ATCC 15453 (pUO101) sólo produjo un 10% de ramnolípidos respecto a la producción de *P. aeruginosa* PG201, *P. putida* KT2442 (pUO98) presentó actividad de la enzima Rt1 (45 U ml⁻¹) y 0.6 g L⁻¹ de ramnolípidos (la inducción de los genes *rhlAB* fue con IPTG 3mM durante la fase exponencial de crecimiento). Los ramnolípidos producidos tanto por las cepas *P. putida* KT2442 (pUO98) como por *P. fluorescens* ATCC 15453 (pUO101) fueron extraídos del sobrenadante y analizados por cromatografía en capa fina, sus valores de R_f se compararon con valores estándar de ramnolípidos purificados de *P. aeruginosa* indicando la presencia de monoramnolípidos en ambas cepas y sólo pequeñas cantidades de diramnolípidos en *P. fluorescens* ATCC 15453 (pUO101).

Estos autores sugirieron que la actividad baja de la enzima Rt1 y las eficiencias bajas de producción de ramnolípidos en algunas cepas puede ser como consecuencia del bajo nivel de expresión de los genes *rhlAB* bajo el control de sus elementos regulatorios, con esto se confirma la complejidad del mecanismo de regulación asociado a la biosíntesis de ramnolípidos en *P. aeruginosa*, y que es diferente en estas cepas. Sin embargo, aún cuando la expresión de los genes *rhlAB* esta bajo el control del promotor *tac*, no se formaron ramnolípidos. Probablemente por la falta de sus sustratos precursores, la dTDP-L-ramnosa y el ácido β -hidroxidecanoico. La concentración intracelular de estos precursores es limitante en algunas cepas, por ejemplo: a

partir de extractos celulares crudos de *E. coli* la capacidad de formación de dTDP-L-ramnosa es menor que en *P. aeruginosa* (Melo A., y Glaser L., 1966). El dímero del ácido graso β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato está ausente en *E. coli* ya que éstos se asocian con la producción de PHAs y estos compuestos no se forman en *E. coli* pero sí en algunas especies de *Pseudomonas*.

Debido a sus propiedades interesantes y sus aplicaciones potenciales en el futuro, en el laboratorio de la Dra. Gloria Soberón Chávez estamos interesados en producir ramnolípidos. Una desventaja es que su productor microbiano *P. aeruginosa*, es un patógeno oportunista de humanos y por lo tanto considerado generalmente como un microorganismo no seguro. Dado que ya se conoce mucho sobre la genética de su biosíntesis, en el presente trabajo se planteó una estrategia de trabajo para llevar a cabo su producción en *E. coli*, un microorganismos mas seguro.

4 HIPOTESIS

E. coli produce una concentración baja de dTDP-L-ramnosa que es utilizada como fuente de L-ramnosa para la biosíntesis de lipopolisacáridos. Nosotros proponemos que al introducir en *E. coli* los genes *rmlBDAC* de *P. aeruginosa* en multicopia, la concentración de dTDP-L-ramnosa aumentará ya que estos genes codifican para las enzimas que catalizan su formación. Por lo tanto, cepas de *E. coli* con una sobreproducción de dTDP-L-ramnosa en presencia de la enzima Ramnosiltransferasa 1, codificada por los genes *rhlAB*, será capaz de producir monoramnolípidos considerando que la parte de los β -hidroxiácidos serán drenados de la vía general de los ácidos grasos.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Construir cepas recombinantes de *E. coli* productoras del biosurfactante monoramnolípidos de *P. aeruginosa*.

5.2 Objetivos particulares

1. Determinar si *E. coli* HB101 con los genes *rhlAB* de *P. aeruginosa* produce monoramnolípidos.
2. Identificar y aislar los genes *rmlBDAC* de *P. aeruginosa* PAO1.
3. Determinar el efecto de la expresión del operón *rmlBDAC* de *P. aeruginosa* en *E. coli*.
4. Coexpresar los genes *rmlBDAC* y *rhlAB* de *P. aeruginosa* en cepas de *E. coli*
5. Determinar si estas cepas recombinantes producen el biosurfactante monoramnolípidos.
6. Estudiar la producción de monoramnolípidos de *E. coli* en un medio mineral M9 con glucosa y ácido oleico como fuentes de carbono.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material Biológico.

Las cepas de diferentes especies bacterianas así como los plásmidos y cósmidos utilizados y construidos en este trabajo se describen en las tablas 6.1 y 6.2, respectivamente. La cepa XL1-Blue de *E. coli* se utilizó como hospedera de vectores del tipo de pBR322 y derivados termosensibles del pSC101, así como en los experimentos de clonación y construcción de plásmidos, la cepa DH5 α de *E. coli* se utilizó como hospedera del plásmido pCP13 y en los experimentos de clonación y construcción de sus derivados, así como hospedera del plásmido pUO94. La cepa PAO1, que es la cepa tipo de *P. aeruginosa* se utilizó como control para producir ramnolípidos. En las condiciones de laboratorio esta bacteria produce dos formas de este glicolípido, una contiene una molécula de ramnosa y la otra tiene dos, llamados monoramnolípido y diramnolípido respectivamente. Las cepas HB101, RR1 y W3110 de *E. coli* se utilizaron como sistemas heterólogos de expresión de los genes necesarios para la producción del biosurfactante monoramnolípido de *P. aeruginosa*.

Tabla 6.1 Cepas bacterianas utilizadas y construidas durante este trabajo.

Cepas:	Genotipo y Fenotipo relevantes	Referencia
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Cepa silvestre no mucoide	Hancock, R. E. W., y A. M. Carey., 1979
Cepas de <i>Escherichia coli</i>		
XL1-Blue	<i>supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi-1, relA1, lac⁻ F'[traD36 proAB⁺ lacI^f lacZΔM15, Tn10 (Tet^R)]</i> . El F' de esta cepa permite la selección de colonias blancas-azules en Xgal.	Sambrook, <i>et al.</i> , 1989
DH5 α	<i>supE44, ΔlacU169, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i> .	Sambrook, <i>et al.</i> , 1989
HB101	Sm ^R , <i>supE44, hsdS20, recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1</i> .	Sambrook, <i>et al.</i> , 1989
RR1	Como la cepa HB101, solo que es RecA ⁺ .	Sambrook, <i>et al.</i> , 1989
W3110	F-, λ -, INV (<i>rnnD-rnnE</i>)1, RecA ⁺ , Lac ⁺ , Trp ⁺ (la cepa original es Trp ⁻ , pero en este caso, el fenotipo Trp ⁻ se restauró a Trp ⁺ por medio de transducción generalizada con el bacteriófago P1).	Jensen, 1993
W2190	Cm ^R , cepa de <i>E. coli</i> W3110 con los genes <i>rhlABR</i> integrados en su cromosoma.	Este trabajo
R203	Cm ^R , cepa de <i>E. coli</i> RR1 con los genes <i>rhlABR</i> integrados en su cromosoma.	Este trabajo

Tabla 6.2 Plásmidos y cósmidos utilizados y construidos durante este trabajo.

Plásmidos/Cósmidos	Características Relevantes	Referencia
pRK2013	Km ^R , origen de replicación ColEI, Tra ⁺ , plásmido ayudador.	Figurski, D. H., y D. R. Helinski., 1979
pUO94	Tc ^R , Plásmido de 13.0 Kb, es conjugable, de 12 a 13 copias, tiene origen de replicación R300B. Contiene a los genes <i>rhlABR</i> en un fragmento <i>AcsI-HindIII</i> , la expresión de los genes <i>rhlAB</i> está bajo el control del promotor <i>tac</i> .	Ochsner, <i>et al.</i> , 1994b
pCP13	Tc ^R , Km ^R , vector cósmido de 23 Kb, es mobilizable pero no transmisible por sí mismo (Mob ⁺ , Tra ⁻), es de bajo número de copias.	Darzins A., y Chakrabarty A. M., 1984
pNC460, pNC487	Tc ^R , cósmidos con el operón <i>rmlBDAC</i> bajo su propio promotor, fueron aislados del banco de cósmidos de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	Este trabajo
pUC19	Ap ^R , vehículos de clonación de 2.686 Kb, tiene origen de replicación del vector pBR322 (ColEI) y es de alto número de copias.	Yanisch-Perron, <i>et al.</i> , 1985
pRML4	Ap ^R , plásmido de 9.0 Kb, contiene a los genes <i>rmlBDAC</i> en un fragmento <i>Sph I</i> de 6.382 Kb en el vector pUC19. Aquí los genes <i>rmlBDAC</i> no están en dirección con <i>lac</i> es decir, la expresión de los genes está bajo el control de su propio promotor.	Olvera , 2000
pBRINTs-Cat2	Vehículo de clonación de 8.1 Kb, su marcador de resistencia es carbenicilina o ampicilina, es de bajo número de copias, permite la integración de DNA clonado en el gen <i>lacZ</i> del cromosoma de <i>E. coli</i> que sea capaz de llevar a cabo recombinación homóloga (RecA ⁺), este plásmido tiene un sitio múltiple de clonación, flanqueado por el gene <i>cat</i> que le confiere resistencia a cloranfenicol para un fácil monitoreo de la integración del fragmento clonado. Su función de replicación es sensible a temperaturas mayores de 30°C, con un aumento en la temperatura de cultivo y en presencia del marcador de selección Cloranfenicol, se promueve su integración en cromosoma.	Le Borgne, S., <i>et al.</i> , 1998; 2001
pINTRHL94	Cb ^R , Cm ^R , plásmido de 11.3 Kb, contiene a los genes <i>rhlABR</i> en un fragmento <i>SspI-HindIII</i> de 3.2 Kb en el vector pBRINTs-Cat2. Aquí la expresión de los genes <i>rhlAB</i> está bajo el control del promotor <i>tac</i> . Este plásmido se electroporó a las cepas <i>E. coli</i> W3110 y <i>E. coli</i> RR1.	Este trabajo
pCP13-B	Tc ^R , Derivado del pCP13, se eliminó un sitio interno <i>Hind III</i> así como la resistencia a Km.	Este trabajo
pCPpRML4	Tc ^R , Ap ^R , en esta construcción, el plásmido pRML4 se insertó al vector cósmido pCP13-B.	Este trabajo
pCRML4	Tc ^R , Cósmido derivado de la construcción pCPpRML4, tiene los genes <i>rmlBDAC</i> , su expresión están bajo el control de su propio promotor.	Este trabajo
pTRC99A	Ap ^R , vehículo de clonación de 4.176 Kb, es de	Amann, <i>et al.</i> , 1988

	mediano número de copias, tiene origen de replicación del vector pBR322 (ColE1). Permite expresar genes bajo el control del promotor <i>trc</i> , el cual es de fuerza promotora similar al promotor <i>tac</i> .	
pRML94-948	Ap ^R , construcción derivada del plásmido pRML4, aquí se eliminó la región promotora de los genes <i>rmlBDAC</i> .	Este trabajo.
pTRML4	Ap ^R , plásmido de 9.6 Kb, contiene a los genes <i>rmlBDAC</i> en un fragmento <i>Eco</i> RI- <i>Hind</i> III de 5.473 Kb en el vector <i>ptrc99A</i> , Aquí la expresión de los genes <i>rmlBDAC</i> está bajo el control del promotor <i>trc</i> .	Este trabajo.

El banco de cósmidos de *P. aeruginosa* PAO1 utilizado en este trabajo nos fue obsequiado por el Dr. Joseph S. Lam, (Burrows, *et al.*, 1997) el DNA de este microorganismo se ligó al vector cósmido pCP13, esta construcción se transformó a *E. coli*. El banco de cósmidos esta alicuotado en 10 grupos de 100 cósmidos cada uno, existe un onceavo grupo que es el banco completo.

6.2 Medios de cultivo.

Los medios que se utilizaron fueron Luria Bertani (LB; Sambrook, *et al.*, 1989); PPGAS (phosphate-limited peptone-glucose-ammonium salts; Zhang, *et al.*, 1992) a pH de 7.2, este medio contiene NH₄Cl₂ (0.02M), KCl (0.02M), Tris-HCl (0.12M), MgSO₄ (0.0016M) glucosa (0.5%) y peptona (1%); medio mineral M9 (Atlas, 1993) con glucosa y por último, medio de cultivo PIA (PIA; Laboratorios Difco, Detroit, Michigan). Los medios se utilizaron líquidos o sólidos con agar al 1.5%.

6.3 Condiciones de cultivo.

La cepa *P. aeruginosa* PAO1 fue mantenida en medio PIA sólido; cuando se utilizó para la producción de ramnolípidos se creció en medio de cultivo PPGAS líquido a 29°C y 250 rpm. Todas las cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo fueron mantenidas en medio sólido agar (LB). Las cepas XL1-BLue, RR1 y W3110 transformadas con plásmidos con funciones de replicación termosensibles (pBRINTs-Cat2 y pINTRHL94) se cultivaron a 30°C y 250 rpm. Para la producción del biosurfactante monoramnolípidos en *E. coli* se utilizaron los medios de cultivo; LB, PPGAS, PPRAS, y M9, en algunos casos estos medios se suplementaron con glucosa 5 g/l;

ramnosa 5 g/l y 10 g/l; y ácido oleico 5mM, 10mM y 15 mM, algunas veces se utilizó Brij 35 (poliexileno monolauril eter, n ca. 23) para solubilizar los ácidos grasos. Para la expresión de los genes bajo el control de los promotores *tac* y *trc* se utilizó IPTG (1mM y 3mM). Este se adicionó en la fase inicial del crecimiento así como en la fase exponencial tardía del cultivo. Cuando fue necesario utilizar antibióticos para seleccionar las construcciones deseadas o asegurar la presencia de un plásmido en *E. coli*, éstos se utilizaron a las siguientes concentraciones: carbenicilina, 100 µg/ml; tetraciclina, 15 µg/ml; ampicilina, 200 µg/ml; cloranfenicol, 30 µg/ml; kanamicina, 50 µg/ml para seleccionar por resistencia a los plásmidos en multicopia; carbenicilina, 20 µg/ml y cloranfenicol, 15 µg/ml para seleccionar clonas con los genes de resistencia en una sola copia; estreptomycin, 100 µg/ml y tetraciclina 150 µg/ml para la cepa *E. coli* HB101 (pUO94, pNCV460). Para seleccionar las clonas con los genes *lacZ* interrumpidos en el cromosoma, además de verificar la adquisición de la resistencia a cloranfenicol, se determinaron los fenotipos β-Gal^r en medio sólido agar (LB) con 33 µg/ml de Xgal + IPTG 100 µg/ml.

6.4 Procedimientos genéticos y técnicas de DNA recombinante.

Los procedimientos estándar para purificación de DNA cromosomal y de plásmidos, digestiones con enzimas de restricción, electroforesis en geles de agarosa, purificación de DNA de geles de agarosa, ligación de DNA, transformación de *E. coli* así como los análisis de hibridación DNA-DNA (análisis de DNA cromosomal, plásmidos y cósmidos por hibridación Southern; Screening de colonias por hibridación) se realizaron según lo descrito por Sambrook y colaboradores, 1989 (Sambrook, *et al.*, 1989).

Purificación de DNA. Cuando se requirió, se preparó DNA de plásmido con QIAGEN Mini-isolation kit (Qiagen, CA, USA) como lo describen los fabricantes. Para los experimentos de clonación, los fragmentos de DNA se extrajeron de geles preparativos de agarosa al 1% utilizando GENE CLEAN III kit de la compañía BioLabs o por el método de maceración-congelación del fragmento de agarosa con la banda de DNA de interés, extracción posterior con fenol y cloroformo y recuperación del fragmento de DNA por precipitación con isopropanol en presencia de acetato de sodio.

Transformación de DNA. En los experimentos de clonación, el DNA de plásmido se introdujo en *E. coli* por el método de electroporación. Durante la construcción de las cepas de *E. coli* productoras del biosurfactante monoramnolípido, éstas se transformaron con DNA en plásmidos y cósmidos por electroporación y conjugación respectivamente.

6.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las reacciones de la polimerasa en cadena se realizaron utilizando Vent DNA polimerasa (Boehringer Mannheim GmbH, Germany). Las mezclas de reacción se prepararon mezclando los siguientes reactivos en un volumen final de 50 μ l: 50 ng de DNA templado, 50 pmol de cada oligonucleotido iniciador, 0.25 mM de mezcla de dNTPs, 1-2 unidades de DNA-polimerasa. Para el proceso de amplificación las mezclas se incubaron en un RoboCycler 40 (STRATAGENE) siguiendo un método de tres etapas: 1. Un ciclo de predesnaturalización a 94 °C durante 1-5 min; 2. De 25-30 ciclos de amplificación, cada uno con un paso de desnaturalización, alineamiento y polimerización, cuyos parámetros de temperatura y duración fueron determinados para cada caso; 3. Un ciclo de extensión final de 10 minutos a la temperatura óptima de la polimerasa que se usó (72 °C).

6.6 Análisis de DNA cromosomal, de plásmido y cósmidos por hibridización Southern.

Se utilizó DNA cromosomal de *P. aeruginosa* PAO1, *E. coli* RR1, *E. coli* W3110, *E. coli* W2190 y *E. coli* R203; DNA del plásmido pINTRHL94 y DNA de cósmidos, se realizaron digestiones del DNA cromosomal con las enzimas de restricción *Ban* II, *Hind* III y *Cla* I. El DNA digerido se corrió en geles de agarosa al 1%, se desnaturalizó *in situ* con NaOH 0.4 N y se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon Hybond N⁺ (Amersham). El DNA unido fue hibridizado por una sonda marcada radioactivamente por la técnica de “random primer” con el kit Rediprime DNA labelling system de Amersham, según indicaciones del fabricante. El resultado fue detectado en un autorradiograma.

6.7 Screening de colonias por hibridización.

Esta técnica se utilizó para identificar colonias bacterianas individuales que lleven los cósmidos que tienen los genes *rmlBDAC* de *P. aeruginosa* PAO1. Cultivos de los grupos que integran el banco de cósmidos de *P. aeruginosa* PAO1 se crecieron durante 12 horas en membranas de nitrocelulosa (filtro), en el filtro también se crecieron las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 y *E. coli* HB101 como controles. Las colonias se examinaron mediante la réplica en placas es decir, simultáneamente se sembraron varias colonias con palillos estériles sobre una membrana de nylon Hybond N⁺ (Amersham) depositada sobre la superficie de una placa a otra placa original con tetraciclina, 20µg/ml. Después de 12 h de crecimiento, las colonias fueron lisadas *in situ* con NaOH 0.4 N. La placa original se mantuvo a 4°C hasta obtener los resultados. El DNA fijado en las membranas de nylon fue hibridizado por la sonda *rml* marcada radioactivamente como ya se describió. El resultado fue detectado en un autorradiograma. Sólo colonias de los grupos 6 y 11 se unieron a la sonda *rml* y por tanto ennegrecieron la película (figura 7.4b). Posteriormente se obtuvieron colonias aisladas de un cultivo del grupo número 6. y utilizando la sonda *rml* se obtuvieron varias colonias que presentaron una señal positiva (datos no mostrados), estas colonias tienen un cósmido con los genes *rmlBDAC*. Finalmente se seleccionaron 2 colonias que llevan los cósmidos que contienen los genes *rmlBDAC*, éstas se recuperaron de la placa original. La estructura de los cósmidos se verificó por análisis de restricción e hibridización Southern a partir de minipreparaciones de DNA de cósmidos. Esta técnica también se utilizó probar la presencia de ambos plásmidos en las cepas *E. coli* HB101(pUO94, pNCV460) y *E. coli* HB101(pUO94, pRML4).

6.8 Cruzas para transferencia de cósmidos por conjugación.

Las cruas triparentales se realizaron utilizando el plásmido ayudador pRK2013.

Se crecieron las cepas donadora, receptora y ayudadora por separado en 5 ml de medio LB líquido con sus respectivos antibióticos por 12 h a 37°C y 250 rpm. Estos cultivos se mezclaron (1:1:2 v/v) y se incubaron en placas de medio sólido agar (LB) sin antibióticos por 24 h a 37°C. Ver la tabla 6.3.

Tabla 6.3 Cruzas triparentales de *E. coli*. utilizando el plásmido ayudador pRK2013

	Donadora	Ayudador	Receptora	Volumen (μ l) (1:1:2)	Construcción:
1a Conjugación	<i>E. coli</i> (pNCV460)	<i>E. coli</i> HB101 (pRK2013)	<i>E. coli</i> HB101	(50:50:100)	<i>E. coli</i> HB101 (NCV460)
2a. Conjugación	<i>E. coli</i> (pNCV460)	<i>E. coli</i> HB101 (pRK2013)	<i>E. coli</i> HB101 (pUO94)	(50:50:100)	<i>E. coli</i> HB101 (pUO94,pNCV460)
3a. Conjugación	<i>E. coli</i> DH5 α (pCRML4)	<i>E. coli</i> HB101 (pRK2013)	<i>E. coli</i> HB101 (pUO94)	(50:50:100)	<i>E. coli</i> HB101 (pUO94,pCRML4)
4a. Conjugación	<i>E. coli</i> (pNCV460)	<i>E. coli</i> HB101 (pRK2013)	<i>E. coli</i> R203	(50:50:100)	<i>E. coli</i> R203 (pNCV460)
5a. Conjugación	<i>E. coli</i> (pNCV460)	<i>E. coli</i> HB101 (pRK2013)	<i>E. coli</i> RR1 (pINTRHL94)	(50:50:100)	<i>E. coli</i> RR1 (pNCV460, pINTRHL94)
6a. Conjugación	<i>E. coli</i> HB101 (pNCV460)	<i>E. coli</i> HB101 (pRK2013)	<i>E. coli</i> W2190	(50:50:100)	<i>E. coli</i> W2190 (pNCV460)
7a. Conjugación	<i>E. coli</i> HB101 (pNCV460)	<i>E. coli</i> HB101 (pRK2013)	<i>E. coli</i> W3110 pINTRHL94	(50:50:100)	<i>E. coli</i> W3110 (pNCV460, pINTRHL94)

Las transconjugantes de la primera conjugación se seleccionaron en placas de medio sólido agar (LB) con tetraciclina 15 μ g/ml y estreptomycin 100 μ g/ml. Para las transconjugantes de la segunda y tercera conjugación se utilizaron placas de medio sólido agar (LB) con tetraciclina 150 μ g/ml y estreptomycin 100 μ g/ml. Para las transconjugantes de la cuarta y sexta conjugación se utilizaron placas de medio sólido agar (LB) con tetraciclina 15 μ g/ml y Cloranfenicol 15 μ g/ml. Para las transconjugantes de la quinta y séptima conjugación se utilizaron placas de medio sólido agar (LB) con tetraciclina 15 μ g/ml y cloranfenicol 30 μ g/ml.

6.9 Ensayo para determinar la actividad enzimática de dTDP-D-glucosa 4,6-deshidratasa (RmlB).

Se llevo a cabo la síntesis *in vitro* de dTDP-6-desoxi-D-xilo-4-hexulosa a partir del sustrato TDP-D-glucosa y de extractos enzimáticos de *E. coli* HB101(pNCV460) y *E. coli* HB101(pNCV487).

a) Condiciones de crecimiento y preparación de los extractos enzimáticos crudos.

Las cepas de *E. coli* HB101, *E. coli* HB101 (pUO94), *E. coli* HB101 (pNCV460) y *E. coli* HB101 (pNCV487), se crecieron en medio de cultivo LB con estreptomicina 100 µg/ml para la cepa *E. coli* HB101 y tetraciclina 15 µg/ml para las cepas recombinantes a 250 rpm y 30°C, hasta alcanzar una DO_{530nm} de 1.3-1.5. Las células se concentraron centrifugándose a 10 000 rpm por 10 minutos a 4°C, se lavaron dos veces con una solución amortiguadora fría (Tris/HCl 50 mM, pH 7.6, MgCl₂ 10 mM y EDTA 1mM), se resuspendieron en el mismo amortiguador y se mantuvieron en un baño frío. El extracto enzimático libre de células se obtuvo por sonicación (4 pulsos de 15 segundos de 14 microons separados por 1 minuto). El sobrenadante (extracto enzimático) y la ultracentrifugación a 40 000 rpm por 2 h a 4°C. Siempre se trabajó bajo condiciones frías.

b) Ensayo de la enzima dTDP-D-glucosa 4,6-deshidratasa (Marumo, *et al.*, 1992).

Se prepararon 3 mezclas de reacción con los extractos enzimáticos ya descritos, ver la tabla 6.4

Tabla 6.4 Ensayo de la enzima dTDP-D-glucosa 4,6-deshidratasa con extractos enzimáticos (Marumo, *et al.*, 1992)

Reacción	mezcla 1 (problema)	mezcla 2 (control)	mezcla 3 (blanco)
Extracto enzimático	400 µl	400 µl	0
Tris/HCl, pH 7.6 (15 µmol)	15 µl	15 µl	15 µl
dTDP-D-glucosa (1.2 µmol)	10 µl	0	10 µl
Agua	75 µl	85 µl	475 µl
Volumen final	500 µl	500 µl	500 µl

Las reacciones se llevaron a cabo a 37°C. Se tomaron muestras de 50 µl desde el tiempo cero y en intervalos de 10 minutos por 80 minutos, para detener la reacción se adicionó a cada muestra 750 µl de NaOH 0.1 M y se incubó por 20 minutos a 37°C. La formación del producto se determinó mediante un análisis espectrofotométrico a 320 nm utilizando como blanco la reacción de la mezcla 3. El coeficiente de extinción molar de la reacción es de 4600 M⁻¹ cm⁻¹. Una unidad de actividad enzimática (U) es definida como un µmol de producto formado por minuto. Actividad específica es definida como una unidad de actividad enzimática por mg de proteína.

Para determinar la actividad enzimática de las muestras se realizó el siguiente cálculo:

$$\text{Actividad Enzimática [U]} = m / (\epsilon)(b)$$

donde:

m = pendiente de la curva (Absorbancia a 320 nm Vs. Tiempo)

ϵ = coeficiente de extensión molar a 320 nm = $4600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$b = 1 \text{ cm}^{-1}$

U = unidades de enzima

Los resultados de la tabla 7.2 se reportan como Actividad específica por lo tanto fue necesario cuantificar la cantidad de proteína para cada cepa, ésta se determinó por la técnica de Bradford (Bradford, 1976) según indicaciones del fabricante.

6.10 Integración de los genes *rhlAB* en el cromosoma de *E. coli*.

Para el proceso de integración se siguió un método de tres etapas: **1.** Construcción del plásmido pINTRHL94; **2.** Integración de una parte del plásmido pINTRHL94 que lleva los genes *rhlAB* en el cromosoma de *E. coli* W3110 y *E. coli* RR1; **3.** Confirmación de la integración por hibridización Southern. La primera etapa fue la subclonación de los genes *rhlAB* a partir del plásmido pUO94 en el vector pBRINTs-Cat2. El plásmido pUO94 se digirió con las enzimas *Ssp* I - *Hind* III, se liberó un fragmento de 3.2 Kb (este fragmento tiene a los genes *rhlABR*. Sin embargo, solo el operón *rhlAB* se expresa bajo el control del promotor *tac*) éste se insertó al vector pBRINTs-Cat2 previamente digerido con *Sma* I-*Hind* III, el plásmido resultante se denominó pINTRHL94, el cual se confirmó por patrón de restricción. El plásmido pINTRHL94 se electroporó a las cepas *E. coli* RR1 y *E. coli* W3110. Como segunda etapa, se llevó a cabo la integración en el cromosoma de los genes *rhlABR* según el protocolo de Sylvie Le Borgne y colaboradores (Le Borgne S. *et al.*, 1998). El proceso de integración se describe en la figura 6.1.

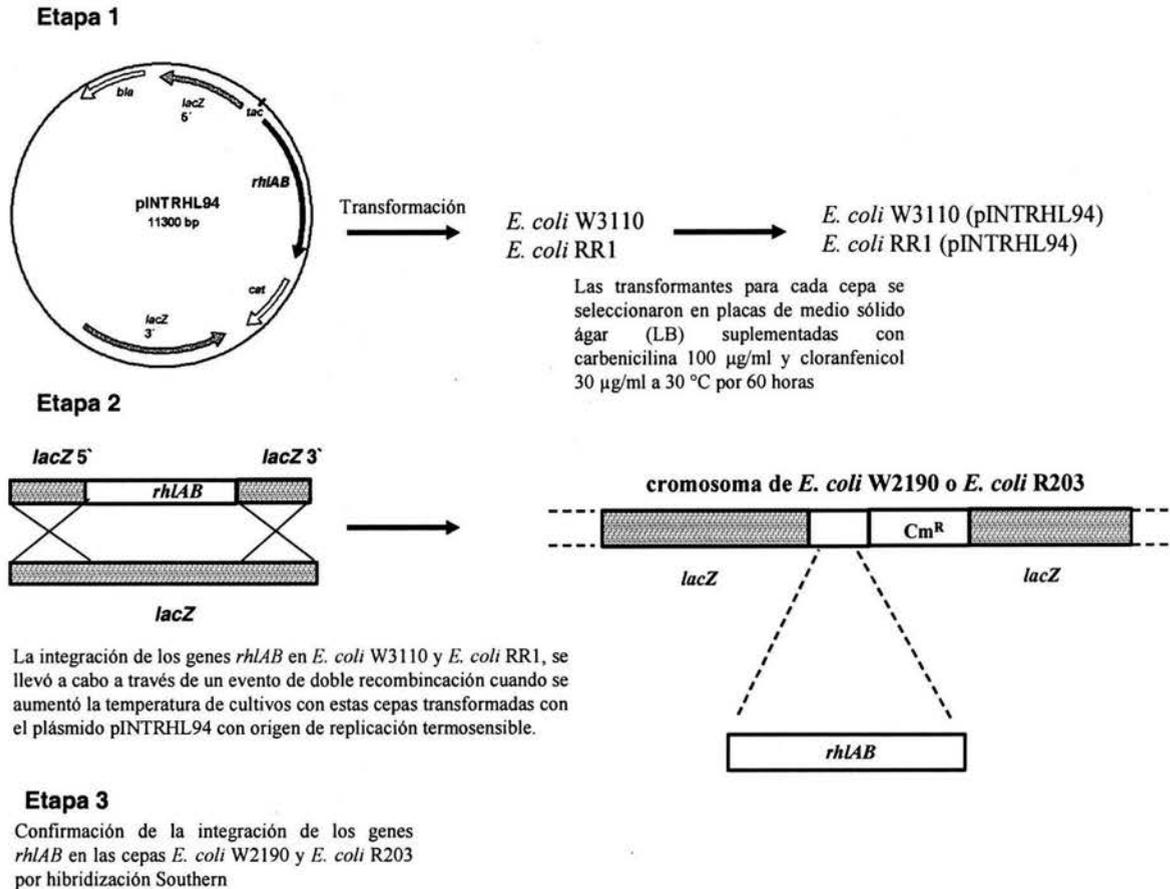


Figura 6.1 Integración de los genes *rhlABR* en las cepas de *E. coli* W3110 y RR1.

Así se obtuvieron las cepas R203 y W2190. En la hibridación Southern se utilizó como sonda radiactiva un fragmento de aproximadamente 1980 pb, que se obtuvo del plásmido pINTRHL94 digerido con la enzima *Bam* HI. Esta sonda se hibridó contra ADN cromosomal de *E. coli* RR1 (control negativo), *E. coli* W3110 (control negativo), *E. coli* R203, *E. coli* W2190 y DNA de plásmido pINTRHL94 (control positivo), el DNA de plásmido y cromosomal de cada una de las cepas se digirió con las enzimas *Hind* III y *Cla* I. Muestras de estas digestiones (5µg de DNA cromosomal y 1 µg de DNA de plásmido) se analizaron en geles de agarosa al 1%. Para ambos geles se siguió el protocolo ya descrito para hibridación Southern. El resultado del autorradiograma obtenido se comenta en la sección de resultados.

6.11 Construcción del plásmido pTRML4.

Aquí la expresión de los genes *rmlBDAC* está bajo el control del promotor *trc*. Se amplificó por la técnica de PCR un fragmento de 614 pb utilizando como templado DNA del plásmido pRML4 y los oligonucleótidos *rmlTrc1* (5' -GTC TTG AAT TCA TGA CGA TTC TCG TGA CCG- 3') y *rmlTrc3* (5' -TTG TGG ATC ACC AGT GGG ATG AGC TTT T- 3'), éstos se diseñaron en base a la secuencia de los genes *rmlBDAC* descrita en el plásmido pRML4 (el oligonucleótido *rmlTrc1* se diseño anteponiendo un sitio *Eco RI* al codón de inicio ATG para la proteína RmlB y el oligonucleótido *rmlTrc3* se diseño 614 pb rio abajo del codón de inicio ATG para la proteína RmlB). El fragmento de DNA amplificado fue de 614 pb, éste se digirió con las enzimas de restricción *Eco RI* y *Sty I*, el fragmento resultante fue de 490 pb. El plásmido pRML4 se digirió con las enzimas de restricción *Eco RI* y *Sty I* (el patrón de restricción obtenido fue de tres fragmentos 890 pb, 546 pb y 7629 pb). El fragmento de 490 pb se insertó en el fragmento de 7629 pb, la construcción resultante se denominó pRML4-948 (8119 pb), en esta construcción se eliminó la secuencia de la región promotora de los genes *rmlBDAC*. El plásmido pRML4-948 se digirió con las enzimas *Eco RI* y *Hind III*, el patrón de restricción obtenido fue de dos fragmentos 2646 pb y 5473 pb, el fragmento de 5473 pb se insertó al vector pTrc99A previamente digerido con las enzimas de restricción *Eco RI* y *Hind III*. La construcción resultante se denominó pTRML4 y se confirmó por patrón de restricción (datos no mostrados).

6.12 Construcción del cósmido pCRML4.

Este cósmido se obtuvo a través de dos pasos. Primero, el vector cósmido pCP13 se digirió con la enzima *Bam HI*, de esta digestión se obtuvieron dos fragmentos, uno de aproximadamente 1.7 Kb (éste incluye un sitio *Hind III* así como la secuencia que codifica para la resistencia a kanamicina) y otro de aproximadamente 21.3 Kb, este último fragmento se religó, el cósmido resultante se denominó pCP13-B de 21.3 Kb (en esta construcción se eliminó un sitio interno *Hind III* así como la resistencia a Kanamicina). El segundo paso fue digerir el plásmido pRML4 con la enzima *Hind III*, este fragmento de 9.0 Kb se insertó al vector cósmido pCP13-B previamente digerido con la enzima *Hind III*, la construcción resultante se denominó pCPpRML4 de aproximadamente 30 Kb. Este plásmido se analizó por patrón de restricción, el DNA fue digerido con la enzima *Xba I*, dependiendo de la orientación del fragmento de 9.0 Kb, el patrón de restricción puede ser de dos formas; fragmentos de 23.6 Kb y 6.4 Kb, o fragmentos

de 27.4 Kb y 2.6 Kb, este último es el patrón de restricción deseado, el fragmento de 27.4 Kb fue religado, el cósmido resultante se denominó pCRML4, el cual se confirmó por patrón de restricción con las enzimas *Hind* III–*Xba* I obteniéndose los fragmentos de 21.7 Kb y 6.4 Kb (datos no mostrados).

6.13 Determinación analítica de ramnolípidos.

La producción de ramnolípidos se determinó en forma cualitativa y cuantitativa. Ambos métodos son a partir del caldo de fermentación libre de células (333 μ l). Los ramnolípidos fueron extraídos dos veces con 1 ml de éter anhidro. La fase superior de éter se evaporó en una campana de extracción y el contenido se resuspendió en 1 ml de agua para la determinación cuantitativa a través del método de orcinol que cuantifica azúcares totales y se basa en la oxidación de los azúcares con ácido sulfúrico para dar una reacción colorida en presencia de orcinol (Chandrasekaran, *et al.*, 1980). Para 100 μ l de muestra se adicionaron 900 μ l de una solución con 0.19% de orcinol (en 53% [vol/vol] de H₂SO₄), las reacciones se incubaron durante 30 min a 80°C, posteriormente se enfriaron durante 15 min a temperatura ambiente y finalmente se leyó la absorbancia a 421nm. La concentración de ramnolípidos se determinó a través de una curva estándar de ramnosa.

Para la determinación cualitativa a través del método de cromatografía en capa fina (Matsuyama, *et al.*, 1987), el contenido de la extracción se resuspendió en 10 μ l de agua. La muestra se depositó en una placa de sílica gel y se corrió dos veces en una mezcla de solventes; la primera, cloroformo-metanol (2:1 v/v), después la placa se secó en la campana de extracción y por segunda vez se corrió en un sistema cloroformo-metanol-amonia (80:24:4 v/v), la placa se secó en la campana de extracción. Para revelarla se atomizó con α -naftol (el cual identifica glicolípidos) sobre una plancha caliente. Así se obtuvieron los cromatogramas.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Uno de los intereses en nuestro laboratorio es la producción del biosurfactante monoramnolípido de *P. aeruginosa* en *E. coli* como sistema heterólogo de expresión y producción. La biosíntesis de este surfactante en *P. aeruginosa* depende de la acción de la enzima Ramnosiltransferasa 1 sobre los sustratos dTDP-L-ramnosa y β -hidroxidecanoil. *E. coli* carece de la capacidad de producir monoramnolípidos ya que no cuenta en su genoma con un gene que codifique para la Ramnosiltransferasa 1. Sin embargo, se sabe que esta enzima es funcional en *E. coli* (Ochsner, *et al.*, 1994b), además *E. coli* produce d-TDP-L-ramnosa y β -hidroxiácidos aunque en menor concentración que *P. aeruginosa*.

7.1 Producción de monoramnolípidos por *E. coli* HB101(pUO94) en medio de cultivo PPGAS con glucosa y ramnosa como fuentes de carbono.

Considerando los resultados de Ochsner y colaboradores, en nuestro laboratorio realizamos estudios con el objetivo de aumentar la concentración de los sustratos precursores y así producir el biosurfactante monoramnolípido de *P. aeruginosa* en *E. coli*. Se cultivaron *P. aeruginosa* PAO1, *E. coli* HB101 como controles positivo y negativo respectivamente y la cepa *E. coli* HB101(pUO94), este plásmido tiene los genes *rhlABR*, los genes *rhlAB* están bajo el control del promotor *tac*. El medio de cultivo que se utilizó para la producción de ramnolípidos en *P. aeruginosa* PAO1 fue PPGAS, el cual es bajo en fosfatos y con glucosa como fuente de carbono. Se sabe que *P. aeruginosa* muestra niveles altos de expresión de *rhlR* en este medio. En el caso de *E. coli*(pUO94) se utilizó PPGAS y además se cambió la fuente de carbono a ramnosa (PPRAS). Estas cepas se incubaron a 37°C por 96 horas a 250 rpm, y se comprobó la producción de monoramnolípidos mediante cromatografía en capa fina.

Una característica que presentan los cultivos en presencia de ramnolípidos es la formación de espuma. *P. aeruginosa* PAO1 produce mono y diramnolípidos en PPGAS (figura 7.1; matraz 1). Cultivos de *E. coli* HB101(pUO94) mostraron espuma en PPRAS. De hecho, a medida que se aumentó la concentración de ramnosa de 5 g/l a 10 g/l, la espuma se incrementó (figura 7.1; matraces 2 y 3). Sorprendentemente *E. coli* HB101(pUO94) no presentó espuma en PPGAS (figura 7.1; matraz 4) y como se esperaba *E. coli* HB101 no presentó espuma en ningún medio (figura 7.1; matraz 5).



Figura 7.1 Cultivos de *E. coli* HB101 con el plásmido pUO94. De izquierda a derecha se muestran los cultivos de *P. aeruginosa* PAO1 en PPGAS, *E. coli* HB101(pUO94) en PPRAS con 10 g/l y 5 g/l de ramnosa respectivamente, *E. coli* HB101(pUO94) en PPGAS y *E. coli* HB101 en PPGAS.

Para determinar si la espuma formada en los cultivos de *E. coli* HB101(pUO94), corresponde al biosurfactante producido por *P. aeruginosa*, se realizó su identificación por cromatografía en capa fina. El cromatograma resultante se muestra en la figura 7.2, éste confirmó la presencia de mono y diramnolípidos en cultivos de *P. aeruginosa* PAO1 en PPGAS (figura 7.2; carril 3), *E. coli* HB101(pUO94) con ramnosa 10 g/l presentó una mancha con un Rf similar al del biosurfactante monoramnolípido de *P. aeruginosa* PAO1 mientras que con ramnosa 5 g/l se observó una mancha tenue que no se aprecia en el cromatograma (figura 7.2; carriles 4 y 5). En el carril 6, se corrieron 10 μ l de una solución de ramnosa 1 mg/ml como control. De hecho en el carril 4 se observó una mancha con un Rf similar al de ramnosa, creemos que esta extracción se contaminó con medio PPRAS, y la mancha que observamos corresponde a ramnosa del medio, ya que el éter no extrajo ramnosa del medio PPRAS (figura 7.2; carril 7).

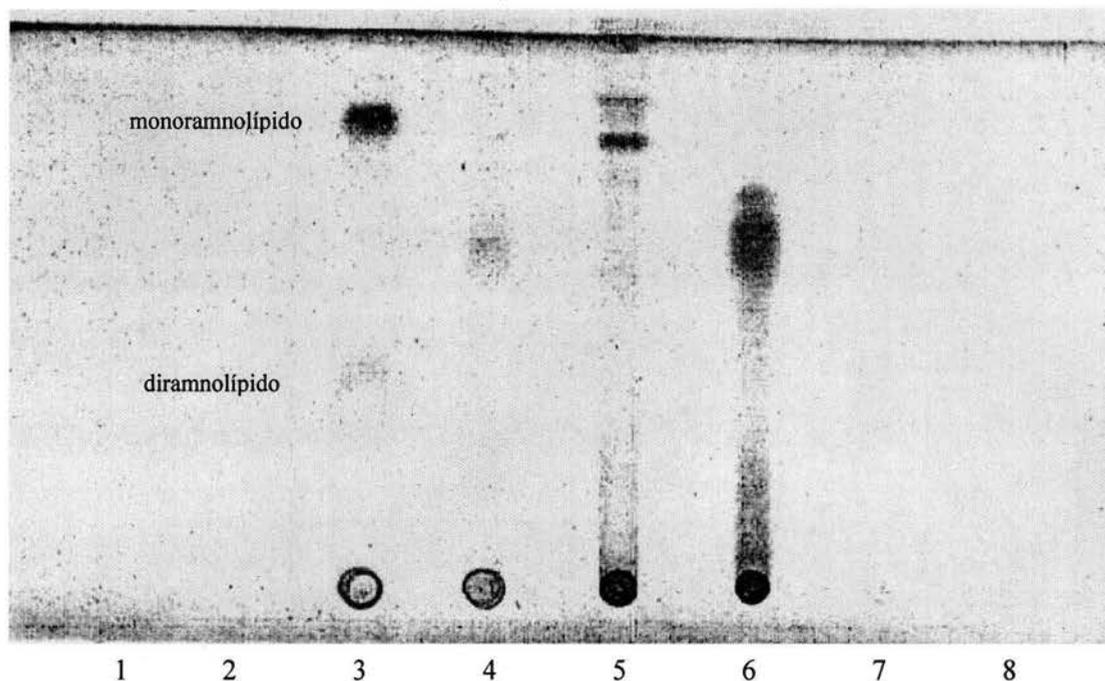


Figura 7.2 Cromatograma de cultivos de *E. coli* HB101(pUO94) con ramnosa como fuente de carbono. Carril 1, *E. coli* HB101(en PPRAS); carril 2, *E. coli* HB101 (en PPGAS); carril 3, *P. aeruginosa* PAO1 (en PPGAS); carril 4, *E. coli* HB101(pUO94) (en PPRAS, 0.5% ramnosa); carril 5, *E. coli* HB101(pUO94) (en PPRAS, 1.0% ramnosa); carril 6, ramnosa 1 mg/ml; carril 7, medio de cultivo PPRAS 0.5% ramnosa; carril 8, *E. coli* HB101(pUO94) (en PPGAS).

De este experimento podemos concluir que cuando utilizamos ramnosa como fuente de carbono, *E. coli* HB101(pUO94) logró producir biosurfactantes los cuales pueden ser monoramnolípidos, ya que éstos presentaron espuma y un Rf muy similar a los producidos por *P. aeruginosa* PAO1. En ese tiempo no pudimos explicar por qué con glucosa como fuente de carbono no obtuvimos monoramnolípidos. Sin embargo, actualmente sabemos que la vía de síntesis de la dTDP-L-ramnosa empieza con glucosa-1-fosfato, por lo tanto sugerimos que con ramnosa se ve favorecida la síntesis de este precursor. La L-ramnosa es metabolizada en *E. coli* por un grupo de enzimas codificadas por los genes *rhaA*, que codifica una ramnosa isomerasa; *rhaB*, que codifica una ramnulosa quinasa; *rhaD*, que codifica una ramnulosa-1-fosfato aldolasa; y *rhaT*, que codifica una permeasa (Moralejo, *et al.*, 1993). Los productos obtenidos a través de esta vía son dihidroxiacetona fosfato y L-lactaldehído, posteriormente el L-lactaldehído en condiciones aeróbicas es convertido por una deshidrogenasa a L-lactato el cual es oxidado a piruvato, éste se incorpora al metabolismo general y probablemente una parte de éste es

canalizado para obtener glucosa-1-fosfato. Cuando se utiliza glucosa como fuente de carbono, ésta es convertida más a glucosa-6-fosfato que a glucosa-1-fosfato.

Nuestra hipótesis es que el aumento en la concentración endógena del sustrato dTDP-L-ramnosa en *E. coli* podría ser necesario para producir monoramnolípidos. Con este fin deberíamos incrementar la síntesis de dTDP-L-ramnosa en *E. coli*. En base a las vías metabólicas de los precursores que intervienen en la síntesis de los ramnolípidos en *P. aeruginosa* PAO1 y considerando que los genes de *P. aeruginosa* PAO1 se expresarán en *E. coli*, en este trabajo proponemos una estrategia para la producción del biosurfactante monoramnolípidos en *E. coli*, que consiste en la expresión de los genes *rmlBDAC* de *P. aeruginosa* PAO1 en cepas de *E. coli*. Estos genes codifican las enzimas necesarias para la producción de dTDP-L-ramnosa a partir de glucosa-1-fosfato.

Clarita Olvera C. durante su proyecto de investigación de doctorado identificó los genes de la síntesis de dTDP-L-ramnosa en el genoma de *P. aeruginosa*, por análisis de homología con la secuencia nucleotídica de los genes biosintéticos de dTDP-L-ramnosa (*rfbABCD*) de *X. campestris* (organismo relacionado genéticamente con *P. aeruginosa*). A través de este análisis se encontró una región con 4 marcos de lectura abiertos cuyas secuencias nucleotídicas presenta un alto porcentaje de identidad con el producto de los genes *rfbABCD* de *X. campestris* y otras bacterias gram negativas (tabla 7.1). Se concluyó que estos ORFs forman el grupo de genes de la biosíntesis de dTDP-L-ramnosa en *P. aeruginosa*, a esta región se le llamó *rml* y tiene un tamaño de 3590 pb, según la secuencia reportada, los cuatro genes están organizados en un operón y el orden de éstos es *rmlBDAC*. De un análisis computacional de la región corriente arriba del gen *rmlB*, se reconoció una secuencia consenso promotora similar al promotor LacUV5, el cual pertenece al grupo de promotores tipo II que reconoce tanto a sigma 70 como a sigma S. En la figura 7.3 se muestra un segmento donde la enzima *Ban* II libera un fragmento de 4.6 Kb que incluye el operón *rmlBDAC*, el segmento se obtuvo a partir de un análisis de restricción (Olvera, 2000).

Tabla 7.1 Identidad a nivel de aminoácidos de los genes *rmlBDAC* de *P. aeruginosa* PAO1 contra diferentes bacterias gram negativas, (Olvera, 2000).

Bacteria/Gene	<i>rmlA</i>	<i>rmlB</i>	<i>rmlC</i>	<i>rmlD</i>
<i>E. coli</i>	76%	64%	70%	62%
<i>S. typhi</i>	76%	65%	65%	60%
<i>X. campestris</i>	68%	70%	54%	55%
<i>S. flexneri</i>	75%	64%	60%	62%

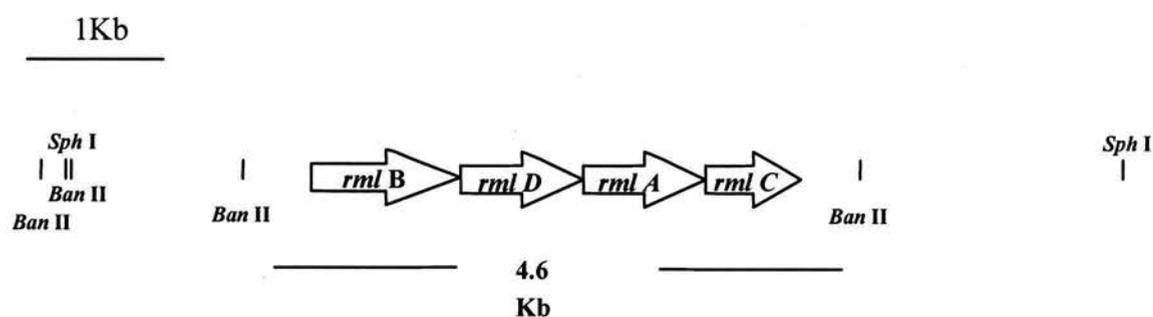


Figura 7.3 Operón de los genes *rmlBDAC* de *P. aeruginosa* PAO1 (Olvera, 2000).

7.2 Identificación y aislamiento del operón *rmlBDAC* de *P. aeruginosa* PAO1.

La identificación de los genes *rmlBDAC* fue a través de una hibridación tipo Southern con DNA cromosomal de la cepa *P. aeruginosa* PAO1 digerido con la enzima de restricción *Ban* II, se utilizó la sonda radiactiva denominada *rml*, ésta es una secuencia nucleotídica de 865 pb amplificada por medio de la técnica de PCR que incluye la región promotora del operón *rmlBDAC* y aproximadamente 200 pb del gen *rmlB* (Olvera, 2000).

La autorradiografía de la hibridación tipo Southern se muestra en la figura 7.4 a). En el carril 1 se muestra el control positivo de la hibridización, que es una señal positiva muy fuerte

por ser la sonda *rml* que hibridó contra sí misma. La señal positiva en el carril 2, es de aproximadamente 4.6 Kb, y corresponde a un fragmento del tamaño esperado cuando el DNA cromosomal de *P. aeruginosa* PAO1 es digerido con la enzima de restricción *Ban* II (figura 7.3). Estos resultados corroboran la presencia y el arreglo de los genes *rmlBDAC* en *P. aeruginosa* PAO1.

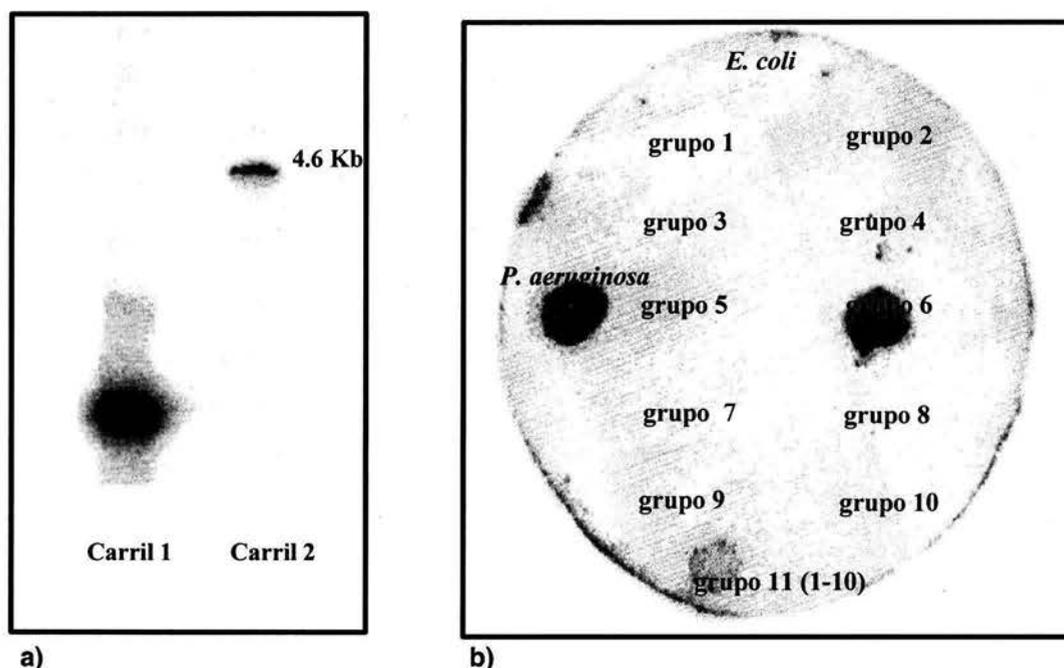


Figura 7.4 Identificación de los genes *rmlBDAC* en *P. aeruginosa*. Autorradiografías tipo southern de DNA cromosomal (a) e hibridación en colonia del banco de cósmidos de *P. aeruginosa* PAO1 (b).

El fragmento de 4.6 Kb con los genes *rmlBDAC* se insertó en el vehículo de clonación pUC19 (Olvera, 2000). Sin embargo, al mismo tiempo, llegó a nuestro laboratorio un banco de cósmidos de *P. aeruginosa* PAO1, por lo que decidimos aislar los genes *rmlBDAC* de este banco mediante un screening de colonias por hibridización. De este experimento solamente 2 grupos nos dieron una señal positiva (figura 7.4b). El grupo número 6 muestra una señal positiva más

fuerte respecto al grupo número 11 probablemente porque en el grupo número 11 hay menos colonias con los genes *rmlBDAC*. Por otra parte *P. aeruginosa* PAO1 presentó una señal de hibridación intensa como se esperaba y *E. coli* no presentó señal, probablemente porque la secuencia nucleotídica de la sonda *rml* representa en su mayoría a la región promotora del operón *rmlBDAC* de *P. aeruginosa* y ésta probablemente no presenta homología con alguna región de la secuencia nucleotídica del genoma de *E. coli*. Sin embargo, a pesar de que la sonda *rml* incluye una parte del gen *rmlB* y éste si presenta un porcentaje de identidad alto con el gen *rfbB* de *E. coli*, la hibridación con *E. coli* no presentó una señal positiva, ya que las condiciones de hibridación y lavados del filtro no son favorables para permitir una hibridización heterológica. Estos resultados proporcionan suficiente evidencia de que en el grupo número 6 está un cósmido con el operón *rmlBDAC*. De este grupo por hibridación en colonia, se seleccionaron dos colonias con los cósmidos denominados pNCV460 y pNCV487.

7.3 Análisis de expresión de los genes *rmlBDAC* de *P. aeruginosa* PAO1 en *E. coli*.

Con el objetivo de demostrar que los genes *rmlBDAC* de *P. aeruginosa* PAO1 se expresan en *E. coli* se determinó la formación *in vitro* del producto dTDP-6-desoxi-D-xilo-4-hexulosa. La síntesis de este compuesto depende de la acción de la enzima dTDP-D-glucosa 4,6-deshidratasa codificada por el gen *rmlB* sobre el sustrato dTDP-D-Glucosa. Los ensayos se llevaron a cabo en *E. coli* HB101 y *E. coli* HB101(pUO94) como controles y *E. coli* HB101(pNCV460), *E. coli* HB101(pNCV487). En la sección de materiales y métodos se describe como se obtuvieron los extractos enzimáticos y como se llevaron a cabo las reacciones para cuantificar la actividad de la enzima RmlB. En la tabla 7.2 se muestran los resultados de la actividad específica, la cual es mayor en las cepas *E. coli* HB101(pNCV460) y *E. coli* HB101(pNCV487). Este incremento corresponde a más del 50 % con respecto a la actividad que presenta la cepa de *E. coli* HB101, creemos que este aumento es consecuencia de la expresión de los genes *rmlBDAC* de *P. aeruginosa* PAO1. En *E. coli* HB101 se forma dTDP-6-desoxi-D-xilo-4-hexulosa porque en su

genoma están presentes los genes *rfbABCD* que codifican para las enzimas que sintetizan la dTDP-L-ramnosa necesaria para la síntesis del antígeno O de lipopolisacáridos (LPS). El aumento de la actividad de la enzima RmlB sugiere que los genes *rmlBDAC* de *P. aeruginosa* PAO1 se expresan en *E. coli* HB101 bajo su propio promotor.

Tabla 7.2 Actividad específica de la enzima dTDP-D-glucosa 4,6 deshidratasa en *E. coli* HB10 con los genes *rmlBDAC* de *P. aeruginosa*.

Cepa	dTDP-D-glucosa 4,6 deshidratasa (U*/mg)	% de Actividad
<i>E. coli</i> HB101	0.99	100.00
<i>E. coli</i> HB101(pUO94)	1.15	116.16
<i>E. coli</i> HB101(pNCV460)	1.63	164.65
<i>E. coli</i> HB101(pNCV487)	1.47	148.48

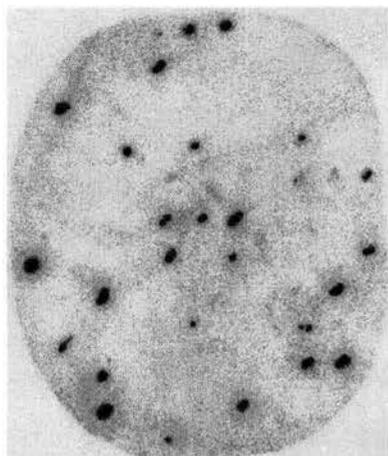
* La unidad (U) es definida como micromoles de producto dTDP-4-ceto-6-desoxi-D-glucosa formado por minuto.

7.4 Construcción de cepas de *E. coli* para producir monoramnolípidos de *P. aeruginosa*.

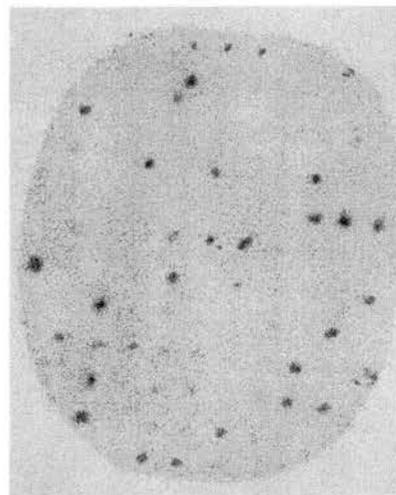
Una vez que determinamos que los genes *rmlBDAC* de *P. aeruginosa* se expresan en *E. coli*, probamos si su sobreexpresión aumenta la concentración endógena de dTDP-L-ramnosa, asumiendo que está directamente relacionada con la producción de ramnolípidos. A continuación se describe la construcción de algunas cepas que llevan tanto los genes *rmlBDAC* como los *rhlAB* que usamos en este trabajo. Los genes *rmlBDAC* siempre están presentes en plásmidos multicopia, su expresión está controlada por su propio promotor y también por el promotor *trc*. Mientras que los genes *rhlAB* están en plásmidos multicopia y algunas veces en una sola copia integrados en cromosoma, su expresión en ambos casos está controlada por el promotor *tac*.

7.4.1 Construcción de la cepa *E. coli* HB101(pNCV460, pUO94).

Esta cepa se obtuvo por conjugación del cósmido pNCV460 a *E. coli* HB101(pUO94), ambos plásmidos son de bajo número de copias y sus orígenes de replicación son diferentes, así que pueden replicarse en la misma cepa. Sin embargo, ambos plásmidos presentan resistencia a tetraciclina. Para probar la presencia de ambos plásmidos en las cepas transconjugantes se realizó hibridación en colonia; 100 colonias se crecieron a 37°C por 12 horas en membranas de nitrocelulosa por duplicado (filtro 1, filtro 1') sobre placas con tetraciclina (150 ug/ml) y estreptomycinina (100 ug/ml). Como controles de la hibridación; para el filtro 1 se utilizó DNA cromosomal de *P. aeruginosa* PAO1 y DNA del cósmido pNCV460 (en una membrana de nitrocelulosa por separado), como controles para el filtro 1' se utilizó DNA de *P. aeruginosa* PAO1 y DNA del plásmido pUO94. La sonda *rml* marcada radiactivamente se hibridó contra las muestras del filtro 1 mientras que, la sonda *rhl* marcada radiactivamente se hibridó contra las muestras del filtro 1' (la sonda *rhl* es un fragmento interno de los genes *rhlAB*). La autorradiografía de la hibridación en colonia, presentó varias colonias tanto con los genes *rmlBDAC* como los *rhlAB* (figura 7.5), se seleccionaron varias cepas. Para comprobar la presencia de ambos plásmidos en estas cepas, se realizó extracción de DNA plasmídico, éste se digirió con la enzima *Hind* III, esta enzima lineariza el plásmido pUO94 que muestra un fragmento de 9.0 Kb y varios fragmentos correspondientes al cósmido pNCV460 (datos no mostrados).



Filtro 1 colonias con los genes
rmlBDAC



Filtro 1' colonias con los genes
rhlAB

Figura 7.5 Autorradiografía de hibridación en colonia para seleccionar la cepa recombinante *E. coli* HB101(pUO94, pNCV460).

7.4.2 Producción del biosurfactante monoramnolípido por la cepa *E. coli* HB101(pNCV460, pUO94) en medio de cultivo LB y PPGAS.

Los cultivos con esta cepa se realizaron en matraces de 250 ml con 50 ml de medio LB o con 50 ml de PPGAS ambos suplementados con tetraciclina 150 $\mu\text{g/ml}$ y estreptomicina 100 $\mu\text{g/ml}$, el inductor IPTG se adicionó desde el inicio del cultivo a una concentración de 3 mM. Los matraces se incubaron a 37°C por 12 horas a 250 rpm. Las cepas *E. coli* HB101(pNCV460) y *E. coli* HB101(pUO94) solo se sembraron en LB; *P. aeruginosa* PAO1 se sembró en medio de cultivo PPGAS y se incubó a 30°C por 24 horas. La figura 7.6 muestra una foto de estos matraces después de agitar. La cepa *E. coli* HB101(pNCV460, pUO94) presentó un fenotipo con espuma en LB, y en menor proporción en PPGAS; las cepas con un solo plásmido no presentaron este fenotipo. Sin embargo, la cepa PAO1 que es el control positivo presentó mucha espuma. La cepa *E. coli* HB101(pNCV460, pUO94) fue capaz de producir 17.4 $\mu\text{g/ml}$ de monoramnolípidos en LB, mientras que en PPGAS fue de 25.8 $\mu\text{g/ml}$. Respecto a la cepa *P. aeruginosa* PAO1 ésta produjo 130 $\mu\text{g/ml}$ de ramnolípidos en PPGAS (el método que utilizamos no distingue entre mono y diramnolípidos). De este experimento podemos concluir que se logró obtener una cepa de *E. coli* capaz de producir monoramnolípidos, aunque en menor concentración que *P. aeruginosa*.

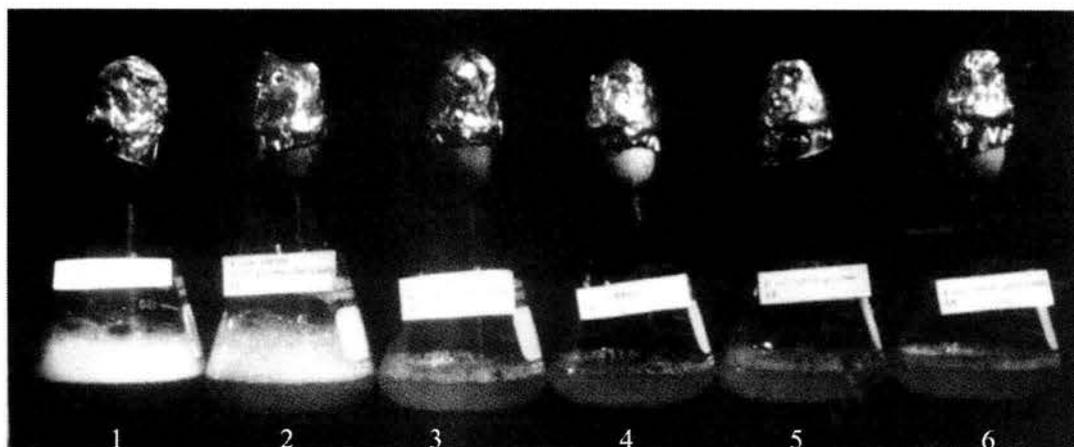


Figura 7.6 Cultivos de *E. coli* HB101(pNCV460, pUO94) en LB y PPGAS (matrazes 2 y 3 respectivamente), *E. coli* HB101, *E. coli* HB101(pUO94), *E. coli* HB101(pNCV460) en LB (matrazes 4, 5 y 6 respectivamente) y *P. aeruginosa* PAO1 en PPGAS (matraz 1).

Con el objetivo de incrementar la concentración de monoramnolípidos en la cepa *E. coli* HB101(pNCV460, pUO94) decidimos suplementar ramnosa (5g/l y 10g/l) y ácido oleico 10 mM al medio de cultivo LB. Decidimos utilizar ramnosa ya que sabemos que ésta es metabolizada por *E. coli*. Respecto al ácido oleico, *E. coli* tiene un sistema altamente específico para transportar ácidos grasos de cadena larga (C12-C18) a través de su envoltura celular, éste sistema requiere de al menos dos proteínas, una de membrana externa FadL y una de membrana interna FadD (Black y DiRusso, 1994; DiRusso, *et al.*, 1999). Además se sabe que los ácidos grasos de cadena larga son sustratos importantes para la producción de energía y biosíntesis de macromoléculas. Las condiciones de cultivo fueron similares a las ya descritas, excepto que se utilizaron 20 ml de medio de cultivo y tetraciclina 15 µg/ml. En la tabla 7.3 se muestran los resultados de estos cultivos. Para su identificación se realizó cromatografía en capa fina, el cromatograma resultante se observa en la figura 7.7.

Tabla 7.3 Producción de monoramnolípidos ($\mu\text{g/ml}$) por la cepa *E. coli* HB101(pNCV460, pUO94) en medio de cultivo LB suplementado con ramnosa y ácido oleico.

cepas	LB	LB-ramnosa 5 g/l	LB-ramnosa 10 g/l	LB-ramnosa 10 g/l y ácido oleico 10mM	PPGAS
<i>E. coli</i> HB101 (pNCV460, pUO94)	19.20	19.56	26.96	24.26	20.61
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	0				150.29

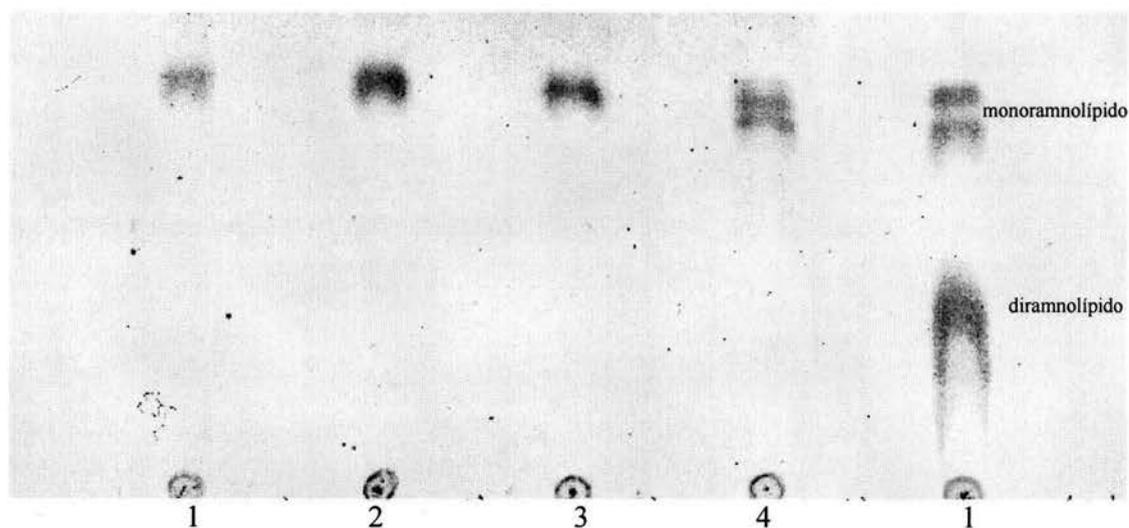


Figura 7.7 Identificación de monoramnolípidos a través de un cromatograma de la cepa *E. coli* HB101(pNCV460, pUO94) en LB (carril 1) y suplementados con ramnosa 5g/l (carril 2); ramnosa 10g/l (carril 3); ramnosa 10g/l y ácido oleico 10mM (carril 4) y *P. aeruginosa* PAO1 (PPGAS).

La concentración de monoramnolípidos aumentó un poco en *E. coli* al suplementar con ramnosa 10 g/l el medio de cultivo LB, pero parece ser que la adición del ácido oleico no tuvo efecto al menos a las doce horas. A pesar de que no se determinó la concentración de proteínas, cuando se centrifugó 1 ml de medio de cultivo para separar el sobrenadante, se observó que la pastilla celular fue mayor en los casos que se suplementaron con ramnosa y ácido oleico. Probablemente la concentración de monoramnolípidos se incrementaría después de las 12 horas.

7.4.3 Construcción de la cepa *E. coli* HB101(pRML4, pUO94).

Esta cepa se obtuvo por electroporación del plásmido pRML4 a *E. coli* HB101(pUO94). El plásmido pRML4 tiene a los genes *rmlBDAC* en el vector de expresión pUC19; los genes *rmlBDAC* se obtuvieron a partir del pNCV460 mediante un fragmento *Sph* I de 6382 pb (Olvera, 2000), aquí los genes *rmlBDAC* no están en la dirección de transcripción del promotor *lac* por lo que su expresión depende de su propio promotor. Como este plásmido es derivado de pUC19, el cual es de número de copias alto, esperamos que aumente la producción de dTDP-L-ramnosa y en consecuencia la concentración de monoramnolípidos. Se confirmó la presencia de ambos plásmidos por hibridación en colonia, así como la extracción de DNA de plásmido y análisis por patrón de restricción con la enzima *Hind* III. Estos resultados demostraron que esta cepa tuvo ambos plásmidos. Sin embargo, después de varios cultivos, se observó la pérdida del plásmido pUO94, esto se probó por extracción de DNA de plásmido y digestión con la enzima *Hind* III. Los plásmidos pRML4 y pUO94 tienen origen de replicación diferentes por lo que deben replicarse en la misma cepa (ColE1 y R300B respectivamente), proponemos que la pérdida del pUO94 se debe a una inestabilidad segregacional probablemente por la diferencia del número de copias entre los plásmidos pUO94 (aproximadamente 12-13 copias) y pRML4 (más de 200 copias). Sin embargo, también puede ser que exista una sobreproducción de ramnolípidos que representará una desventaja por lo que se seleccionan cepas que han perdido esta capacidad. El evento más frecuente debe ser la pérdida del plásmido de menor número de copias, de tal forma que segrega el pUO94 que tiene los genes que codifican para la enzima Rt1. A pesar de esta situación, se logró evaluar la producción del biosurfactante monoramnolípidos en esta cepa. De la misma forma que la cepa *E. coli* HB101(pNCV460, pUO94) se estudió el efecto de ramnosa y ácido oleico sobre la producción de monoramnolípidos. En la tabla 7.4 se muestran los resultados de estos cultivos.

Tabla 7.4 Producción de monoramnolípidos ($\mu\text{g/ml}$) por la cepa *E. coli* HB101(pRML4, pUO94) en medio de cultivo LB con ramnosa y ácido oleico.

	LB	LB-ramnosa (5g/l)	LB-ramnosa (10g/l)	LB-ácido oleico(5mM)	LB-ácido oleico(15mM)	PPGAS
<i>E. coli</i> HB101 (pRML4, pUO94)	21	26.22	30.11	33.99	52.22	31.54
<i>P. aeruginosa</i> PAO1						150.29

La producción de ramnolípidos por esta cepa es mayor con respecto a la cepa que lleva el cósmido pNCV460, lo cual nos sugiere que tal vez el número de copias de los genes *rmlBDAC* tiene un efecto positivo sobre la concentración de éstos. Proponemos que los experimentos que se suplementaron con ramnosa, tal vez incrementaron la concentración del precursor glucosa-1-fosfato como ya se comentó en otro experimento, pero tal vez se hicieron limitantes los β -hidroxiácidos y por esta razón en el experimento que se suplementó ácido oleico 15 mM se incrementó la concentración de monoramnolípidos. El experimento no fué repetido debido a la inestabilidad de la cepa.

7.4.4 Efecto del IPTG y del tiempo de inducción sobre la producción de monoramnolípidos por la cepa *E. coli* HB101(pNCV460, pUO94).

Se utilizó esta cepa porque es mas estable que *E. coli* HB101(pRML4, pUO94). Este experimento se realizó porque pensamos que la concentración de IPTG 3mM que utilizamos previamente puede ser alta ya que existen reportes de que el aumento en las concentraciones de IPTG afecta de manera negativa el crecimiento de algunas cepas de *E. coli* en condiciones aeróbicas (Miao y Kompala, 1992). Se realizaron cultivos con la cepa *E. coli* HB101(pNCV460, pUO94) en matraces de 250 ml con 25 ml de medio LB suplementado con tetraciclina y estreptomicina a 100 $\mu\text{g/ml}$ y se incubaron a 37°C. La concentración de proteína y de monoramnolípidos obtenida se muestra en la tabla 7.5. Para evaluar el efecto de los factores inductor y tiempo de inducción a dos niveles (se probaron dos concentraciones de IPTG 1 y 3 mM; en el tiempo cero y a las 7 horas del cultivo) se realizaron cuatro experimentos: 1) 1 mM de IPTG desde el inicio del cultivo; 2) 3 mM de IPTG desde el inicio del cultivo; 3) 1 mM de IPTG a las 7 horas del cultivo; y 4) 3 mM de IPTG a las 7 horas del cultivo. En la tabla 7.5

presentamos un resumen de los resultados de los cuatro experimentos obtenidos a las 7 y 9 horas (en el momento de inducción y dos horas después de ésta).

Tabla 7.5 Efecto del IPTG y tiempo de inducción sobre la concentración de proteínas y monoramnolípidos obtenidos de *E. coli* HB101(pNCV460, pUO94) en medio de cultivo LB.

Experimento	IPTG (mM)	Tiempo de inducción (horas)	Proteína (mg/ml) 7 horas	Proteína (mg/ml) 9 horas	Monoramnolípidos (µg/ml) 7 horas	Monoramnolípidos (µg/ml) 9 horas
1	1	0	0.4319	0.4778	11.54±0.007	33.03 ±0.041
2	3	0	0.380	0.4608	19.56±0.029	29.60±0.018
3	1	7	0.3689	0.5090	0	33.43±0.026
4	3	7	0.3803	0.5051	0	33.99±0.012

En las concentraciones probadas, la comparación de resultados permite establecer que la concentración de proteína a las 7 horas del cultivo es similar en los cuatro experimentos lo que nos indica que ambos factores no afectaron la biosíntesis de proteína. Sin embargo, dos horas más tarde, la concentración de proteína fue mayor en los cuatro experimentos con respecto a las 7 horas. La concentración de proteína entre los experimentos 1 y 2 aumentó de manera similar es decir que, estos datos sugieren que la concentración de IPTG no afectó la biosíntesis de proteína; así mismo se puede concluir que este factor tampoco afectó la biosíntesis de proteína en los experimentos 3 y 4 ya que no hay diferencia en su concentración final. Pero esta concentración es mayor que la obtenida para los experimentos 1 y 2. Estos datos nos indican que la inducción con IPTG en una fase de crecimiento tardía nos da como resultado una mayor concentración de proteínas, en este caso se da con la Ramnosiltransferasa 1. Respecto a la concentración de monoramnolípidos la concentración máxima fue de 33 µg/ml, ésta es similar para los 4 experimentos lo cual nos sugiere que en las condiciones probadas, el IPTG adicionado desde el inicio del cultivo o después no afectó la producción de monoramnolípidos. aún cuando se utilizó IPTG a una concentración de 3 mM.

7.4.5 Producción de monoramnolípidos por la cepa *E. coli* HB101(pNCV460, pUO94) en medio mineral con glucosa y ácido oleico como fuentes de carbono.

En experimentos previos se tuvo la evidencia de que la cepa *E. coli* HB101 (pUO94, pNCV460) produce monoramnolípidos en medio de cultivo LB y PPGAS. Sin embargo, aunque PPGAS utiliza glucosa como fuente de carbono, estos medios de cultivo son complejos. Creemos que es importante utilizar un medio de cultivo mineral, por esta razón decidimos utilizar M9 con glucosa y ácido oleico como fuente de carbono para la producción de monoramnolípidos. Se realizaron cultivos con la cepa *E. coli* HB101(pNCV460, pUO94) en matraces de 250 ml con 25 ml de medio M9 suplementado con tetraciclina y estreptomicina a 100 µg/ml, tiamina 0.001%, prolina 164 µg/ml, leucina 41 µg/ml e IPTG 1 mM desde el inicio del cultivo y se incubaron a 37°C por 72 horas. La concentración de proteína y de monoramnolípidos se muestra en la tabla 7.6.

Se utilizó glucosa y ácido oleico a una concentración de 5g/l y 5mM respectivamente, como el ácido oleico es inmisible en agua se utilizó Brij 35 (poliexitileno monolauril eter, n ca. 23) como emulsificador; para demostrar que este detergente no tiene efecto sobre el crecimiento se utilizó como fuente de carbono a una concentración de 5 mg/ml, también se estudió el efecto combinado de las dos fuentes de carbono más el emulsificador. Las condiciones descritas se incluyen en los siguientes 8 experimentos (tabla 7.6): 1) medio mineral M9 sin fuente de carbono; 2) medio mineral M9 con glucosa 5g/l; 3) medio mineral M9 con Brij 35 5mg/ml; 4) medio mineral M9 con glucosa 5g/l y Brij 35 5mg/ml; 5) medio mineral M9 con ácido oleico 5mM; 6) medio mineral M9 con glucosa 5g/l y ácido oleico 5mM; 7) medio mineral M9 con ácido oleico 5mM y Brij 35 5mg/ml y 8) medio mineral M9 con glucosa 5g/l, Brij 35 5mg/ml y ácido oleico 5mM. En la tabla 7.6 presentamos un resumen de los resultados de estos ocho experimentos obtenidos a las 36 y 60 horas.

Tabla 7.6 Proteínas y monoramnolípidos obtenidos de *E. coli* HB101(pNCV460, pUO94) en medio de cultivo M9 con glucosa y ácido oleico como fuentes de carbono.

Experimento	Glucosa %	Brij35 mg/ml	Acido Oleico mM	Proteína (mg/ml) 36 horas	Monoramnolípidos (µg/ml) 36 horas	Monoramnolípidos (µg/ml) 60 horas
1	0	0	0	No creció	0	0
2	0.5	0	0	1.222	23.86	31.80
3	0	5	0	No creció	0	0
4	0.5	5	0	1.204	51.55	32.30
5	0	0	5	0.073	0	0
6	0.5	0	5	1.371	52.05	31.11
7	0	5	5	0.340	0	11.54
8	0.5	5	5	1.249	37.53	33.31

En las concentraciones probadas, la concentración de proteína que se obtuvo en los experimentos 2, 4, 6 y 8 a las 36 horas fue la misma desde las 12 horas y solo disminuyó un poco a las 72 horas (datos no mostrados); para el experimento 5, a las 12 horas casi no se observó proteína sin embargo, a las 72 horas aumentó a 0.257 mg/ml; para el experimento 7 el cual tiene Brij35 se obtuvo 0.425 mg/ml a las 72 horas. Ambos experimentos tienen ácido oleico como fuente de carbono, pero el crecimiento fue mayor en el experimento 7, estos datos nos indican que el detergente Brij 35 si ayudó a emulsificar el ácido oleico y por lo tanto se hizo más disponible. Por otra parte, el experimento 6 que tiene glucosa y ácido oleico así como el experimento 8 que tiene glucosa, ácido oleico y Brij35, no incrementaron su concentración de proteína con respecto al experimento 2 que solo tiene glucosa, probablemente porque el ácido oleico no se utilizó como fuente de carbono. Respecto a la producción de monoramnolípidos, en el experimento 2 se demostró que es posible la síntesis de este biosurfactante a partir de glucosa, su concentración a las 60 horas fue de 31.80 µg/ml, muy similar a la obtenida en medio LB. Sin embargo, el experimento 4 que tiene glucosa y Brij 35, la concentración de monoramnolípidos a las 36 horas es mayor con respecto al experimento 2. No tenemos claro en que forma este compuesto ayude a incrementar la producción de ramnolípidos, se sabe que el Brij 35 es un detergente que se usa para purificar proteínas de membrana, probablemente a la concentración que usamos ayude a despegar los ramnolípidos de la membrana. Resulta interesante que en los experimentos 6 y 8 suplementados con ácido oleico, a las 36 horas la concentración de

monoramnolípidos es mayor con respecto al experimento 2, este resultado es importante porque si consideramos que el ácido oleico no fue utilizado como fuente de carbono para crecer, probablemente este fue internalizado al interior de la célula y a través de la β -oxidación proporcionó precursores de ácidos grasos para la síntesis de monoramnolípidos. De igual manera un dato muy importante es que el experimento 7 con ácido oleico como fuente de carbono en presencia del detergente Brij 35 logró producir a las 60 horas 11.54 $\mu\text{g/ml}$ de monoramnolípidos, estos datos nos sugieren que la síntesis de ambos precursores se obtienen a partir del metabolismo central de carbono y de la degradación de los ácidos grasos. En este trabajo proponemos que la parte hidrofóbica de los monoramnolípidos puede ser proporcionada por ambas vías metabólicas, de tal forma que la enzima Ramnosiltransferasa 1 puede utilizar como sustratos ácidos grasos libres (Burger, *et al.*, 1963, 1966), o unidos a ACP, cuando se derivan de la biosíntesis de ácidos grasos o unidos a CoA cuando proceden de la degradación de éstos. (figura 7.8).

Los resultados obtenidos con estos experimentos demuestran que la cepa *E. coli* HB101(pNCV460, pUO94) crecida en medio M9 utilizando glucosa como fuente de carbono produce mas proteína respecto a LB y también produce monoramnolípidos, sin embargo con ácido oleico como fuente de carbono única (experimento 5), las células no son capaces de crecer ya que esta fuente de carbono es inmisible en el resto del medio de cultivo, sin embargo, en presencia de un emulsificador se logró una solubilización parcial, de esta forma las células fueron capaces de crecer un poco más (experimento 7), probablemente si se mejorara el emulsificador esta fuente de carbono podría aprovecharse mejor

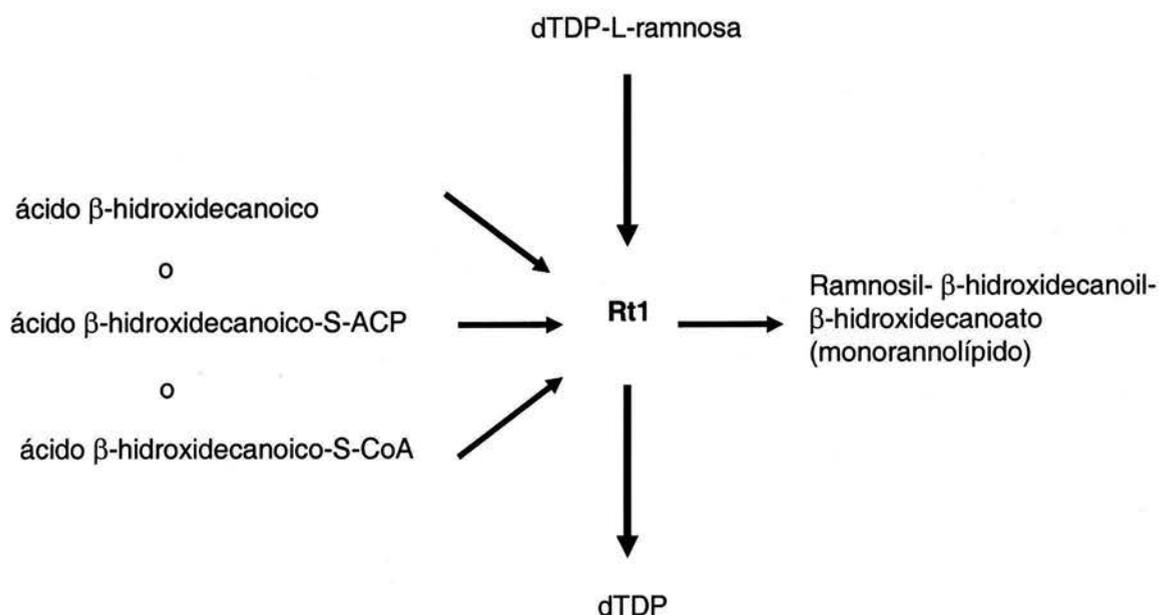


Figura 7.8 La enzima ramnosiltransferasa 1 (Rt1) es capaz de usar como sustratos ácidos grasos libres, unidos a ACP o CoA.

7.4.6 Construcción de las cepas *E. coli* W2190 y *E. coli* R203:

Con el objetivo de construir una cepa más estable, productora del biosurfactante monoramnolípido, se diseñó una cepa, la cual quedaría transformada con los genes *rmlBDAC* en multicopia a través del cósmido pNCV460, y del plásmido pRML4; mientras que los genes *rhlAB* se integrarían a su cromosoma. Se decidió integrar los genes *rhlAB*, considerando que en el plásmido pUO94 su expresión está regulada bajo el control del promotor *tac*. La idea de integrar los genes *rhlAB* bajo el promotor *tac* es para compensar el hecho de que la cepa solo tendrá una copia de estos genes. Se utilizaron la cepas de *E. coli* RR1 y *E. coli* W3110 para la integración de los genes *rhlAB* en su cromosoma. *E. coli* RR1 es igual a la cepa *E. coli* HB101 sólo que ésta es capaz de llevar a cabo recombinación, *E. coli* W3110 es una cepa utilizada a nivel industrial y también es capaz de llevar a cabo recombinación. La estrategia que seguimos está basada en un sistema desarrollado por Sylvie Le Borgne y colaboradores (Le Borgne, *et al.*,

1998). Este grupo desarrolló la construcción y caracterización de tres vectores que permiten la integración de DNA en el gen *lacZ* del cromosoma de *E. coli* por recombinación homóloga, estos plásmidos tienen un Sitio Múltiple de Clonación insertado en el gen *lacZ*, el MCS está flanqueado por un gen que le confiere resistencia a cloranfenicol, kanamicina y gentamicina que permite la selección del fragmento de DNA clonado. Una característica relevante de estos vectores es que para llevar a cabo la integración en el cromosoma considera las funciones de replicación de estos vectores, las cuales son sensibles a temperaturas mayores de 30°C. Es decir, con un aumento en la temperatura de cultivo y en presencia del marcador de selección, se seleccionan aquellas bacterias en las que ocurrió la integración en cromosoma. La validación del sistema, fue a través de clonar el gen heterólogo *amy* de *B. stearothermophilus*, en uno de los vectores construidos e integrarlo posteriormente en el locus cromosomal *lacZ* de *E. coli* W3110 (Le Borgne, *et al.*, 1998).

El proceso que permitió la integración de los genes *rhlAB* en el locus cromosomal *lacZ* de *E. coli* RR1 y W3110, se describió en materiales y métodos (figura 6.1). Las cepas con los genes *rhlABR* integrados en su cromosoma se denominaron R203 y W2190. Para corroborar que los genes *rhlABR* están incluidos en su cromosoma, se realizó una hibridación tipo Southern. La autorradiografía se muestra en la figura 7.9, en los incisos a) y b) se muestran los filtros correspondientes al estudio con la cepa R203 y W2190 respectivamente. En el inciso a), el orden en los carriles es el siguiente: 1)DNA pINTRHL94/*Hind* III, 2)DNA RR1/*Hind* III, 3)DNA R203/*Hind* III, 4)DNA λ /*Hind* III, 5)DNA R203/*Hind* III, 6)DNA pINTRHL94/*Cla* I, 7)DNA RR1/*Cla* I, 8)DNA R203/*Cla* I, 9)DNA λ /*Hind* III, 10)DNA R203/*Cla* I. Las señales positivas fuertes que se muestran en los carriles 1 y 6 son el control positivo de la hibridización es decir, la sonda hibridó con DNA del plásmido pINTRHL94 digerido con las enzimas *Hind* III y *Cla* I respectivamente. La señal positiva en los carriles 3 y 5, son duplicado y corresponden a un fragmento liberado de una digestión de DNA cromosomal de la cepa R203 con la enzima de restricción *Hind* III. La señal positiva en los carriles 8 y 10, son duplicado y corresponden a un fragmento liberado de una digestión de DNA cromosomal de la cepa R203 con la enzima de

restricción *Cla* I. El control negativo no mostró hibridización (carriles 2 y 7, DNA cromosomal de la cepa *E. coli* RR1 digerido con las enzimas *Hind* III y *Cla* I respectivamente). Estos resultados muestran que los genes *rhlABR* están integrados en el cromosoma de la cepa R203. En el inciso b), el orden en los carriles es el siguiente: 1)DNA pINTRHL94/*Hind* III, 2)DNA W3110/*Hind* III, 3)DNA W2190/*Hind* III, 4)DNA λ /*Hind* III, 5)DNA W2190/*Hind* III, 6)DNA pINTRHL94/*Cla* I, 7)DNA W3110/*Cla* I, 8)DNA W2190/*Cla* I, 9)DNA λ /*Hind* III, 10)DNA W2190/*Cla* I Como el orden de los carriles es el mismo que para la cepa R203, se puede deducir que la cepa W2190 tiene a los genes *rhlABR* integrados en su cromosoma.

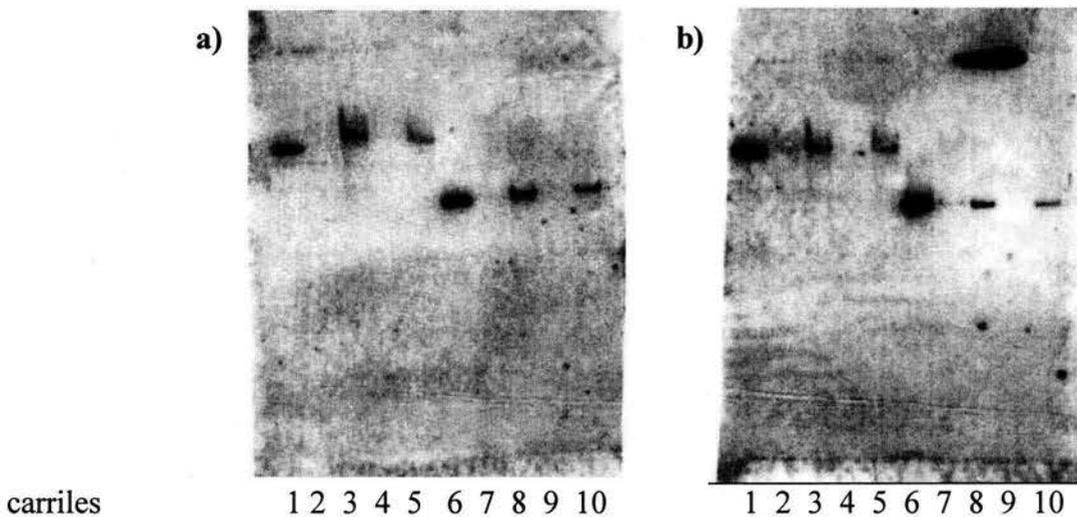


Figura 7.9 Identificación de los genes *rhlAB* en *E. coli*. Autorradiografía tipo southern de DNA cromosomal de *E. coli* R203 (a) y DNA cromosomal de *E. coli* W2190 (b).

7.4.7 Construcción de las cepas W2190(pNCV460), W2190(pRML4), R203(pNCV460), R203(pRML4):

Estas cepas se obtuvieron por conjugación del cósmido pNCV460, y por electroporación del plásmido pRML4 a las cepas W2190 y R203. Se determinó la producción de monoramnolípidos de estas cepas en medio de cultivo LB, se utilizó la cepa *E. coli* HB101(pNCV460, pUO94) como control. El medio de cultivo LB se suplementó con cloranfenicol 15 µg/ml, tetraciclina 20 µg/ml y ampicilina 100 µg/ml, el inductor IPTG 1mM se adicionó cuando la densidad óptica a 625 nm fue de 0.6. Los matraces se incubaron a 30°C y 37°C por 24 horas. Se cuantificó monoramnolípidos por el método de orcinol sin embargo, las concentraciones fueron demasiado bajas. Se realizó cromatografía en capa fina a partir de 666 µl de sobrenadante en vez de 333 µl para poder visualizar mejor el producto, para la cepa *E. coli* HB101(pNCV460, pUO94) fue de 333 µl. Tanto a las 12 como a las 24 horas del cultivo, no se percibieron manchas en los cromatogramas que indicaran la presencia de monoramnolípidos de alguna cepa tanto a 30°C como a 37°C, sólo se observaron monoramnolípidos para la cepa *E. coli* HB101(pNCV460, pUO94) (datos no mostrados). La figura 7.10 muestra una foto de los matraces correspondientes a estos cultivos después de agitar. En todas las cepas, el fenotipo de espuma se abatió con respecto a la cepa *E. coli* HB101(pNCV460, pUO94). Sólo la cepa R203(pNCV460) a 30°C presentó un poco más de espuma respecto a las otras cepas (figura 7.10). De hecho en el cromatograma se apreció un mancha muy tenue en el momento de revelado, la cual después de unos momentos desapareció.

a)



b)



Figura 7.10 Cultivos de *E. coli* en LB con los genes *rhlAB* integrados en cromosoma a 30°C a) y 37°C b). Para ambos casos de izquierda a derecha se muestran los cultivos de *E. coli* R203(pNCV460), *E. coli* R203(pRML4), *E. coli* HB101(pUO94, pNCV460), *E. coli* W2190(pNCV460), *E. coli* W2190(pRML4).

Proponemos que las cepas W2190(pNCV460), W2190(pRML4), R203(pNCV460), R203(pRML4) disminuyeron su producción de monoramnolipidos probablemente porque tienen una sola copia de los genes *rhlAB* en su cromosoma, por lo tanto decidimos determinar la producción de monoramnolipidos en cepas con el mismo fondo genético y con los genes *rhlAB* en multicopia a través del plásmido pINTRHL94. Estas cepas son *E. coli* W3110(pINTRHL94,

pNCV460) y *E. coli* RR1(pINTRHL94, pNCV460). Se realizaron cultivos de estas cepas, así como de la cepas *E. coli* HB101(pNCV460, pUO94) y *P. aeruginosa* PAO1 en medio de cultivo M9 con glucosa 5g/l. Los cultivos se llevaron a cabo en matraces de 250 ml con 25 ml de medio de cultivo, además se adicionó tetraciclina 150 µg/ml, tetraciclina 20 µg/ml, cloranfenicol 30 µg/ml, IPTG 1 mM, tiamina 0.001%, prolina 164 µg/ml y leucina 41 µg/ml. Estos matraces se incubaron a 37°C por 24 horas y a 30°C para *P. aeruginosa* PAO1. La concentración de monoramnolípidos se determinó por el método de orcinol y se encontró que las cepas *E. coli* W3110(pINTRHL94, pNCV460) y *E. coli* RR1(pINTRHL94, pNCV460) produjeron 30.71 µg/ml y 16.56 µg/ml de monoramnolípidos respectivamente y *P. aeruginosa* PAO1 produjo 132.20 µg/l y 93.9 µg/ml de ramnolípidos en PPGAS y M9 respectivamente. Las cepas de *E. coli* W3110 y RR1 transformadas con el plásmido pINTRHL94 que lleva los genes *rhlAB* y con el cósmido pNCV460 sí producen monoramnolípidos. La concentración de monoramnolípidos en la cepa *E. coli* RR1(pINTRHL94, pNCV460) es similar a la obtenida en la cepa *E. coli* HB101(pNCV460, pUO94) mientras que en la cepa *E. coli* W3110(pINTRHL94, pNCV460) es un poco mayor. Estos resultados nos sugiere que probablemente la disminución de la concentración de monoramnolípidos en las cepas W2190(pNCV460), W2190(pRML4), R203(pNCV460) y R203(pRML4) se debe a que solo tienen una copia de los genes *rhlAB*, a pesar de que éstos están controlados por el promotor *tac*. Desafortunadamente en nuestro laboratorio no disponemos de la técnica para cuantificar la actividad de la enzima Ramnosiltransferasa 1, dato que sería útil para probar nuestra hipótesis. Las cepas *E. coli* W3110(pINTRHL94, pRML4) y *E. coli* RR1(pINTRHL94, pRML4) no se pudieron obtener debido a que ambos plásmidos presentan resistencia a ampicilina.

7.4.8 Construcción de la cepa *E. coli* HB101(pTRML4, pUO94).

Hasta esta etapa del trabajo, la expresión de los genes *rmlBDAC* fue bajo su propio promotor. Sin embargo, si la expresión de estos genes se lleva a cabo bajo un promotor fuerte, probablemente la concentración de las enzimas codificadas por estos genes incrementa. Debido a lo anterior

decidimos subclonar los genes *rmlBDAC* a partir del plásmido pRML4 en el vector de expresión pTrc99A (Amann, *et al.*, 1988). El plásmido resultante se denominó pTRML4, aquí la expresión de los genes está regulada por el promotor *trc* el cual es inducible por IPTG. Este plásmido se transformó por electroporación a la cepa *E. coli* HB101(pUO94). Se realizaron cultivos de esta cepa en medio de cultivo M9 con glucosa 5g/l. Los cultivos se llevaron a cabo como ya se describió en el experimento anterior, excepto que se adicionó tetraciclina 20 µg/ml y ampicilina 200 µg/ml. Se encontró que la cepa *E. coli* HB101(pTRML4, pUO94), produjo 15.87 µg/ml de monoramnolípidos. Esta concentración es similar a la cepa *E. coli* HB101(pNCV460, pUO94), a pesar de que no cuantificamos la actividad de la enzima RmlB, la producción de monoramnolípidos por esta cepa, nos sugiere que no es necesario incrementar los niveles de expresión de los genes *rmlBDAC* para aumentar la concentración de monoramnolípidos y que el paso limitante en la biosíntesis de este biosurfactante en *E. coli*, puede ser la concentración del precursor de los ácidos grasos o la síntesis de glucosa-1-fosfato.

7.4.9 Construcción de la cepa *E. coli* HB101(pCRML4, pUO94).

Un dato que nos llamó la atención es que la cepa R203(pNCV460) presentó más espuma que la cepa R203(pRML4) tanto a 30°C como a 37°C (figura 7.10), nosotros esperábamos que la cepa con el plásmido pRML4 produciría más monoramnolípidos ya que tiene mas copias de los genes *rmlBDAC*. Este resultado nos puede sugerir que probablemente en el cósmido pNCV460 exista algún (os) gene (s) que regule (n) a los genes *rmlBDCA*. Para eliminar el efecto de esta supuesta regulación, se subclonaron los genes *rmlBDAC* a partir del plásmido pRML4 (este plásmido tiene un fragmento de 6382 pb del pNCV460 que lleva los genes *rmlBDAC*) en el vector pCP13 (que es un cósmido diseñado para hacer bibliotecas genómicas y es el mismo vector que el del pNCV460; Darzins A. y Chakrabarty A.M., 1984), el plásmido obtenido se denominó pCRML4. Aquí al igual que en el plásmido pRML4, los genes *rmlBDCA* están bajo su propio promotor. Este cósmido se transformó por conjugación a la cepa *E. coli* HB101(pUO94). En esta cepa tanto el plásmido pUO94 como el pCRML4 son de bajo número de copias y ambos presentan

resistencia a tetraciclina por lo que se seleccionó con alta concentración de tetraciclina, si esta cepa produce igual concentración de monoramnolípidos que la cepa *E. coli* HB101(pNCV460, pUO94), entonces tal vez no exista ninguna regulación de los genes *rmlBDAC* en el cósmido pNCV460. La concentración de monoramnolípidos en medio M9 con glucosa 5g/l en las condiciones ya descritas fue de 15.91 $\mu\text{g/l}$. Lo cual nos sugiere que no existe alguna regulación de los genes *rmlBDAC* en el cósmido pNCV460 y que en *E. coli* el promotor del operón *rmlBDAC* es funcional.

8 DISCUSIÓN GENERAL

Los estudios de síntesis de monoramnolípidos de *P. aeruginosa* en *E. coli* previos a éste, no tuvieron éxito debido a una baja concentración de sus sustratos precursores: la dTDP-L-ramnosa o β -hidroxiácidos.

En este trabajo, planteamos que si aumentamos la concentración de uno o ambos precursores y en presencia de la enzima Ramnosiltransferasa 1, probablemente se lleve a cabo la síntesis de monoramnolípidos en *E. coli*. Esta hipótesis se planteó tomando en cuenta los resultados que obtuvo Ochsner y colaboradores durante su estudio de genética en la biosíntesis de ramnolípidos en *P. aeruginosa*. La evidencia que presentamos en este trabajo apoya^o nuestra hipótesis. Ya que, cuando expresamos en *E. coli* los operones *rmlBDAC* y *rhlAB* de *P. aeruginosa* que codifican las enzimas involucradas en la síntesis de dTDP-L-ramnosa, y la Ramnosiltransferasa 1 respectivamente; fue posible la formación de este biosurfactante. Estos resultados nos indican que la baja concentración de dTDP-L-ramnosa producida por *E. coli* en la ausencia del operón *rmlBDAC* no es suficiente como sustrato de la ramnosiltransferasa 1 para la producción de monoramnolípidos. Sin embargo, la cepa de *E. coli* HB101(pUO94) crecida en PPRAS, con L-ramnosa como fuente de carbono si produjo monoramnolípidos a una concentración baja. En este caso la dTDP-L-ramnosa donadora del grupo ramnosil sólo es formada a través de la vía del operon *rfbABCD*, creemos que en presencia de L-ramnosa se ve favorecida la síntesis de precursores de la vía de dTDP-L-ramnosa, probablemente glucosa-1-fosfato.

Un dato importante que aportó este trabajo fue la síntesis de monoramnolípidos por *E. coli* HB101(pNCV460, pUO94) tanto en medios de cultivo ricos (LB y PPGAS) como en medio mineral M9 con glucosa y ácido oleico como fuentes de carbono, estos últimos datos nos permitieron proponer que la enzima Ramnosiltransferasa 1 puede usar ácidos grasos-ACP o ácidos grasos-CoA. Por otro lado un dato adicional que obtuvimos fue cuando se combinaron ambas fuentes de carbono (tabla 7.5; experimento 6) este resultado nos sugiere que los ácidos grasos pueden ser limitantes. De tal forma que en base a estos resultados es importante la optimización de la composición del medio de cultivo y/o el incremento de la producción de los ácidos grasos a través de una estrategia de ingeniería de vías metabólicas. Ya en *E. coli* se han llevado a cabo con éxito este tipo de estrategias para producir polihidroxialcanoatos (PHA) de cadena media.

9 CONCLUSIONES

En las condiciones probadas y con glucosa como fuente de carbono, la cepa de *E. coli* HB101 que expresa los genes *rhlAB* de *P. aeruginosa* probablemente produce una concentración de dTDP-L-ramnosa que no es suficiente para sintetizar monoramnolípidos. Sin embargo, con L-ramnosa se logró obtener un biosurfactante que produce espuma, su identificación por cromatografía en capa fina sugiere que pueden ser monoramnolípidos.

Se aislaron los genes *rmlBDAC* de *P. aeruginosa* PAO1, estos genes codifican las enzimas necesarias para sintetizar dTDP-L-ramnosa.

Los genes *rmlBDAC* de *P. aeruginosa* PAO1 se expresaron en *E. coli* bajo su propio promotor, y como resultado, probablemente la concentración endógena de dTDP-L-ramnosa en *E. coli* aumentó ya que la cepa HB101 de *E. coli* transformada con los genes *rhlAB* y *rmlBDAC*, de *P. aeruginosa* PAO1 produjo monoramnolípidos en diferentes medios de cultivos; LB, PPGAS, medio mineral M9-glucosa y medio mineral M9-ácido oleico. Sin embargo, éstos parecen degradarse en función del tiempo.

Se obtuvieron las cepas de *E. coli* R203 y W2190, éstas tiene los genes *rhlAB* de *P. aeruginosa* PAO1 integrados en su cromosoma y bajo el control transcripcional del promotor *tac*.

Las cepas R203 y W2190 transformadas con los genes *rmlBDAC* de *P. aeruginosa* PAO1, disminuyeron considerablemente su concentración de monoramnolípidos en medio mineral M9-glucosa al compararlas con las cepas W3110 y RR1 de *E. coli* que expresan tanto los genes *rhlAB* y como los genes *rmlBDAC* en multicopia, probablemente por una reducción de 10 veces en el número de copias de los genes *rhlAB* que codifican la enzima Ramnosiltransferasa 1.

La producción de monoramnolípidos en medio mineral M9-glucosa es igual en *E. coli* HB101 que expresa los genes *rmlBDAC* de *P. aeruginosa* PAO1 bajo su propio promotor así como bajo el promotor *trc*.

Las evidencias que presentamos en este trabajo, nos sugieren que la enzima Ramnosiltransferasa 1, además de usar como sustratos ácidos β -hidroxidecanoicos libres también puede usar ácidos β -hidroxialnoicos unidos a ACP, en medio mineral M9 con glucosa como fuente de carbono y unidos a CoA, en medio mineral M9 con ácido oleico como fuente de carbono.

Este es el primer trabajo que reporta la síntesis del biosurfactante monoramnolípido de *P. aeruginosa* en cepas recombinantes de *E. coli*.

10 PERSPECTIVAS

Caracterizar químicamente los biosurfactantes producidos por *E. coli*. Así como sus propiedades fisicoquímicas y biológicas.

Seleccionar una cepa de *E. coli* productora de monoramnolípidos y caracterizar a escala de matraz y/o fermentador de laboratorio, la cinética de crecimiento y la producción de este biosurfactante a partir de glucosa y del estudio de parámetros que potencialmente pueden afectar la síntesis de monoramnolípidos.

Desarrollar un proceso de producción de monoramnolípidos para *E. coli* que incluya un medio de cultivo mineral que permita el estudio de otras fuentes de carbono.

Producir monoramnolípidos a partir de glucosa alterando las rutas del metabolismo central y de los ácidos grasos en *E. coli*.

Construir cepas que no requieran de la adición de inductor, por ejemplo, bajo un promotor que se exprese constitutivamente.

Purificar la enzima Ramnosiltransferasa 1 para caracterizar sus propiedades catalíticas así como la afinidad por otros sustratos derivados de ácidos grasos.

Evaluar la expresión del operón *rmlBDAC* en *E. coli* a través de una fusión transcripcional *rmlB::lacZ*.

11 REFERENCIAS

- Amann E., Ochs B., and Abel K. J. 1988. Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene*. **69**(2): 301-315.
- Allard T.M. S., Giraud M. F., Whitfield C., Messner P., and Naismith J. H. 2000. The purification, crystallization and structural elucidation of dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase (RmlB), the second enzyme of the dTDP-L-rhamnose synthesis pathway from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Acta Crystallog. Sect. D*. **56**: 222-225
- Arino S., Marchal R., and Vandecasteele J. P. 1996. Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. *Appl Microbiol Biotechnol*. **45**: 162-168
- Atlas R. M. 1993. Handbook of microbiological media (ed.) Parks, L.C. CRC Press. Boca Raton, Florida. pp: 529
- Arsenault L. T., Huges W. D., MacLean B. D., Szarek A. W., Kropinski B. M. A., and Lam S. J. 1991. Estructural studies on the polysaccharide portion of "A-band" lipopolysaccharide from a mutant (AK1401) of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1. *Can J Chem*. **69**: 1273-1280
- Babu P. S., Vaidya A. N., Bal A. S., Kapur R., Juwarkar A., and Khanna P. 1996 Kinetics of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial wastes. *Biotechnol Lett* **18**: 263-268
- Banco de cósmidos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 donado por Dr. Joseph S. Lam del departamento de Microbiología de la universidad de Guelph.
- Bergen G. A. and Shelhamer J. H. 1996. Pulmonary infiltrates in the cancer patient. *Infect Dis Clin North Am*. **10**: 297-326
- Black P. N., and DiRusso C. C. 1994. Molecular and biochemical analyses of fatty acid transport, metabolism, and gene regulation in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*. **1210**(2): 123-45
- Bosch M. P., Parra J. L., Manresa M. A., Ventura F., and Rivera J. 1989. Analysis of glycolipids by fast atom bombardment mass spectrometry. *Biomed Environ Mass Spectrom*. **18** (12): 1046-1050
- Bradford M. 1976. *Anal. Biochem*. **72**: 248
- Bergström S., Theorell H., Davide H. 1946. On a metabolic product of *Ps. pyocyanea*, pyolipic acid, active against Myobact. tuberculosis. *Ark Kem Mineral Geol* **23A**: 1-12
- Brint M. J., and Ohman E. D. 1995. Synthesis of Multiple Exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* Is under the Control of RhlR-RhII, Another Set of Regulators in Strain PAO1 with Homology to the Autoinducer-Responsive LuxR-LuxI Family. *J Bacteriol*. **177**(24): 7155-7163

- Burger M. M., Glaser L., and Burton R.M. 1963. The enzymatic synthesis of a rhamnose-containing glycolipid by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem.* **238**: 2595-2601
- Burger M. M., Glaser L., and Burton R.M. 1966. Formation of rhamnolipids of *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods Enzimol.* **8**: 441-445
- Burrows, L. L., Chow, D. and Lam, J. S. 1997 *Pseudomonas aeruginosa* B-band O-antigen chain length is modulated by Wzz (Rol). *J. Bacteriol* **179**: 1482-1489.
- Campos G. J., Caro A.D., Nájera R., Miller-Maier R., Al-tahhan A. R., and Soberón-Chávez G., 1998. The *Pseudomonas aeruginosa rhlG* Gene Encodes an NADPH-Dependent β -Ketoacil Reductase Wich Is Specifically Involved in Rhamnolipid Synthesis. *J Bacteriol.* **180**(17): 4442-4451
- Chandrasekaran V. E., and Bemiller N. J., in: R. L. Whistler (Ed.). *Constituen analyses of glycosaminoglycans. Methods in Carbohydrate Chemistry.* Academic Press, New York, 1980, 89-96.
- Clarke B. R., and Whitfield C. 1992. Molecular cloning of the *rfb* region of *Klebsiella pneumoniae* serotype O1:K20: the *rfb* gene cluster is responsible for synthesis of the D-galactan I O polysaccharide. *J Bacteriol.* **174**(14): 4614-21
- Coyne J. M., JR., Russell S. K., Coyle L. C., and Goldberg B. J. 1994. *The Pseudomonas aeruginosa algC* Gene Encodes Phosphoglucomutase, Required for the Synthesis of a Complete Lipopolysaccharide Core. **176**(12): 3500-3507
- Daniels L., Linhardt R. J., Bryan B. A., Mayerl F., Pickenhagen W., 1988. Method for producing rhamnose. European patent 0 282 942
- Darzins A., and Chakrabarty A. M. 1984. Cloning of genes controlling alginate biosynthesis from a mucoid cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **159**(1): 9-18.
- Davey E. Mary, Nicky C. Caiazza, and George A. O'Toole. 2003. Rhamnolipid Surfactant Production Affects Biofilm Architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol.* **185**: 1027-1036
- Desai J. and Banat I. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potencial. *Microbiol. Mol Biol Rev.* **61**: 47-64
- Deziel E., Paquette G., Villemur R., Lepine F., and Bisailon G. J. 1996. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol.* **62**: 1908-1912
- Deziel E., Lepine F., Dennie D., Boismenu D., Mamer OA., and Villemur R. 1999. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by grown on mannitol or naphthalene. *Biochim Biophys Acta.* **1440** (2-3): 244-252

- Deziel E., Lepine F., Milot S., and Villemur R. 2003. *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology*. **149**: 2005-2013
- De Koster CG., Vos B., Versluis C., Heerma W., and Haverkamp J. 1994. High-performance thin-layer chromatography/fast atom bombardment (tandem) mass spectrometry of *Pseudomonas* rhamnolipids. *Biol Mass Spectrom*. **23** (4): 179-185
- DiRusso C. C., Black P. N., and Weimar J. D. 1999. Molecular insights into the regulation and metabolism of fatty acids, lessons from bacteria. *Prog Lipid Res*. **38**(2): 129-97
- Edwards J. R., and Hayashi J. A. 1965. Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Biochem Biophys*. **111**: 415-421
- Fergie J. E., Shema S. J., Lott L., Crawford R., Patrick C. C. 1994. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in immunocompromised children: analysis of factors associated with a poor outcome. *Clin Infect Dis*. **18**: 390-394
- Fiechter A. 1992. Biosurfactants: Moving towards industrial application. *TIBTECH*. **10**: 208-217
- Figurski D. H., and Helinski D. R., 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **76**(4): 1648-52
- Fuqua C., Winans C. S., and Greenberg E. P. 1996. CENSUS AND CONSENSUS IN BACTERIAL ECOSYSTEMS: The LuxR-LuxI Family of Quorum-Sensing Transcriptional Regulators. *Annu. Rev. Microbiol*. **50**: 727-751
- Fuqua C., and Greenberg E. P. 1998. Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. *Curr Opin Microbiol*. **1**(2): 183-189
- Gambello M. J., and Iglewski B. H. 1991. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriol*. **173**(9): 3000-3009
- Gambello M. J., Kaye S., and Iglewski B. H. 1993. LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infect Immun*. **61**(4): 1180-1184.
- George R. H. 1987. *Pseudomonas* infection in cystic fibrosis. *Arch Dis Child*. **62**(5): 438-439
- Giani C, Wullbrandt D, Robert R, Meiwes J. (1997) *Pseudomonas aeruginosa* and its use in a process for the biotechnological preparation of L-rhamnose. US patent 5,658,793 (Hoechst AG Frankfurt)

- Glaser L. and Kornfeld S. 1961. The enzymatic synthesis of thymidine-linked sugar. *J. Biol. Chem.* **263**(6): 1975-1999
- Glaser L. 1963. Biosynthesis of Deoxysugars. *Physiological reviews.* **43**(2): 215-242
- Govan J. R., and Deretic V. 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev.* **60**(3): 539-574
- Hancock, R. E. W., and Carey A. M. 1979. Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: heat- and 2-mercaptoethanol-modifiable proteins. *J. Bacteriol* **140**: 902-910
- Hauser G., and Karnovsky M. L. 1954. Studies on the production of glycolipide by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **68**: 645-654
- Hauser G., and Karnovsky M. L. 1956. Rhamnose and rhamnolipide biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem.* **224**: 91-105
- Hauser G., and Karnovsky L.M. 1958. Studies on biosynthesis of L-rhamnose. *J Biol Chem.* **233**: 287-291
- Itoh, S., Honda H., Tomita F, and Suzuki T. 1971. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on *n*-paraffin. *J Antibiotics* **24**: 855-859
- Jarvis F. G., and Jhonson J. M. 1949. A glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Am Chem Soc* **71**: 4124-4126
- Jensen K. F. 1993., The *Escherichia coli* K12 "wild types" W3110 and MG1655 have an *rph* frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low *pyrE* expression levels. *J. Bacteriology.* **175**: 3401-3407
- Jiang X. M., Neal B., Santiago F., Lee S. J., Romana L. K., and Reeves P. R. 1991. Structure and sequence of the *rfb* (O antigen) gene cluster of *Salmonella serovar typhimurium* (strain LT2). *Mol Microbiol.* **5**(3): 695-713
- Klena D. J., and Schnaitman A. C. 1993. Function of the *rfb* gene cluster and the *rfe* gene in the synthesis of O antigen by *Shigella dysenteriae* 1. *Mol Microbiol.* **9**(2): 393-402
- Koch K. A., Kappeli O., Fiechter A., and Reiser J. 1991. Hydrocarbon Assimilation and Biosurfactant Production in *Pseudomonas aeruginosa* Mutants. *J Bacteriol.* **173**(13): 4212-4219
- Köhler Thilo, Lasta Kocjancic Curty, Francisco Barja, Christian Van Delden and Jean-Claude Pechère. 2000. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol.* **182**: 5990-5996

- Koplin R., Wang G., Hotte B., Priefer U. B., Puhler A. 1993. A 3.9-kb DNA region of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* that is necessary for lipopolysaccharide production encodes a set of enzymes involved in the synthesis of dTDP-rhamnose. *J Bacteriol.* **175**(24): 7786-92
- Kosaric Naim. BIOSURFACTANTS: Productions, Properties, Application, Surfactant Science Series vol. 48. Primera edición. Marcel Dekker, Inc. New York.1993. pp: 65-97
- Lang S.and Wullbrant D. 1999. Rhamnose lipids - biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* **51**: 22-32
- Lam C. Y. M., McGroarty J. E., Kropinski M. A., MacDonald A. L., Pedersen S. S., Hoiby N., and Lam S. J. 1989. Occurrence of a common lipopolysaccharide antigen in standard and clinical strain of *Pseudomonasa eruginosa*. *J Clin Microbiol.* **27**: 962-967.
- Langenbach S., Rehm A.H.Bernd, and Steinbüchel A. 1997. Funtional expression of the PHA synthase gene *phaC1* from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* results in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. *FEMS Microbiology Letters.* **150**(2): 303-309
- Latifi A., Winson K. M., Foglino M., Bycroft W. B., Stewart B.A.S. Gordon., Lazdunski A., and Williams P. 1995. Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Molecular Microbiology.* **17**(2): 333-343
- Latifi A., Foglino M., Tanaka K., Williams P., and Lazdunski A. 1996. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Molecular Microbiology.* **21**(6): 1137-1146
- Le Borgne S., Palmeros B., Valle F., Bolivar F., and Gosset G. 1998. pBRINT-Ts: a plasmid family with a temperature-sensitive replicon, designed for chromosomal integration into the *lacZ* gene of *Escherichia coli*. *Gene.* **223**: 213-219
- Le Borgne S., Palmeros B., Bolivar F., and Gosset G. 2001. Improvement of the pBRINT-Ts plasmid family to obtain marker-free chromosomal insertion of cloned DNA in *E. coli*. *Biotechniques.* **30**(2): 252-254
- Leenhouts J. M., van den Wijngaard P. W., de Kroon A. I., and de Kruijff B. 1995. Anionic phospholipids can mediate membrane insertion of the anionic part of a bound peptide. *FEBS Lett.* **370**(3): 189-192
- Linhardt R. J., Bakhit R., Daniels L., Mayerl. F., Pickenhagen W. 1989. Microbially produced rhamnolipid as a source of rhamnose. *Biotechnol Bioeng.* **33**: 365-368
- Lowry O., Rosebrough N., Farr A. and Randall R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

- Macpherson F. D., Manning A. P., and Morona R., 1995. Genetic analysis of the *rfbX* gene of *Shigella flexneri*. *Gene*. **155**(1): 9-17
- Maier M. R. and Soberón-Chávez G. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. **54**: 625-633
- Manresa M. A., Bastida J., Mercadé M. E., Robert M., Andrés J de., Espuny M. J., Guinea J. 1991. Kinetic studies on surfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *J Ind Microbiol* **8**: 133-136
- Manso Pajarron A., De Koster C. G., Heerma W., Schmidt M., and Haverkamp J. 1993. Estructure identificación of natural rhamnolipids mixtures by fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Glycoconj J*. **10** (3): 219-226
- Marolda C. L., and Valvano M. A. 1995. Genetic analysis of the dTDP-rhamnose biosynthesis region of the *Escherichia coli* VW187 (O7:K1) *rfb* gene cluster: identification of functional homologs of *rfbB* and *rfbA* in the *rff* cluster and correct location of the *rffE* gene. *J Bacteriol*. **177**(19): 5539-5546
- Marumo K., Lindqvist L., Verma N., Weintraub A., Reeves P. R., and Lindberg A. A. 1992. Enzymatic synthesis and isolation of thymidine diphosphate-6-deoxy-D-xylo-4-hexulose and thymidine diphosphate-L-rhamnose. Production using cloned gene products and separation by HPLC. *Eur J Biochem*. **204**(2): 539-545
- Matsufuji M., Nakata K., and Yoshimoto A. 1997. High production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* growing on ethanol. *Biotechnol Lett* **19**: 1213-1215
- Matsumaya T., Sogawa M, and Yano I. 1987. Direct colony thin-layer Chromatography and rapid characterization of *Serratia marcescens* mutants defective in production of wetting agents. *Appl. Environ. Microbiol*. **53**: 1186-1188.
- May T. B., and Chakrabarty A. M. 1994. *Pseudomonas aeruginosa*: genes and enzymes of alginate synthesis. *Trends Microbiol*. **2**(5): 151-157
- Melo A., and Glaser L. 1966. Nucleotide diphosphate hexose pyrophosphatases. *Biochem Biophys Res Commun*. **22**(5):524-531.
- Mercadé M. E., and Manresa M. A. 1994. The use of agroindustrial by products for biosurfactants production. *J Am Oil Chem Soc*. **71**: 61-64
- Miao F., and Kompala D. S. 1992. Overexpression of cloned genes using recombinant *Escherichia coli* regulated by T7 promoter. 1. Batch cultures and kinetic modeling. *Biotechnol. Bioeng* **40**. 787.796

- Moralejo P., Egan S. M., Hidalgo E., and Aguilar J. 1993. Sequencing and characterization of a gene cluster encoding the enzymes for L-rhamnose metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **75**(17): 5585-5594.
- Ochsner A.U., Koch K. A., Fiechter A., and Reiser J. 1994a. Isolation and Characterization of a Regulatory Gene Affecting Rhamnolipid Biosurfactant Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **176**(7): 2044-2054
- Ochsner A. U., Fiechter A., and Reiser J. 1994b. Isolation, Characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlAB* Genes Encoding a Rhamnosyltransferase Involved in Rhamnolipid Biosurfactant Synthesis. *J. Biol. Chem.* **269**(31): 19787-19795
- Ochsner A. U., and Reiser J. 1995. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactants synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad.* **92**: 6424-6428
- Ochsner A. U., Reiser J., Fiechter A., and Witholt B. 1995. Production of *Pseudomonas aeruginosa* Rhamnolipid Biosurfactants in Heterologous Host. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(9): 5303-3506
- Olvera C., Goldberg B. J., Sánchez R., and Soberón-Chávez G. 1999. The *Pseudomonas aeruginosa* *algC* gene product participates in rhamnolipid biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett.* **179**: 85-90
- Olvera C. 2000. Biosíntesis de la dTDP-L-ramnosa y su regulación genética en *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos. México.
- Osman M., Ishigami Y., Someya J., and Jensen H. B. 1996 The bioconversion of ethanol to biosurfactants and dye by a novel coproduction technique. *J Am Oil Chem Soc* **73**: 851-856
- Pace, N. R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science.* **276**: 139-144
- Parra J. L., Pastor J., Comelles F., Manresa M. A., and Bosch M. P. 1990. Studies of biosurfactants obtained from olive oil. *Tenside Surf Det* **27**: 302-306
- Pearson J. P., Gray K. M., Passador L., Tucker K. D., Eberhard A., Iglewski B. H., and Greenberg E. P. 1994. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc Natl Acad Sci.* **91**(1): 197-201
- Pearson P. J., Passador L., Iglewski H. B., and Greenberg E. P. 1995. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci.* **92**(5): 1490-1494

- Pearson P. J., Pesci C. E., and Iglewski H. B., 1997. Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* Quorum-Sensing Systems in Control of Elastase and Rhamnolipid Biosynthesis Genes. *J Bacteriol.* **179**(18): 5756-5767
- Pesci C. E., Pearson P. J., Seed C. P., and Iglewski H. B., 1997. Regulation of *las* and *rhl* Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **179**(10): 3127-3132
- Pier G. B. 1985. Pulmonary disease associated with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: current status of the host-bacterium interaction. *J Infect Dis* **151**: 575-580.
- Qi Q., Steinbuchel A., and Rehm B. H. 2000. In vitro synthesis of poly(3-hydroxydecanoate): purification and enzymatic characterization of type II polyhydroxyalkanoate synthases PhaC1 and PhaC2 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **54**(1): 37-43
- Rahim R., Lori L. Burrows, Mario A. Monteiro, Malcom B. Perry and Joseph S. Lam. 2000. Involvement of the *rml* locus in core oligosaccharide and O polysaccharide assembly in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **146**: 2803-2814
- Rahim R., Ochsner A. U., Olvera C., Graninger M., Messner P., Lam S. J., and Soberón-Chávez G. 2001. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Molecular Microbiology.* **40**(3): 708-718
- Rehm H. Bernd, Krüger N., and Steinbüchel A., 1998. A New Metabolic Link between Fatty Acid *de Novo* Synthesis and Polyhydroxyalkanoic Acid Synthesis. *The Journal of Biological Chemistry.* **273**(37): 24044-24051
- Rehm H. Bernd and Steinbuchel A. 1999. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *Int J Biol Macromol.* **25**(1-3): 3-19
- Rehm H. Bernd, Mitsky T. A., and Steinbuchel A. 2001. Role of fatty acid *de novo* biosynthesis in polyhydroxyalkanoic acid (PHA) and rhamnolipid synthesis by *pseudomonads*: establishment of the transacylase (PhaG)-mediated pathway for PHA biosynthesis in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* **67**(7): 3102-3109
- Rendell N. B., Taylor G. W., Somerville M., Todd H., Wilson R., and Cole P. J. 1990. Characterization of *Pseudomonas* rhamnolipids. *Biochim Biophys Acta.* **1045**(2): 189-193
- Rivera M., Bryan E. L., Hancock W. E. R., and McGroarty J. E. 1988. Heterogeneity of lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of lipopolysaccharide chain length. *J Bacteriol.* **170**: 512-521
- Roberto M., Mercadé M. E., Bosch M. P., Parra J L., Espuny M. J., Manresa M. A., and Guinea J., 1989. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 *Biotechnol Lett* **11**: 871-874

- Rocchetta L. H., Pacan C. J., and Lam S. J. 1998. Synthesis of the A-band polysaccharide sugar D-rhamnose requires Rmd and WbpW: identification of multiple AlgA homologues, WbpW and ORF488, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*. **29**: 0-16
- Rocchetta L. H., Burrows L.L., and Lam S. J., 1999. Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev*. **63**(3): 523-53
- Rosenberg E. and Ron Z. E. 1999. High- and low-molecular-mass microbial surfactan *Appl Microbiol Biotechnol*. **52**: 154-162
- Salmond G. P., Bycroft B. W., Stewart G. S., and Williams P. 1995. The bacterial 'enigma': cracking the code of cell-cell communication. *Mol Microbiol*. **16**(4): 615-624
- Sambrook J., Fritsch E. F., and Maniatis T. 1989. Molecular cloning, A laboratory manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York., U.S.A.
- Seed C. P., Passador L., and Iglewski H. B. 1995. Activation of the *Pseudomonas aeruginosa lasI* Gene by LasR and the *Pseudomonas* Autoinducer PAI: an Autoinduction Regulatory Hierarchy. *J Bacteriol*. **177**(3): 654-659
- Suzuki T., and Itoh. 1972. Verfahren zur biotechnischen Herstellung rhamnosehaltiger Glycolipide. Deutsches Patent 2 150 375 (Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd, Tokio)
- Sim L., Ward O. P., and Li Z. Y. 1997 Production and characterisation of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. *J Ind Microbiol Biotechnol* **19**: 232-238
- Syldatk C., Lang S., Wagner F., Wray V., and Witte L. 1985a. Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas* spec. DSM 2874 grown on n-alkanes. *Z Naturforsch*. **40**: 51-60
- Syldatk C., Lang S., U., Matulovic U., and Wagner F. 1985b. Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* species. DSM 2874. *Z Naturforsch*. **40** (1-2): 61-67
- Sttover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Miizoguchi, P. Warrenner, M. J. Hickey, f. S. L. Brinkman, W, O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman,, Y. Yuan, I. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K.-S. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. W. Hancock, S. Lory, & M. V. Olson. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. **406**: 959-964
- Sung-Chyr Lin. 1996. Biosurfactants: Recent advances. *J. Chem. Tech. Biotechnol*. **66**: 109-120
- Toder D. S., Gambello M. J., and Iglewski B. H., 1991. *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase under the transcriptional control of lasR. *Mol Microbiol*. **5**(8): 2003-2010

Toder D. S., Ferrell S. J., Nezezon J. L., Rust L., and Iglewski B. H. 1994. *lasA* and *lasB* genes of *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of transcription and gene product activity. *Infect Immun.* **62**(4): 1320-1327

Van Delden Christian and Iglewski H. B., 1998. Cell-to-Cell Signaling and *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Emerging Infectious Diseases.* **4**: 551-560

Wagner F., Behrendt U., Bock H., Kretschmer A., Lang S., and Syldatk C. 1983. Production and chemical characterization of surfactants from *Rhodococcus erythropolis* and *Pseudomonas sp.* MUB grown on hydrocarbons. In Zajic JE, Cooper DG, Jack TR Kosaric N (eds) *Microbial enhanced oil recovery.* Penn Well Books, Tulsa, Okla, pp 55-60

Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**: 221-271

Yamaguchi M., Sato A., and Yukuyama A. 1976. Microbial production of sugar-lipids. *Chem Ind.* **4**: 741-742

Yanisch-Perron C., Vieira J., and Messing J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* **33**(1): 103-19

Zhang Y., and Miller M. R. 1992. Enhanced Octadecane Dispersion and Biodegradation by a *Pseudomonas* Rhamnolipid Surfactant (Biosurfactant). *Appl Environ Microbiol.* **58**(10): 3276-3282

Zhang L., al-Hendy A., Toivanen P., and Skurnik M., 1993. Genetic organization and sequence of the *rfb* gene cluster of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3: similarities to the dTDP-L-rhamnose biosynthesis pathway of *Salmonella* and to the bacterial polysaccharide transport systems. *Mol Microbiol.* **9**(2): 309-321