



Universidad de
Oviedo



Universidad de Oviedo
Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

Máster en Biomedicina y Oncología Molecular

***Desarrollo de plataformas bacterianas
para la biosíntesis de polifenoles***

Ignacio Gutiérrez del Río Menéndez

Julio 2015

**Departamento de Biología Funcional
(Área de Microbiología)**

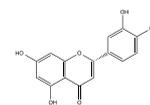
Trabajo Fin de Máster

Índice

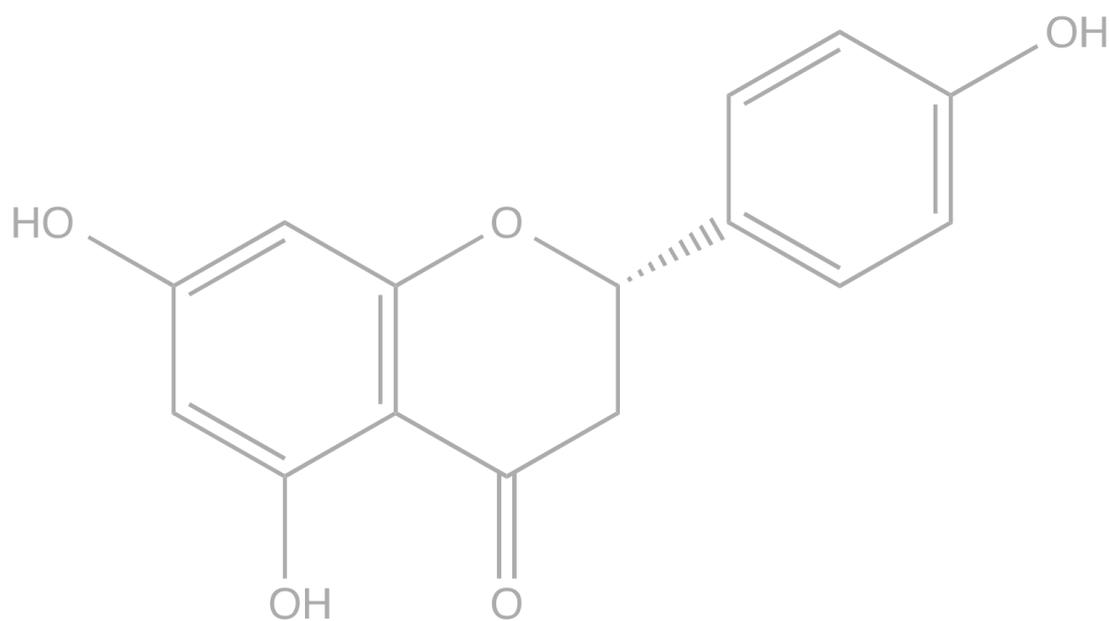
Resumen	2
1. Introducción	3
1.1 Nutracéuticos	4
1.2 Fitoquímicos	6
1.2.1 Polifenoles y su clasificación.....	7
1.3 Flavonoides	7
1.3.1 Flavonas.....	9
1.3.2 Flavanonas.....	10
1.4 Metabolismo de los flavonoides en humanos	12
1.5 Actividades biológicas de los flavonoides	12
1.6 Biosíntesis de flavonoides en plantas (flavonas y flavanonas)	13
1.7 Biosíntesis de flavonoides en microorganismos	14
1.7.1 Biosíntesis en procariotas.....	16
1.7.2 Biosíntesis en eucariotas.....	17
1.7 Streptomyces como factorías celulares	20
1.7.1 Ciclo de vida.....	20
2. Objetivos	22
3. Material y métodos	23
3.1 Cepas bacterianas y plásmidos	24
3.2 Medios de cultivo	26
3.3 Condiciones de cultivo de <i>Escherichia coli</i> y <i>Streptomyces albus</i>	26
3.4 Antibióticos de selección	27
3.5 Obtención y manipulación <i>in vitro</i> del ADN	27
3.5.1 Digestiones enzimáticas.....	28
3.5.2 Electroforesis de ADN en gel de agarosa.....	28
3.5.3 Purificación de fragmentos de ADN.....	28
3.5.4 Ligación del ADN.....	29
3.5.5 Producción de células competentes de <i>E. coli</i>	29
3.5.6 Producción de células electro-competentes de <i>E. coli</i>	29
3.5.7 Transformación en cepas competentes de <i>E. coli</i>	29
3.5.8 Transformación en cepas electro-competentes de <i>E. coli</i>	30
3.5.9 Minipreparaciones de ADN plasmídico a partir de <i>E. coli</i>	30
3.5.10 Secuenciación de ADN y análisis de las secuencias.....	30
3.6 Preparación y transformación de protoplastos de <i>S. albus</i>	30
3.7 Esporulación de <i>S. albus</i>	31
3.8 Cuantificación de esporas	31
3.9 Producción de flavonoides en cepas recombinantes de <i>S. albus</i>	31
3.10 Extracción de flavonoides desde cepas recombinantes de <i>S. albus</i>	32
3.11 Cromatografía de HPLC-MS	32
4. Resultados y discusión	33
4.1 Elección del microorganismo hospedador	34
4.2 Diseño de los cassetes génicos	34
4.3 Generación de cepas productoras de la flavanona naringenina	36
4.4 Generación de cepas productoras de la flavona apigenina	39
4.5 Generación de cepas productoras de la flavanona eriodictyol	43
4.6 Generación de cepas productoras de la flavona luteolina	47
5. Conclusiones	50
6. Agradecimientos	51
7. Bibliografía	52
ANEXO	I

Resumen

Los flavonoides son un grupo mayoritario de polifenoles integrado por 6000 compuestos diferentes ampliamente distribuidos en la dieta debido a su presencia ubicua en plantas. A pesar de que no son nutrientes esenciales para la vida, generan efectos beneficiosos para la salud realizando una importante función en la quimiopreención de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo como son el cáncer o las enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas. El creciente interés por estos compuestos ha aumentado de forma importante su demanda, frente a la cual no se puede responder con la ineficiente extracción a partir de vegetales ni con la cara síntesis química, es por esto que el uso de microorganismos como huéspedes para la producción heteróloga de estos compuestos sea una alternativa efectiva. Hasta entonces, la mayoría de los grupos han utilizado a *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* como huéspedes modelo, pero son pocos los que se han centrado en el potencial de *Streptomyces* para la producción heteróloga de polifenoles. Mediante el diseño de cassettes génicos codificados en plásmidos replicativos bifuncionales se ha logrado demostrar mediante cromatografía de HPLC-MS la biosíntesis *de novo* de las flavonas apigenina y luteolina, y las flavanonas naringenina y eriodictyol en *S. albus*, estableciéndose de esta forma cepas recombinantes productoras de estos compuestos. Los buenos resultados abren la puerta a nuevas estrategias de ingeniería metabólica para la mejora en la eficiencia de producción.



1. INTRODUCCIÓN



1.1 Nutracéuticos

En los últimos años ha ido cobrando una creciente importancia un nuevo paradigma que se centra en los efectos positivos de la dieta, pues numerosos estudios epidemiológicos han evidenciado una clara relación entre los hábitos dietéticos y el riesgo de enfermedad, con un directo impacto de la alimentación sobre la salud a medio y largo plazo (Das *et al.*, 2012; Espín *et al.*, 2007); por ejemplo, se estima que un tercio de las muertes debidas a cáncer en los Estados Unidos (EEUU) podrían ser prevenidas mediante la modificación de los hábitos dietéticos (Liu, 2013).

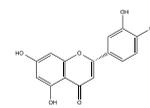
La esperanza de vida está en continuo crecimiento, y se estima que para 2025 un 10,4 % de la población mundial estará representada por personas de más de 65 años de edad (González-Sarrías *et al.*, 2013). Esto supone un importante punto a tener en cuenta, pues las edades avanzadas están asociadas con un incremento de desórdenes crónicos-degenerativos tales como enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, diabetes de tipo II y muchos tipos de cáncer. Todo esto supondrá un mayor esfuerzo por parte de la atención médica con efectos significativos sobre el campo social, económico y clínico (Das *et al.*, 2012; Espín *et al.*, 2007; González-Sarrías *et al.*, 2013). A pesar de que existe una importante componente genética responsable del comienzo de estas patologías, el estilo de vida (dieta, sedentarismo o hábito tabáquico) es también un determinante crítico en el desarrollo de estas enfermedades. Es por esto que el mercado de los alimentos y de la salud se ha visto invadido por alimentos funcionales y suplementos dietéticos, con el objetivo de contribuir al mantenimiento de la salud y la prevención de la enfermedad (González-Sarrías *et al.*, 2013).

Estudios de mercado llevados a cabo por diferentes industrias han mostrado el creciente interés de los consumidores por productos naturales beneficiosos para la salud presentes en los alimentos, y por ello se han comercializado estos compuestos bioactivos en forma de productos farmacéuticos (comprimidos, cápsulas, suspensiones, etc.) que incorporan extractos de alimentos a los cuales se les ha atribuido una directa o indirecta actividad fisiológica (Espín *et al.*, 2007). Estos productos son fármacos obtenidos a partir de alimentos, generándose por ello un concepto híbrido entre “nutrientes” y “farmacéuticos” denominado como “nutracéuticos” (Espín *et al.*, 2007; Srividya *et al.*, 2010). El término “nutracéuticos” fue introducido por primera vez por Stephen DeFelice en 1989, definiéndolo como “aquel alimento (o parte de un alimento) que realiza un efecto beneficioso sobre la salud, incluyendo la prevención y/o el tratamiento de determinadas enfermedades entre las que se engloba el cáncer” (Das *et al.*, 2012; Nasri *et al.*, 2014; Srividya *et al.*, 2010); sin embargo, la relación entre la dieta y la sa-

lud ya se sospechaba 2500 años atrás, cuando el filósofo griego Hipócrates, considerado como uno de los padres de la medicina, recogió la siguiente cita en uno de sus tratados hipocráticos: “Que la comida sea tu medicina y la medicina tu alimento” (Chauhan *et al.*, 2013; Das *et al.*, 2012). A pesar de que el uso de los nutraceuticos se remonta a etapas tempranas de la historia del hombre en forma de la medicina tradicional, sólo la evidencia médica y científica obtenida en los últimos años les ha permitido emerger como una alternativa potencialmente efectiva, y es por esto que son muchos los estudios que se están centrando en el conocimiento del potencial preventivo de ciertos compuestos presentes en alimentos frente a determinadas enfermedades (Das *et al.*, 2012). Los criterios que debe cumplir un nutraceutico son: (a) tratarse de un producto de origen natural, (b) ser aislado y purificado por métodos no desnaturalizantes, (c) ejercer una acción preventiva y/o curativa, y (d) mejorar la calidad de vida.

Los nutraceuticos se clasifican dentro del grupo de los suplementos dietéticos y son usados con el objetivo de generar beneficios sobre la salud mediante dosis que exceden las que en condiciones normales se obtendrían en la dieta (Espín *et al.*, 2007). La FDA (*Food and Drug Administration*) presenta una regulación específica para los suplementos dietéticos (nutraceuticos) diferente a la que se aplica a los alimentos o a los medicamentos; sin embargo, no existe una regulación específica en Europa que controle los nutraceuticos (Espín *et al.*, 2007; González-Sarrías *et al.*, 2013). Los nutraceuticos no deben ser confundidos con los alimentos funcionales, que son aquellos que consumidos regularmente ejercen un efecto beneficioso sobre la salud; por lo tanto, los alimentos funcionales se presentan en una matriz alimentaria, mientras que los nutraceuticos lo hacen en matrices no alimentarias en forma de diferentes formulaciones farmacéuticas (Espín *et al.*, 2007; González-Sarrías *et al.*, 2013). Los nutraceuticos pueden ser clasificados de diferentes formas, donde una de las más comunes es en función de la fuente alimentaria: (a) fibra dietética, (b) probióticos, (c) prebióticos, (d) ácidos grasos poli-insaturados, (e) vitaminas antioxidantes, y (d) polifenoles (Chauhan *et al.*, 2013; Das *et al.*, 2012).

El mercado mundial de nutraceuticos se encuentra en creciente expansión, siendo evaluado en 160,6 mil millones de dólares en 2013, con un incremento a 171,8 mil millones de dólares en 2014. En base a esta tendencia de crecimiento positivo anual estimada del 7 %, se espera que el mercado de los nutraceuticos llegue a los 241,1 mil millones de dólares en 2019 (BCC Research, 2014). Los países a la cabeza del mercado de los nutraceuticos son EEUU, Reino Unido y Japón (Das *et al.*, 2012; Nasri *et al.*, 2014).



1.2 Fitoquímicos

En base a la epidemiología nutricional y meta-análisis se estima que las dietas bajas en frutas, verduras y bebidas como el té o el vino son las responsables del 1,5-4 % de la morbilidad mundial (Bohn, 2014; González-Vallinas *et al.*, 2013; Hollman, 2014). Algo que tienen en común todos estos alimentos es que son fuentes ricas de polifenoles, los cuales se encuadran dentro de un grupo diverso de metabolitos secundarios biológicamente activos presentes en las plantas conocidos como fitoquímicos, siendo los polifenoles el grupo más representativo (Bohn, 2014; Hollman, 2014). Los fitoquímicos no son nutrientes esenciales para la vida, por lo que su ausencia en la dieta no genera estados carenciales como ocurre con micronutrientes como las vitaminas; sin embargo, realizan efectos muy positivos para la salud reduciendo el riesgo de desarrollo de varios tipos de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo como son el cáncer o las enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, es por esto que los polifenoles han ganado gran importancia en los últimos 20 años (Liu, 2013; Manach *et al.*, 2004). Estos compuestos presentan una baja actividad como compuestos bioactivos cuando son comparados con fármacos, pero si son ingeridos de forma regular y en cantidades significativas, generan un demostrable efecto fisiológico a largo plazo (Espín *et al.*, 2007).

Los fitoquímicos de la dieta se dividen de forma general en seis categorías (Figura 1): (a) polifenoles, (b) alcaloides (p. ej. cafeína), (c) compuestos que contienen nitrógeno, (d) compuestos organosulfurados (p. ej. isotiocianato), (e) fitoesteroles (p. ej. sitoesterol), y (f) carotenoides (p. ej. licopeno). Los grupos más estudiados de fitoquímicos por su efecto positivo sobre la salud humana son los polifenoles (Liu, 2013).

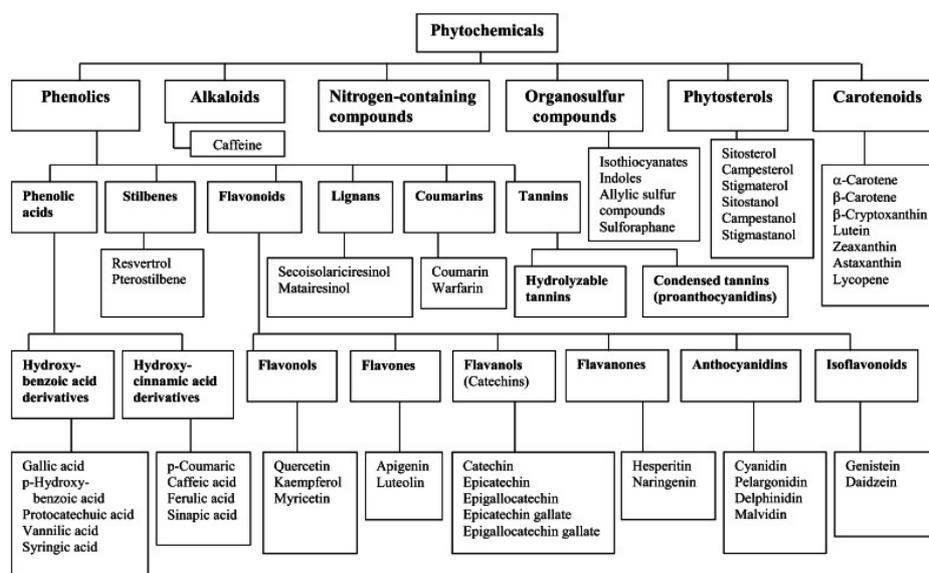


Figura 1: Clasificación de los fitoquímicos de la dieta (Liu, 2013).

1.2.1 Polifenoles y su clasificación

Los compuestos fenólicos de la dieta, o también llamados polifenoles, constituyen uno de los productos naturales más numerosos y ampliamente distribuidos en el reino vegetal, habiéndose descrito más de 10.000 compuestos fenólicos hasta la fecha en plantas superiores, donde varios cientos se encuentran en plantas comestibles (A. Li *et al.*, 2014; Manach *et al.*, 2004; Tsao, 2010).

El hecho de que sean un grupo de metabolitos secundarios con una distribución ubicua en plantas explica que realicen funciones *in planta* importantes en la defensa contra patógenos, la reparación de los daños producidos por la radiación ultravioleta y la transducción de señales (Fantini *et al.*, 2015). En las plantas, los polifenoles intervienen en el transporte de auxinas, en el desarrollo del meristemo apical del tallo y de la raíz, en la modulación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) en los tejidos, así como en la determinación del color de las flores, funcionando como un atrayente visual para los polinizadores (Falcone Ferreyra *et al.*, 2012). Por otro lado, son necesarios para la señalización de bacterias simbióticas como *Rhizobium* en leguminosas (Andersen & Markham, 2006; Weston & Mathesius, 2013). Los polifenoles no solo desempeñan funciones *in planta*, sino que pueden ser liberados al suelo mediante exudación de las raíces realizando un papel importante en la interferencia alelopática o frente a patógenos (Liu, 2013; Weston & Mathesius, 2013).

Los polifenoles comprenden una gran variedad de compuestos que comparten una estructura química característica de al menos un anillo aromático que presenta uno o más grupos hidroxilo (Fantini *et al.*, 2015). Además, a esta complejidad estructural hay que añadirle el hecho de que los polifenoles se presentan en las plantas en forma de glucósidos con diferentes azúcares unidos a posiciones del esqueleto del polifenol (Tsao, 2010).

Lo más común es clasificar los polifenoles atendiendo a su estructura química en función del número de anillos fenólicos que contienen y de los elementos estructurales que se unen a esos anillos: (a) ácidos fenólicos (p.ej ácido gálico), (b) flavonoides (p.ej quercetina), (c) estilbenos (p.ej resveratrol), (d) lignanos (p.ej secoisolariciresinol), (e) cumarinas (p.ej cumarina), y (f) taninos (p.ej proantocianidinas) (Liu, 2013; Manach *et al.*, 2004).

1.3 Flavonoides

Los flavonoides (del latín *flavus*, “amarillo”) representan el 60 % de los polifenoles de la dieta y están distribuidos de forma ubicua en plantas (González-Vallinas *et al.*, 2013). La historia de este grupo de polifenoles se remonta a 1936, cuando el fisiólogo Albert Szent-Györgyi

(Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1937) describió el efecto positivo que ejercía una molécula de la piel del limón en la prevención del sangrado capilar asociado al escorbuto (Romano *et al.*, 2013; Rusznyak & Szent-Györgyi, 1936). En aquel momento Györgyi pensó encontrarse frente a una nueva clase de vitaminas y la denominó vitamina P, pero más tarde se vio que esta sustancia era un flavonoide y se le dio el nombre de rutina (quercetina-3-rutinósido) (Chaudhuri *et al.*, 2013; Chua, 2013; Kumar & Pandey, 2007). Desde ese momento y hasta la actualidad se han descrito más de 6.000 flavonoides (Chaudhuri *et al.*, 2013).

Todos los flavonoides tienen una estructura química genérica formada por 15 átomos de carbono (C6-C3-C6) repartidos en dos anillos aromáticos (anillos A y B) conectados mediante un puente de tres carbonos que se une a un oxígeno y dos carbonos del anillo A generando un anillo heterocíclico de pirano de 6 carbonos (anillo C), lo cual forma una estructura característica de tipo fenil-benzopirano (el anillo de benzopirano también es conocido como cromano) (Figura 2A y 2B) (Fantini *et al.*, 2015; Kumar & Pandey, 2007; R. H. Liu, 2013; Ravishankar *et al.*, 2013; Verma & Pratap, 2010). Este esqueleto básico puede tener múltiples sustituyentes, se suelen añadir grupos hidroxilo en las posiciones C4', C5 y C7, así como azúcares (Crozier *et al.*, 2009). La gran mayoría de los flavonoides de la dieta se encuentran comúnmente en la naturaleza como conjugados en formas glicosiladas (se han descrito más de 80 tipos diferentes de azúcares unidos a flavonoides) así como esterificadas, aunque también pueden estar presentes en forma de aglicones, especialmente cuando el alimento vegetal ha sido cocinado o procesado (Figura 2C) (Liu, 2013).

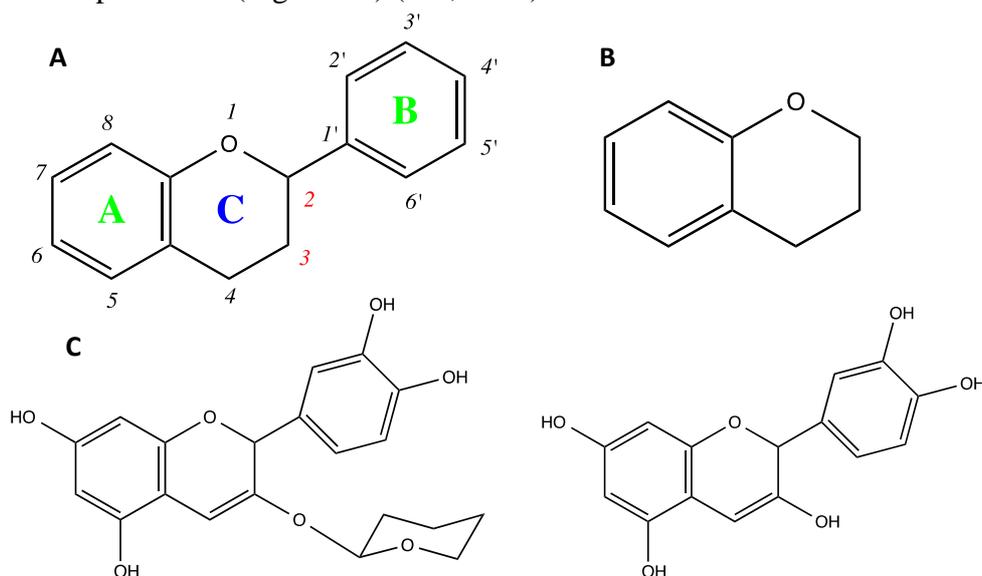


Figura 2. A. Estructura química básica de los flavonoides (aglicón). Las letras verdes (A y B) representan los anillos aromáticos y la letra azul (C) el anillo heterocíclico de pirano B. Benzopirano (cromano). C. Estructura química básica de un flavonoide glicosido (izquierda) y de un flavonoide aglicón (derecha). Modificado de Kumar & Pandey, 2007; Verma & Pratap, 2010 .

En función del patrón de hidroxilación y los sustituyentes presentes en el anillo heterocíclico C, los flavonoides pueden ser clasificados en varios sub-grupos: (a) antocianidinas (p. ej. delphinidina y pelargonidina), (b) flavan-3-oles o flavanoles (p. ej. catequina y epicatequina), (c) flavonas (p. ej. luteolina y apigenina), (d) flavanonas (p. ej. eriodictyol y naringenina), (e) flavonoles (p. ej. quercetina, kaempferol y myricetina), (f) isoflavonas (p. ej. genisteína y daidzeína) y (g) dihidroflavonoles (dihidrokaempferol) (Liu, 2013; Tsao, 2010). Los compuestos individuales dentro de una misma familia difieren en el patrón de sustituyentes de los anillos A y B (Kumar & Pandey, 2007). Mientras que en la gran mayoría de los flavonoides el anillo aromático B se une al heterociclo C en su posición C2, algunos flavonoides como las isoflavonas presentan el anillo B unido a la posición C3 del heterociclo (Tsao, 2010).

Las actividades biológicas de estos compuestos dependen tanto de las diferencias estructurales entre flavonoides como del patrón de glicosilación; por lo tanto, sus actividades son estructura-dependientes (Kumar & Pandey, 2007; Tsao, 2010).

1.3.1 Flavonas

La estructura química de las flavonas está sujeta a una multitud de modificaciones químicas, incluyendo hidroxilaciones, metilaciones, *O*- y *C*-alquilaciones, así como glicosilaciones. Aunque en plantas lo más común es que se encuentren en forma de 7-*O*-glicósidos, cereales como el trigo y el mijo o bebidas como el té rooibos contienen *C*-glicósidos de flavonas como la vitexina u orientina (Del Rio *et al.*, 2013; Fantini *et al.*, 2015; Manach *et al.*, 2004). Como ocurre con la mayoría de los flavonoides, las formas glicosiladas son hidrolizadas durante el proceso de absorción intestinal para liberar el aglicón (Pandurangan & Esa, 2014).

Las flavonas más abundantes en los alimentos de origen vegetal son la apigenina (perejil, apio, cebolla, ajo, pimiento rojo y té de camomila) así como la luteolina (chile tailandés, brócoli, hojas de la cebolla y apio) (Tabla 1). La piel de los cítricos contiene también grandes cantidades de flavonas polimetoxiladas como la tangeretina, nobilatina o sinensetina, las cuales son formas altamente hidrofóbicas (Manach *et al.*, 2004). La ingesta diaria de flavonoides varía en un amplio rango desde unos pocos cientos de miligramos hasta 650 mg/día (Liu, 2013); en el caso de la ingesta diaria de flavonas es bastante baja, del orden de 0,3 a 1,6 mg/día (Tabla 1) (Fantini *et al.*, 2015).

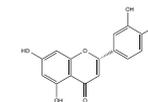
1.3.2 Flavanonas

Las flavanonas son flavonoides no-planares caracterizados por la ausencia del doble enlace entre el carbono 2 y 3 del heterociclo así como por la presencia de un centro quiral en el carbono 2 (Tabla 1). *In planta*, las flavanonas se encuentran predominantemente en el (*S*)-enantiómero con el anillo C unido al anillo B, con el C2 en la configuración α (Del Rio *et al.*, 2013).

Este grupo de flavonoides se encuentra en tomates y ciertas plantas aromáticas como la menta, pero sólo están en altas concentraciones en cítricos en forma de mono- o diglicósidos o, menos frecuentemente, en forma de aglicones libres. Los aglicones más importantes son la naringenina, la hesperetina y el eriodictyol, aunque es común que las flavanonas presenten unido al C7 un disacárido que puede ser una neohesperidosa (2-O- α -L-rhamnosil-D-glucosa) que proporciona un sabor amargo (como la naringenina en el pomelo); o bien una rutinosa (6-O- α -L-rhamnosil-D-glucosa) que no proporciona sabor alguno (Del Rio *et al.*, 2013; Fantini *et al.*, 2015; Manach *et al.*, 2004).

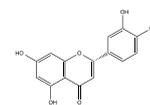
Las correspondientes formas glicosiladas se denominan neohesperidósidos como la naringina (naringenina-7-O-neohesperidosido) y neohesperidina (hesperetina-7-O-neohesperidosido); y rutinósidos como la narirutina (naringenina-7-O-rutinosido) y hesperidina (hesperetina-7-O-rutinosido). La hesperetina, naringenina, neohesperidina y naringina son abundantes en naranjas ácidas y pomelo; mientras que las principales fuentes de hesperidina, narirutina y eriodictyol son el limón, la mandarina y el pomelo (Fantini *et al.*, 2015; Manach *et al.*, 2004).

Un zumo de naranja contiene entre 200 y 600 mg/L de hesperidina y 15-85 mg/L de narirutina, por lo que un vaso de zumo contiene unos 140 mg de glicósidos de flavanonas. Sin embargo, debido a que las partes sólidas de los cítricos como el albedo y las membranas o septos que separan los segmentos tienen un alto contenido en flavanonas, la fruta al completo contiene 5 veces más flavonoides que un vaso de zumo de naranja (Manach *et al.*, 2004). El valor de ingesta diaria de flavanonas es alta en Europa (20,4-50,6 mg/día) y relativamente baja en EEUU (14,4 mg/día) (Tabla 1) (Fantini *et al.*, 2015).



Grupo de flavonoides	Esqueleto	Ejemplos	Fuente alimentaria	Ingesta diaria
Flavonas		 Luteolina Apigenina	Piel de frutas, vino tinto, alforfón, pimiento rojo, perejil, apio y piel de tomate	0,3-1,6 mg/día
Flavonoles		 Quercetina Kaempferol	Cebollas, col rizada, vino tinto, te, aceite de oliva, puerro y brócoli	6-27 mg/día
Flavanonas		 Eriodictyol Naringenina	Cítricos (naranja, limón y pomelo)	14,4-50,6 mg/día
Antocianidinas		 Delfinidina Pelargonidina	Bayas, cerezas, uvas rojas, grosellas, berenjena, rábanos, vino tinto, naranja roja, arroz, cebollas rojas y repollo	180-215 mg/día
Flavan-3-oles		 Catequina Epicatequina	Vino tinto, té verde, cacao y albaricoque	12-189,2 mg/día
Isoflavonas		 Genisteína Daidzeína	Soja y sus derivados (leche de soja)	1,2-300 mg/día

Tabla 1. Estructura química de las diferentes familias de flavonoides y fuentes alimentarias. Modificado de Del Rio et al., 2013; Kumar & Pandey, 2007 .



1.4 Metabolismo de los flavonoides en humanos

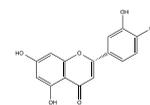
La absorción de los flavonoides de la dieta liberados de los alimentos mediante el masticado depende de si se encuentran en forma de aglicón o de glicósido. La mayoría de los flavonoides, a excepción de la subclase de las catequinas, están presentes en plantas en forma de glicósidos y para ser absorbidos deben ser convertidos previamente en el aglicón correspondiente; los aglicones pueden ya ser absorbidos directamente en el intestino delgado (Bohn, 2014; D'Archivio *et al.*, 2010; Marín *et al.*, 2015).

Algunos flavonoides glicosilados pueden atravesar el intestino delgado mediante cotransportadores de glucosa Na^+ -dependientes (SGLT1), otros glicósidos son hidrolizados por β -glicosidasas del borde en cepillo del epitelio del intestino delgado, liberándose el aglicón. Sin embargo, no todos los glicósidos son sustrato de estas enzimas, y en este caso deben viajar al colon donde la microbiota bacteriana se encarga de hidrolizarlos en aglicones que son absorbidos, pero la capacidad de absorción del intestino grueso es altamente ineficiente (Kumar & Pandey, 2007). Una vez en sangre, los aglicones viajan por la vía porta-hepática al hígado donde son conjugados con proteínas, y entran en células diana mediante diversos mecanismos de transporte no del todo conocidos pero que se cree que son similares a los que ocurren en los enterocitos (Bohn, 2014). En función del grado de polaridad, los flavonoides serán excretados por la orina o en las heces mediante excreción biliar (Bohn, 2014; Manach *et al.*, 2004).

1.5 Actividades biológicas de los flavonoides

Los flavonoides han suscitado un gran interés en los últimos años debido al amplio espectro de actividades biológicas que presentan, ya que intervienen en la modulación de diversas actividades enzimáticas, la inhibición de la proliferación celular, la actividad antiinflamatoria, y actividades antivirales o antibacterianas, pero el punto donde se centra el interés es en su capacidad antioxidante. Los daños causados por el estrés oxidativo tienen un efecto negativo sobre la salud, ya que generan un ambiente que favorece la aparición de mutaciones, contribuyen al envejecimiento celular, son un punto clave en el desarrollo carcinogénico y oxidan las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Por lo tanto, la capacidad antioxidante de estos polifenoles funciona como llave maestra en la prevención de numerosas enfermedades asociadas a daño oxidativo como las cardiovasculares, neurodegenerativas y el cáncer (Hollman, 2014; Ravishankar *et al.*, 2013).

La gran diversidad estructural que presentan los flavonoides ha hecho que sean una rica fuente de nuevos componentes con propiedades anti-carcinogénicas, y es que la capacidad *in vitro*



de ciertos flavonoides para producir un bloqueo del ciclo celular, inducir apoptosis, alterar la formación del huso mitótico o inhibir la angiogénesis los ha hecho emerger como prometedores agentes en la lucha contra el cáncer; de hecho, la quercetina o la genisteína han llegado a fases finales de ensayos clínicos por varias indicaciones oncológicas, especialmente como coterapia junto con la quimioterapia. A nivel molecular, los flavonoides son capaces de modular proteín-quinasas o receptores de factores de crecimiento como EGFRs o VEGFRs (Ravishankar *et al.*, 2013). Sin embargo, la gran mayoría de los estudios que muestran estos efectos son ensayos *in vitro*, que requieren de concentraciones elevadas de compuesto que serían difíciles de alcanzar *in vivo*, dada la baja biodisponibilidad de los flavonoides, para lo cual se están buscando soluciones como el desarrollo de nuevas formulaciones basadas, por ejemplo, en nanopartículas (Khushnud & Mousa, 2013; Wang *et al.*, 2013). De todas formas, el efecto mejor demostrado de estos polifenoles es su capacidad quimiopreventiva a largo plazo, que queda bien evidenciada en estudios epidemiológicos que establecen una relación entre las dietas ricas en frutas y verduras y la incidencia de determinados tipos de enfermedades, acción que se debe a su capacidad para mantener a raya las especies reactivas de oxígeno (Li *et al.*, 2014; Petrick *et al.*, 2015; Sporn & Liby, 2005).

1.6 Biosíntesis de flavonoides en plantas (flavonas y flavanonas)

Los flavonoides son sintetizados *in planta* mediante la vía fenilpropanoide, una vía del metabolismo secundario de las plantas ampliamente conocida, transformando la L-fenilalanina procedente de la ruta del ácido shikímico en 4-cumaroil-CoA, que finalmente entra en la vía de biosíntesis de flavonoides (Figura 3) (Falcone Ferreyra *et al.*, 2012). Los tres primeros pasos comunes en la ruta de los fenilpropanoides son catalizados por la fenilalanina amonio liasa (PAL), 4-cinamato hidroxilasa (4CH) y 4-cumaroil CoA ligasa (4CL) (Figura 3). El enzima PAL cataliza la desaminación de la fenilalanina hacia ácido 4-cinámico, el cual es el sustrato de la 4CH que cataliza su hidroxilación hacia ácido 4-cumárico, y la 4CL conjuga al ácido 4-cumárico la CoA-SH, que interacciona con el carboxilo del ácido, formando 4-cumaroil-CoA. En algunas plantas y microorganismos, la tirosina amonio liasa (TAL) puede catalizar la conversión de tirosina directamente a 4-cumaroil-CoA. El primer paso limitante en la biosíntesis de flavonoides es la condensación de una molécula de 4-cumaroil-CoA con tres moléculas de malonil-CoA, que son usadas como unidades de extensión para generar la chalcona de naringenina, reacción catalizada por el primer enzima específico de la ruta de los flavonoides, que es la chalcona sintasa (CHS) que añade las tres moléculas mediante reacciones secuenciales de descarboxilación y condensación, generando el esqueleto a partir de los

cuales derivan todos los flavonoides (Falcone Ferreyra *et al.*, 2012; Joo *et al.*, 2014; Tsao, 2010; Y. Wang *et al.*, 2011). En los siguientes pasos, la gran diversidad es generada mediante la acción de enzimas secuenciales que decoran este esqueleto base (Trantas *et al.*, 2015).

El cierre del heterociclo es catalizado por la chalcona isomerasa (CHI) que genera el intermedio naringenina. Esta flavanona es a su vez precursor de flavonas como la apigenina o la luteolina, así como de la flavanona eriodictyol. Para generar apigenina se requiere de la actividad de la flavona sintasa (FNS) y sobre este compuesto actúa posteriormente la flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H) para generar luteolina. Por otro lado, la naringenina es sustrato de la F3'H para generar luteolina. Por otro lado, la naringenina es sustrato de la F3'H para generar como producto eriodictyol sin ser necesaria la actividad de la FNS (Figura 3) (Crozier *et al.*, 2009).

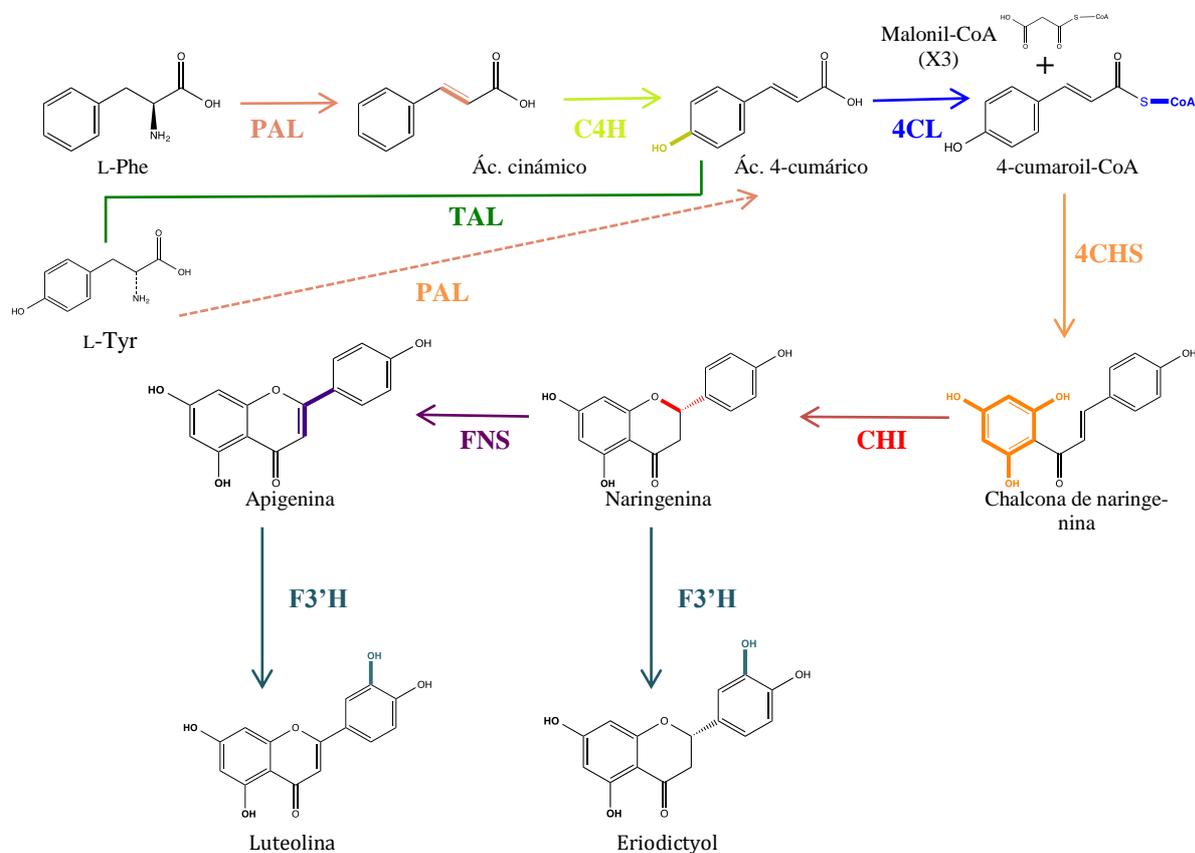
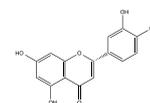


Figura 3. Ruta de biosíntesis de flavonas y flavanonas en plantas. En verde se muestra la ruta alternativa mediada por el enzima TAL presente en algunas plantas que usa como sustrato L-Tirosina evitando la actividad C4H. La flecha discontinua naranja trata de representar la menor afinidad que presenta el enzima PAL por la L-Tirosina como sustrato. Modificado de Crozier *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2014 .

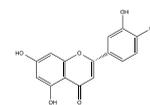
1.7 Biosíntesis de flavonoides en microorganismos

Los metabolitos secundarios producidos por plantas poseen diversas actividades biológicas y esto hace que sean una fuente extraordinariamente rica de valiosos compuestos para su uso en la industria farmacéutica, química y nutracéutica. Sin embargo, mientras que el 50 % de las



moléculas usadas en la industria farmacéutica presentan un origen vegetal natural (Liu & Wang, 2008; Newman & Cragg, 2012), existe un impedimento general en términos de aplicación industrial de muchos productos naturales prometedores debido a las limitadas cantidades que se pueden obtener directamente de las plantas. Una solución efectiva es la síntesis química, pero al tratarse de metabolitos con complejas estructuras químicas, su producción es impracticable en términos económicos en la mayoría de los casos. Por lo tanto, una alternativa muy atractiva sería expresar vías génicas biosintéticas de plantas en huéspedes microbianos mediante biosíntesis combinatoria donde genes procedentes de diferentes organismos son agrupados en un agrupamiento génico artificial dirigido a la producción del compuesto bioactivo natural (Falcone Ferreyra *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2014; Trantas *et al.*, 2015). Microorganismos comúnmente utilizados son *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, sobre los que a su vez se aplican técnicas de mejora genética para incrementar la producción de estos metabolitos generando cantidades económicamente favorables. La biosíntesis microbiana ofrece una gran cantidad de ventajas sobre el resto de alternativas debido al rápido crecimiento de los microorganismos en comparación con las plantas, su facilidad de manipulación genética, y el buen conocimiento de herramientas de ingeniería genética. A esto se le une el hecho de que la producción microbiana es más respetuosa con el medio ambiente que la síntesis química. Sin embargo, la reconstrucción funcional de vías biosintéticas de vegetales en microorganismos y su aplicación a nivel industrial es aún un campo emergente sometido a una profusa investigación (Song *et al.*, 2014).

El diseño de vías altamente optimizadas para la producción de flavonoides de forma barata y segura es el primer paso para la reconstrucción apropiada de vías sintéticas en microorganismos. La ingente cantidad de información genómica generada mediante la secuenciación masiva ofrece importantes posibilidades para el desarrollo de rutas biosintéticas (Santos *et al.*, 2011). Desde el año 2003, los investigadores han centrado su atención en la producción microbiana de flavonoides, sobre todo en procedimientos *de novo* sin la necesidad de añadir al medio de cultivo precursores directos de los compuestos a generar (Y. Wang *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2014). Estos avances se han conseguido con la construcción de rutas de biosíntesis heterólogas compuestas por las enzimas: fenilalanina/tirosina amonio liasa (PAL/TAL), 4-cumaroil-CoA ligasa (4CL), chalcona sintasa (CHS), chalcona isomerasa (CHI), flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H), y flavona sintasa (FNS).



1.7.1 Biosíntesis en procariotas

E. coli fue el primer huésped utilizado en el año 2003 para la biosíntesis de flavonoides mediante la expresión heteróloga de un agrupamiento génico artificial formado por los enzimas PAL de *Rhodotorula rubra*, 4CL del actinomiceto *S. coelicolor* y CHS de *Glycyrrhiza echinata*, el cual dirigió la síntesis de las flavanonas naringenina y pinocembrina utilizando como precursor L-fenilalanina o L-tirosina con menor afinidad (Hwang *et al.*, 2003; Kaneko, Ohnishi, & Horinouchi, 2003). El paso de las chalconas hacia las flavanonas ocurría de forma espontánea cuando se incrementaba el pH, pero posteriormente se logró mediante la adición del gen *CHI* de *Pueraria lobata* (Miyahisa *et al.*, 2005). El enzima PAL de *R. rubra* es capaz de convertir tanto L-fenilalanina como L-tirosina en ácido cinámico y ácido 4-cumárico respectivamente, no siendo necesario en este último caso la actividad C4H para generar naringenina (Figura 3, flecha naranja discontinua); además la 4CL descrita por Kaneko *et al.* (2003) era capaz de ligar CoA al ácido cinámico para generar de esta forma chalcona de pinocembrina cuando se usaba como precursor L-fenilalanina. Por lo tanto, la cierta inespecificidad por su sustrato de la PAL unido a la actividad de la 4CL, permitió generar naringenina y pinocembrina respectivamente sin ser necesaria la actividad C4H, la cual en plantas es una citocromo P450 hidroxilasa unida a la membrana del retículo endoplasmático, que requiere además de un sistema específico de transferencia de electrones para ser activa en bacterias (Du *et al.*, 2010). Estas dos razones explican que su uso sea limitado en bacterias (Song *et al.*, 2014). De todas formas, puesto que la PAL usaba L-tirosina con menos afinidad y la 4CL era poco eficiente usando ácido cinámico como sustrato, la producción de flavanonas era muy limitada.

Un año más tarde, el descubrimiento del enzima TAL de *Rhodotorula sphaeroides* permitió la conversión directa y con mayor afinidad de L-tirosina en ácido 4-cumárico sin ser necesaria la expresión de la C4H, lo cual permitió obtener altos niveles de naringenina (Watts *et al.*, 2004). Una vez superado el reto de la C4H, el siguiente problema que se presenta a la hora de producir en *E. coli* flavonoides hidroxilados como el eriodictyol es la expresión funcional de la P450 hidroxilasa F3'H que requiere estar unida a una citocromo P450 reductasa donadora de electrones (CPR) y las bacterias carecen de transportadores endógenos para soportar la total actividad catalítica de los enzimas P450 (Leonard *et al.*, 2006; Trantas *et al.*, 2015). Dos grupos han conseguido superar este problema utilizando una versión truncada de la F3'H que fue fusionada con una CPR generando así una quimera del gen. Leonard *et al.* (2006) consiguió generar eriodictyol con esta estrategia pero añadiendo naringenina como precursor, únicamente el grupo de Zhu *et al.* (2014) consiguió la síntesis *de novo* (Leonard *et al.*, 2006; Zhu *et al.*,

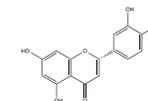
2014). Finalmente, para la generación de la apigenina se necesita de la actividad FNS, y la secuencia codificadora de este gen se obtuvo de *Petroselinum crispum*, lográndose la biosíntesis de apigenina a partir de L-tirosina, sin embargo, esta técnica no fue útil para dirigir la biosíntesis de luteolina (Tabla 3) (Miyahisa *et al.*, 2006).

Una vez que se consiguió que la cepa huésped produjera naringenina, apigenina o eriodictyol, el siguiente paso consistió en la aplicación de herramientas de ingeniería genética para aumentar los niveles intracelulares de malonil-CoA en *E. coli*, el cual es el primer paso limitante en la producción de flavonoides al requerirse tres moléculas de malonil-CoA para que la CHS genere chalcona de naringenina, lo cual se logró sobre-expresando la acetil-CoA carboxilasa (ACC) de *Photorhabdus luminescens*. Con esta estrategia se logró mejorar la producción de naringenina y eriodictyol (Leonard *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2014). Otra estrategia empleada en *E. coli* fue inhibir rutas competitivas minimizando la deriva del malonil-CoA hacia la síntesis de ácidos grasos reprimiendo a FabB y FabF (Leonard *et al.*, 2008).

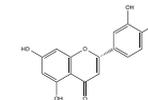
El género *Streptomyces* también se ha planteado como un hospedador potencial (Tabla 3). Se consiguió sintetizar naringenina a partir de ácido 4-cumárico en *S. venezuelae* dirigiendo la expresión de los genes codificadores de las enzimas 4CL y CHS, pero las cantidades generadas son mucho menores que las conseguidas en *E. coli* (Park *et al.*, 2009). Por otro lado, mediante el uso de codones optimizados de FNS obtenidos de *P. crispum* se consiguió generar apigenina en *S. venezuelae* cuando se añadía como precursor naringenina (Park *et al.*, 2010).

1.7.2 Biosíntesis en eucariotas

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido también ampliamente utilizada para expresar genes biosintéticos de flavonoides. La principal ventaja que presenta este microorganismo sobre el resto de huéspedes eucariotas es la presencia de un sistema de endomembranas (p. ej. retículo endoplásmico) en los cuales tanto las enzimas citocromo P450 como la 4CH están integradas con sus otras enzimas necesarias, las CPR (Ververidis *et al.*, 2007). Se ha conseguido generar en este microorganismo naringenina a partir de L-fenilalanina usando los mismo genes que son requeridos en plantas para la génesis de este producto final (*TAL*, *4CL* y *CHS*), no siendo necesario incluir en los agrupamientos génicos la secuencia génica codificante de la C4H (Tabla 2) (Jiang *et al.*, 2005).



Producto final	Huésped	Precursor	Genes	Producción (mg/L)	Referencia
Naringenina	<i>E. coli</i>	L-Tirosina y L-Fenilalanina	<i>PAL</i> (<i>Rhodotorula rubra</i>), <i>4CL</i> (<i>S. coelicolor</i>), <i>CHS</i> (<i>Glycyrrhiza echinata</i>)	0,45	(Hwang <i>et al.</i> , 2003)
	<i>E. coli</i>	Sin precursor añadido	<i>TAL</i> (<i>Rhodobacter sphaeroides</i>), <i>CHS</i> (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	20,8	(Watts <i>et al.</i> , 2004)
	<i>E. coli</i>	Glucosa	<i>TAL</i> (<i>Rhodotorula glutinis</i>), <i>4CL</i> (<i>Petroselinum crispum</i>), <i>CHS</i> (<i>Petunia hybrida</i>), <i>CHI</i> (<i>P. lobata</i>)	29	(Santos <i>et al.</i> , 2011)
	<i>S. venezuelae</i>	Ácido 4-cumárico	<i>4CL</i> (<i>S. coelicolor</i>), <i>CHS</i> (<i>A. thaliana</i>)	4	(Park <i>et al.</i> , 2009)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L-Fenilalanina	<i>PAL</i> (<i>Rhodosporidium toruloides</i>), <i>4CL</i> (<i>A. thaliana</i>), <i>CHS</i> (<i>Hypericum androsaemum</i>)	7	(Jiang <i>et al.</i> , 2005)



Apigenina	<i>E. coli</i>	L-Tirosina	<i>PAL (R. rubra), 4CL (S. coelicolor), CHS (G. echinata), CHI (P. lobata), FNSI (P. crispum), ACC (C. glutamicum)</i>	13	(Miyahisa <i>et al.</i> , 2006)
	<i>S. venezuelae</i>	Naringenina	<i>FLSI (P. crispum)</i>	1,5	(Park <i>et al.</i> , 2010)
Eriodictyol	<i>E. coli</i>	Ácido caféico	<i>4CL (P. crispum), CHS y CHI (P. hybrida), F3H (Malus domestica), FLS (A. thaliana)</i>	0,02	(Leonard <i>et al.</i> , 2006)
	<i>E. coli</i>	L-Tirosina	<i>TAL (R. rubra), 4CL (P. crispum), CHS (P. hybrida), CHI (M. sativa), F3'H-CPR (Gerbera hybrida-C. roseus)</i>	42,6	(Zhu <i>et al.</i> , 2014b)

Tabla 2. Antecedentes en la producción heteróloga de flavonas y flavanonas. Modificado de Trantas *et al.*, 2015 .

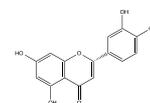
1.7 *Streptomyces* como factorías celulares

Desde un punto de vista filogenético, el género *Streptomyces*. pertenece a la familia *Actinobacteria*, y son bacterias Gram-positivas filamentosas con un cromosoma lineal (DNA) de 8 a 10 mb con un alto contenido en GC (70 %) cuando se compara con otras bacterias como *E. coli* (50 %) (de Lima Procópio *et al.*, 2012; Hwang *et al.*, 2013). Los estreptomicetos viven como saprófitos en el suelo, aunque presentan un amplio rango de otros nichos en los que pueden vivir tanto terrestres como acuáticos, e incluso algunas cepas son patógenas de plantas y animales (Flärdh & Buttner, 2009). Una de las características únicas del genoma de *Streptomyces* es la presencia de agrupamientos génicos de biosíntesis codificadores de enzimas que contribuyen a la producción de metabolitos secundarios incluyendo policétidos, péptidos no ribosomales y terpenos (Hwang *et al.*, 2013).

Desde el año 1940, las diferentes especies de *Streptomyces* han supuesto una rica fuente de fármacos que han sido incorporados a la práctica clínica, especialmente antibióticos. Se calcula que 50 % de los antibióticos de uso clínico son producidos en este género (Newman & Cragg, 2012; van Dissel *et al.*, 2014), aunque los recientes datos obtenidos mediante la secuenciación de los genomas indican que este microorganismo es capaz de producir más metabolitos secundarios de los que en un principio se pensaba, muchos de los cuales aún no han sido dilucidados (Hwang *et al.*, 2013). Sin embargo, la importancia atribuida a *Streptomyces* spp. no sólo reside en su alta tasa de producción de metabolitos codificados en su genoma, sino que también este género de estreptomicetos presenta una serie de características que lo convierte en un huésped ideal para la expresión heteróloga de diferentes tipos de compuestos, entre los que se encuentran los compuestos de origen vegetal (Park *et al.*, 2009, 2010; Vrancken & Anné, 2009). Aparte de las aplicaciones biomédicas, presentan también un gran interés ambiental, ya que se encuentran entre los microorganismos del suelo más numerosos y versátiles, realizando un papel fundamental en los ciclos biológicos de la materia orgánica (de Lima Procópio *et al.*, 2012).

1.7.1 Ciclo de vida

Streptomyces spp. presenta un ciclo de vida complejo que es muchos aspectos muy similar al de los hongos filamentosos, pues ambos crecen en forma de hifas que se ramifican generando un micelio vegetativo y se dispersan mediante esporas que se generan en estructuras reproductoras especializadas denominadas micelio aéreo, el cual emerge desde la superficie de la



colonia. La producción de antibióticos y otras moléculas bioactivas está coordinada de forma muy fina con su ciclo de desarrollo (Flärdh & Buttner, 2009).

Cuando una espora encuentra un sustrato con una condiciones y nutrientes favorables, germina y emergen uno o dos tubos germinales que crecen por extensión de la parte apical y ramificación para formar el micelio vegetativo que se abre camino en profundidad a través del sustrato. En respuesta a un agotamiento de los nutrientes, entre otras señales, se inicia una nueva diferenciación morfológica que se acompaña de la producción de metabolitos secundarios. En este momento las hifas aéreas rompen la tensión superficial alejándose del entorno del micelio vegetativo. Estas hifas aéreas comienzan a dividirse mediante un proceso de división celular altamente controlado generándose largas cadenas de compartimentos pre-espora que luego forman las gruesas paredes de las esporas unigenómicas, sintetizan pigmentos y adquieren las características de esporas maduras (Figura 4) (Flärdh & Buttner, 2009; van Dissel *et al.*, 2014).

Este ciclo de vida clásico ha sido refinado aportando nueva información sobre las fases que preceden a la formación del micelio aéreo y a la esporulación (Yagüe *et al.*, 2013). Tras la germinación de la espora se forma así un micelio compartimentalizado joven (MI) que sufre un proceso de muerte (PCD, *Programmed Cell Death*), y posteriormente los segmentos viables se diferencian en un segundo micelio multinucleado (MII), el cual crece embebido en el medio de cultivo (micelio sustrato) hasta que empieza a expresar cubiertas hidrofóbicas y pasa a crecer en el aire (micelio aéreo) finalizando con la formación de esporas (Figura 4) (Manteca *et al.*, 2007). Antes de la esporulación, se da una segunda ronda de muerte celular programada que afecta al micelio aéreo y sustrato (Miguélez *et al.*, 1999).

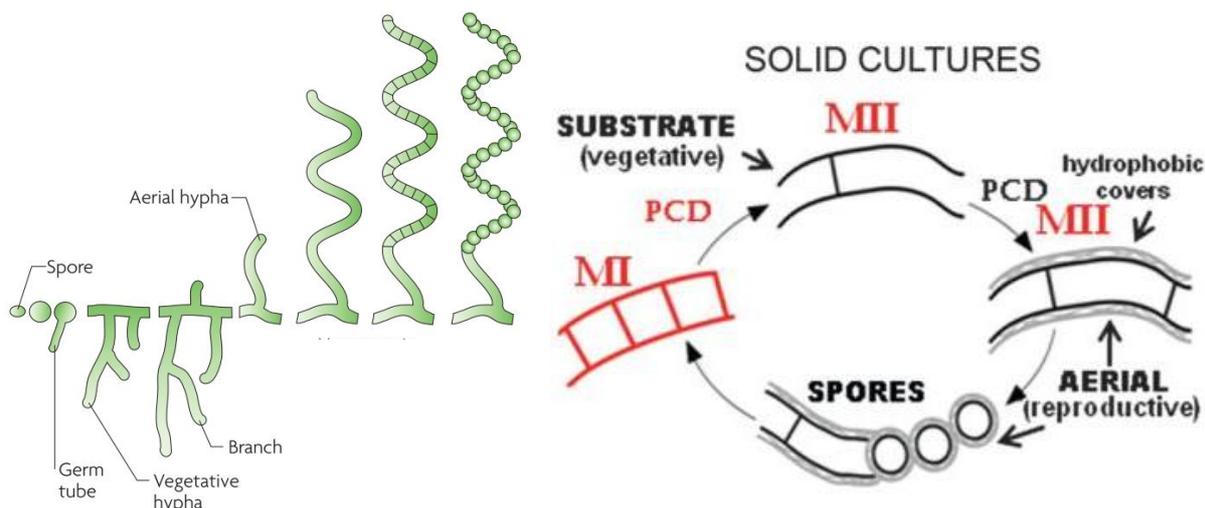
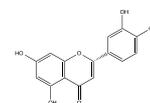


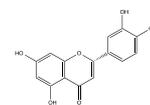
Figura 4. Visión clásica (izquierda) y reciente (derecha) del ciclo de vida de *Streptomyces* en el que se incluyen procesos de muerte celular (Flärdh & Buttner, 2009; Yagüe *et al.*, 2013).



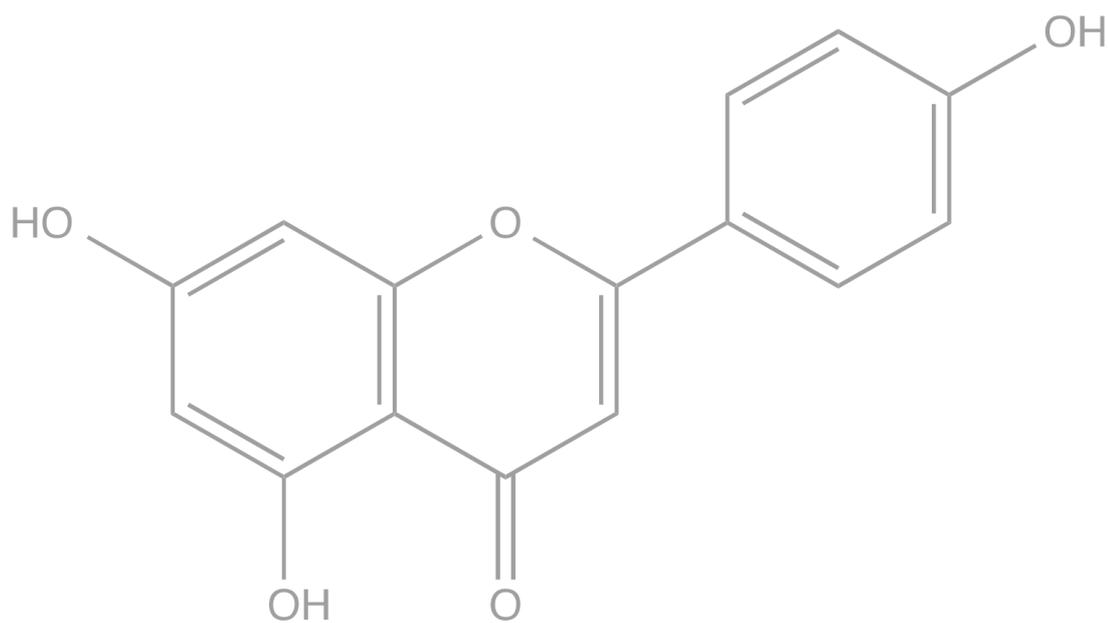
2. Objetivos

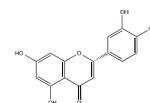
Los objetivos que se han planteado en el presente Trabajo Fin de Máster son:

1. Generación de cepas de *S. albus* productoras de la flavanona naringenina.
2. Generación de cepas de *S. albus* productoras de la flavona apigenina.
3. Generación de cepas de *S. albus* productoras de la flavanona eriodictyol.
4. Generación de cepas de *S. albus* productoras de la flavona luteolina.
5. Optimización de la extracción de compuestos polifenólicos.



3. MATERIAL Y MÉTODOS





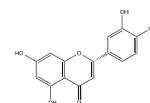
3.1 Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas y plásmidos utilizados en el presente trabajo están descritos en las Tablas 4 y 5 respectivamente.

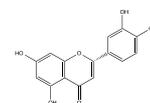
Cepa	Características	Procedencia
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74 nupG recA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galIE15</i> <i>galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ⁻</i>	Invitrogen®
<i>E. coli</i> ET12567	F ⁻ <i>dam</i> ⁻¹³ :: Tn9 <i>dcm-6 hsdM hsdR zjj-202</i> :: Tn10 <i>recF143 galK2 galT22 ara-14 lacY1 xyl-5 leuB6 thi-1 tonA31 rpsL136 hisG4 tsx-78 mtl-1 glnV44</i>	ATCC®
<i>S. albus</i> J1074	<i>Ilv-1, sal-2</i>	(Chater & Wilde, 1980)

Tabla 4: Cepas utilizadas junto con sus características y procedencia.

Plásmido	Características	Procedencia
pUC57	Vector de selección positiva de <i>E. coli</i> ; <i>lacZ</i> ⁺ , Amp ^R (2,7 kb)	Fermentas®
pCR®-Blunt	Vector de selección positiva de <i>E. coli</i> ; <i>lacZ</i> ⁺ , Kan ^R (3,5 kb)	Invitrogen®
pSL1180	Vector de selección positiva de <i>E. coli</i> ; <i>lacZ</i> ⁺ , Amp ^R (3,4 kb)	(Brosius, 1989)
pWHM3	Vector bifuncional multicopia para <i>E. coli</i> y <i>Streptomyces</i> ; <i>lacZ</i> ⁺ , Amp ^R , Tsr ^R (7,2 kb)	(Vara <i>et al.</i> , 1989)



pJFF34	pCR [®] -Blunt con cuatro P _{ermE} [*] (4,3 kb)	Este trabajo
pJFF38	pCR [®] -Blunt con genes <i>TAL</i> , <i>4CL</i> y <i>CHS</i> , con P _{ermE} [*] delante de cada gen y detrás de <i>CHS</i> (8,8 kb)	Este trabajo
pFNS	pUC57 con gen <i>FNS</i> (3,8 kb)	Este trabajo
pF3'H	pUC57 con gen <i>F3'H</i> (4,3 kb)	Este trabajo
pNGM1	pSL1180 con gen <i>CHI</i> con P _{ermE} [*] delante y detrás de <i>CHI</i> (4,5 kb)	Este trabajo
pNGM2	pSL1180 con genes <i>TAL</i> , <i>4CL</i> , <i>CHS</i> y <i>CHI</i> con P _{ermE} [*] delante de cada gen y detrás de <i>CHI</i> y <i>CHS</i> (9,5 kb)	Este trabajo
pNGM3	pWHM3 con genes <i>TAL</i> , <i>4CL</i> , <i>CHS</i> , <i>FNS</i> y <i>CHI</i> con un único P _{ermE} [*] delante de <i>TAL</i> (13,8 kb)	Este trabajo
pNGM4	pWHM3 con genes <i>TAL</i> , <i>4CL</i> , <i>CHS</i> y <i>CHI</i> con P _{ermE} [*] delante de cada gen y detrás de <i>CHS</i> (13,4 kb)	Este trabajo
pNGM5	pCR [®] -Blunt con gen <i>F3'H</i> precedido de tres P _{ermE} [*] (5,7 kb)	Este trabajo
pNGM6	pSL1180 con genes <i>TAL</i> , <i>4CL</i> , <i>CHS</i> , <i>FNS</i> y <i>CHI</i> con P _{ermE} [*] delante de cada gen y detrás de <i>CHI</i> (10,5 kb)	Este trabajo
pNGM7	pWHM3 con genes <i>TAL</i> , <i>4CL</i> , <i>CHS</i> , <i>FNS</i> y <i>CHI</i> con P _{ermE} [*] delante de cada gen (14,6)	Este trabajo
pNGM8	pCR [®] -Blunt con genes <i>TAL</i> , <i>4CL</i> , <i>CHS</i> , <i>CHI</i> y <i>F3'H</i> con P _{ermE} [*] delante de cada gen y detrás de <i>CHS</i> (11,5 kb)	Este trabajo
pNGM9	pCR [®] -Blunt con genes <i>TAL</i> , <i>4CL</i> , <i>CHS</i> , <i>FNS</i> , <i>CHI</i> y <i>F3'H</i> con P _{ermE} [*] delante de cada gen (12,7 kb)	Este trabajo



pNGM10	pWHM3 con genes <i>TAL</i> , <i>4CL</i> , <i>CHS</i> , <i>CHI</i> y <i>F3'H</i> con P_{ermE}^* delante de cada gen y detrás de <i>CHS</i> (15,2 kb)	Este trabajo
pNGM11	pWHM3 con genes <i>TAL</i> , <i>4CL</i> , <i>CHS</i> , <i>FNS</i> , <i>CHI</i> y <i>F3'H</i> con P_{ermE}^* delante de cada gen (16,4 kb)	Este trabajo
pNGM12	pWHM3 con genes <i>TAL</i> , <i>4CL</i> , <i>CHS</i> , <i>CHI</i> y <i>F3'H</i> con un único P_{ermE}^* delante de <i>TAL</i> (14,3 kb)	Este trabajo
pSTSW	pWHM3 con genes <i>TAL</i> , <i>4CL</i> y <i>STS</i> con un único P_{ermE}^* delante de <i>TAL</i> (11,9 kb)	(Marín Fernández, 2015)
pLMF32	pWHM3 con genes <i>TAL</i> , <i>4CL</i> , <i>CHS</i> , <i>FNS</i> , <i>CHI</i> e <i>IFSR</i> (12,8 kb)	(Marín Fernández, 2015)
pLTW	pWHM3 con genes <i>TAL</i> , <i>4CL</i> , <i>CHS</i> , <i>FNS</i> , <i>CHI</i> y <i>F3'H</i> con un único P_{ermE}^* delante de <i>TAL</i> (15,4 kb)	(Marín Fernández, 2015)

Tabla 5: Plásmidos utilizados junto con sus características y procedencia.

Los genes utilizados en este trabajo han sido generados por síntesis mediante la casa comercial Genscript® (USA). Estos genes han sido *TAL*, *4CL*, *CHS*, *CHI*, *FNS* y *F3'H*.

3.2 Medios de cultivo

Los medios utilizados para el desarrollo de este trabajo se describen en detalle en Sambrook & Russell, y Kieser *et al.* (Kieser *et al.*, 2000; Sambrook & Russell, 2001).

3.3 Condiciones de cultivo de *E. coli* y *S. albus*

- **Cultivo de *E. coli*:** Las cepas de *E. coli* se crecieron a 37 °C en agitación (250 rpm) durante una noche con o sin antibiótico de selección en medios líquidos LB (*Luria Broth*) o TSB (*Trypticase Soy Broth*). En el caso de que las cepas se crezcan en medio sólido TSA con o sin antibiótico, la incubación será también a 37 °C pero en estático. Para la conservación de las cepas se realizaron stocks de glicerol a una concentración final del 25 % y se conservaron a -20 °C.
- **Cultivo de *Streptomyces*.**
 - o **Obtención de protoplastos:** Los cultivos de *S. albus* para la preparación de protoplastos se realizaron a partir de las esporas en suspensión guardadas a -20 °C y

se incubaron en matraces invaginados de 250 ml a 30 °C en agitación (250 rpm) durante 36 h en medio líquido YEME 17 % complementado.

- **Recogida de esporas:** Para esporular *S. albus* se utilizó medio Bennet previamente fundido para añadir el antibiótico de selección, que en este caso es tiostreptona (50 µg/ml). Una vez solidificado se siembra con esporas o micelio la superficie de la placa de Petri. Se incuba entre 7 y 10 días a 30 °C en estático para que tenga lugar la esporulación y una vez pasado este tiempo las esporas se recogen con bisturí en un criovial con una solución de glicerol al 20 % y se guardan a -20 °C (Figura 6).
- **Producción de metabolitos:** Para la producción de los metabolitos de interés se utilizó medio R5A al que se le añadió el antibiótico de selección (tiostreptona), junto con la cantidad requerida de esporas libres de micelio. Se incubó en matraces invaginados durante 4 días a 30 °C y 250 rpm.

3.4 Antibióticos de selección

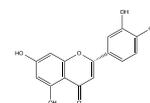
Los antibióticos utilizados para seleccionar las diferentes construcciones y vectores en *E. coli* y *S. albus* fueron todos suministrados por Applichem[®] y una vez preparados se conservaron a -20° C (Tabla 6).

Antibiótico	Solvente	Microorganismo para selección	Concentración inicial (mg/mL)	Concentración final (µg/mL)
Ampicilina (Amp)	H ₂ O	<i>E. coli</i> TOP10	100	100
Kanamicina (Kan)	H ₂ O	<i>E. coli</i> Top10	50	50
Cloranfenicol (Clo)	Etanol 100%	<i>E. coli</i> ET12567	50	25
Tiostreptona (Tsr)	DMSO	<i>S. albus</i>	25	50

Tabla 6: Soluciones de antibióticos utilizadas.

3.5 Obtención y manipulación *in vitro* del ADN

Los métodos que se han utilizado para el aislamiento de ADN han sido los descritos por Sambrook & Russell, y Kieser *et al.* (Kieser *et al.*, 2000; Sambrook & Russell, 2001).



3.5.1 Digestiones enzimáticas

Las digestiones de ADN se han realizado según los métodos descritos por Sambrook y Russell (Sambrook & Russell, 2001).

Las digestiones de comprobación se realizaron tomando 7 μL del ADN, 1 μL de RNasa (1 mg/mL), 1 μL del tampón correspondiente y 1 μL de la enzima necesaria (5 U/ μL), dejando la mezcla 2 h a la temperatura recomendada (37 °C, excepto *SmaI* que es a 30 °C).

Las digestiones para la purificación de banda se realizaron con 50 μL de ADN, 5 μL RNasa (1 mg/mL), 25 μL de agua esterilizada, 10 μL del tampón correspondiente y 10 μL de la enzima necesaria (5 U/ μL), dejando la mezcla 2 h a la temperatura que recomienda la casa comercial.

En las defosforilaciones necesarias en algunos casos antes de la purificación de algunos de los plásmidos digeridos, se usaron 85 μL de ADN ya digerido y purificado, 5 μL de fosfatasa alcalina “CIAP” (40 U/ μL) (EURx) y 10 μL del correspondiente tampón sobre un volumen final de 100 μL . La mezcla se incubó durante 10 min a 37 °C.

3.5.2 Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Los fragmentos resultantes de los cortes con las enzimas de digestión se separaron en geles de agarosa al 0,7 % en tampón TBE (1x) utilizado como electrolito. Las muestras de ADN se mezclaron con el tampón de carga “Loading Buffer 10x” (TaKaRa Biotechnology[®]) (100 mM EDTA, 43 % glicerol y 0,5 % azul de bromofenol) utilizado como densificante y marcador cromogénico. Para conocer el peso de las diferentes bandas generadas se utilizó el marcador “Perfect Plus 1 kb DNA Ladder” (Roboklon[®]). La potencia utilizada para los geles fue de 170 V durante 25 minutos y se visualizaron en un equipo “Gel Doc 2000” (Bio-Rad[®]).

3.5.3 Purificación de fragmentos de ADN

Para la purificación de fragmentos de ADN que van a ser utilizados para realizar una ligación, una vez terminada la electroforesis, se cortaron de la agarosa los fragmentos de ADN de interés con un bisturí estéril. La purificación de los fragmentos resultantes se llevó a cabo con el kit comercial GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific[®]).

3.5.4 Ligación del ADN

Las ligaciones se realizaron usando la ligasa del fago T4 (1 U/ μ L) (Fermentas[®]), que permite la unión de extremos cohesivos y romos, y añadiendo el tampón “T4 DNA Ligasa 10x Buffer” (Fermentas[®]). Para las ligaciones se utilizó una proporción 1:3 entre el número de copias del vector digerido (y defosforilado, para evitar religaciones) y las del fragmento de ADN a clonar, 1 μ L de tampón y 1 μ L de la ligasa (1 U/ μ L), teniendo un volumen final de 10 μ L y manteniendo la mezcla a temperatura ambiente (20-25^o C) durante 3-4 horas. En el caso de tener ligación entre extremos romos, se mantiene a temperatura ambiente durante 12-24 h, y se usa 1 μ L de ligasa a una concentración inicial de 5 U/ μ L.

3.5.5 Producción de células competentes de *E. coli*

La producción de células competentes de la cepa TOP10 (Invitrogen[®]) de *E. coli* se realizó usando el protocolo de cloruro de calcio (Sambrook & Russell, 2001).

3.5.6 Producción de células electro-competentes de *E. coli*

La producción de células electro-competentes de la cepa ET12567 de *E. coli* se realizó mediante el protocolo que proporciona el distribuidor del electroporador (Eppendorf[®]) con algunas modificaciones, ya que las alícuotas finales son de 50 μ L.

3.5.7 Transformación en cepas competentes de *E. coli*

La transformación de la cepa TOP10 de *E. coli* competente se lleva a cabo siguiendo el protocolo descrito por Sambrook y Russell (2001). En primer lugar se descongela en hielo durante 7 min una alícuota de TOP10 y transcurrido este tiempo se le añaden 5 μ L de la ligación correspondiente sin resuspender para de esta forma evitar dañar las células. Se devuelve el eppendorf de nuevo al hielo y se deja durante 30 min. Transcurrido este tiempo se somete a las células a un choque térmico a 42 °C durante 45 s y posteriormente se deja en hielo durante 1 min. Se añade, bajo campana de flujo laminar, 1 mL de LB autoclavado al eppendorf y si el vector es ampicilina resistente se puede plaquear directamente, pero sino es necesario incubar durante una hora a 37 °C. Se funde una botella de TSA a la que se le añade el antibiótico de selección y se reparte en 4 placas de Petri, para posteriormente sembrar en sábana diluciones crecientes con la ayuda de una pipeta Pasteur doblada bajo la llama que es utilizada a modo de asa de siembra. Las placas se incuban durante 1 noche a 37 °C.

3.5.8 Transformación en cepas electro-competentes de *E. coli*

La electroporación de esta cepa se lleva a cabo poniendo 1 μL del ADN plasmídico en la cubeta de electroporación. Se deja en hielo de 4 a 7 min el tubo eppendorf con la alícuota de 50 μL de las células electro-competentes y luego se transfieren a la cubeta que contiene el ADN plasmídico. Se limpia la humedad de la cubeta y del recipiente donde se introduce la misma, y se electropora a 1.700 V, 5 ms en el modo procariotas. Inmediatamente después se añade 1 mL de LB estéril y se transfiere con una pipeta Pasteur a un tubo de 10 ml. Se incuba a 37 °C durante 1 hora y se plaquean estas células en TSA con el antibiótico que debamos utilizar.

3.5.9 Minipreparaciones de ADN plasmídico a partir de *E. coli*

La extracción del ADN plasmídico de la cepa de *E. coli* TOP10 se realizó siguiendo los protocolos que aparecen en el libro de Sambrook y Russell (adaptación del protocolo de extracción de ADN plasmídico de Birnboim y Doly, 1979).

3.5.10 Secuenciación de ADN y análisis de las secuencias

Las muestras de ADN enviadas a secuenciar fueron extraídas mediante el kit de Miniprep StrataPrep[®] Plasmid (Agilent Technologies[®]) y se realizaron diluciones hasta obtener una concentración final de 500 ng/ μL .

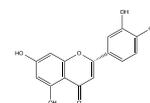
Las muestras de ADN se secuenciaron en la Unidad de Secuenciación de los Servicios Científico-Tecnológicos (SCTs) de la Universidad de Oviedo, utilizando el equipo de análisis genético ABI PRISM[®] 3130xl (Applied Biosystems[®]). Se utilizaron oligos universales M13 directo y reverso. Los cromatogramas obtenidos se leyeron con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor. Para comparar la secuencia recibida de los SCTs y la teórica de las regiones correspondientes, y ver así si el clon es correcto, se utilizó el programa ClustalW2, del Instituto Bioinformático Europeo EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

El programa Clone Manager Basic 9[®] y SnapGene[®] fueron utilizados para la planificación de estrategias de clonación y diseño de nuevos plásmidos.

3.6 Preparación y transformación de protoplastos de *S. albus*

Los protocolos que se siguieron para la generación de los protoplastos son los descritos en la bibliografía (Kieser *et al.*, 2000).

La transformación de los protoplastos de *S. albus* conseguidos con el protocolo anterior se realizó de la siguiente forma:



- A cada alícuota de 200 μL de protoplastos se añadieron 20 μL del ADN del plásmido correspondiente y luego 500 μL de PEG 6000 resuspendido en tampón P suplementado (1 gramo de PEG 6000/3 mL P suplementado). Es esencial filtrar el PEG 600 antes de su uso con filtros de 0,2 μm . Se resuspende la mezcla final con la pipeta un par de veces con sumo cuidado.
- Esta mezcla se reparte equitativamente en cuatro placas de medio PS que se incuban durante 24-30 h a 30 °C y boca arriba.
- Cuando se observó regeneración del micelio sustrato (a las 24 h aproximadamente), se añadieron 1,5 mL de H_2O con tiostreptona (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por cada placa de PS y se incubaron 3 días a 30 °C.

3.7 Esporulación de *S. albus*

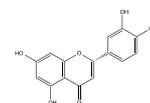
A los tres días de incubación tras la adición de la tiostreptona al micelio sustrato, se podrá observar la formación de colonias aisladas, las cuales se pican con la ayuda de un asa de siembra estéril y se siembran en medio Bennet con antibiótico de selección. Una vez esporuladas, se recogen con un bisturí estéril y se realizan stocks en glicerol al 20 % que se almacenan a -20 °C.

3.8 Cuantificación de esporas

Para la cuantificación de esporas se esporularon las cepas de interés en 10 placas de medio Bennet con tiostreptona. Se recogen las esporas de las 10 placas con un bisturí estéril y se juntan en un tubo Falcon al que se le añaden 30 mL de una solución de Glicerol 20 % + 0,001 % de tritón X-100. Se agita la mezcla en vórtex durante 10 min y esta solución de esporas se filtra en un Falcon nuevo con jeringuillas con algodón esterilizadas para eliminar los restos de micelio. Se realiza una centrifugación durante 5 min a 8.000 rpm y 4 °C, se elimina el sobrenadante y se realizan dos lavados del pellet con H_2O MilliQ estéril. Finalmente se resuspende el pellet lavado en 1,5 ml H_2O MilliQ y se reparte en 2 crioviales para evitar posibles contaminaciones. Se realizan diluciones seriadas en H_2O MilliQ por duplicado hasta 10^{-9} y se siembran 100 μL de las diluciones 10^{-9} , 10^{-8} y 10^{-7} en placas de medio TSA sin antibiótico que se incuban a 30 °C durante 3 días, periodo tras el cual se realiza el recuento de colonias.

3.9 Producción de flavonoides en cepas recombinantes de *S.albus*

Con el objetivo de estandarizar las producciones de metabolitos, se inocularon 10 μL de una concentración inicial de 10^{10} esporas/mL a 25 mL de medio R5A líquido con tiostreptona (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La mezcla se incubó en matraces invaginados de 250 mL durante 4 días a 250 rpm.



3.10 Extracción de flavonoides desde cepas recombinantes de *S. albus*

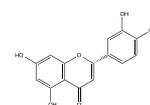
Para la extracción de los metabolitos de interés se centrifugaron los 25 mL de medio durante 5 min a 10.000 rpm y el pellet y sobrenadante se resuspendieron en 6 mL de: (a) acetato de etilo, (b) acetato de etilo + 0,01 % ácido fórmico, (c) 80 % acetato de etilo + 20 % metanol o (d) 80 % acetato de etilo + 0,01 % fórmico + 20 % metanol. Se agita la mezcla en vórtex durante 20 min a temperatura ambiente hasta que el sobrenadante adquiriera un color amarillento. Posteriormente se centrifuga 5 min a 10.000 rpm y se reparte el sobrenadante en un tubo eppendorf de 2 mL perforado, y se seca el pellet en *Speed-Vac*. El extracto seco se resuspendió en 200 μ L de una solución 1:1 de metanol-DMSO que se filtró y se prepararon alícuotas de 50 μ L para su análisis en HPLC-MS. Así mismo, se prepararon diluciones a una concentración final de 5 μ M de los patrones comerciales tanto de los compuestos a medir (naringenina, apigenina, luteolina y eriodictyol) como de sus precursores y derivados (kaempferol y ácido cumárico).

Los patrones fueron suministrados por diferentes casas comerciales: naringenina de Sigma Aldrich[®]; quercetina y luteolina de Cayman Chemical Company[®]; y eriodictyol y ácido cumárico de Calbiochem[®].

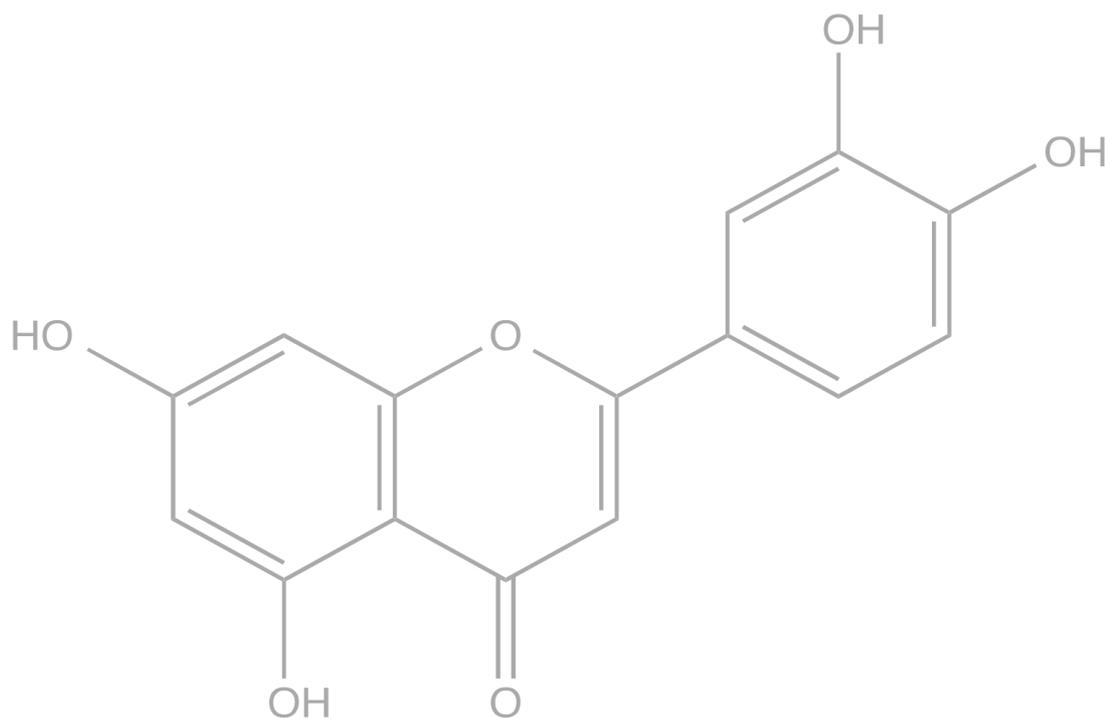
3.11 Cromatografía de HPLC-MS

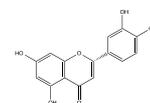
Para el análisis por cromatografía de masas se utilizó el equipo de Agilent Technologies[®] 1290 Infinity con fuente de ionización por electrospray. La columna utilizada fue una Zorbax Eclipse Plus C18 de Agilent[®], de 1,8 μ m y 50 x 2,1 mm. La temperatura de la columna fue de 30 °C. Los solventes utilizados fueron agua con 0,1 % de ácido fórmico y acetonitrilo con 0,1 % de ácido fórmico. Las condiciones fueron 0-10 % (porcentaje de acetonitrilo con 0,1 % de ácido fórmico) durante 1 min, 10-35 % durante 3 min, 35 % durante 1 min, 35-80 % durante 3 min, 80 % durante 2 min y 80-10 % durante 1 min. El flujo se mantuvo constante a 0,3 mL/min. Estas condiciones fueron las mismas para todos los compuestos.

Para cuantificar la producción de flavonoides en HPLC-MS se hicieron curvas de calibración para cada patrón a 3 concentraciones diferentes (0,1; 0,25 y 0,5 μ M), se determinaron las áreas de los picos generados y se extrapolaron las áreas de los productos medidos. Para determinar la cantidad final de polifenoles producida se calculó la concentración utilizando la fórmula $V_i \cdot C_i = V_f \cdot C_f$, siendo la C_i la detectada por HPLC-MS, el V_i el volumen de resuspensión del extracto seco y la V_f el volumen de producción. Una vez calculada la C_f se multiplicó por la masa molecular de cada compuesto para hallar los mg/L. El análisis de HPLC-MS utilizado fue MRM (*Multiple Reaction Monitoring*).



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



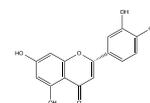


4.1 Elección del microorganismo hospedador

El primer punto a tener en cuenta a la hora de diseñar plataformas bacterianas para la biosíntesis de flavonas y flavanonas fue elegir un huésped óptimo para la expresión heteróloga de estos compuestos. Para ello se realizó una profunda revisión bibliográfica que se muestra en el punto 1.7 del apartado de la introducción (Tabla 2), donde se puede ver que la gran mayoría de los investigadores se han centrado en el uso de *E. coli* como huésped modelo de procariotas, y en *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de eucariotas. Sin embargo, tan solo un grupo ha centrado su atención en el género *Streptomyces*. (Park *et al.*, 2008, 2009, 2010), un grupo de actinomicetos ampliamente utilizado como sistema de expresión de diferentes compuestos bioactivos naturales, gracias a su eficiente sistema genético, sus altas tasas de producción y la relación coste-efectividad altamente favorable que presenta (Vrancken & Anné, 2009; Zaburannyi *et al.*, 2014). Además, es bien conocida la excelente capacidad de este grupo de microorganismos a la hora de secretar al medio de cultivo el producto recombinante generado, lo cual es un punto importante a tener en cuenta debido a que la acumulación del producto final en el citoplasma puede derivar en un bucle de retroalimentación negativa que termine con la inhibición de la vía (Lee *et al.*, 2012; Nakashima *et al.*, 2005). Dentro del género *Streptomyces*, se plantearon dos especies como posibles hospedadores finales: *S. albus* y *S. coelicolor*, donde el segundo fue la opción que se creyó más favorable en un principio al existir mutantes (M1154) optimizados hacia la producción heteróloga de compuestos evitando que el malonil-CoA, limitante en la biosíntesis de flavonoides, fuera derivado hacia otras rutas nativas (Gomez-Escribano & Bibb, 2011; Marín Fernández, 2015); además, el enzima 4CL que será utilizado para el diseño de los cassettes génicos que dirigirán la síntesis de flavonoides procede de esta especie (Kaneko *et al.*, 2003). Sin embargo, los resultados obtenidos por Marín Fernández, (2015) demostraron unas producciones de polifenoles como el estilbeno resveratrol y los flavonoides daidzeína o kaempferol superiores en *S. albus* que en *S. Coelicolor* (Marín Fernández, 2015). Por todas estas razones, se eligió a *S. albus* como el hospedador definitivo para dirigir la biosíntesis de flavonoides.

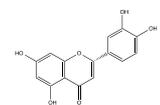
4.2 Diseño de los cassettes génicos

Un cuello de botella importante se plantea en el nivel de expresión de los genes heterólogos y por ello es esencial seleccionar un promotor apropiado. Se han descrito diferentes promotores constitutivos para estreptomicetos, y en este caso se ha optado por el promotor del gen de resistencia a eritromicina (P_{ermE^*}) (Bibb *et al.*, 1986; Kieser *et al.*, 2000; Schmitt-John & Engels, 1992), un promotor fuerte que induce incrementos significativos en los niveles de



transcripción de los genes bajo su control (Pan *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2010). Puesto que los cassettes génicos que se diseñaron durante el desarrollo de este trabajo llegan a presentar hasta un total de 6 genes, lo que supone un tamaño del inserto de 8 kb, y puesto que el principal objetivo es garantizar una fuerte expresión, se decidió situar a cada gen bajo el control de un P_{ermE^*} independiente. Este diseño multi-promotor se apoya en evidencias de la bibliografía, donde el ejemplo más representativo es el del grupo de Santos *et al.* (2011), que consiguió un incremento de 10 veces en la producción de naringenina utilizando *E. coli* como hospedador.

Una vez asumido el diseño multi-promotor de los cassettes génicos (Figura 5), se pasó a seleccionar los genes que formarían parte de los mismos. Este trabajo tiene como objetivo generar naringenina, apigenina, luteolina y eriodictyol, flavonoides que tienen en común los tres primeros enzimas de la vía fenilpropanoide (PAL, C4H y 4CL), además de la CHS (primer enzima de la ruta de biosíntesis de los flavonoides). Sin embargo, para garantizar la viabilidad del modelo se decidió prescindir del enzima PAL y C4H, ya que este último en plantas es una citocromo P450 hidroxilasa unida a la membrana del retículo endoplasmático, que requiere además para su actividad de una citocromo P450 reductasa ausente en bacterias (Du *et al.*, 2010). Por esta razón se ha decidido optar por el enzima TAL, el cual está presente en algunas plantas (rara vez en microorganismos) y es capaz de generar ácido cumárico a partir de L-tirosina sin ser necesaria la actividad C4H (Zhu *et al.*, 2012). Puesto que muchas enzimas TAL presentan bifuncionalidad frente a sustrato (L-fenilalanina o L-tirosina), y con el objetivo final de optimizar la producción, se eligió el enzima TAL de *Rhodobacter capsulatus*, que se ha descrito que presenta una afinidad de hasta 150 veces superior por L-tirosina que por L-fenilalanina, de esta forma se evita en gran medida la formación de ácido cinámico (intermediario no hidroxilado) que no continuaría la ruta al no poder ser hidroxilado por la C4H no presente en el cassette (Kyndt *et al.*, 2002). El siguiente enzima de la ruta, la 4CL, fue tomada de *S. coelicolor*, y la CHS de *Glycine max*. Estos tres genes llevan a la síntesis de chalcona de naringenina, la cual es el precursor de todas las familias de flavonoides, sobre la cual actuarán diferentes enzimas para generar las flavonas y flavanonas, cuya actividad y procedencia se discutirán en el apartado correspondiente. Finalmente, cada una de las construcciones portadoras de los genes necesarios para la biosíntesis de cada flavonoide en particular, fueron subclonadas en el vector bifuncional multicopia pWHM3, que permite la selección de clones positivos en *Streptomyces* y en *E. coli*.



Todos los genes utilizados en este trabajo están optimizados para su expresión en *Streptomyces*, y fueron además diseñados con una secuencia de unión al ribosoma (RBS) en la posición 5' y con sitios de restricción compatibles flanqueando a cada gen con el fin de generar cassettes génicos.

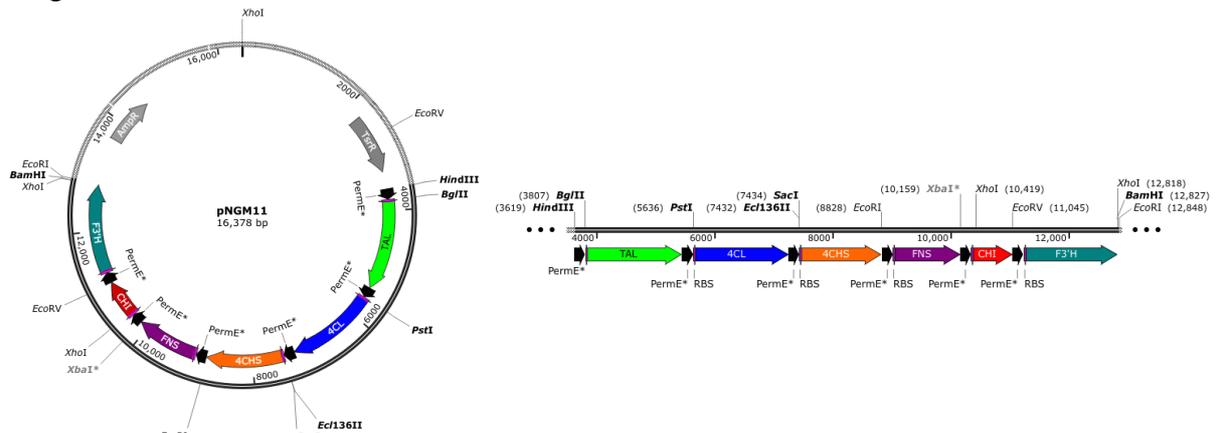


Figura 5. Ejemplo de la construcción que dirige la síntesis de luteolina subclonada en pWHM3. A la derecha se muestra un detalle del cassette génico, donde en **rosa** se indica el RBS, en **negro** el P_{ermE^*} (ambos preceden a cada gen) y el resto de colores representan los diferentes enzimas de la ruta.

4.3 Generación de cepas productoras de la flavanona naringenina

La naringenina (4',5,7-trihydroxy-flavanona) es una flavanona con cierta relevancia en el campo de la biosíntesis de compuestos naturales, ya que fue el primer flavonoide que se consiguió sintetizar en *E. coli* (Hwang *et al.*, 2003). Este mérito es atribuible en gran parte al hecho de que requiere de la actividad de pocos enzimas para su síntesis, y además es un precursor directo de otras flavanonas como el eriodictyol, o flavonas como la apigenina o luteolina. Para la biosíntesis de naringenina se requiere de los enzimas TAL, 4CL y CHS, los cuales generan su precursor más directo que es la chalcona de naringenina, la cual es sustrato de la chalcona isomerasa (CHI) que media el cierre del heterociclo para generar la naringenina (Figura 6). La secuencia codificadora del enzima CHI se obtuvo de *Glycine max*.

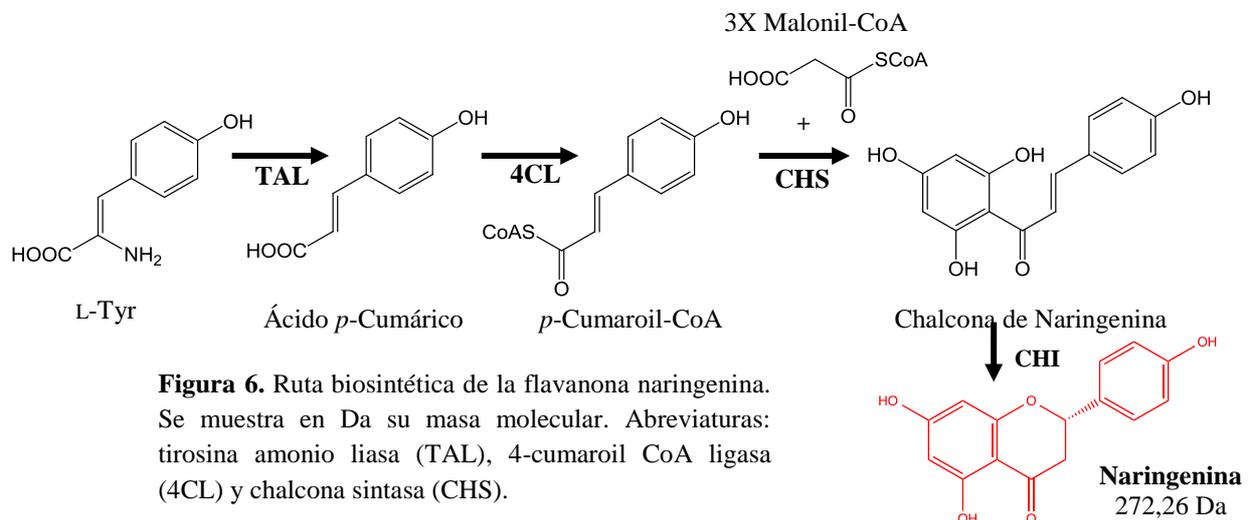
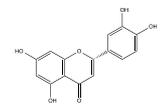
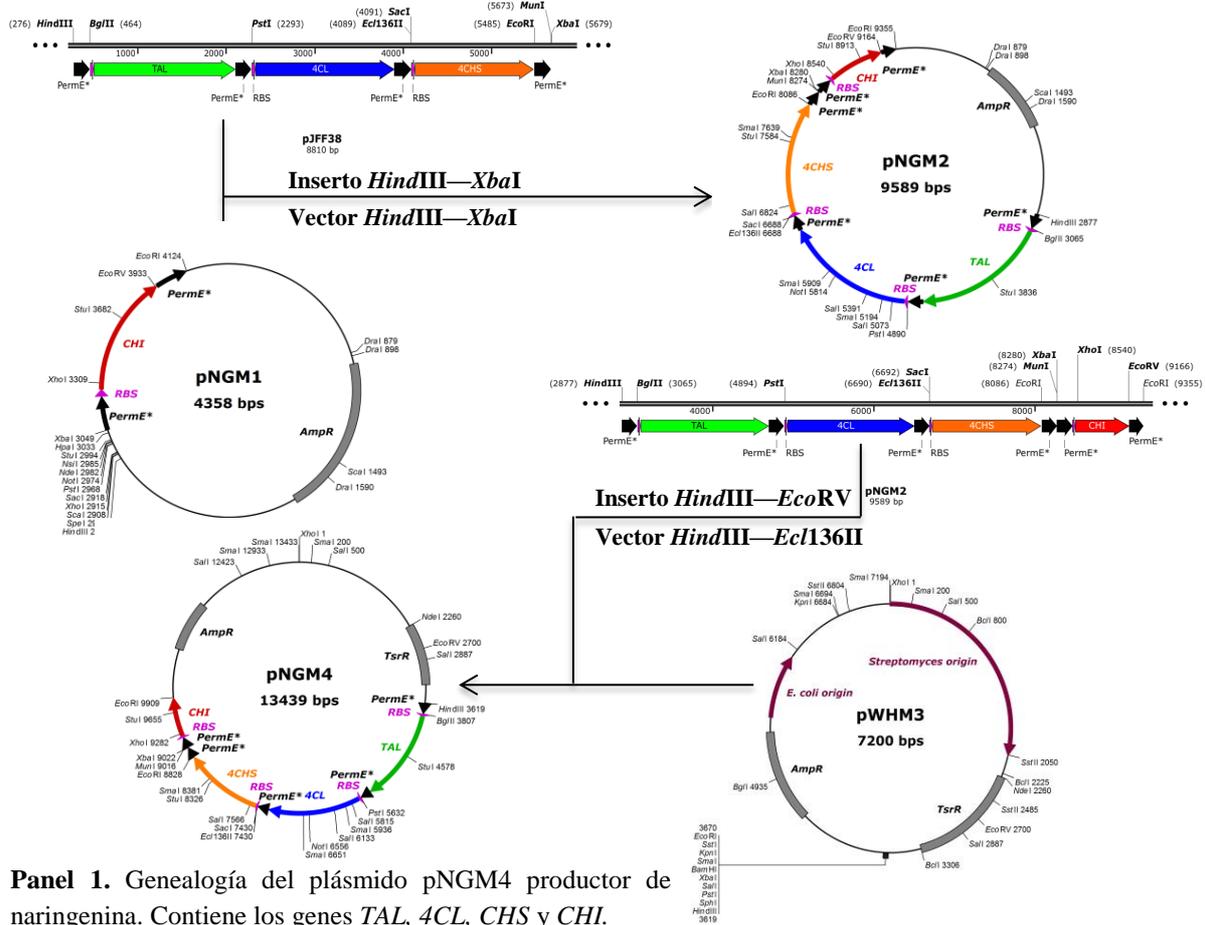


Figura 6. Ruta biosintética de la flavanona naringenina. Se muestra en Da su masa molecular. Abreviaturas: tirosina amonio liasa (TAL), 4-cumaroil CoA ligasa (4CL) y chalcona sintasa (CHS).



El plásmido que dirige la biosíntesis de naringenina se denominó pNGM4 y consta de los genes *TAL*, *4CL*, *CHS* y *CHI*, precedido cada uno de ellos del promotor constitutivo P_{ermE^*} y de su propio RBS. Para la construcción de este vector se partió del plásmido pJFF38 que contiene los genes *TAL*, *4CL* y *CHS* iniciadores de la ruta bajo el control de tres P_{ermE^*} . Todo ello se clonó como *HindIII/XbaI* en el vector pNGM1 portador del gen *CHI* flanqueado por dos promotores, generándose de esta forma pNGM2. El diseño de esta construcción presenta un promotor adicional tras el gen *CHS* seguido de los puntos de corte únicos *MunI-XbaI*, no con el objetivo de conseguir una mayor expresión del gen *CHI* (lo cual no tiene sentido porque ya presenta su promotor propio) sino para permitir la clonación en estos lugares del gen *FNS* esencial para la biosíntesis de la luteolina. Finalmente, el cassette codificador para la naringenina de pNGM2 (6,2 kb) se clonó como *HindIII/EcoRV* en el vector bifuncional multicopia pWHM3 abierto *HindIII/Ecl136II* (7,2 kb) (Figura 7A), para así formar la construcción definitiva pNGM4 (Panel 1). Con el fin de comprobar que la construcción obtenida es la correcta, se realizaron dos digestiones de comprobación sobre pNGM4, con los enzimas de restricción *EcoRI* (12,3 kb + 1,1 kb) y *PstI/XbaI* (10,2 kb + 3,2 kb) (Figura 7B). Como seguro adicional, se secuenció la construcción pudiéndose comprobar la presencia del primer y último gen (P_{ermE^*} -*TAL* y *CHI* respectivamente) (Figura A Anexo).



Panel 1. Genealogía del plásmido pNGM4 productor de naringenina. Contiene los genes *TAL*, *4CL*, *CHS* y *CHI*.

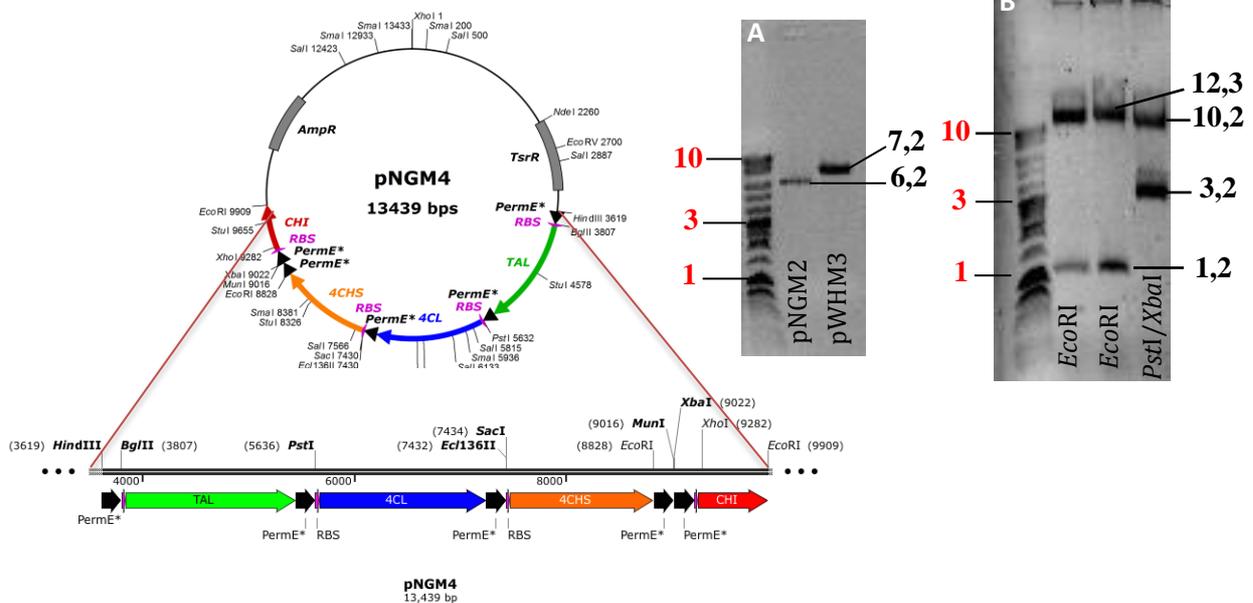
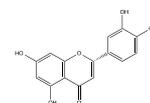


Figura 7. Plásmido pNGM4 con detalle del inserto. **A.** Gel de concentración donde se muestra el inserto (pNGM2) y el vector (pWHM3), ambos ya digeridos. **B.** Gel de electroforesis correspondiente a la digestión de comprobación de pNGM4. Las unidades de los pesos se muestran en kb. *Nota: En el detalle del inserto se ha invertido la dirección de los genes para facilitar su visualización. La primera calle corresponde siempre al ladder.*

El plásmido pNGM4 (Figura 7) fue transformado en protoplastos de *S. albus* y se inocularon 10^8 esporas en 25 mL de R5A líquido que se incubó durante 4 días. La extracción se realizó con 6 mL de acetato de etilo + 0,01 % de ácido fórmico y el pellet seco resuspendido se analizó mediante HPLC-MS con el método MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), pudiéndose detectar dos picos mayoritarios con la misma masa, patrón de fragmentación y tiempo de retención que los patrones comerciales cuyos cromatogramas se muestran en la figura E del Anexo, en este caso naringenina y su precursor el ácido cumárico (Figura 8). Los iones de fragmentación obtenidos por análisis MRM fueron 151 y 119,1 para el peso de la naringenina, y 191 y 93 para el del ácido cumárico, donde los iones que se cuantificaron fueron los mayoritarios (119,1 para la naringenina y 191 para el ácido cumárico). La naringenina presentó un tiempo de retención de 5,85 minutos y el ácido cumárico de 3,55 minutos. En todos los cromatogramas se usó como control negativo *S. albus* transformado con el vector pWHM3 vacío, cuyo cromatograma se muestra en la figura F del anexo.

Una vez que se detectó la presencia de naringenina, lo cual era un hecho fehaciente del correcto funcionamiento de los genes que integran los cassetes génicos, en este caso *TAL*, *4CL*, *CHS* y *CHI*, se pasó a cuantificar los niveles de producción, para lo cual se integró el cromatograma para conocer el área bajo la curva de cada pico, y partir de este valor se pudo conocer la concentración de compuesto en los 25 mL de medio de producción, obteniéndose un valor



de 16,64 $\mu\text{g/L}$ para el ácido cumárico y de 1,08 $\mu\text{g/L}$ para la naringenina. El valor tan elevado de ácido cumárico hace ver la óptima actividad que presenta el enzima TAL a la hora de generar ácido cumárico a partir de L-tirosina, la cual es muy superior al del resto de los enzimas de la ruta previos a la naringenina, ya que en condiciones normales este producto inicial de la ruta debería ser convertido en sus respectivos productos al existir los enzimas para los que es sustrato, no acumulándose por ello en cantidades tan elevadas. Esto no se explica por la fuerza de expresión del promotor que podría ser mayor en el primer gen y decrecer en los genes finales produciéndose un acúmulo de precursores dada la baja expresión génica, ya que cada gen presenta un P_{ermE^*} propio.

El valor de producción de 1,08 $\mu\text{g/L}$ obtenido para la naringenina está alejado de los 29 mg/L logrados por Santos *et al.* (2009); sin embargo, este grupo utilizó como microorganismo hospedador *E. coli*, el único que utilizó al género *Streptomyces* fue el de Park *et al.* (2009) y sus niveles de producción fueron 1000 veces superiores a los obtenidos en este trabajo pero con la adición de precursores al medio de cultivo, en este caso ácido cumárico, no habiendo sido capaces de solventar la limitación que supone el enzima PAL. En este trabajo, gracias al uso del enzima TAL, se ha conseguido la síntesis *de novo* de naringenina en *S.albus*.

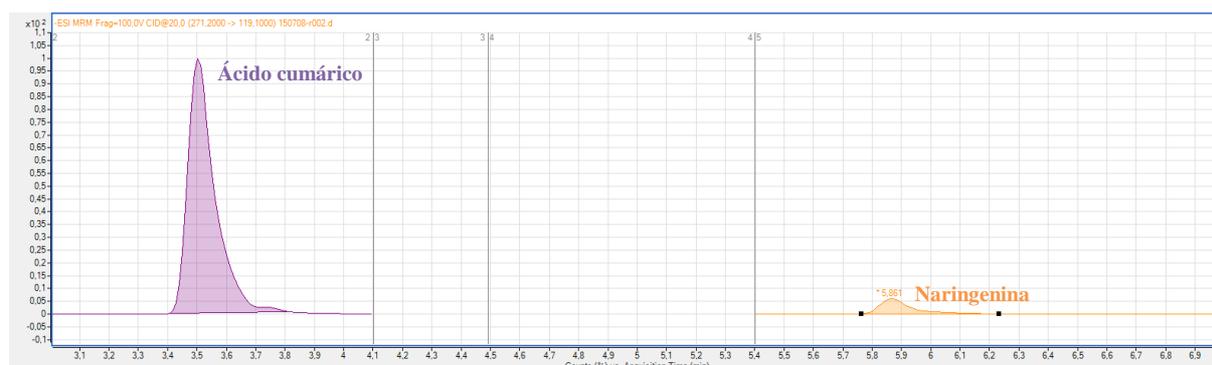


Figura 8. Cromatograma de HPL-MS tras análisis MRM que muestra la naringenina y el ácido cumárico producidos por pNGM4 para sus iones mayoritarios, coincidentes en todos los parámetros con los patrones comerciales.

4.4 Generación de cepas productoras de la flavona apigenina

La apigenina (5,7,4'-trihydroxyflavona) es una flavona que posee una remarcable actividad anti-oxidante, anti-inflamatoria y anti-carcinogénica, con una importancia creciente por su efecto inhibitor sobre las vías de señalización PI3K/Akt/mTOR (Tong & Pelling, 2012). La apigenina es un derivado directo de la naringenina, y es generada por la actividad de la flavona sintasa (FNS) que oxida la naringenina introduciendo un doble enlace entre el C2-C3 del

heterociclo (Figura 9). La secuencia codificadora del enzima FNS se obtuvo de *Petroselinum crispum*, pues el perejil es uno de los vegetales que presenta mayor contenido en esta flavona.

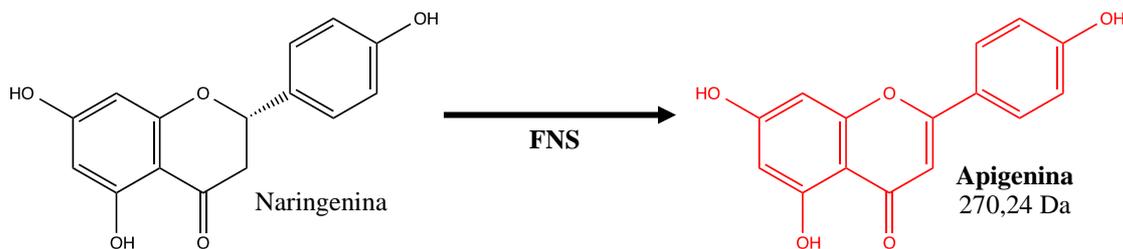
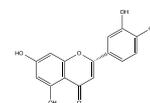
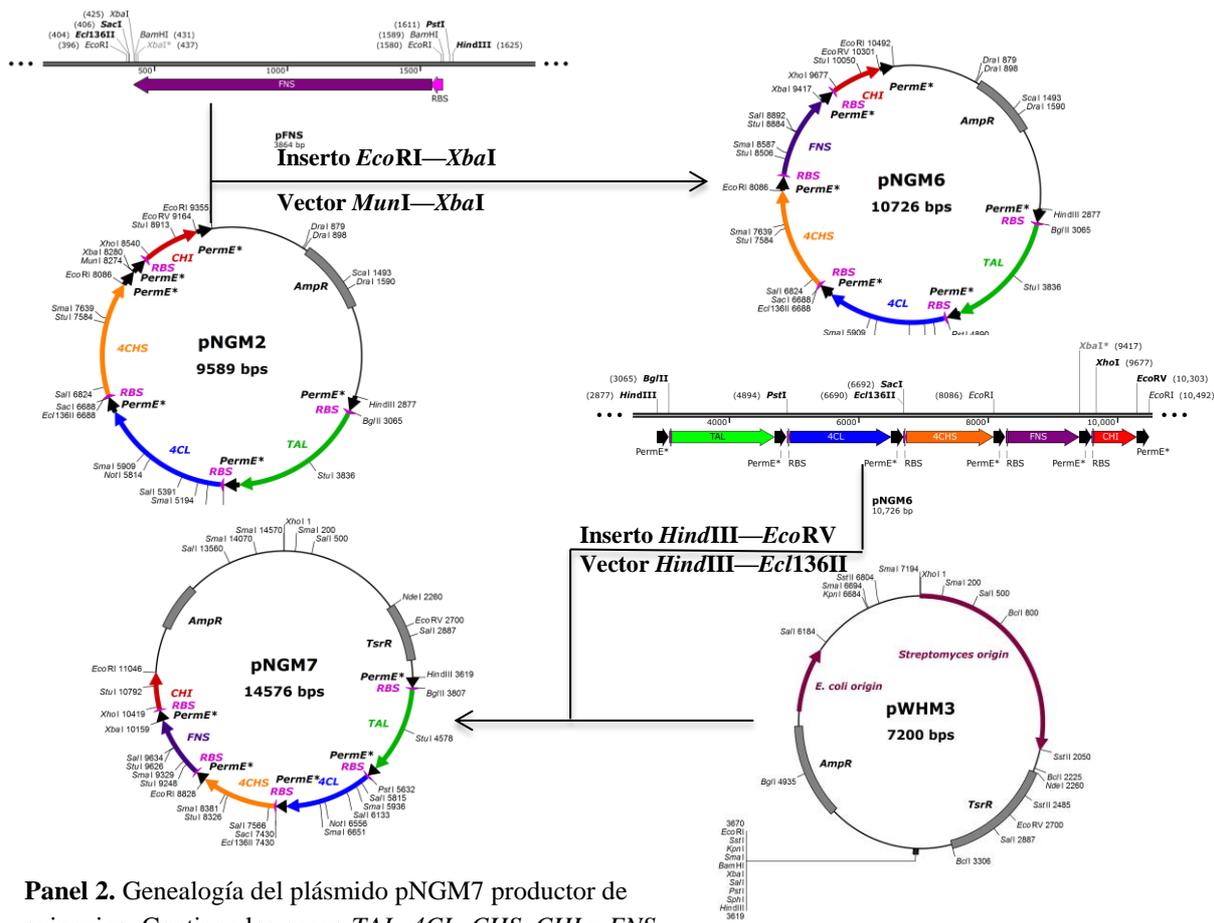


Figura 9. Ruta biosintética de la flavona apigenina. Se muestra en Da su masa molecular. Abreviatura: flavona sintasa (FNS).

El plásmido encargado de la biosíntesis heteróloga de apigenina se denominó pNGM7 y está formado por los genes *TAL*, *4CL*, *CHS*, *CHI* y *FNS*, cada uno de ellos bajo el control de un promotor del gen de resistencia a eritromicina (P_{ermE^*}) y precedidos de un RBS propio. La construcción del vector pNGM6 tan sólo requirió de la adición del gen *FNS* digerido como *EcoRI-XbaI* al plásmido pNGM2 de la naringenina en los puntos de corte *MunI-XbaI* que habían sido diseñados desde un principio para esta función. El gen *FNS* presente en el plásmido comercial pFNS se encuentra flanqueado por los puntos de corte *EcoRI/XbaI*, y a continuación de este *XbaI* existe un *BamHI* seguido de un nuevo *XbaI* (Figura 10A). Sin embargo, la clonación como *XbaI* no fue posible con la rutina de clonación en *E. coli* Top10 ya que este punto de corte que flanquea a la *FNS* se encuentra precedido de la secuencia GA, generándose el lugar de reconocimiento GATC para las metilasas Dam de *E. coli* que produjeron el bloqueo de este punto de corte, pero no del *XbaI* situado más adelante. Para solventar este problema, se transformó el plásmido comercial pFNS en cepas de *E. coli* ET12567 (Dam^-) para permitir el desbloqueo de *XbaI*, pues si se hubiera realizado la digestión en *E. coli* Top10 se habría digerido el *XbaI* siguiente y no el que flanquea al gen, arrastrándose por ello en la secuencia el punto de corte *BamHI* presente entre ambos, lo cual supondrá un problema en construcciones futuras, ya que el cassette génico de la luteolina se clonará en pWHM3 en este punto de corte, no siendo pues posible aplicar esta estrategia en el caso de que se hubiera arrastrado un *BamHI* adicional en construcciones previas. Por lo tanto, finalmente se logró clonar la *FNS* en pNGM2 como *EcoRI/XbaI* para generarse la construcción pNGM6. Por último, esta ruta biosintética se subclonó como *HindIII/EcoRV* (7,4 kb) en el vector replicativo bifuncional pWHM3 abierto como *HindIII/Ecl136II* (7,2 kb) para generar la construcción final pNGM7 (Figura 10A), la cual se digirió con el enzima de restricción *EcoRI* para liberarse dos fragmentos de 12,3 kb y 2,3 kb, indicativos de la correcta entrada del inserto en el vec-



tor pWHM3 (Figura 10B) (Panel 2). Adicionalmente se secuenció el plásmido pNGM7 (Figura B Anexo).



Panel 2. Genealogía del plásmido pNGM7 productor de apigenina. Contiene los genes *TAL*, *4CL*, *CHS*, *CHI* y *FNS*.

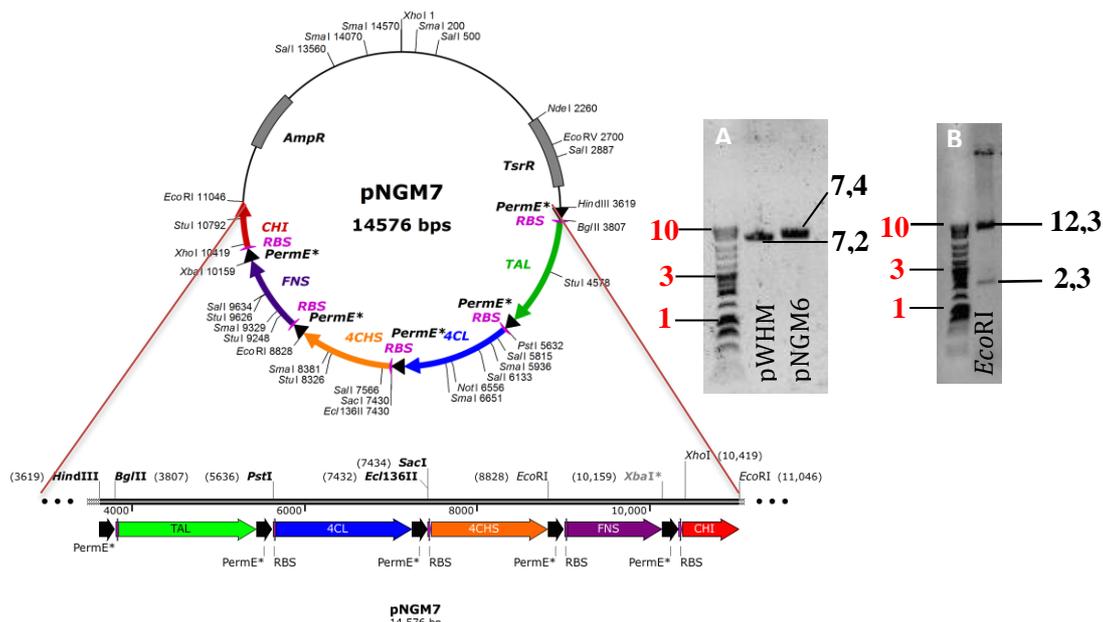
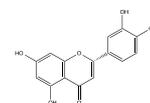


Figura 10. Plásmido pNGM7 con detalle del inserto. **A.** Gel de concentración donde se muestra el vector (pWHM3) y el inserto (pNGM6), ambos ya digeridos. **B.** Gel de electroforesis correspondiente a la digestión de comprobación de pNGM7. Las unidades de los pesos se muestran en kb. *Nota: En el detalle de la inserto se ha invertido la dirección de los genes para facilitar su visualización.*



El plásmido final pNGM7 (Figura 10) fue transformado en protoplastos de *S. albus* y se inocularon 10^8 esporas en 25 mL de R5A líquido que se incubó durante 4 días. La extracción se realizó con 6 mL de acetato de etilo + 0,01 % de ácido fórmico y el pellet seco resuspendido se analizó mediante HPLC-MS con el método MRM (*Multiple Reaction Monitoring*). Se detectaron tres picos mayoritarios coincidentes en masa, patrón de fragmentación y tiempo de retención con los patrones comerciales de ácido cumárico, naringenina y apigenina (Figura E del Anexo). Los iones obtenidos mediante análisis MRM fueron 117 (mayoritario) y 150 para la apigenina, con un tiempo de retención de 5,9 minutos (Figura 11).

La presencia de apigenina es indicativa del correcto funcionamiento del enzima *FNS* que media la transformación de su precursor naringenina. En términos de producciones, se obtuvieron 13,65 $\mu\text{g/L}$ de apigenina y 0,4 $\mu\text{g/L}$ de naringenina. Se puede observar por lo tanto una gran acumulación del producto final que se buscaba con la construcción pNGM7 pero muy baja de su precursor directo de ruta que es la naringenina, lo cual demuestra el óptimo funcionamiento de la *FNS* que presenta un alto grado de eficiencia, transformando prácticamente la totalidad de su sustrato en apigenina.

Son pocas las publicaciones que hacen referencia a la síntesis de apigenina en *E. coli*, que se reducen a una (Park *et al.*, 2010) si se habla de *Streptomyces* como microorganismo productor, logrando en este último caso la biosíntesis de apigenina pero a partir de naringenina. Sin embargo, en el presente trabajo se ha conseguido llegar al producto final utilizando como sustrato L-tirosina, y no un precursor directo de ruta, lo cual implica la actuación de 5 genes diferentes.

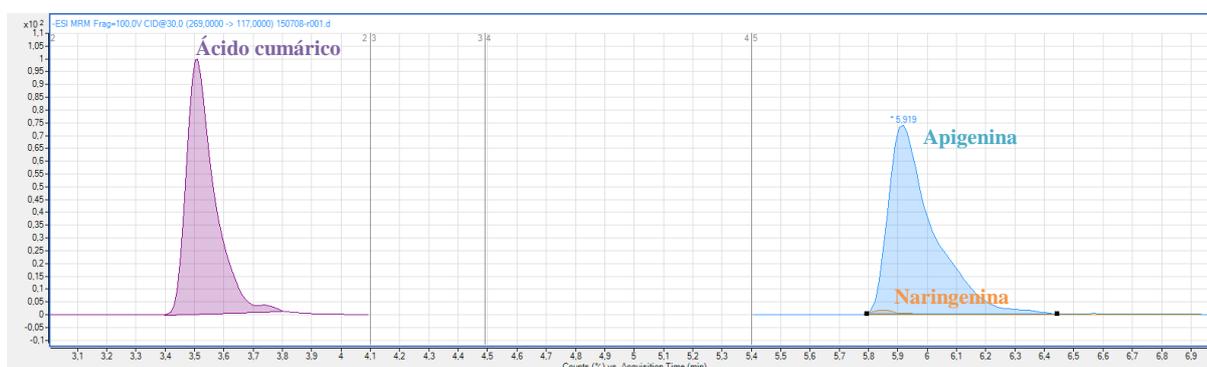
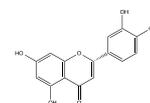


Figura 11. Cromatograma de HPL-MS tras análisis MRM que muestra la naringenina, ácido cumárico y apigenina producidos por pNGM7 para sus iones mayoritarios, coincidentes en todos los parámetros con los patrones comerciales.

El protocolo para la extracción de flavonoides es prácticamente unánime en la bibliografía decantándose por el acetato de etilo como solvente único (Hwang *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2011); sin embargo, como en el presente trabajo se han realizado las ex-



tracciones con acetato de etilo + 0,01 % de ácido fórmico, se decidió comprobar si el método de extracción realiza un impacto directo en los niveles de producción finales utilizando como modelo la apigenina, que demostró una alta eficiencia de producción. Para ello se inoculó un matraz con 100 mL de medio y una vez crecido se realizaron extracciones de 25 mL cada una con acetato de etilo + 0,01 % de ácido fórmico (método 1), con acetato de etilo 100 % (método 2), con 80 % de acetato de etilo + 20 % de metanol (método 3), y 80 % de acetato de etilo + 20 % de metanol + 0,01 % de ácido fórmico (método 4). Los resultados se filtraron en HPLC-MS únicamente para la masa de la apigenina y se muestran en la Figura 12, lográndose un mejor resultado con el método 3. Se integraron los picos del cromatograma y se obtuvieron unos valores de concentración de 15,34 $\mu\text{g/L}$ con el método 3 frente a los 13,65 $\mu\text{g/L}$ del método 1 utilizado hasta el momento. Por lo tanto, a partir de entonces, las extracciones de luteolina y eriodictyol se realizaron con estas nuevas condiciones.

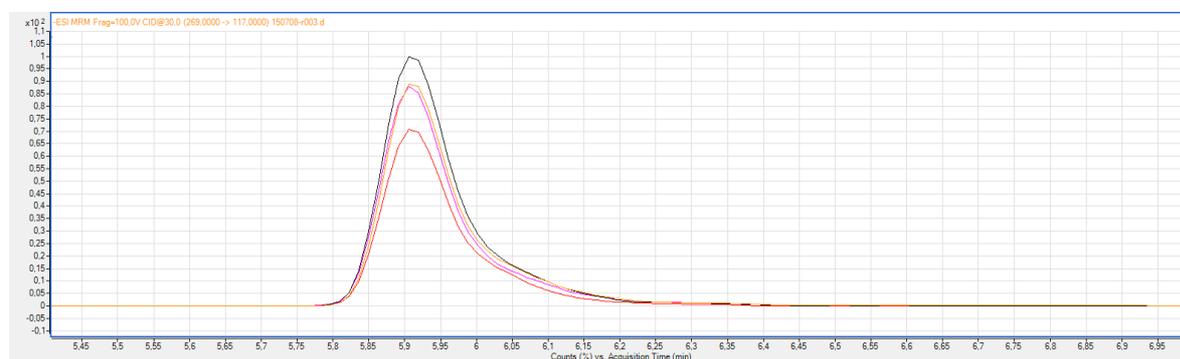


Figura 12. Cromatograma de HPL-MS tras análisis MRM filtrada para el fragmento mayor de la apigenina que muestra las diferencias de producción entre los diferentes métodos de extracción. En **negro** se muestra el método 3, en **naranja** el método 1, en **rosa** el método 2, y en **rojo** el método 4.

4.5 Generación de cepas productoras de la flavanona eriodictyol

El eriodictyol (3',4',5,7-tetrahydroxyflavanona) se clasifica dentro de la familia de las flavanonas y, a pesar de que se le ha dedicado una menor producción científica en comparación con otros flavonoides como la apigenina, la quercetina o el kaempferol, posee efectos antioxidantes así como anti-neoplásicos interviniendo en la inhibición directa de vías de señalización que potencian la proliferación celular (Liu *et al.*, 2011). Esta flavanona se genera a partir de la naringenina que, a diferencia de lo que ocurría con la apigenina, es sustrato de otro enzima, en este caso de la flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H) que media la incorporación de un grupo hidroxilo en el carbono 3' del anillo aromático B (Figura 13). La secuencia codificadora que se incluyó a los cassettes génicos se obtuvo a partir de *Arabidopsis thaliana*.

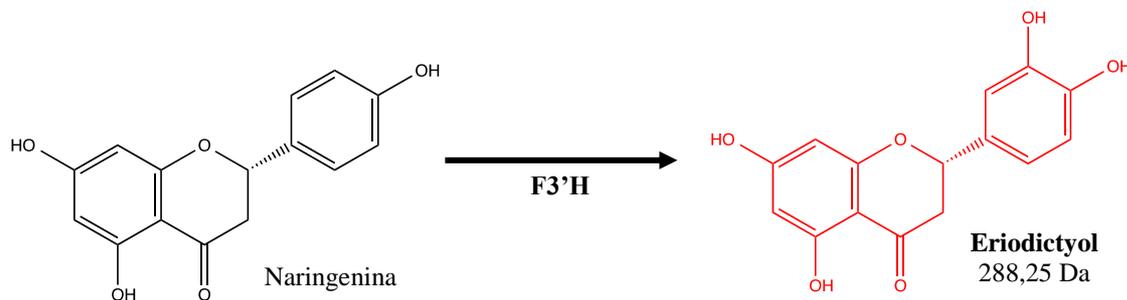
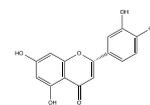
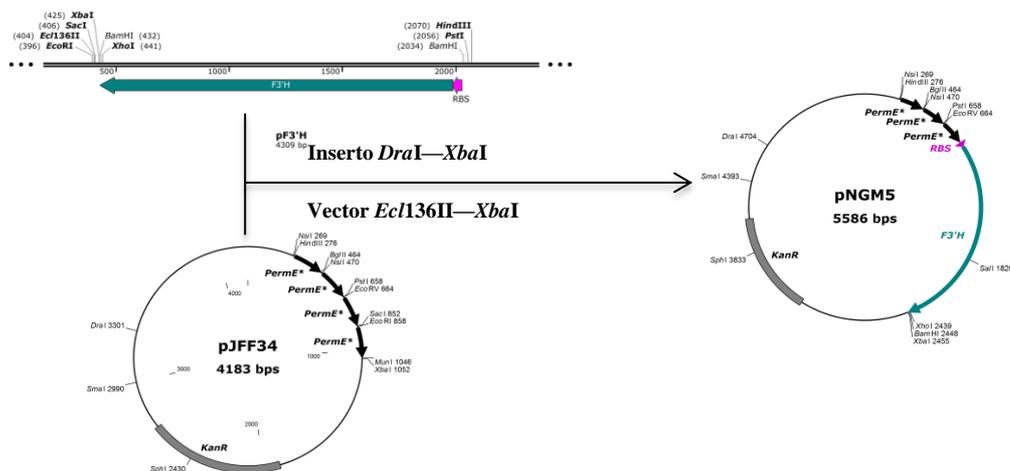
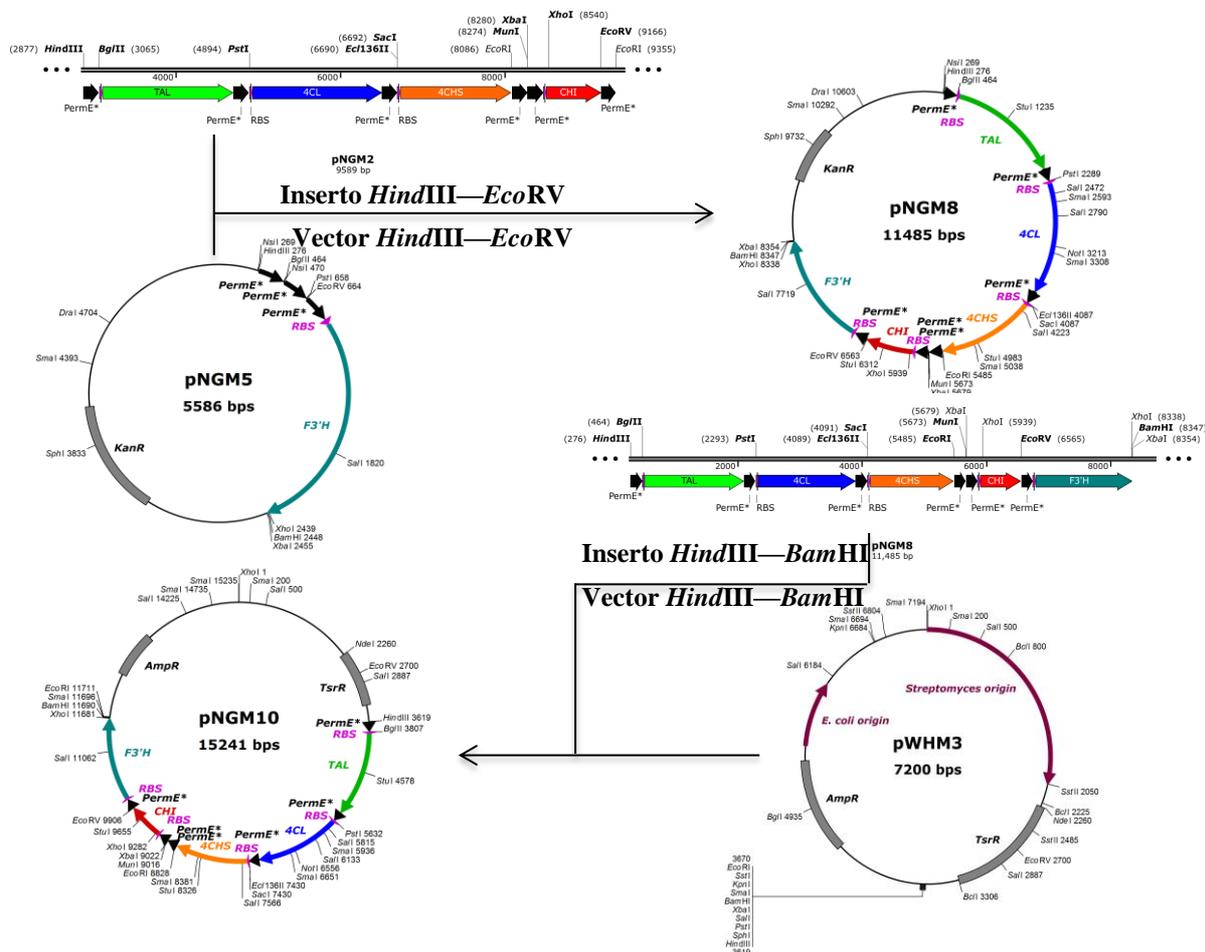
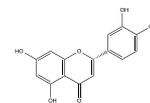


Figura 13. Ruta biosintética de la flavanona eriodictyol. Se muestra en Da su masa molecular. Abreviatura: flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H).

El plásmido portador del cassette génico productor de eriodictyol se nombró como pNGM10 y consta de los genes *TAL*, *4CL*, *CHS*, *CHI* y *F3'H*, presentando una vez más el diseño constituido por un promotor y RBS por gen. Para generar la construcción pNGM10 se requirió de un paso adicional, no pudiéndose realizar en dos clonaciones seriadas como ocurrió con la naringenina o la apigenina. Esto se debe a que se requiere de una construcción previa (pNGM5) en la que el gen comercial de la *F3'H* sea clonado tras un promotor P_{ermE}^* , ya que a pesar de que el plásmido pNGM2 presenta un promotor libre los puntos de corte no son compatibles. Por lo tanto, el gen comercial de la *F3'H* fue clonado como *DraI/XbaI* en el vector pJFF34 que se digirió en *Ecl136II/XbaI*, para de esta forma permitir la entrada del gen contiguo a un promotor, y así se creó pNGM5 (Panel 3). Esta última construcción se utilizó como vector para clonar delante de $P_{ermE}^* + F3'H$ todo el cassette génico codificador de la naringenina (pNGM2) como *HindIII/EcoRV*, y así se generó pNGM8. Toda esta ruta biosintética se subclonó como *HindIII/BamHI* (8 kb) en el vector replicativo bifuncional pWHM3 (7,2 kb) para obtenerse la construcción final pNGM10 que dirige la biosíntesis heteróloga de eriodictyol (Figura 14A) (Panel 3), la cual se comprobó realizando una digestión con *EcoRI* que liberó dos bandas de 12,3 kb y 2,9 kb (Figura 14B). Además, para garantizar la entrada del gen *F3'H* se envió el plásmido a secuenciar (Figura C del Anexo) (Panel 3).





Panel 3. Genealogía del plásmido pNGM10 productor de eriodictyol. Contiene los genes *TAL*, *4CL*, *CHS*, *CHI* y *F3'H*.

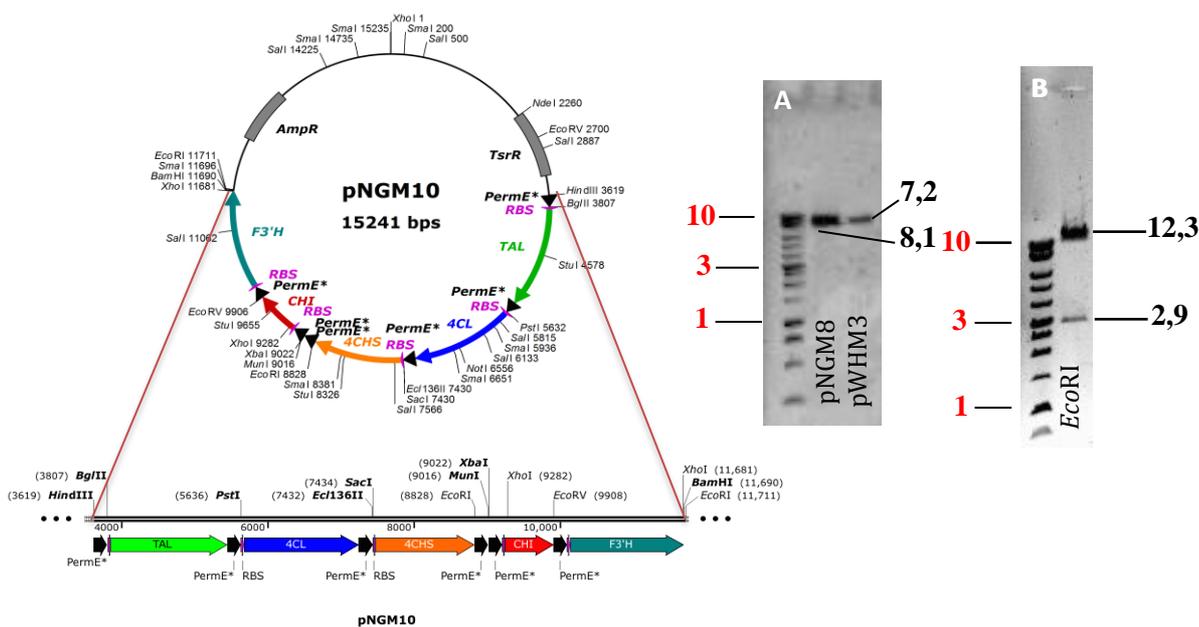
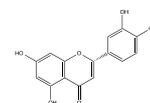


Figura 14. Plásmido pNGM10 con detalle del inserto. **A.** Gel de concentración donde se muestra el vector (pWHM3) y el inserto (pNGM8), ambos ya digeridos. **B.** Gel de electroforesis correspondiente a la digestión de comprobación de pNGM10. Las unidades de los pesos se muestran en kb. *Nota:* En el detalle del inserto se ha invertido la dirección de los genes para facilitar su visualización.



El plásmido final pNGM10 (Figura 14) fue transformado en protoplastos de *S. albus* y se inocularon 10^8 esporas en 25 mL de R5A líquido que se incubó durante 4 días. La extracción se realizó con 6 mL de 80 % de acetato de etilo + 20 % de metanol y el pellet seco resuspendido se analizó mediante HPLC-MS con el método MRM (*Multiple Reaction Monitoring*). Se detectaron tres picos mayoritarios coincidentes en masa, patrón de fragmentación y tiempo de retención con los patrones comerciales de ácido cumárico, naringenina y eriodictyol (Figura E del Anexo). Los iones obtenidos mediante análisis MRM fueron 135 (mayoritario) y 150 para el eriodictyol, con un tiempo de retención de 5,06 minutos (Figura 15).

Sin hablar de producciones, los resultados del cromatograma llaman la atención, ya que se pudieron detectar cantidades cuantificables de eriodictyol, lo cual no es esperable si se revisa la bibliografía existente hasta el momento (Figura 15). Leonard *et al.* (2006) y Zhu *et al.* (2014) dejaron clara la difícil expresión funcional de la F3'H en microorganismos debido a que se trata de una P450 hidroxilasa que requiere estar unida a una citocromo P450 reductasa (CPR) para su correcta actividad, y para superar este problema ambos grupos diseñaron una quimera del gen *F3'H* fusionado con una CPR que fue eficiente *in vivo*; sin embargo, este diseño no se aplicó al gen utilizado en el presente trabajo. A pesar de que se detectaron niveles cuantificables de eriodictyol, se estaría hablando de una muy pobre producción del orden de $0,03 \mu\text{g/L}$, que unido a una acumulación muy importante de su precursor directo naringenina ($5,29 \mu\text{g/L}$) deja clara la baja eficiencia de este enzima, y por lo tanto la necesidad del diseño de un nuevo gen sintético basado en una quimera. De todas formas, pese a las bajas producciones, el éxito de este experimento reside en el hecho de que se ha conseguido generar por primera vez *de novo* eriodictyol en el género *Streptomyces*, lo cual podrá ser mejorado en un futuro con la incorporación de una quimera a las construcciones.



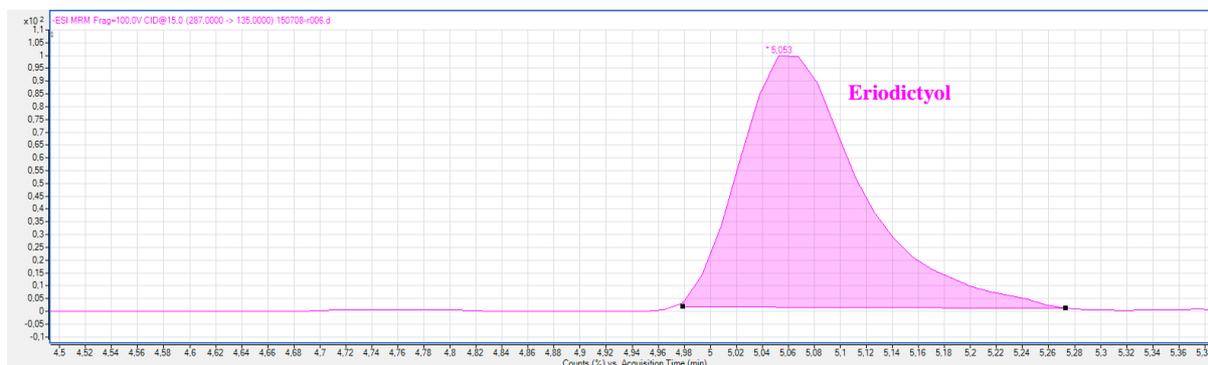
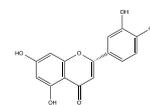


Figura 15. Cromatograma de HPL-MS tras análisis MRM que muestra la naringenina, ácido cumárico y eriodictyol producidos por pNGM10 para sus iones mayoritarios, coincidentes en todos los parámetros con los patrones comerciales (arriba). La imagen de abajo es una magnificación de la primera con el objetivo de observar mejor el pico correspondiente al eriodictyol.

4.6 Generación de cepas productoras de la flavona luteolina

La luteolina (3',4',5,7-tetrahydroxyflavona), clasificada dentro del grupo de las flavonas, es uno de los flavonoides más ampliamente distribuidos en el reino vegetal y con un mayor espectro de actividades biológicas. Al igual que el resto de flavonoides, presenta actividades anti-oxidantes, anti-inflamatorias, anti-microbianas y anti-carcinogénicas, destacando en este último caso su capacidad para inhibir la angiogénesis o reducir el tamaño tumoral *in vivo* (López-Lázaro, 2009). Todo esto, unido al hecho de que ningún grupo haya conseguido su producción heteróloga *de novo*, hace de él un compuesto de enorme interés biomédico y biotecnológico. Esta flavona presenta un alto grado de complejidad estructural debido a que la síntesis de su esqueleto químico requiere de la acción de un gran número de enzimas, pues además de la actividad *TAL*, *4CL*, *CHS* y *CHI*, requiere de la acción conjunta de la *FNS* y la *F3'H*, y por ello se podría considerar como un derivado directo de la apigenina o bien del eriodictyol, según actúe sobre uno u otro sustrato la *F3'H* y *FNS* respectivamente (Figura 16).

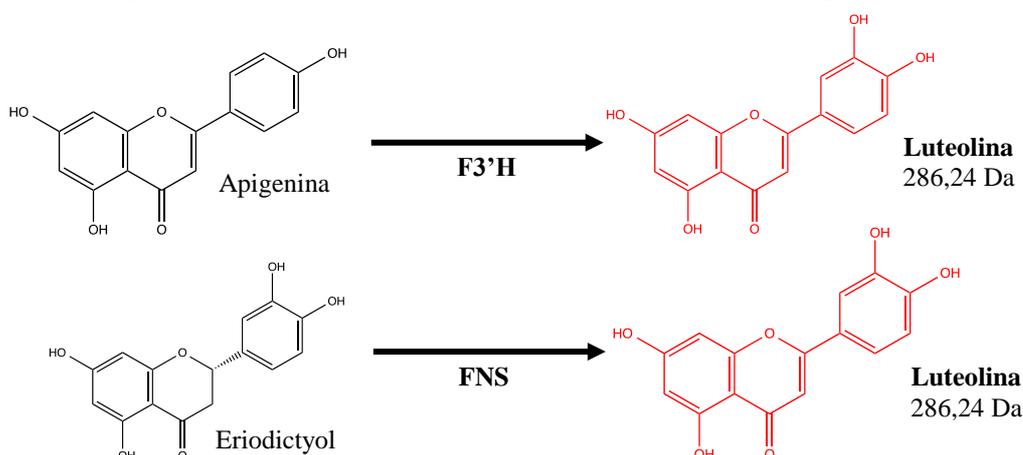
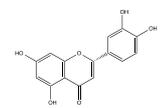
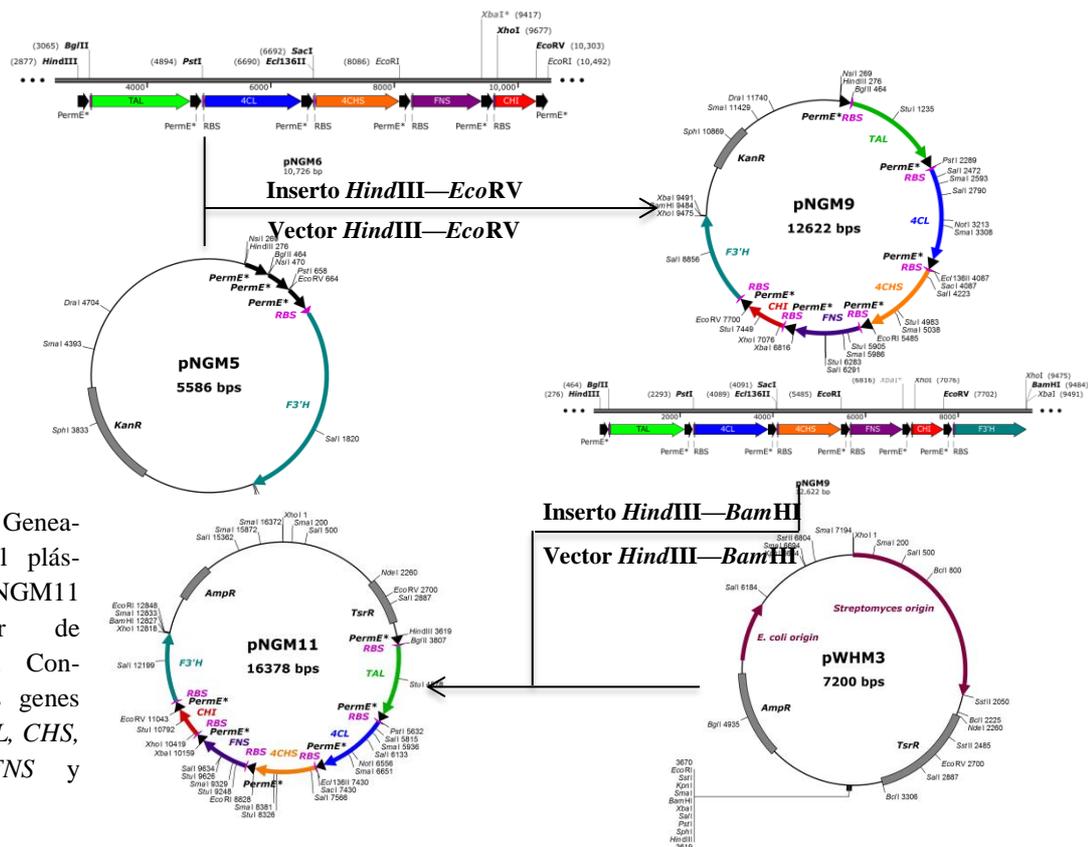


Figura 16. Ruta biosintética bimodal de la flavanona luteolina. Se muestra en Da su masa molecular. Abreviaturas: flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H) y flavona sintasa (FNS).



El plásmido que se generó para guiar la biosíntesis de luteolina fue nombrado como pNGM11 y consta de un largo cassette génico de casi 10 kb portador de los genes *TAL*, *4CL*, *CHS*, *CHI*, *FNS* y *F3'H*. Una vez más se construyó en base al modelo multi-RBS y multi-promotor, algo especialmente importante en este caso en concreto, pues el último gen (*F3'H*) se encontraría a una distancia de 6,5 kb del *P_{ermE}** en una versión uni-promotor de este cassette génico. Para llegar a la construcción pNGM11, en este caso se partió del plásmido codificador de la apigenina (pNGM6) que contiene la *FNS*, por lo que sólo fue necesario clonar pNGM6 como *Hind*III/*Eco*RV en el vector pNGM5 que porta el gen *F3'H* precedido de su propio promotor; de esta forma se generó pNGM9 cuyo cassette génico se clonó como *Hind*III/*Bam*HI (9,2 kb) en el vector bifuncional multicopia pWHM3 (7,2 kb) abierto como *Hind*III/*Bam*HI (Figura 17A) (Panel 4), lo cual fue posible gracias a que en construcciones previas se eligieron estrategias alternativas para garantizar la presencia de *Bam*HI como sitio de corte único (ver punto 4.4). Para garantizar que el clon obtenido es el correcto, se digirió con el enzima de restricción *Eco*RI obteniéndose dos pesos de 12,3 kb y 4,1 kb, y como comprobación adicional se digirió la construcción previa pNGM10 con el mismo enzima y se obtuvieron dos pesos de 12,3 kb y 2,9 kb; se obtuvo en esta última digestión una banda 1,2 kb menor que la de pNGM11, prueba irrefutable de que pNGM11 era portador de la *FNS* (Figura 17B). De todas formas se secuenció el plásmido para garantizar la presencia del primer y último gen (Figura D del Anexo) (Panel 4).

Panel 4. Genealogía del plásmido pNGM11 productor de luteolina. Contiene los genes *TAL*, *4CL*, *CHS*, *CHI*, *FNS* y *F3'H*.



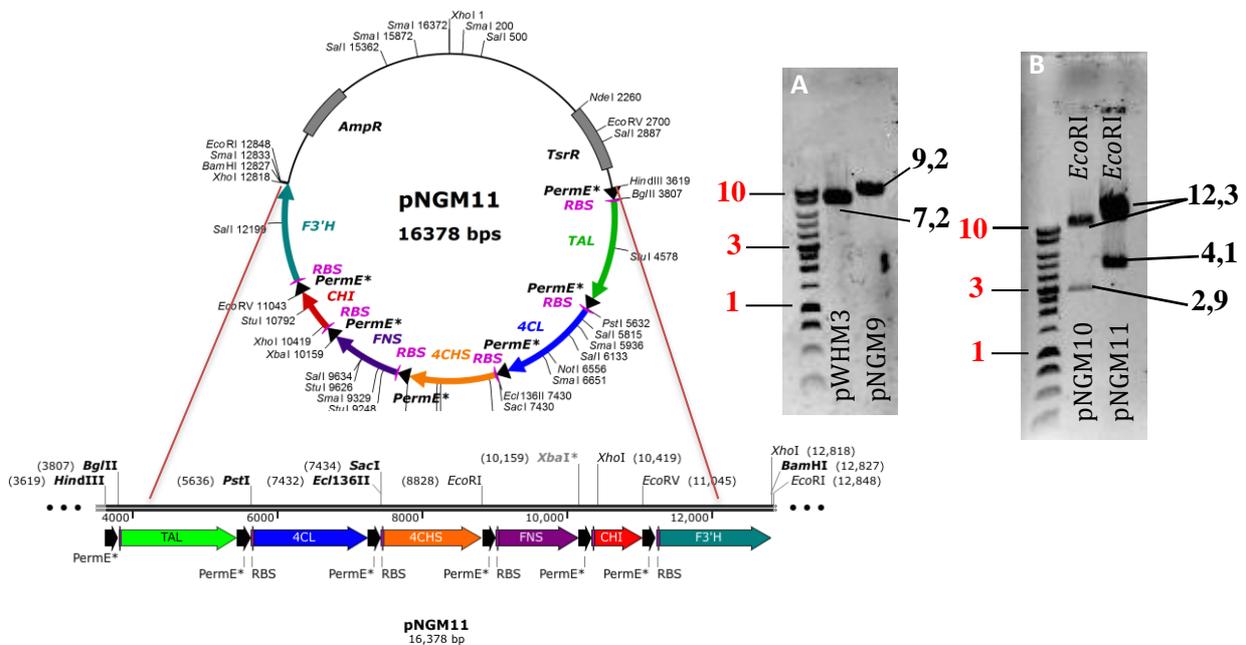
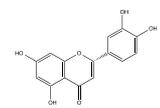


Figura 17. Plásmido pNGM11 con detalle del inserto. **A.** Gel de concentración donde se muestra el vector (pWHM3) y el inserto (pNGM9), ambos ya digeridos. **B.** Gel de electroforesis correspondiente a la digestión de comprobación de pNGM11. Las unidades de los pesos se muestran en kb. *Nota: En el detalle del inserto se ha invertido la dirección de los genes para facilitar su visualización.*

El plásmido final pNGM11 (Figura 17) fue transformado en protoplastos de *S. albus* y se inocularon 10^8 esporas en 25 mL de R5A líquido que se incubó durante 4 días. La extracción se realizó con 6 mL de 80 % de acetato de etilo + 20 % de metanol y el pellet seco resuspendido se analizó mediante HPLC-MS con el método MRM (*Multiple Reaction Monitoring*). Se detectaron tres picos mayoritarios coincidentes en masa, patrón de fragmentación y tiempo de retención con los patrones comerciales de ácido cumárico, naringenina, apigenina y luteolina (Figura E del Anexo). Los iones obtenidos mediante análisis MRM fueron 131 y 151 (mayoritario) para la luteolina, con un tiempo de retención de 5,14 minutos (Figura 18).

Los resultados del cromatograma ratifican una vez más la ineficiencia de la F3'H y la necesidad de la incorporación de un nuevo diseño basado en una quimera a los cassettes génicos, ya que se detectaron niveles bajos pero cuantificables de luteolina (0,37 $\mu\text{g/L}$) que contrastan con las altas producciones de su precursor apigenina no hidroxilado en la posición 3' (9,77 $\mu\text{g/L}$). Sin embargo, se detectaron niveles bajos del precursor naringenina del orden de 0,29 $\mu\text{g/L}$ que son positivos, ya que indican una vez más que la FNS es altamente eficiente en realizar la oxidación del heterociclo. De nuevo, pese a las bajas producciones los resultados son incluso más favorables que los del eriodictyol, ya que es la primera referencia de síntesis de luteolina *de novo* en microorganismos.

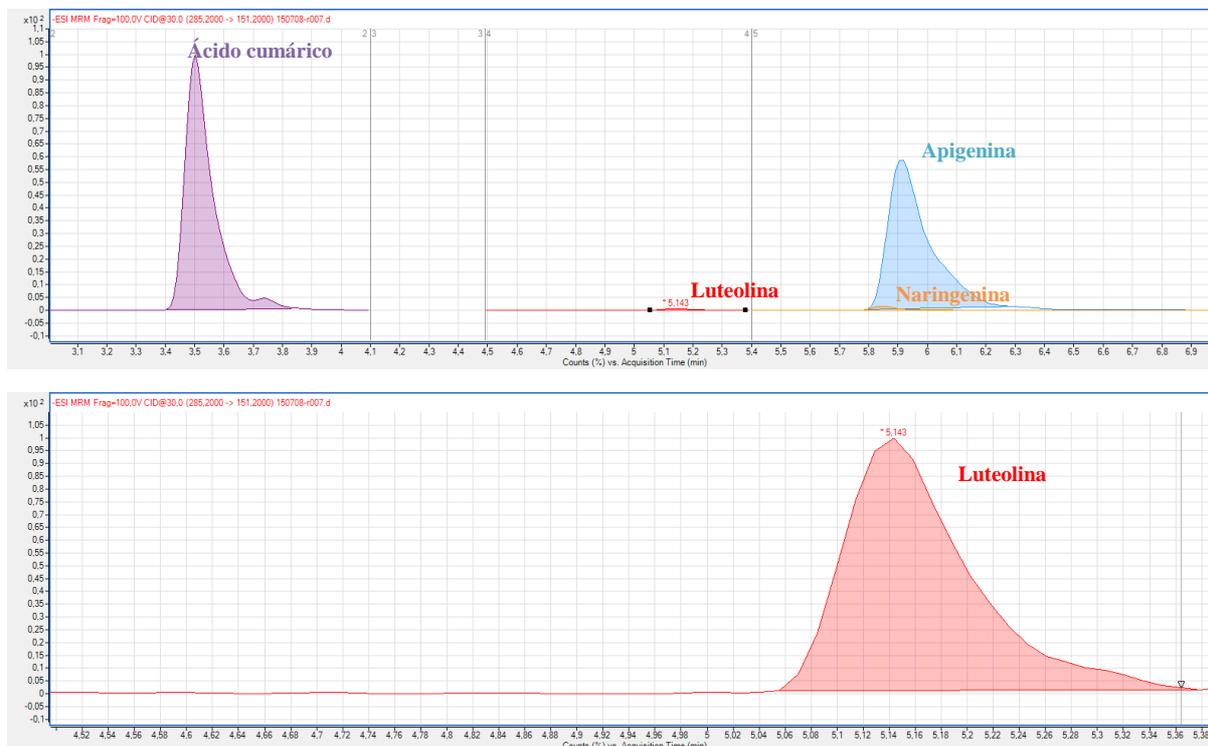
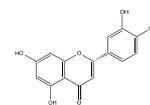
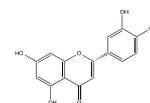


Figura 18. Cromatograma de HPL-MS tras análisis MRM que muestra la naringenina, ácido cumárico, apigenina y luteolina producidos por pNGM11 para sus iones mayoritarios, coincidentes en todos los parámetros con los patrones comerciales. La imagen de abajo es una magnificación de la primera con el objetivo de observar mejor el pico correspondiente a la luteolina.

5. Conclusiones

1. Se ha logrado construir una vía de biosíntesis heteróloga *de novo* con genes funcionales en la especie *S. albus* para:
 - a. Las flavanonas naringenina y eriodictyol.
 - b. Las flavonas apigenina y luteolina.
2. Se ha optimizado un protocolo de extracción a partir de medio de cultivo formado por 80% de acetato de etilo + 20% de metanol.
3. Se ha demostrado el limitado funcionamiento de la F3'H, lo cual establece la necesidad del desarrollo de una futura quimera portadora de una reductasa.
4. Se abre la puerta a nuevas estrategias de ingeniería metabólica con el fin de aumentar las eficiencias de producción.

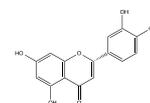


6. Agradecimientos

La realización de este trabajo no habría sido posible sin el soporte conjunto de cinco pilares fundamentales, hasta tal punto que con la falta de alguno de ellos todo habría sido mucho más difícil.

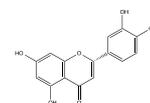
- *Dicen que todos tenemos un ángel de la guarda que nos protege y nos guía por el camino adecuado, pero algunas veces estos ángeles se materializan y toman el nombre de una persona que, por azar o por destino, se cruza en nuestro viaje. Gracias por confiar en mí con fe ciega, incluso cuando a mí más me costaba hacerlo, por escuchar mis dilemas y por cogerme de la mano y mostrarme un nuevo camino que se encontraba hasta entonces oculto para mis ojos, todo ello siempre acompañado de tu característico “Es que ye para matarte”.*
- *Gracias a Felipe, por ser el tutor que cualquiera querría tener, por preocuparse en todo momento por mí, por estar siempre disponible para cualquier duda y por guiarme con paciencia por un nuevo camino que me era casi totalmente desconocido en un principio, transmitiéndome desde un primer momento ilusión y confianza en mis capacidades.*
- *Gracias a mi otra familia, la que vive en ese pequeño laboratorio al fondo del pasillo que algunos llaman “Lomboratorio” y por el que muchos pasan y algunos dejan huella. Gracias a Javi y Juan por sus consejos, porque con ellos cerca, eso de que “nunca te acostarás sin saber una cosa más” se cumple cada día y más de una vez; así como a los que habiendo llegado más tarde se han ganado un lugar importante: Jorge, Aro, Marty, Lucía, Coral y Saúl, con los que siempre es posible compartir una divertida conversación que te haga olvidar la frustración de un mal experimento. Pero no puedo terminar esta página sin agradecer a la persona que me ha aguantado día tras día y codo con codo, la maestra que me ha enseñado todo en este tiempo respondiendo todas mis preguntas con paciencia estoica y envidiable, siempre dispuesta a resolver cualquier duda con una sonrisa. Gracias por todo Laura, sabes que personas que hacen tanto por los demás dejan una huella difícil de borrar.*
- *Agradecer también, por supuesto, a mi familia y amigos, por TODO, no hace falta escribir nada más.*
- *Y por último, no me olvido de agradecer a todos mis profesores que, al igual que un cincel en manos de un escultor experto, han tallado durante cinco años una piedra burda para generar algo semejante a un futuro investigador.*

Ignacio Gutiérrez del Río Menéndez

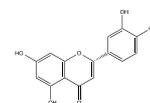


7. Bibliografía

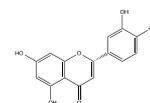
- Andersen, O. M., & Markham, K. R. (2006). *Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications*. Florida: Taylor & Francis Group (CRC Press).
- BCC Research (2014). Nutraceuticals: Global Markets. Retrieved from <http://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/nutraceuticals-markets-report-fod013e.html>
- Bibb, M. J., Janssen, G. R., & Ward, J. M. (1986). Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin-resistance gene (*ermE*) of *S. erythraeus*. *Gene*, *41*(2-3), E357–E368.
- Bohn, T. (2014). Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Reviews*, *72*(7), 429–452.
- Brosius, J. (1989). Superpolylinkers in cloning and expression vectors. *DNA (Mary Ann Liebert, Inc.)*, *8*(10), 759–77.
- Chater, K., & Wilde, L. (1980). *S. albus* G mutants defective in the SalI restriction-modification system. *Society for General Microbiology*, *116*, 323–334.
- Chaudhuri, S., Sengupta, B., Taylor, J., Pahari, B. P., & Sengupta, P. K. (2013). Interactions of Dietary Flavonoids with Proteins: Insights from Fluorescence Spectroscopy and Other Related Biophysical Studies. *Curr Drug Metab*, *14*(4):491-503.
- Chauhan, B., Kumar, G., Kalam, N., & Ansari, S. H. (2013). Current concepts and prospects of herbal nutraceutical: a review. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, *4*(1), 4–8.
- Chua, L. S. (2013). A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, *150*(3), 805–817.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, *26*(8), 1001–1043.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scaccocchio, B., & Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, *11*(4), 1321–1342.
- Das, L., Bhaumik, E., Raychaudhuri, U., & Chakraborty, R. (2012). Role of nutraceuticals in human health. *Journal of Food Science and Technology*, *49*(5), 173–183.
- De Lima Procópio, R. E., da Silva, I. R., Martins, M. K., de Azevedo, J. L., & de Araújo, J. M. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, *16*(5), 466–471.
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, *18*(14), 1818–92.



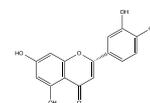
- Du, H., Huang, Y., & Tang, Y. (2010). Genetic and metabolic engineering of isoflavonoid biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(5), 1293–1312.
- Espín, J. C., García-Conesa, M. T., & Tomás-Barberán, F. a. (2007). Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2986–3008.
- Falcone Ferreyra, M. L., Rius, S. P., & Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 3(7), 1–15.
- Fantini, M., Benvenuto, M., Masuelli, L., Frajese, G., Tresoldi, I., Modesti, A., & Bei, R. (2015). In Vitro and in Vivo Antitumoral Effects of Combinations of Polyphenols, or Polyphenols and Anticancer Drugs: Perspectives on Cancer Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5).
- Flärdh, K., & Buttner, M. J. (2009). *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews. Microbiology*, 7(1), 36–49.
- Gomez-Escribano, J. P., & Bibb, M. J. (2011). Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microbial Biotechnology*, 4(2), 207–15.
- González-Sarrías, A., Larrosa, M., García-Conesa, M. T., Tomás-Barberán, F. a, & Espín, J. C. (2013). Nutraceuticals for older people: facts, fictions and gaps in knowledge. *Maturitas*, 75(4), 313–34.
- González-Vallinas, M., González-Castejón, M., Rodríguez-Casado, A., & Ramírez de Molina, A. (2013). Dietary phytochemicals in cancer prevention and therapy: A complementary approach with promising perspectives. *Nutrition Reviews*, 71(9), 585–599.
- Hollman, P. C. H. (2014). Unravelling of the health effects of polyphenols is a complex puzzle complicated by metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 559, 100–105.
- Hwang, E. Il, Kaneko, M., Ohnishi, Y., & Horinouchi, S. (2003). Production of plant-specific flavanones by *E. coli* containing an artificial gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5), 2699–706.
- Hwang, K., Kim, H. U., Charusanti, P., Palsson, B. Ø., & Lee, S. Y. (2013). Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 32(2), 1–14.
- Jiang, H., Wood, K. V, & Morgan, J. A. (2005). Metabolic engineering of the phenylpropanoid pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), 2962–9.
- Joo, E. J., Cress, B. F., & Koffas, M. A. G. (2014). *Using Recombinant Microorganisms for the Synthesis and Modification of Flavonoids and Stilbenes* (Vol. 1). Elsevier Inc.
- Kaneko, M., Ohnishi, Y., & Horinouchi, S. (2003). Cinnamate: coenzyme A ligase from the filamentous bacterium *S. coelicolor* A3 (2). *J Bacteriol*, 185(1), 20–27.
- Khushnud, T., & Mousa, S. a. (2013). Potential role of naturally derived polyphenols and their nanotechnology delivery in cancer. *Molecular Biotechnology*, 55(1), 78–86.
- Kieser, T., Chater, K., Bibb, M., Buttner, M., & Hopwood, D. (2000). *Practical Streptomyces Genetics* (England: J).



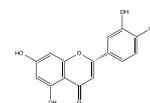
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2007). Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *The Scientific World Journal*, 73, 637–670.
- Kyndt, J. A., Meyer, T. E., Cusanovich, M. A., & Van Beeumen, J. J. (2002). Characterization of a bacterial tyrosine ammonia lyase, a biosynthetic enzyme for the photoactive yellow protein. *FEBS Letters*, 512(1-3), 240–4.
- Lee, J. W., Na, D., Park, J. M., Lee, J., Choi, S., & Lee, S. Y. (2012). Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals. *Nature Chemical Biology*, 8(6), 536–46.
- Leonard, E., Lim, K.-H., Saw, P.-N., & Koffas, M. A. G. (2007). Engineering central metabolic pathways for high-level flavonoid production in *E. coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(12), 3877–86.
- Leonard, E., Yan, Y., Fowler, Z. L., Li, Z., Lim, C.-G., Lim, K.-H., & Koffas, M. A. G. (2008). Strain improvement of recombinant *E. coli* for efficient production of plant flavonoids. *Molecular Pharmaceutics*, 5(2), 257–65.
- Leonard, E., Yan, Y., & Koffas, M. A. G. (2006). Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in *E. coli*. *Metabolic Engineering*, 8(2), 172–81.
- Li, A., Li, S., Zhang, Y., Xu, X., Chen, Y., & Li, H. (2014). Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *Nutrients*, 6, 6020–6047.
- Li, M.-J., Yin, Y.-C., Wang, J., & Jiang, Y.-F. (2014). Green tea compounds in breast cancer prevention and treatment. *World Journal of Clinical Oncology*, 5(3), 520–8.
- Liu, K., Cho, Y.-Y., Yao, K., Nadas, J., Kim, D. J., Cho, E.-J., ... Dong, Z. (2011). Eriodictyol inhibits RSK2-ATF1 signaling and suppresses EGF-induced neoplastic cell transformation. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(3), 2057–66.
- Liu, R. H. (2013). Health-Promoting Components of Fruits and Vegetables in the Diet. *Advances in Nutrition*, 4(3), 384S–392S.
- Liu, Y., & Wang, M.-W. (2008). Botanical drugs: challenges and opportunities: contribution to Linnaeus Memorial Symposium 2007. *Life Sciences*, 82(9-10), 445–9.
- López-Lázaro, M. (2009). Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 9(1), 31–59.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747.
- Manteca, A., Claessen, D., Lopez-Iglesias, C., & Sanchez, J. (2007). Aerial hyphae in surface cultures of *S. lividans* and *S. coelicolor* originate from viable segments surviving an early programmed cell death event. *FEMS Microbiology Letters*, 274(1), 118–25.
- Marín Fernández, L. (2015). *Producción heteróloga de novo de estilbenos y flavonoides en Streptomyces*.



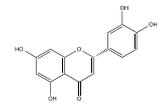
- Marín, L., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2015). Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *BioMed Research International*, 2015, 1-18.
- Miguélez, E. M., Hardisson, C., & Manzanal, M. B. (1999). Hyphal death during colony development in *S. antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *The Journal of Cell Biology*, 145(3), 515–25.
- Miyahisa, I., Funa, N., Ohnishi, Y., Martens, S., Moriguchi, T., & Horinouchi, S. (2006). Combinatorial biosynthesis of flavones and flavonols in *E. coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(1), 53–58.
- Nakashima, N., Mitani, Y., & Tamura, T. (2005). Actinomycetes as host cells for production of recombinant proteins. *Microbial Cell Factories*, 4(1), 7.
- Nasri, H., Baradaran, A., Shirzad, H., & Rafieian-Kopaei, M. (2014). New concepts in nutraceuticals as alternative for pharmaceuticals. *International Journal of Preventive Medicine*, 5(12), 1487–99.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75(3), 311–35.
- Pan, H. X., Li, J. A., He, N. J., Chen, J. Y., Zhou, Y. M., Shao, L., & Chen, D. J. (2011). Improvement of spinosad production by overexpression of gtt and gdh controlled by promoter P_{ermE^*} in *Saccharopolyspora spinosa* SIPI-A2090. *Biotechnology Letters*, 33(4), 733–739.
- Pandurangan, A. K., & Esa, N. M. (2014). Luteolin, a bioflavonoid inhibits colorectal cancer through modulation of multiple signaling pathways: A review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(14), 5501–5508.
- Park, S. R., Paik, J. H., Ahn, M. S., Park, J. W., & Yoon, Y. J. (2010). Biosynthesis of plant-specific flavones and flavonols in *S. venezuelae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(9), 1295–9.
- Park, S. R., Park, J. W., Jung, W. S., Han, A. R., Ban, Y.-H., Kim, E. J., ... Yoon, Y. J. (2008). Heterologous production of epothilones B and D in *S. venezuelae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(1), 109–17.
- Park, S. R., Yoon, J. A., Paik, J. H., Park, J. W., Jung, W. S., Ban, Y.-H., ... Yoon, Y. J. (2009). Engineering of plant-specific phenylpropanoids biosynthesis in *S. venezuelae*. *Journal of Biotechnology*, 141(3-4), 181–8.
- Petrick, J. L., Steck, S. E., Bradshaw, P. T., Trivers, K. F., Abrahamson, P. E., Engel, L. S., ... Gammon, M. D. (2015). Dietary intake of flavonoids and oesophageal and gastric cancer: incidence and survival in the United States of America (USA). *British Journal of Cancer*, 1–10.
- Ravishankar, D., Rajora, A. K., Greco, F., & Osborn, H. M. I. (2013). Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(12), 2821–31.
- Romano, B., Pagano, E., Montanaro, V., Fortunato, A. L., Milic, N., & Borrelli, F. (2013). Novel insights into the pharmacology of flavonoids. *Phytotherapy Research*, 27(11), 1588–1596.



- Rusznayk, S., & Szent-Györgyi, A. (1936). Vitamin P. Flavonols as Vitamins. *Nature*, 138(3479).
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (CSHL Press).
- Santos, C. N. S., Koffas, M., & Stephanopoulos, G. (2011). Optimization of a heterologous pathway for the production of flavonoids from glucose. *Metabolic Engineering*, 13(4), 392–400.
- Schmitt-John, T., & Engels, J. W. (1992). Promoter constructions for efficient secretion expression in *S. lividans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36(4), 493–8.
- Song, M. C., Kim, E. J., Kim, E., Rathwell, K., Nam, S., & Yoon, Y. J. (2014). Microbial biosynthesis of medicinally important plant secondary metabolites. *Natural Product Reports*, 15, 1–13.
- Sporn, M. B., & Liby, K. T. (2005). Cancer chemoprevention: scientific promise, clinical uncertainty. *Nature Clinical Practice. Oncology*, 2(10), 518–25.
- Srividya, A. R., Venkatesh, N., & Vishnuvarthan, V. J. (2010). Nutraceutical As Medicine. *Pharmanest*, 1(2), 132–145.
- Tong, X., & Pelling, J. (2012). NIH Public Access. *Anticancer Anticancer Med Chem*, 29(6), 997–1003.
- Trantas, E. a., Koffas, M. a. G., Xu, P., & Ververidis, F. (2015). When plants produce not enough or at all: metabolic engineering of flavonoids in microbial hosts. *Frontiers in Plant Science*, 6(2), 1–16.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246.
- Van Dissel, D., Claessen, D., & van Wezel, G. P. (2014). *Morphogenesis of streptomyces in submerged cultures*. *Advances in Applied Microbiology* (1st ed., Vol. 89). Elsevier Inc.
- Vara, J., Lewandowska-Skarbek, M., Wang, Y. G., Donadio, S., & Hutchinson, C. R. (1989). Cloning of genes governing the deoxysugar portion of the erythromycin biosynthesis pathway in *Saccharopolyspora erythraea* (*S. erythreus*). *Journal of Bacteriology*, 171(11), 5872–81.
- Verma, A. K., & Pratap, R. (2010). The biological potential of flavones. *Natural Product Reports*, 27(11), 1571–1593.
- Ververidis, F., Trantas, E., Douglas, C., Vollmer, G., Kretzschmar, G., & Panopoulos, N. (2007). Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products . Part II : Reconstruction of multienzyme pathways in plants and microbes. *Biotechnology Journal*, 2, 1235–1249.
- Vrancken, K., & Anné, J. (2009). Secretory production of recombinant proteins by *Streptomyces*. *Future Microbiology*, 4(2), 181–188.
- Wang, S., Zhang, J., Chen, M., & Wang, Y. (2013). Delivering flavonoids into solid tumors using nanotechnologies. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 10(10), 1411–28.
- Wang, Y., Chen, S., & Yu, O. (2011). Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(4), 949–956.



- Watts, K. T., Lee, P. C., & Schmidt-Dannert, C. (2004). Exploring recombinant flavonoid biosynthesis in metabolically engineered *E. coli*. *Chembiochem : A European Journal of Chemical Biology*, 5(4), 500–7.
- Weston, L. a., & Mathesius, U. (2013). Flavonoids: Their Structure, Biosynthesis and Role in the Rhizosphere, Including Allelopathy. *Journal of Chemical Ecology*, 39(2), 283–297.
- Wu, J., Du, G., Zhou, J., & Chen, J. (2014). Systems metabolic engineering of microorganisms to achieve large-scale production of flavonoid scaffolds. *Journal of Biotechnology*, 188, 72–80.
- Yagüe, P., López-garcía, M. T., Rioseras, B., Sánchez, J., & Manteca, Á. (2013). Pre-sporulation stages of *Streptomyces* differentiation : state-of- the-art and future perspectives. *FEMS Microbiol Lett*, 342(2), 79–88.
- Zaburanyi, N., Rabyk, M., Ostash, B., Fedorenko, V., & Luzhetskyy, A. (2014). Insights into naturally minimised *S. albus* J1074 genome. *BMC Genomics*, 15(1), 97.
- Zhu, S., Wu, J., Du, G., Zhou, J., & Chen, J. (2014a). Efficient synthesis of eriodictyol from l-tyrosine in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(10), 3072–3080.
- Zhu, Y., Liao, S., Ye, J., & Zhang, H. (2012). Cloning and characterization of a novel tyrosine ammonia lyase-encoding gene involved in bagremycins biosynthesis in *Streptomyces*. sp. *Biotechnology Letters*, 34(2), 269–274.



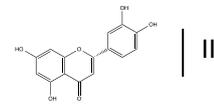
ANEXO

pNGM4RP		CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment	
permE*+TAL	-----GCACGGGTCGATCTTGACGNNNNNNNAGAGNG 34 GTCGCGGTTGATCGGCATCGCAGGTGCACGGGTCGATCTTGACGGCTGGCGAGAGGTG 300 *****	pNGM4UP	-----CGCCGGNNCCGGNNCC 18 GGATCCTTTGATATCTCAGACGATGATGCCGTGGGAGACACCCCGGAGCGCGACGC 60 *****
pNGM4RP	NGGGAGGATCTGACCGACGGTCCACAGTGGACCGNNTGCTGTTGGGCAACA 94 permE*+TAL CGGGAGGATCTGACCGACGGTCCACAGTGGACCGATGCTGTTGGGCAACA 360 *****	pNGM4UP	CAGGNCCGCTTGGGTCGGGGCTCAGGNNNNNNNNNNNNNGTCTCCAGCACGGC 78 CHI CAGGACCGCTTGGGTCGGGGCTCAGGCGGTCTCCGCGATGTTCTCCAGCACGGC 120 *****
pNGM4RP	CTCCCGGTTGGTAGGAGACAGATCTGGTGGGTAACAGGCTAACCTCCGATAG 154 permE*+TAL CTCCCGGTTGGTAGGATCTAGCCAGATCTGGTGGGTAACAGGCTAACCTCCGATAG 420 *****	pNGM4UP	CGCCGAGACNCCTTGTCTCGATGACGGCGGTCTCTCTCCGGATGTTGCGCTCTC 138 CHI CGCCGAGACNCCTTGTCTCGATGACGGCGGTCTCTCTCCGGATGTTGCGCTCTC 180 *****
pNGM4RP	AGGACGACATGACCTCCAGTCCAGCCGGAAGGACTGCTCGCCCTGGACGGCC 214 permE*+TAL AGGACGACATGACCTCCAGTCCAGCCGGAAGGACTGCTCGCCCTGGACGGCC 480 *****	pNGM4UP	CGAGAAGGAGGCCAGGATGCCCTCCGGGACTGGCGGTAGAACAACGCTGGCCGG 198 CHI CGAGAAGGAGGCCAGGATGCCCTCCGGGACTGGCGGTAGAACAACGCTGGCCGG 240 *****
pNGM4RP	TCACCTGTGTCAGTGGGAAGCATGCCACCCACGCTCCGATCTCCTGACCCCG 274 permE*+TAL TCACCTGTGTCAGTGGGAAGCATGCCACCCACGCTCCGATCTCCTGACCCCG 540 *****	pNGM4UP	GGGAACTTGACCTTCTGAAGGCTCCCGAACCTTCTCGATTCGGCGGGCTCCGCT 258 CHI GGGAACTTGACCTTCTGAAGGCTCCCGAACCTTCTCGATTCGGCGGGCTCCGCT 300 *****
pNGM4RP	CCCTCCGGGAAGCTGGCGCGCCACGCCGCTGGAGCCGCAATCGCCGAACAG 334 permE*+TAL CCCTCCGGGAAGCTGGCGCGCCACGCCGCTGGAGCCGCAATCGCCGAACAG 600 *****	pNGM4UP	GCGTANGTCCCAAGGACTTATGTGGCCACGAGTCTCCATGACCTTCTGCTGTA 318 CHI GCGTANGTCCCAAGGACTTATGTGGCCACGAGTCTCCATGACCTTCTGCTGTA 360 *****
pNGM4RP	GCCACATCTACGGATCAGCAGCGGTTNNNNNNNNNGCCACCCGCTGATCGGG 394 permE*+TAL GCCACATCTACGGATCAGCAGCGGTTNNNNNNNNNGCCACCCGCTGATCGGG 659 *****	pNGM4UP	CTCCGCGCGGCCAGGGGAGGATCTTCGACCGGGATGAGCTTCTGAAACGGCCG 378 CHI CTCCGCGCGGCCAGGGGAGGATCTTCGACCGGGATGAGCTTCTGAAACGGCCG 420 *****
pNGM4RP	GACAGGGGGGAACTCCAGCANAACCTCATACCACTTGGCCACCGCGCTCGCC 454 permE*+TAL GACAGGGGGGAACTCCAGCANAACCTCATACCACTTGGCCACCGCGCTCGCC 719 *****	pNGM4UP	NATGATGTCGGGTAGAAAGTGGAGGTTGGACAGCTCTCGCTGGTCTGCCCTNN 438 CHI NATGATGTCGGGTAGAAAGTGGAGGTTGGACAGCTCTCGCTGGTCTGCCCTNN 480 *****
pNGM4RP	AAGCTCTCTGGGCGAAGCCGCGCTCATGCTCGCCCGCTCACTCCATCTCCAG 514 permE*+TAL AAGCTCTCTGGGCGAAGCCGCGCTCATGCTCGCCCGCTCACTCCATCTCCAG 779 *****	pNGM4UP	CTTGGCCGAGGAGCGGACCGCTTGTCTCCAGTAGAGCCGATGCGGTAACCT 498 CHI CTTGGCCGAGGAGCGGACCGCTTGTCTCCAGTAGAGCCGATGCGGTAACCT 540 *****
pNGM4RP	GGCCCTCCGGTCCCTCCCGAACATCGACCGCATCGTCCGCTGTAAGCCGG 574 permE*+TAL GGCCCTCCGGTCCCTCCCGAACATCGACCGCATCGTCCGCTGTAAGCCGG 839 *****	pNGM4UP	GATGAATTCGCCCTCGATGTCNGGCCCGCTCGCNGNNCCCGAGGAAGTNGTCT 558 CHI GATGAATTCGCCCTCGATGTCNGGCCCGCTCGCNGNNCCCGAGGAAGTNGTCT 600 *****
pNGM4RP	TTGCCCCGAAAGTNGCGGCCANGGCCCTCGCCGCTCCGCGACTCACCCGCC 634 permE*+TAL TTGCCCCGAAAGTNGCGGCCANGGCCCTCGCCGCTCCGCGACTCACCCGCC 898 *****	pNGM4UP	GNCGNAGCGGGN-TNGNCGANGGGGAACTNAGGAACCTNNCTGNNNNNN 617 CHI GNCGNAGCGGGN-TNGNCGANGGGGAACTNAGGAACCTNNCTGNNNNNN 660 *****
pNGM4RP	NNNNNNNAGNCCGCGCCGCGGCTCGCCGCGCTCGCCGCGG-CCCTCT----- 1003 permE*+TAL CTTGACAGGAA--GCCGCGCGCTGATGACCGCTCTCGCCGCGG-CCCTCT----- 1003 *****		

Figura A: Secuenciación del primer (*p_{permE*}+TAL*) y último gen (*CHI*) de la construcción pNGM4.

pNGM7RP	-----TTAANN-----GAGTGTCCGTTGAGTGGGGCTTGGCCCGATGCTA 43 permE*+TAL GCCAAAGAGCTCAAAAAGCTTGGAGTGTCCGTTGAGTGGGGCTTGGCCCGATGCTA 240 *****	pNGM7UP	-----CGCCGGNNCCGGNNCC 18 GGATCCTTTGATATCTCAGACGATGATGCCGTGGGAGACACCCCGGAGCGCGACGC 60 *****
pNGM7RP	GTCGCGGTTGNNNNNNNNNNNNGTGCACCGGTCGATCTGACGGTGNNNNAGGG 103 permE*+TAL GTCGCGGTTGATCGGATCGCAGGTGCAAGGTCGATCTGACGGTGNNNNAGGG 300 *****	pNGM7UP	CAGGNCCGCTTGNNTCCGGGCTCAGGNNNNNNNNNNNNNGTCTCCAGCACGGC 78 CHI CAGGACCGCTTGGGTCGGGGCTCAGGCGGTCTCCGCGATGTTCTCCAGCACGGC 120 *****
pNGM7RP	CGGGAGGNTCTGACCGACGGGCTCCACAGTGGACCGCGTGTGTTGGGCAACA 163 permE*+TAL CGGGAGGATCTGACCGACGGGCTCCACAGTGGACCGCGTGTGTTGGGCAACA 360 *****	pNGM7UP	CGCCGAGACCGCTTGTCTCGATGACGGCGGTCTCTCTCCGGATGTTGCGCTCTC 138 CHI CGCCGAGACCGCTTGTCTCGATGACGGCGGTCTCTCTCCGGATGTTGCGCTCTC 180 *****
pNGM7RP	CTCCCGGTTGGTAGGAGACAGATCTGGTGGGTAACAGGCTAACCTCCGATAG 223 permE*+TAL CTCCCGGTTGGTAGGATCTAGCCAGATCTGGTGGGTAACAGGCTAACCTCCGATAG 420 *****	pNGM7UP	CGAGAAGGAGGCCAGGATGCCCTCCGGGACTGGCGGTAGAACAACGCTGGCCGG 198 CHI CGAGAAGGAGGCCAGGATGCCCTCCGGGACTGGCGGTAGAACAACGCTGGCCGG 240 *****
pNGM7RP	AGGACGACATGACCTCCAGTCCAGCCGGAAGGACTGCTCGCCCTGGACGGCC 283 permE*+TAL AGGACGACATGACCTCCAGTCCAGCCGGAAGGACTGCTCGCCCTGGACGGCC 480 *****	pNGM7UP	GGGAACTTGACCTTCTGAAGGCTCCCGAACCTTCTCGATTCGGCGGGCTCCGCT 258 CHI GGGAACTTGACCTTCTGAAGGCTCCCGAACCTTCTCGATTCGGCGGGCTCCGCT 300 *****
pNGM7RP	CCCTCCGGAAGCTGGCGCGCCACGCCGCTGGAGCCGCAATCGCCGAACAG 403 permE*+TAL CCCTCCGGAAGCTGGCGCGCCACGCCGCTGGAGCCGCAATCGCCGAACAG 600 *****	pNGM7UP	GCGTANGTCCCAAGGACTTATGTGGCCACGAGTCTCCATGACCTTCTGCTGTA 318 CHI GCGTANGTCCCAAGGACTTATGTGGCCACGAGTCTCCATGACCTTCTGCTGTA 360 *****
pNGM7RP	GCCACATCTACGGATCAGCAGCGGTTNNNNNNNNNGCCACCCGCTGATCGGG 463 permE*+TAL GCCACATCTACGGATCAGCAGCGGTTNNNNNNNNNGCCACCCGCTGATCGGG 660 *****	pNGM7UP	CTCCGCGCGGCCAGGGGAGGATCTTCGACCGGGATGAGCTTCTGAAACGGCCG 378 CHI CTCCGCGCGGCCAGGGGAGGATCTTCGACCGGGATGAGCTTCTGAAACGGCCG 420 *****
pNGM7RP	ACCAGGGCGGAACTCCAGCAGAACTCATACCACTTGGCCACCGCGCTCGCC 523 permE*+TAL ACCAGGGCGGAACTCCAGCAGAACTCATACCACTTGGCCACCGCGCTCGCC 720 *****	pNGM7UP	GATGATGTCGGGTAGAAAGTGGAGGTTGGACAGCTCTCGCTGGTCTGNNCTTCA 438 CHI GATGATGTCGGGTAGAAAGTGGAGGTTGGACAGCTCTCGCTGGTCTGNNCTTCA 480 *****
pNGM7RP	AGCTCTCTGGGCGAAGCCCGGCCCTCATGCTCGCCCGCTCACTCCATCTCCAG 583 permE*+TAL AGCTCTCTGGGCGAAGCCCGGCCCTCATGCTCGCCCGCTCACTCCATCTCCAG 780 *****	pNGM7UP	CTTGGCCGAGGAGCGGACCGCTTGTCTCCAGTAGAGCCGATGCGGTAACCT 498 CHI CTTGGCCGAGGAGCGGACCGCTTGTCTCCAGTAGAGCCGATGCGGTAACCT 540 *****
pNGM7RP	GCCTCCGGTCCCTCCCGAACATCGACCGCATCGTCCGCTGCTGAACCGGG 643 permE*+TAL GCCTCCGGTCCCTCCCGAACATCGACCGCATCGTCCGCTGCTGAACCGGG 840 *****	pNGM7UP	GATGAATTCGCCCTCGATGTCNGGCCCGCTCGCNGNNCCCGAGGAAGTNGTCT 558 CHI GATGAATTCGCCCTCGATGTCNGGCCCGCTCGCNGNNCCCGAGGAAGTNGTCT 600 *****
pNGM7RP	TCGCCCCGAAAGTNGCGGCCANGGCCCTCGCCGCTCCGCGACTCACCCGCC 703 permE*+TAL TCGCCCCGAAAGTNGCGGCCANGGCCCTCGCCGCTCCGCGACTCACCCGCC 859 *****	pNGM7UP	GCCGACCGCGGGCTGTCAGCAGCGGGGAACTCCAGGAACCTCACCTGCACGGCG 618 CHI GCCGACCGCGGGCTGTCAGCAGCGGGGAACTCCAGGAACCTCACCTGCACGGCG 660 *****
pNGM7RP	GCCACATGCTCTCGGCTCCAGGGCGGGCGGATGATGACCCCTCCGCGCCG 763 permE*+TAL GCCACATGCTCTCGGCTCCAGGGCGGGCGGATGATGACCCCTCCGCGCCG 959 *****	pNGM7UP	GATGTCGCGCATTTAGCGCTCTCTCTCAGGAGGTTAGCTGGTTACCCCACTTCT 678 CHI GATGTCGCGCATTTAGCGCTCTCTCTCAGGAGGTTAGCTGGTTACCCCACTTCT 714 *****
pNGM7RP	CANAGCNGGNCNMGNTGGANCNCTCTGNNGGGCCCCNNANCTCNCNCCCG 823 permE*+TAL CAGGAAGCGCGGCTGATGACCGCTCTCGGGGGCCCCCTGACCCCTGCGCCCG 1019 *****		

Figura B: Secuenciación del primer (*p_{permE*}+TAL*) y último gen (*CHI*) de la construcción pNGM7.



pNGM10RP permE+TAL	-----GCTTAA-----CGAGTGNCCGTTGANTGGCGGCTTGGCCCGGATGCTA 45 GCCAAGAGCTCAAAAGCTTGGAGTGTCCGTTGAGTGGCGGCTTGGCCCGGATGCTA 240 *****	pNGM10UP F3'H	GGGTTGNNNNNNNNNNNNNNNGCGCGCTGGAGGTCAGCCGNNNNNNNCTCAATGTT 110 GGGTTGAGCAGCAGCGCCAGCGCGCTGGAGGTCAGCCGTCAGGACCTCCATGTT 120 *****
pNGM10RP permE+TAL	CTCCGGTGNNNNNNNNNNNNNNNNNGTCAAGCGTCACTTGAAGGNTGNNNNAGGTTG 105 CTCCGGTGTATCGGATGCAAGTCAAGCGTCACTTGAAGGNTGNNNNAGGTTG 300 *****	pNGM10UP F3'H	CAGCTTCTGGGGGTGACGCCACCGCCAGCTCCAGTCGAAGCCCTGCACCCAGCTGGC 170 CAGCTTCTGGGGGTGACGCCACCGCCAGCTCCAGTCGAAGCCCTGCACCCAGCTGGC 180 *****
pNGM10RP permE+TAL	CGGGAGGNTCTGACGACCGGTTCCACGCTGGCACCGGNTGCTGTTGGGCAACA 165 CGGGAGGATCTGACGACCGGTTCCACGCTGGCACCGGNTGCTGTTGGGCAACA 360 *****	pNGM10UP F3'H	GGTGAAGAACTGATGTCGGAGGCCAGGGAGGCGCCCGCAGTCGCACGCGCGCC 230 GGTGAAGAACTGATGTCGGAGGCCAGGGAGGCGCCCGCAGTCGCACGCGCGCC 240 *****
pNGM10RP permE+TAL	CGTCCGGTGTAGTAGATCGACAGTCTGGTGGGTAAACAGGCTAACCTCCCTAGG 225 CGTCCGGTGTAGTAGATCGACAGTCTGGTGGGTAAACAGGCTAACCTCCCTAGG 420 *****	pNGM10UP F3'H	GCCGAACGGGATCAGCTGAAGTCCGAGCCCTGACCTCCAGCCGGACTTCTGCCACC 290 GCCGAACGGGATCAGCTGAAGTCCGAGCCCTGACCTCCAGCCGGACTTCTGCCACC 300 *****
pNGM10RP permE+TAL	AGGACACATGACCTCCAGTCCAGCCGCGAAGGACTGCTGCGCTGGACGGCGCC 285 AGGACACATGACCTCCAGTCCAGCCGCGAAGGACTGCTGCGCTGGACGGCGCC 480 *****	pNGM10UP F3'H	CGGCAGGAACCGCTCCGGTTGAAGGCGAGGGGTCGACCACTGGTGGGTCGCGCC 350 CGGCAGGAACCGCTCCGGTTGAAGGCGAGGGGTCGACCACTGGTGGGTCGCGCC 360 *****
pNGM10RP permE+TAL	TCACCTGCTCACTGGAAGCCATCGCCACCAACCGCTCCGCACTCCGTCGACCCCG 345 TCACCTGCTCACTGGAAGCCATCGCCACCAACCGCTCCGCACTCCGTCGACCCCG 540 *****	pNGM10UP F3'H	GATGGCCAGATGTTCTCAGGAGGTGGAGCCCTTCGGATGTGTAGCCGTTGATCTC 410 GATGGCCAGATGTTCTCAGGAGGTGGAGCCCTTCGGATGTGTAGCCGTTGATCTC 420 *****
pNGM10RP permE+TAL	CCCTCCGGAACGCTGCGCGCGCCACCGCCCTGGAGCAGCCATCGCGAACAGC 405 CCCTCCGGAACGCTGCGCGCGCCACCGCCCTGGAGCAGCCATCGCGAACAGC 600 *****	pNGM10UP F3'H	GCACGACTCGGAGGCGATGTGCGGNNNNNNAGGGGGTGGCGGTCGACCGGAAAT 470 GCACGACTCGGAGGCGATGTGCGGNNNNNNAGGGGGTGGCGGTCGACCGGAAAT 480 *****
pNGM10RP permE+TAL	GCCACATCTACGGCATACAGACCGGTTNNNNNNNTGCCAACCGCTGNTGGGGGCC 465 GCCACATCTACGGCATACAGACCGGTTNNNNNNNTGCCAACCGCTGNTGGGGGCC 660 *****	pNGM10UP F3'H	CTCCTGATGACCGCCCTGGAGTGGGGAGCTGGCGGATGTGGGATCTCTTACCGCCG 530 CTCCTGATGACCGCCCTGGAGTGGGGAGCTGGCGGATGTGGGATCTCTTACCGCCG 540 *****
pNGM10RP permE+TAL	ANCAAGGCGGGAACCTCAGCAGAACCTATCTACACCTGGCCAGCGGCTGGCCCA 525 ANCAAGGCGGGAACCTCAGCAGAACCTATCTACACCTGGCCAGCGGCTGGCCCA 720 *****	pNGM10UP F3'H	GTGCGCGCCGACACAGATGTCCAGCTTCTCTGGGCTTGACCATGATGTCCGGTGGG 590 GTGCGCGCCGACACAGATGTCCAGCTTCTCTGGGCTTGACCATGATGTCCGGTGGG 600 *****
pNGM10RP permE+TAL	AGTCTCTCGGCGGAAGCCGCGCCCTATGCTGCGCGGCTCAACTCCATCTCAGG 585 AGTCTCTCGGCGGAAGCCGCGCCCTATGCTGCGCGGCTCAACTCCATCTCAGG 780 *****	pNGM10UP F3'H	GATCAGCTCGGATGNNCCAGTCCACGTCGACCGGAGCTGTGGTCCCGGGGTGAA 650 GATCAGCTCGGATGNNCCAGTCCACGTCGACCGGAGCTGTGGTCCCGGGGTGAA 660 *****
pNGM10RP permE+TAL	GCGCTCCGTCGCTCCCGGAAACCATCGACCCGATGCTGCGGTGTAACGCGGGT 645 GCGCTCCGTCGCTCCCGGAAACCATCGACCCGATGCTGCGGTGTAACGCGGGT 840 *****	pNGM10UP F3'H	CATGTTCCAGGACGAGCCCTGATCTCCGTCGCTCANGGAGCCCGCTGCCCTCGAG 710 CATGTTCCAGGACGAGCCCTGATCTCCGTCGCTCANGGAGCCCGCTGCCCTCGAG 720 *****
pNGM10RP permE+TAL	TCGCGCGGAAGTCCGCGCCGCGCCAGCCCTGCGGCGCTCCGCGGACTCACCCCGCT 705 TCGCGCGGAAGTCCGCGCCGCGCCAGCCCTGCGGCGCTCCGCGGACTCACCCCGCT 899 *****	pNGM10UP F3'H	GTGCGTCCCTTACAGCAGATGAGCTGGACAGCATGNNNTGTCTTGTCTCGGNC 770 GTGCGTCCCTTACAGCAGATGAGCTGGACAGCATGNNNTGTCTTGTCTCGGNC 780 *****
pNGM10RP permE+TAL	GNCCACATGCTCCTCGGCTCCANGGCGGGGCGATGATGACCCCTCCGCGCGGCT 765 GNCCACATGCTCCTCGGCTCCANGGCGGGGCGATGATGACCCCTCCGCGCGGCT 959 *****	pNGM10UP F3'H	GTTTCATCTGCTCTCCNN--NCCGANGANNAGGAAACCGCCGTCGACCCCTTGTGCGNN 829 GTTTCATCTGCTCTCCNN--NCCGANGANNAGGAAACCGCCGTCGACCCCTTGTGCGNN 840 *****
pNGM10RP permE+TAL	CANNAANNCGNNCCGNNNGGACCGCTCTGNNGGNNCCCGTCAACCTC----- 817 CAGGAAGCCGCGCGCTGATGAGACCGCTCTGCGGGGCGCC--TGACCTCGCGCGCC 1018 *****	pNGM10UP F3'H	CTTCATCTTCCCG----- 843 CTTCATCTTCCCG----- 900 *****

Figura C: Secuenciación del primer (p_{ermE^*+TAL}) y último gen ($F3'H$) de la construcción pNGM10.

pNGM11RP permE+TAL	-----GANTCTCNGTTCGAGTGNCGGCTTGGCCCGGATGCTA 37 GCCAAGAGCTCAAAAGCTTGGAGTGTCCGTTGAGTGGCGGCTTGGCCCGGATGCTA 240 *****	pNGM11UP F3'H	-----TCNNCCGNNCCAGCCGCTANNNGTGGCGGAGCCGCGGCTT 45 GGATCCTTCTCAGTCAAGCCGAGCCAGCCGCTAGAGCTGGCGGAGCCGCGGCTT 60 *****
pNGM11RP permE+TAL	GTCCGGTGNNNNNNNNNNNNNNNGACCGGTCGATCTTGAAGGNNNNNNNAGGTT 97 GTCCGGTGTATCGGATGCAAGTCAAGCGGTCGATCTGAGCGTGGCGAGAGGTT 300 *****	pNGM11UP F3'H	GGGTTGNNNNNNNNNNNNNNNGCGCGCTGGAGGTCAGCCGNNNNNNNCTTCAATGTT 105 GGGTTGAGCAGCAGCGCCAGCGCGCTGGAGGTCAGCCGTCAGGACCTCCATGTT 120 *****
pNGM11RP permE+TAL	NGGGAGGNTCTGACGACCGGTTCCACAGCTGGCACCGGNTGCTGTTGGGCAACA 157 CGGGAGGNTCTGACGACCGGTTCCACAGCTGGCACCGGNTGCTGTTGGGCAACA 360 *****	pNGM11UP F3'H	CAGCTTCTGGGGGTGAGGCCACCGCCAGCTCCAGTCGAAGCCCTGCACAGCGCC 165 CAGCTTCTGGGGGTGAGGCCACCGCCAGCTCCAGTCGAAGCCCTGCACAGCGCC 180 *****
pNGM11RP permE+TAL	CGTCCGGTGTAGTAGGACAGACATCTGGTGGGTAAACAGGCTAACCTCCCTAGG 217 CGTCCGGTGTAGTAGGACAGACATCTGGTGGGTAAACAGGCTAACCTCCCTAGG 420 *****	pNGM11UP F3'H	GGTGAAGAACTGATGTCGGAGGCCAGGGAGGCCCGCCGAGTCGCACGCGCCG 225 GGTGAAGAACTGATGTCGGAGGCCAGGGAGGCCCGCCGAGTCGCACGCGCCG 240 *****
pNGM11RP permE+TAL	AGGACACATGACCTCCAGTCCAGCCGCGGAAGGACTGCTGCCCTGACCGCGCC 277 AGGACACATGACCTCCAGTCCAGCCGCGGAAGGACTGCTGCCCTGACCGCGCC 480 *****	pNGM11UP F3'H	GCCGAACGGGATCAGCTGAAGTCCGAGCCCTGACCTCCAGCCGGACTTCTGCCACC 285 GCCGAACGGGATCAGCTGAAGTCCGAGCCCTGACCTCCAGCCGGACTTCTGCCACC 300 *****
pNGM11RP permE+TAL	TCANNNNNNTCAAGTCCGAAGCCATCGCCACCCAGCGCTCCGCGATCTCCGTCACCCCG 337 TCACCTGCTCAAGTCCGAAGCCATCGCCACCCAGCGCTCCGCGATCTCCGTCACCCCG 540 *****	pNGM11UP F3'H	CGGCAGGAACCGCTCCGGTTGAAGGCGAGGGGTCGACCACTGGTCCGGTCCCGCC 345 CGGCAGGAACCGCTCCGGTTGAAGGCGAGGGGTCGACCACTGGTCCGGTCCCGCC 360 *****
pNGM11RP permE+TAL	CCCTCCGGAACGCTGCGCGCGCCAGCCCGCTGNNNNNNNNNTCCGCAACAG 399 CCCTCCGGAACGCTGCGCGCGCCAGCCCGCTGNNNNNNNNNTCCGCAACAG 597 *****	pNGM11UP F3'H	GATGGCCAGATGTTCTCAGGAGGTGGAGCCCTTCGGATGTGTAGCCGTTGATCTC 405 GATGGCCAGATGTTCTCAGGAGGTGGAGCCCTTCGGATGTGTAGCCGTTGATCTC 420 *****
pNGM11RP permE+TAL	GCCACATCTACGGCATACAGACCGGTTGCTGCTCCGCAACCGCTGATCGGGGCC 457 GCCACATCTACGGCATACAGACCGGTTGCTGCTCCGCAACCGCTGATCGGGGCC 659 *****	pNGM11UP F3'H	GCACGACTCGGAGCGATGTGCGGNNNNNNNNNGGGTGGCGGTCGACCGGAAAT 465 GCACGACTCGGAGCGATGTGCGGNNNNNNNNNGGGTGGCGGTCGACCGGAAAT 480 *****
pNGM11RP permE+TAL	GANCAGGCGCGGAACCTCAGCAAGCATCATCTACACCTGGCCACCGCGCTCGCCCC 517 GANCAGGCGCGGAACCTCAGCAAGCATCATCTACACCTGGCCACCGCGCTCGCCCC 719 *****	pNGM11UP F3'H	CTCCTGATGACCGCCCTGGAGTGGGGAGCTGGCGGATGTGGGATCTCTTACCGCCG 525 CTCCTGATGACCGCCCTGGAGTGGGGAGCTGGCGGATGTGGGATCTCTTACCGCCG 540 *****
pNGM11RP permE+TAL	AAGCTCTCCTGGGCGAAGCCCGGCCCTCATGCTGCGCGGCTCAACTCCATCTCCAG 577 AAGCTCTCCTGGGCGAAGCCCGGCCCTCATGCTGCGCGGCTCAACTCCATCTCCAG 779 *****	pNGM11UP F3'H	GTGCGCGGACACAGATGTCCAGCTTCTCTGGGCTTGACCATGATGTCCGGTGGC 585 GTGCGCGGACACAGATGTCCAGCTTCTCTGGGCTTGACCATGATGTCCGGTGGC 600 *****
pNGM11RP permE+TAL	GCGCCCTCGGTCGTCGCCGAAACATCGACCGCATCTGCGCGTCAAGCGCGGG 637 GCGCCCTCGGTCGTCGCCGAAACATCGACCGCATCTGCGCGTCAAGCGCGGG 839 *****	pNGM11UP F3'H	GATCAGCTCCGGATGGCCAGTCCACCGTCGACCGGAGCTGTGGTCCCGGGGTGAA 645 GATCAGCTCCGGATGGCCAGTCCACCGTCGACCGGAGCTGTGGTCCCGGGGTGAA 660 *****
pNGM11RP permE+TAL	TTGCCCCGGAAGTCCGCGCCAGGCGACCGTGGGGCTCCGGGANTCACCCCGCT 697 TTGCCCCGGAAGTCCGCGCCAGGCGACCGTGGGGCTCCGGGANTCACCCCGCT-T 898 *****	pNGM11UP F3'H	CATGTTCCAGGACGAGCCCTGNTCTCCGTCGGTCCANGGAGCCCGCTGCCCTGAM 705 CATGTTCCAGGACGAGCCCTGNTCTCCGTCGGTCCANGGAGCCCGCTGCCCTGAM 720 *****
pNGM11RP permE+TAL	GGCCACATGCTCCTGCGCTCCAGGCGCGGGGCGATGATGACCCCTCCGCGCCG 757 GGCCACATGCTCCTGCGCTCCAGGCGCGGGGCGATGATGACCC--TCCGGCGCG 957 *****	pNGM11UP F3'H	GTGCGTCCCTCAGCGAGATGAGCGTGGCAGCATGTGGTGTCTTGTGTCGNNNN 765 GTGCGTCCCTCAGCGAGATGAGCGTGGCAGCATGTGGTGTCTTGTGTCGNNNN 780 *****
pNGM11RP permE+TAL	TGCGNNAAGCCCGCCNCCNAGTGGACCCCTCTGCGGGGCGCCNCCNCCNCCNCCN 817 TGCGNNAAGCC--GCGCGTGTGGACCCCTCTGCGGGGCGCCCTG--ACCTCGCGCC 1015 *****	pNGM11UP F3'H	NTTTCATCTGCTCTCNCNCCN-- 789 GTTTCATCTGCTCTTCCAGTGGAGGAGGAAAGCCGTCGACCCCTTGTGAGCGG 840 *****

Figura D: Secuenciación del primer (p_{ermE^*+TAL}) y último gen ($F3'H$) de la construcción pNGM11.

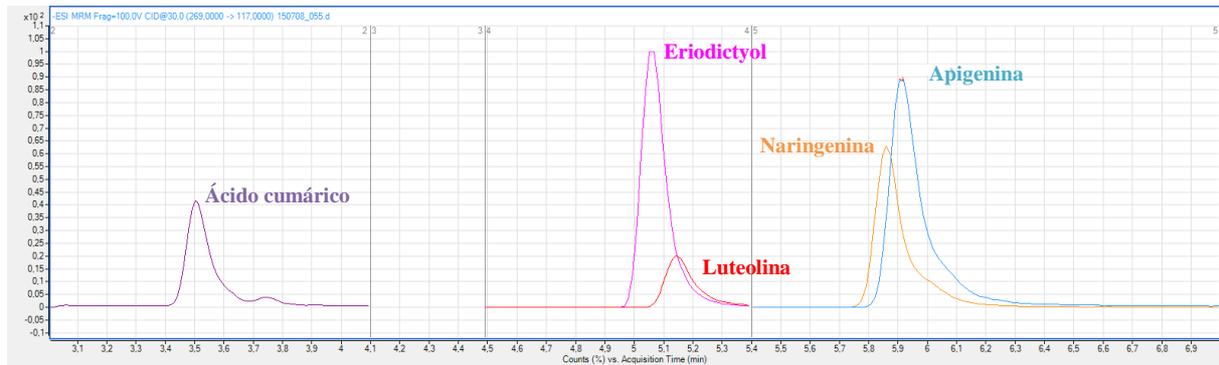
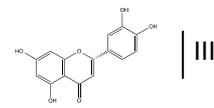


Figura E: Análisis MRM en HPC-MS de los fragmentos mayoritarios de los patrones comerciales a 5 μ M.

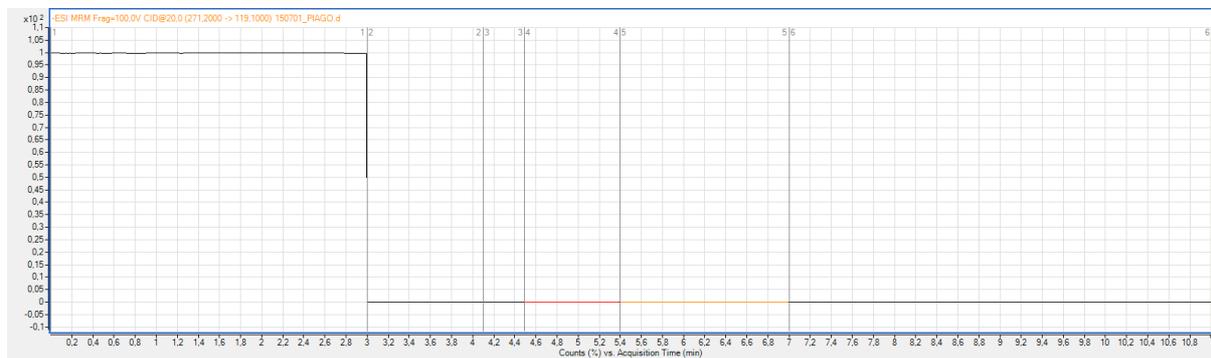


Figura F: Análisis MRM de la producción del vector vacío pWHM3 transformado en *S. albus*. Se ha filtrado para la masa de los patrones y no se observan picos en ningún caso.

