

EVALUACIÓN DE *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* COMO NUEVO MODELO PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO SHIKIMICO.

Alma Alva; Fabián Moreno-Avitia; Francisco Bolívar; Adelfo Escalante.
Instituto de Biotecnología, Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Cuernavaca, 62210.
adelfo@ibt.unam.mx

Palabras clave: Pseudomonas chlororaphis, ácido shikímico, ingeniería metabólica.

Introducción. El ácido shikímico (AS) es un intermediario de la vía del AS y se encuentra naturalmente en bacterias, plantas y algunos parásitos. Este compuesto es de gran interés ya que es utilizado como precursor de antivirales, antitumorales, antibióticos, etc, por lo que se han buscado diferentes estrategias para su obtención como son la ingeniería metabólica de microorganismos. Los principales organismos de estudio han sido *E. coli*, *Bacillus* sp. y recientemente *C. glutamicum*, este último fue seleccionado por producir de manera eficiente aminoácidos aromáticos que tienen como precursor al corismato, último intermediario de la vía del AS (1). Considerando las características naturales de otros organismos, en este trabajo se propone la evaluación de *P. chlororaphis* para la producción de AS, ya que de manera natural produce diferentes metabolitos derivados del corismato, puede metabolizar diferentes fuentes de carbono y resistir condiciones adversas (2). El objetivo de esta contribución fue evaluar la producción de AS en medio rico suplementado con glucosa o glicerol en la cepa silvestre así como en cepas mutantes que tengan bloqueado el flujo de AS hacia corismato, además, se buscó incrementar la disponibilidad de los precursores de la vía (fosfoenolpiruvato y eritrosa-4-fosfato) y se sobre-expresarán algunos genes involucrados en la misma.

Metodología. Las cepas mutantes generadas se obtuvieron mediante una metodología basada en doble recombinación (3). Una vez obtenido el fondo genético se sobre-expresaron los genes *aroB*, *tktA*, *aroG^{tblr}*, *aroE* y *aroD* provenientes de un operón sintético de *E. coli* (4) utilizando como vector al plásmido pUCP24 generando así al plásmido pUCP24A5. Todas las cepas fueron evaluadas en medio King con 15 g/L de glucosa (Glc) o glicerol (Gly). Se colectaron muestras durante 24 h para determinar la cantidad de AS y de otros intermediarios de la vía como ácido dehidroquinico (DHQ), ácido dehidroshikímico (DHS), ácido gálico y ácido quínico.

Resultados. Las evaluaciones cinéticas de la cepa silvestre demostraron que es capaz de crecer más rápido al utilizar Glc como fuente de carbono, sin embargo, al utilizar Gly, el rendimiento biomasa/sustrato es mayor. Esta cepa solo era capaz de acumular en pequeñas concentraciones DHQ y DHS al utilizar Gly como fuente de carbono siendo el DHQ el más abundante (0.09 g/L). La cepa *arok* (A1), la cual tiene inactivado el gen que

codifica para la shikimato cinasa, no presentó gran diferencia al utilizar una u otro fuente de carbono en su velocidad de crecimiento ni en su biomasa máxima alcanzada debido a que esta última, depende de la cantidad de aminoácidos aromáticos disponibles en el medio a los cuales la cepa es auxótrofa. Si bien, esta inactivación conllevó a un decremento en la velocidad de crecimiento, la cepa fue capaz de acumular DHQ y DHS al utilizar las dos fuentes de carbono. Para incrementar el flujo de carbono hacia la vía del AS, a la cepa A1 le fueron inactivados de manera independiente los genes que codifican para las isoenzimas piruvato cinasas generando así la cepa A2 (*arok⁻ pykA⁻*) y A3 (*arok⁻ ttuE⁻*). La caracterización de estas cepas demostró que, al igual que en otros modelos, estas isoenzimas tienen diferente actividad y/o regulación lo que conllevó a diferencias principalmente en la producción de DHQ y DHS, siendo la cepa A3 la que acumuló hasta 1.16 g/L de estos metabolitos. Es importante recalcar que hasta este punto, ninguna de las cepas obtenidas eran capaces de acumular AS, por lo que, se sobre-expresaron varios de los genes involucrados en la vía para evitar cuellos de botella, así como el gen *tktA* para incrementar la disponibilidad de eritrosa-4-fosfato. Al transformar las cepas A2 y A3 con el plásmido pUCP24A5 se logró producir hasta 0.1 g/L de AS utilizando como fuente de carbono el Gly y hasta 0.08 g/L al utilizar Glc.

Conclusiones. Las modificaciones realizadas en el metabolismo central de carbono y en la vía del AS permitieron generar 3 cepas derivadas de *P. chlororaphis* capaces de acumular DHQ, DHS y AS, siendo las cepas con el plásmido pUCP24A5 las que lograron una acumulación de hasta 0.1 g/L del metabolito de interés.

Agradecimientos. Este trabajo fue financiado por el proyecto PAPIIT-UNAM IN209618.

Bibliografía. 1. Bilal, M. et al., (2018). Metabolic engineering strategies for enhanced shikimate biosynthesis: current scenario and future developments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, pp.1–15.
2. Nickel, P.L., et al., (2014). Biotechnological domestication of pseudomonads using synthetic biology. *Nature reviews. Microbiology*, 12(5), pp.368–79
3. Choi, K.-H. & Schweizer, H.P., (2005). An improved method for rapid generation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* deletion mutants. *BMC microbiology*, 5(1), p.30.
4. Rodríguez, A. et al., (2013). Constitutive expression of selected genes from the pentose phosphate and aromatic pathways increases the shikimic acid yield in high-glucose batch cultures of an *Escherichia coli* strain lacking PTS and pykF. *Microbial cell factories*, 12(1), p.86.

