

ESTUDIO SOBRE EL EFECTO DE LA MODIFICACION DEL NODO DE FOSFOENOL PIRUVATO EN LA DISTRIBUCION DE FLUJOS DE CARBONO EN UNA CEPA DE *ESCHERICHIA COLI* QUE CARECE DEL SISTEMA DE FOSFOTRANSFERASA.

Eugenio Meza, Judith Becker, Alfredo Martínez, Francisco Bolivar, Christoph Wittmann, Guillermo Gosset, Instituto de Biotecnología UNAM. Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Av. Universidad #2001, Col. Chamilpa C.P. 62210 Cuernavaca, Morelos Apdo. Postal 510-3, C.P.62250, Fax 777 3291601, gosset@ibt.unam.mx.

Palabras clave: *PTS*, *piruvato cinasa*, *nodo PEP*.

Introducción. La determinación de flujos de carbono es una técnica que permite la determinación de las actividades *in vivo* de cada reacción involucrada en una red metabólica. En trabajos previos⁽¹⁾ se ha evaluado la distribución de flujos metabólicos bajo diferentes modificaciones en las reacciones que consumen fosfoenol piruvato (PEP), tales como el sistema de fosfo transferasa (PTS) o piruvato cinasa (PykA, PykF). Debido a la importancia de PEP como precursor de los aminoácidos aromáticos, se ha hecho ingeniería de vías metabólicas para aumentar la disponibilidad de este en cepas productoras. Se ha aumentado el rendimiento de fenilalanina (PHE) de un 8% del teórico máximo en una cepa silvestre a un 50% en una cepa PTS⁻.

El objetivo de este trabajo es la generación de cepas PTS⁻ *pykA*⁻ y PTS⁻ *pykF*⁻ y la posterior determinación de distribución de flujos de carbono para entender los cambios que sufre el metabolismo central de carbono con la finalidad de establecer estrategias de ingeniería de vías metabólicas que permitan la generación de cepas productoras de PHE en altos rendimientos.

Metodología. Las cepas mutantes PTS- *pykA*- y PTS- *pykF*- se generaron de la cepa VH33, que es una cepa PTS- *lacI*- *lacZ*- derivada de la cepa silvestre W3110 (F-*l*- galactosa⁺ derivada de *Escherichia coli* K-12) a la que se le ha cambiado el promotor silvestre de *galP* por el promotor fuerte *Trc*. Se hicieron fermentaciones en matraz, 10 ml de medio mineral M9 a una DO₆₀₀=0.01, 37 °C, 300 rpm, utilizando glucosa marcada (¹³C₁) 10 g/l, se recolectaron las células en la fase exponencial y se hidrolizó con HCl 6N la pastilla celular. Los aminoácidos de los hidrolizados fueron separados por cromatografía de gases y posteriormente analizados por espectrometría de masas para conocer la composición isotopomérica. Estos datos son utilizados en un modelo de la red metabólica que permite la determinación de distribución de flujos de carbono que mejor describan la composición de isotopómeros observada.

Resultados y discusión. La inactivación de Pyk en el fondo PTS- no genera un cambio drástico en el flujo entre PEP y PYR, los cambios se llevan a cabo principalmente en la vía anaplerótica (*ppc*) y la gluconeogénica (*Pck*). Debido al cambio en los flujos de estas dos reacciones,

el flujo en TCA también cambia, disminuyendo cuando el ciclo "inútil" por *Ppc* y *Pck* es mínimo, lo que hace que el shunt de glioxalato se encuentre activo, como una manera de suplir carbono hacia oxaloacetato.

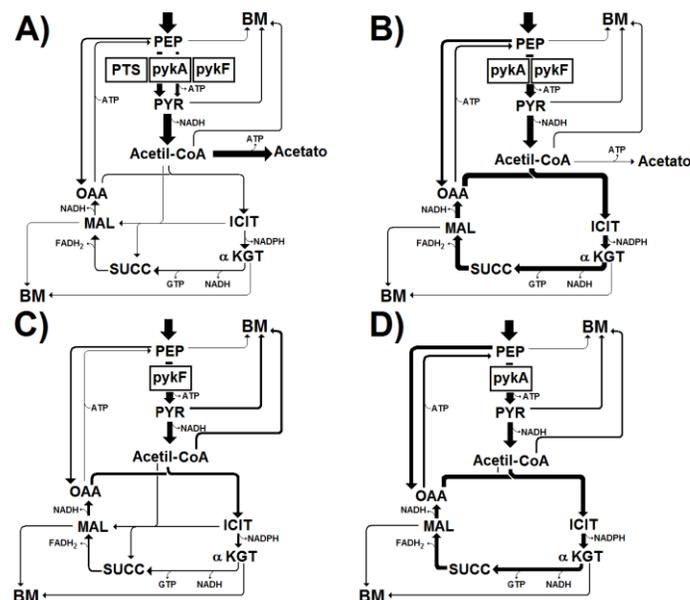


Fig. 1. Distribución de flujos de carbono en la cepa A) W3110, B) VH33 (PTS-), C) VH34 (PTS- *pykA*-), D) VH35 (PTS- *pykF*-).

Conclusiones. Este trabajo permite conocer la plasticidad del metabolismo de *E. coli* en los nodos PEP - PYR. Dicha plasticidad se la dan la reacción anaplerótica *Ppc* y la gluconeogénica *Pck*. Aún más, el flujo que tiene *Pck* parece ir de la mano con el flujo glucolítico, ya que cumple una función tipo ATPasa que consume ATP lo que podría desinhibir a varias reacciones de la glucólisis.

Agradecimiento. A la M. en C. Georgina Hernandez Chávez por su ayuda en la obtención de los perfiles de HPLC. A CONACYT por financiar este trabajo.

Bibliografía.

1. Flores, S, Gosset, G, Flores, N, de Graaf, A y Bolivar, F. (2002). Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by ¹³C labeling and NMR spectroscopy.