



Efecto de la inactivación de las enzimas shikimato cinasas sobre el crecimiento y la producción de shikimato en medio mínimo en una cepa de *Escherichia coli* PTS⁻

Fabián Moreno, Georgina Hernández, Francisco Bolívar, Adelfo Escalante, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos. fma@ibt.unam.mx.

Palabras clave: Shikimato cinasas, compuestos aromáticos, *Escherichia coli*.

Introducción. Las shikimato cinasas (SK) son enzimas involucradas en la vía de síntesis de los compuestos aromáticos. En *Escherichia coli* se encuentran dos isoenzimas con actividad SK, la SK1 y SK2 (codificadas por los genes *aroK* y *aroL* respectivamente) [1,2]. Entre los compuestos aromáticos de interés se encuentra el shikimato (SHK), el cual es utilizado para síntesis de diferentes compuestos a nivel industrial [3]. Los esfuerzos más importantes reportados hasta el momento han alcanzado rendimientos considerables en la producción de este, sin embargo, todos estos reportes se centran en cepas cultivadas en medios complejos ya que unas de las principales características para la acumulación de este compuesto es la inactivación de las SK (junto con otras modificaciones que ayudan a incrementar el rendimiento de compuestos aromáticos) lo que convierte a estas cepas en auxótrofas para aminoácidos aromáticos y otros productos de la vía [4]. Este trabajo se enfoca en estudiar cepas de *E. coli* en las que sólo se inactivó una de estas SK y analizar las diferencias en su perfil metabólico y parámetros cinéticos, con el objetivo de tener un mejor entendimiento del papel que juegan estas enzimas en el metabolismo de compuestos aromáticos en cepas productoras de SHK y determinar su capacidad para producir este mismo.

Metodología. A partir de una cepa de *E. coli* PTS⁻ Glc⁺ se generó una mutante inactivando los genes *pykF* y *ydiB* (que codifican para las enzimas piruvato cinasa I y SHK/quinato deshidrogenasa respectivamente), para favorecer la producción de SHK (PB12.KL), posteriormente, se generaron dos cepas con la SK1 o SK2 inactivas (PB12.SK2 y PB12.SK1 respectivamente). Por último, se transformaron estas tres cepas con el plásmido pTrcAro6 que contiene un operón sintético que codifica genes de la vía del SHK y dos genes de la vía de las pentosas fosfato (*aroB*, *aroD*, *aroE*, *aroG*, *tktA* y *zwf*) dando lugar a las cepas PB12.KLAro6, PB12.SK2Aro6 y PB12.SK1Aro6. Se evaluó el crecimiento de estas cepas en matraces de 500mL con 50ml de medio M9 con 10 g/L de glucosa (Glc), a 37°C y a 300 rpm; la producción de SHK se determinó por HPLC. Adicionalmente se evaluó la actividad SK *in vitro* del extracto crudo de las tres cepas para establecer la importancia de cada una de estas enzimas en la vía del SHK.

Resultados. La mutante con ambas SK activas posee una velocidad de crecimiento específica (μ) de 0.11 h⁻¹, la mutante PB12.SK2Aro6 conserva una μ de 0.1 h⁻¹,

mientras que la mutante PB12.SK1Aro6 tuvo una disminución del 50% en su μ . Debido a la ausencia de una u otra SK, este paso de la vía se volvió limitante en mayor o menor grado permitiendo una acumulación distinta de SHK en las cepas evaluadas. Los cultivos de las cepa control PB12.KLAro6 y la mutante PB12.LAro6 no mostraron acumulación alguna de SHK, mientras que la mutante PB12.KAro6 tuvo un rendimiento de 0.1 mol SHK/mol Glc de este compuesto (Fig. 1, Tabla 1).

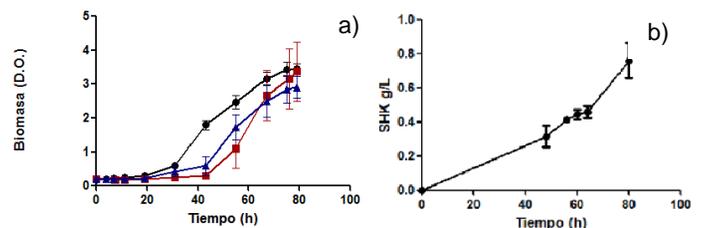


Fig. 1. a) Cinética de crecimiento de tres mutantes, PB12.KLAro6 (negro), PB12.LAro6 (rojo) y PB12.LAro6 (azul). b) Cinética de producción de SHK de la cepa PB12.KAro6.

Tabla 1. Rendimientos y velocidades de crecimiento específicas.

Cepa	μ (h ⁻¹)	Y Biomasa/Glc (g/g)	SHK (g/L)	Y _{SHK/Glc} (mol/mol)
PB12.KLAro6	0.11	1.12	0.002	0.0003
PB12.LAro6	0.10	1.27	0.004	0.0004
PB12.KAro6	0.05	1.49	0.804	0.1187

Conclusiones. La velocidad de crecimiento de las cepas PB12.SK2Aro6 y PB12.SK1Aro6 se vio afectada por la inactivación de la SK correspondiente, observándose un papel diferencial. Además, dadas sus velocidades de crecimiento, se puede inferir que cada una de ellas incrementa su actividad *in vivo* al estar ausente la otra SK. Sólo al inactivarse la SK2 se puede observar una acumulación de SHK de hasta 0.802g/L, mientras que las otras dos mutantes presentan valores próximos a 0.002g/L.

Agradecimientos. Este trabajo contó con el financiamiento del proyecto CONACYT Ciencia Básica 240519.

Bibliografía.

- Pittard J. y Defeyter R. (1986). Purification and properties of shikimate kinase II from *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 165: 331-333.
- Lobner-Olesen A. y Marinus M. G. (1992). *J. Bacteriol.* 174: 225-229.
- Krämer M., J. Bongaerts, R. Bovenberg, S. Kremer, U. Müller, S. Orf., M. Wubbolts, L. Raeven. (2003). *Met. Eng.* 5: 277-83
- Rodríguez A., Martínez J.A., Báez-Viveros J.L., Flores N., Hernández-Chávez G., Ramírez O. T., Gosset G., Bolívar F. (2013). *Micro. Cell Fact.* 12: 86.