



DETERMINACION DEL FLUJO DE CARBONO DIRIGIDO HACIA LA VIA DEL SHIKIMATO EN CEPAS DE *Escherichia coli* CARENTES DE TRANSPORTADORES DE GLUCOSA

Juan Carlos Fragoso Jiménez, Luz María Martínez Mejía, Georgina Hernández Chávez, Noemí Flores Mejía, Alfredo Martínez Jiménez y Guillermo Gosset Lagarda. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología, Departamento de Ingeniería celular y Biocatálisis. Cuernavaca, Morelos C.P. 62210, México; teléfono: (52)777-329-161 email: jucafra@ibt.unam.mx

Palabras clave: *Escherichia coli*, producción de aromáticos, transportadores de carbohidratos

Introducción. *Escherichia coli*, es una bacteria usada en la industria para la producción de muchos compuestos incluidos los compuestos aromáticos. En *E. coli* la vía del shikimato inicia con la condensación de fosfoenolpiruvato (PEP) y eritrosa-4-fosfato (E4P) provenientes de la vía glicolítica Emdem-Meyerhof-Parnas y la vía de las pentosas fosfato (PPP) respectivamente, generando 3-deoxi-D-arabinoheptulose-7-fosfato (DAHP) por la enzima DAHP sintasa codificada en tres genes *aroF, G* y *H*. después se da la reducción del DAHP a dehidroquinato (DHQ) por la DHQ sintasa codificada en el gen *aroB*. Al realizar la inactivación de este gen se acumula DAHP y se detiene el flujo a través de la vía (Baez 2001, Chavez 2005).

El objetivo del trabajo fue determinar los efectos causados por la reducción en la capacidad de consumo de glucosa sobre el flujo de carbono dirigido a la vía del shikimato en cepas de *E. coli* carentes de transportadores de glucosa.

Metodología. Se realizaron cinéticas en dos fases, primero se generó biomasa en medio M9 con 5 g/L de extracto de levadura y glucosa 10g/L, 0.1 mM de IPTG y tetraciclina 30 µg/ml. Se incubó a 37 °C y a 300 rpm en matraces bafleados de 250 mL con un volumen de trabajo de 50 mL. Después, se realizaron las fermentaciones de producción con células en reposo (sin crecimiento) en el mismo medio de cultivo pero sin extracto de levadura, se tomaron muestras para medir biomasa por absorbancia a 600 nm, se determinó glucosa residual y producción de acetato por HPLC (Fuentes *et al.* 2013) y la producción de DAHP fue determinada por el método del ácido tiobarbitúrico (Baez *et al.* 2001).

Resultados. Previamente se generó una colección de cepas las cuales se les inactivaron genes de transportadores de carbohidratos de tipo PTS (sistema fosfoenolpiruvato: carbohidrato fosfotransferasa) de glucosa (G), manosa (M), maltosa (X), o bien de transportadores independientes de PEP como el simporter GalP (P) o el sistema MglBAC (C) (Fuentes *et al.* 2013), a esta colección se les inactivó el gen *aroB* (b) y se transformaron con el plásmido pJLBaroG^{trkA} (g) que codifica para una versión insensible a la inhibición de la DAHP sintasa y a la transcetolasa necesaria para favorecer la síntesis de E4P. Además la cepa WHIbg fue transformada con el plásmido pTrcV5galPglk que codifica para el simporter galP y la glucocinasa bajo el control de

un promotor *trc* mutagenizado de menor fuerza que el nativo. Posteriormente se calcularon la velocidad específica de consumo de glucosa, de producción de acetato y DAHP, así como los rendimientos de DAHP y acetato a partir de glucosa. Todos los resultados se presentan condensados en la tabla 1.

Tabla 1. Parámetros cinéticos de las cinéticas con células en reposo de las cepas usadas en el estudio. Todos los resultados se presentan con el error de la media estándar.

| Cepa | qs | qp DAHP | Y DAHP | qp acetato | Y acetato |
|---------------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|
| W3110bg | 2.02±0.16 | 0.90±0.05 | 0.44±0.07 | 1.38±0.07 | 0.70±0.04 |
| WGbg | 1.74±0.08 | 0.81±0.02 | 0.45±0.02 | 0.85±0.04 | 0.49±0.02 |
| WGXbg | 0.93±0.11 | 0.49±0.05 | 0.50±0.02 | 0.10±0.02 | 0.10±0.02 |
| WGMbg | 0.28±0.02 | 0.19±0.01 | 0.67±0.01 | 0.02±0.00 | 0.06±0.01 |
| WGMCbg | 0.26±0.05 | 0.19±0.01 | 0.60±0.06 | 0.03±0.00 | 0.14±0.04 |
| WHIbg | 0.15±0.02 | 0.08±0.00 | 0.72±0.03 | ND | ND |
| WHIPbg | 0.33±0.03 | 0.09±0.01 | 0.34±0.06 | ND | ND |
| WHICbg | 0.34±0.04 | 0.06±0.00 | 0.18±0.02 | ND | ND |
| WHIbg/pTrcV5galPglk | 2.16±0.09 | 1.35±0.00 | 0.62±0.00 | 0.41±0.08 | 0.58±0.01 |

Después se realizaron graficas de qs contra qp de acetato y DAHP, también de qs contra rendimiento de acetato y DAHP, a partir de estas se determinaron correlaciones lineales entre los parámetros mencionados con anterioridad (graficas no mostradas).

Conclusiones. Se encontró una correlación lineal entre la qs y qp de DAHP, también entre qs y qp de acetato en las condiciones de cultivo. La cepa WHIbg pTrcV5galPglk desplegó la mejor qp de DAHP. Las cepas WHIPbg y WHICbg desplegaron una mayor qs que la cepa parental WHIbg, sin embargo desplegaron un menor rendimiento de DAHP, probablemente se esté favoreciendo el flujo de carbono hacia el ciclo de Krebs para la obtención de energía.

Agradecimiento. Este trabajo recibió apoyo por parte de DGAPA/PAPIIT/UNAM IT200314 y CONACyT 177569

Bibliografía.

- Baez JL, Bolívar F, Gosset G. Determination of 3-Deoxy-D-Arabinose-7-Phosphate Productivity and Yield from Glucose in *Escherichia coli* Devoid of the Glucose Phosphotransferase Transport System, (2001). *Biotechnol Bioeng.* 73:530-535
- Chavez MI, Martinez A, Bolivar F, Gosset G. Metabolic pathway engineering for microbial production of aromatic amino acids, (2005). *Res. Adv. Food Science*, 5:11-20
- Fuentes LG, Lara AR, Martínez LM, Ramírez OT, Bolívar F, Martínez A and Gosset G. Modification of glucose import capacity in *Escherichia coli*: physiologic consequences and utility for improving DNA vaccine production, (2013). *Microb Cell Fact*, 12:42 1-11