XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería
21 al 26 de Junio de 2015 Guadalajara, Jalisco, México.
Guadalajara

PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS EN CEPAS DE *Escherichia coli ptsHIcrr⁻* MODIFICADAS EN EL NODO PEP-PYR

Andrea Sabido[1], Juan C. Sigala[2], Noemí Flores[1], Guillermo Gosset[1], Francisco Bolívar[1]. [1] Instituto de Biotecnología-UNAM. Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Cuernavaca, Morelos 62210; [2] Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa. Departamento de Procesos y Tecnología, México, D.F. 01120; andrea_sabido82@yahoo.com.mx

Palabras clave: Cepas ptsHIcrr⁻, nodo PEP-PYR, compuestos aromáticos.

Introducción. El fosfoenolpiruvato (PEP) es un precursor involucrado en la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos y otros compuestos de valor agregado en *E. coli*. El sistema de transporte de hidratos de carbono dependiente de PEP o sistema PTS es el mayor consumidor de este metabolito. Para incrementar la disponibilidad de PEP, se han generado cepas de *E. coli* carentes del operón *ptsHIcrr* (1). Debido a que estas mutantes carecen de represión catabólica, se exploró la posibilidad de separar glucólisis del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) mediante la deleción de los genes *pykA*, *pykF* y *ppsA*, durante la coutilización de glucosa y acetato. Bajo las mismas condiciones, se determinó la capacidad de estas derivadas para producir compuestos aromáticos.

Metodología. Las inactivaciones de genes cromosomales se realizaron mediante un protocolo establecido (2), al igual que la extracción de RNA y la síntesis de cDNA (3). Las muestras de aislamiento de RNA se obtuvieron de fermentadores con un volumen de trabajo de 750 mL con medio M9 y glucosa (2 g/L) más acetato (3 g/L). La producción de compuestos aromáticos se realizó en células en reposo utilizando matraces bafleados de 250 mL con medio M9 y glucosa (10 g/L) más acetato (3-5 g/L). La cuantificación de aromáticos se realizó por HPLC.

Resultados. Las cepas PB11 *pykAF⁻ppsA⁻* y PB12 *pykAF⁻ppsA⁻* fueron capaces de re-establecer su crecimiento en glucosa + acetato comparadas con el crecimiento en sustratos sencillos (Tabla 1). Bajo las mismas condiciones, el perfil de expresión mostró que los genes *ppc* y *pckA*, cuyas enzimas conectan glucólisis y TCA en la cepa PB11 *pykAF⁻ppsA⁻* están subexpresados con respecto a la cepa parental PB11. Por su parte, en la cepa evolucionada PB12 *pykAF⁻ppsA⁻* dichos genes mantienen el mismo nivel de expresión, mientras que el resto se sobreexpresan comparada con la cepa PB12 (Fig. 1a y b). Asimismo, se determinó de manera indirecta la acumulación de PEP a través de la síntesis de aromáticos, siendo la cepa modificada PB12 *pykAF⁻ ppsA⁻* la que obtuvo el mayor título y rendimiento durante la coutilización de glucosa y acetato (Tabla 2).

Conclusiones. En el caso de la cepa PB11 *pykAF⁻ppsA⁻*, éste es el primer estudio donde se reporta que glucólisis y TCA coexisten de manera independiente durante la coutilización de glucosa y acetato. Por otro lado, se demostró que al utilizar a las derivadas *ptsHIcrr⁻pykAF⁻ ppsA⁻*, el PEP proveniente del catabolismo de la glucólisis puede ser redirigido hacia la vía de síntesis de los compuestos aromáticos.

Tabla 1. Tasa específica de crecimiento ($\mu=h^{-1}$) en medio mínimo con glucosa, acetato y la mezcla glucosa + acetato. ND: No detectado.

Cepas	$\mu_{Glucosa}$	$\mu_{Acetato}$	$\mu_{Glucosa + Acetato}$
PB11 (*ptsHIcrr⁻*)	0.13	0.18	0.27
PB11 *pykAF⁻ ppsA⁻*	ND	ND	0.16
PB12 (*ptsHIcrr⁻* evolucionada)	0.40	0.15	0.41
PB12 *pykAF⁻ ppsA⁻*	0.18	0.15	0.33

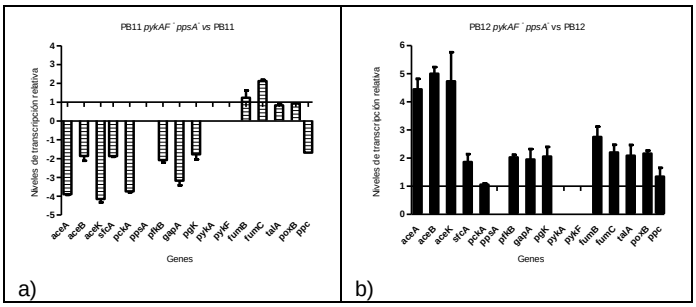

Fig. 1. Valores de RT-qPCR para algunos genes sobreexpresados (1.6 veces o más) y genes reprimidos (-1.6 veces o menos) en las cepas *ptsHIcrr⁻pykAF⁻ppsA⁻* en glucosa + acetato. Los valores para cada gen en las cepas controles (PB11 y PB12) se normalizaron a un valor de 1.

Tabla 2. Título y rendimiento de aromáticos totales (TAC) para las cepas de estudio en glucosa + acetato.

Cepa	TAC (g/L)	$Y_{TAC/Glc+Ace}$ (mmol C/ mmol C)
PB11 *tyrR⁻pheA*$^{ev2+}$/pJLB*aroG*^{fbr}*tktA*/ pv5Glk5GalP	1. 29	0.14
PB11 *pykAF⁻ ppsA⁻* *tyrR⁻ pheA*$^{ev2+}$/ pJLB*aroG*^{fbr}*tktA*/pv5Glk5GalP	4.33	0.38
PB12 *tyrR⁻ pheA*$^{ev2+}$/pJLB*aroG*^{fbr}*tktA*	1.24	0.12
PB12 *pykAF⁻ ppsA⁻* *tyrR⁻pheA*$^{ev2+}$/ pJLB*aroG*^{fbr}*tktA*	8.08	0.52

Agradecimientos. A CONACyT (proyecto 105782), FONSEC/SSA/ISSSTE/CONACyT (proyecto 44126), DGAPA-PAPIIT-UNAM (proyecto IN205811) y al proyecto 740 Ing. Cel. Biocatálisis.

Bibliografía.

1. Flores N, Xiao J, Berry A, Bolívar F, Valle F. (1996). *Nat Biotechnol* (14): 620-623.
2. Datsenko K, Wanner B. (2000). *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (97): 6640-6645.
3. Aguilar C, Escalante A, Flores N, de Anda R, Riveros-McKay F, Gosset G, Morett E, Bolívar F. (2012). *BMC Genomics* 13:385.