

## ESTUDIO SOBRE EL EFECTO DE LA ACTIVIDAD DE PIRUVATO CINASA EN LA DISTRIBUCIÓN DE FLUJOS EN EL METABOLISMO CENTRAL DE UNA CEPA DE *ESCHERICHIA COLI* QUE CARECE DEL SISTEMA DE FOSFOTRANSFERASA.

Eugenio Arturo Meza Mora, Evelia Milan Noris, Alfredo Martínez Jiménez, Francisco Bolívar Zapata, Guillermo Gosset Lagarda, 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](mailto:gosset@ibt.unam.mx).

*Palabras clave:* Fenilalanina, PTS, ingeniería metabólica.

**Introducción.** La fenilalanina (FEN) es un aminoácido aromático con diversas aplicaciones comerciales. Como una alternativa a la síntesis química de este compuesto se han desarrollado tecnologías biotecnológicas que hacen uso de microorganismos modificados, los cuales a partir de glucosa producen FEN. En *E. coli*, el primer paso para la biosíntesis de FEN es la condensación entre la eritrosa 4 fosfato y del fosfoenol piruvato (PEP) catalizada por la DAHP sintasa (Fig. 1). Se ha demostrado que en cepas productoras de aminoácidos aromáticos el precursor limitante suele ser PEP, el cual es generado por la glucólisis y consumido por el sistema de fosfotransferasa (PTS) y la actividad de las piruvato cinasas (*pykA* y *pykF*) (Fig. 1). PTS es el sistema de transporte de glucosa utilizado por la bacteria y consume el 50% del PEP. Entonces el nodo PEP es un blanco a modificar cuando se busca generar organismos productores de FEN con alto rendimiento (1).



Fig. 1. Biosíntesis de aminoácidos aromáticos.

**Metodología.** Se generaron cepas con fenotipos PTS<sup>-</sup>, PTS<sup>-</sup> *pykA*<sup>-</sup>, PTS<sup>-</sup> *pykF*<sup>-</sup> y PTS<sup>-</sup> *pykA*<sup>-</sup> *pykF*<sup>-</sup>, en las cuales se espera que varíe de manera descendente el flujo entre PEP y piruvato (PIR). Para desregular la vía se transformaron las cepas con el plásmido pJLBaroG<sup>fbr</sup>*tktA* que contiene una versión insensible a inhibición alostérica de la DAHP sintasa (*aroG*<sup>fbr</sup>) bajo el promotor Trc y transcetolasa A (*tktA*) de expresión constitutiva, así como el plásmido pTrc*pheA*<sup>ev2</sup> que contiene una versión insensible a inhibición alostérica de la corismato mutasa pefenato deshidratasa (*pheA*<sup>ev2</sup>) bajo el control del promotor Trc. Se

hicieron experimentos con células en reposo y mediante HPLC y espectrometría de masas se determinó FEN para calcular productividad y rendimiento.

**Resultados y discusión.** La cepa que tiene un mayor rendimiento de FEN es la cepa con fondo PTS<sup>-</sup> ( $Y=0.23\text{gFEN/gglc}$ ), es 7 veces la de la cepa silvestre, 3 veces la del fondo PTS<sup>-</sup> *pykA*<sup>-</sup> y 11 veces el del fondo PTS<sup>-</sup> *pykF*<sup>-</sup>. Es muy importante el hecho de que en la cepa PTS<sup>-</sup> *pykA*<sup>-</sup> se observa crecimiento en las células en reposo y probablemente la célula esté llevando el carbono a biomasa y esto hace que el rendimiento de FEN disminuya.

**Conclusiones.** La delección de PTS se refleja en un aumento del rendimiento de FEN, lo que aún no es muy claro es si la delección de *pykA* tiene un efecto en dicho rendimiento. Si la cepa PTS<sup>-</sup> *pykA*<sup>-</sup> tuviera un consumo de glucosa parecido al de las cepas PTS<sup>-</sup> y PTS<sup>-</sup> *pykF*<sup>-</sup>, entonces se podrían alcanzar rendimientos de FEN de hasta  $Y=0.28\text{gFEN/gglc}$ , esto permitiría especular acerca de cuál es el flujo de PEP→PIR necesario para aproximarse al máximo teórico de 0.55gFEN/gglc.

**Agradecimientos.** A la M. en C. Georgina Hernández Chávez por su ayuda en la obtención de los perfiles de HPLC. Al grupo Bolívar-Gosset, por sus aportaciones a este trabajo. Al consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACYT).

### Bibliografía.

I. Baez, J. Osuna, J. Hernández, G. Soberón, X. Bolívar, F. Gosset, G. (2004). Metabolic Engineering and Protein Directed Evolution Increased the Yield of L-Phenylalanine Synthesized From Glucose in *Escherichia coli*. *Biotechnol and Bioeng.* Vol(87) 516-524.