



PRODUCCION DE DAHP EN UNA CEPA CARENTE DEL SISTEMA PTS CUANDO COUTILIZA VARIAS FUENTES DE CARBONO.

Karla Martínez, Guillermo Gosset, Francisco Bolívar Z.

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo Postal 510-3. Cuernavaca, Morelos 62250, México; fax: 52-777-3172388. E-mail: karlamg@ibt.unam.mx.

Palabras clave: PEP, E4P, DAHP.

Introducción. Debido a la importancia industrial de los compuestos aromáticos se han aplicado varias estrategias de la ingeniería de rutas metabólicas a una cepa de *Escherichia coli* con la finalidad de obtener una cepa sobreproductora de compuestos aromáticos. La vía metabólica de los aminoácidos aromáticos comienza con la condensación de fosfoenolpiruvato (PEP) y eritrosa-4-fosfato (E4P) para formar el primer intermediario de la vía, 3-Deoxy-D-arabinoheptulose-7-fosfato (DAHP). Para canalizar el flujo de PEP hacia la vía y aumentar el rendimiento y productividad de compuestos aromáticos en cultivos con glucosa; fue eliminado el sistema carbohidrato de fosfotransferencia (sistema PTS) de la cepa silvestre JM101 (Flores et al., 1996), generando la cepa PB11PTS⁻Glc⁻. A partir de esta cepa se obtuvo por evolución adaptativa en fermentador, una cepa capaz de crecer en glucosa (PB12PTS⁻Glc⁺). El sistema PTS (particularmente el componente EIIA^{glc}) está involucrado en la represión catabólica por glucosa (Peterkofsky et al., 1993). Ya que la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ carece de este sistema, y que estas cepas son capaces de coutilizar glucosa y otras fuentes de carbono (Flores et al., 2005), en este trabajo se analizó que fuentes de carbono cometaboliza la cepa y el impacto de la coutilización de fuentes de carbono en la productividad y rendimiento de DAHP.

Metodología. Determinación de los patrones de consumo de las fuentes de carbono y parámetros cinéticos: cultivos por duplicado en fermentadores de 1 litro (M9, 2 gr/L de cada fuente de carbono, 37 °C, 600 rpm y ajustando el pH a 7 con NH₄OH (2%)). Medición de fuentes de carbono y metabolitos: HPLC y gluconato con un kit enzimático. Se calculó el rendimiento y productividad específica de DAHP en la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ transformada con los plásmidos pCLtktA y pRW300aroG^{tblr} en un sistema de células suspendidas, inducidas con IPTG 0.1 mM (Báez et al., 2000). La cepa *aroB* fue obtenida con el método de Datsenko y Wanner (2000). El DAHP fue medido con la técnica del ácido tiobarbitúrico.

Resultados y discusión. La cepa PB12PTS⁻Glc⁺ puede coutilizar glucosa con varias fuentes de carbono (cuadro 1).

Cuadro 1. Parametros cinéticos de PB12PTS-Glc⁺ en varias fuentes de carbono

Fuente(s) de carbono	μ (hr ⁻¹)	Y _{x/s}	Q _s (mmol C/ gr p.s biomasa)
Glucosa	0.42	0.50	24.50
Glucosa-Arabinosa	0.55	0.48	38.19
Glucosa-Glicerol	0.55	0.45	38.23
Glucosa-Gluconato	0.51	0.35	40.80
Glucosa-Acetato	0.48	-----	35.50

La coutilización de fuentes de carbono le permite metabolizar mas moles de carbono por minuto y aumentar su velocidad de crecimiento respecto a glucosa. La cepa PB12PTS⁻Glc⁺aroB⁻ (pRW300aroG^{tblr}, pCLtktA) aumenta la productividad específica de DAHP cuando coutiliza una segunda fuente de carbono (de un 50 a un 200%) segun la(s) fuentes de carbono. Esto indica que la coutilizacion permite el aumento de la pozas de PEP y E4P, además la modificación de los flujos del metabolismo central. Los rendimientos son altos en la mayoría de las fuentes de carbono excepto en glicerol esto debido al alto flujo glicolítico de la cepa. Cabe mencionar que los rendimientos y productividades son significativamente altos respecto a la cepa silvestre (JM101PTS⁺Glc⁺) en las mismas condiciones.

Cuadro 2. Parametros cinéticos de la producción de DAHP en un sistema de células en reposo.

Fuente(s) de carbono (F.C)	Q _p (mmol DAHP/gr. cél *hr)	Q _s (mmol fuente de carbono/ gr cél * hr)	Y _{real} (mmol DAHP/ mmol F.C)	Y _{teórico} (mmol DAHP/ mmol F.C)	(Y _{real} /Y _{teórico}) * 100
Glucosa	0.42	0.4	0.77	0.86	89%
Arabinosa	0.95	0.67	0.71	0.71	100%
Acetato	----	----	-----	0.21	-----
Gluconato	0.5	1.19	0.50	0.50	100%
Glicerol	0.36	4.68	0.13	0.42	30%
Glucosa-Arabinosa	0.95	1.55	0.74	0.81	91%
Glucosa-Acetato	0.67	2.91	0.32	0.32	100%
Glucosa-Glicerol	1.36	2.62	0.41	0.67	61%
Glucosa-Gluconato	0.76	1.14	0.41	0.69	60%

Conclusiones. La cepa PB12PTS⁻Glc⁺ ha perdido la represión catabólica por glucosa en varias fuentes de carbono. La coutilización de fuentes de carbono aumenta la productividad específica de DAHP respecto a glucosa. Las productividades y rendimientos de la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ son mayores que la cepa JM101PTS⁺Glc⁺, en todas las fuentes de carbono.

Bibliografía.

- Flores, N, Yong-Xiao, J, Berry, A, Bolívar F (1996). Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol* vol (14): 620-623.
- Peterkofsky, A, Reizer, P, Amin N (1997). Bacterial adenyl cyclases. *Prog. Nucleic Acids Res.Mol. Biol*, vol(44): 31-65.
- Flores S, Flores N, de Anda R, Gonzalez A, Escalante A, Sigala JC, Gosset G Bolivar F (2005). Nutrient-scavenging stress response in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system, as explored by gene expression profile analysis. *J. Mol. Microbiol Biotechnol*. vol(1): 51-63.
- Báez, JL, Bolivar F, Gosset G (2001). Determination of 3-deoxy-D-arabino-heptulose 7-phosphate productivity and yield from glucose in *Escherichia coli* devoid of the glucose phosphotransferase system. *Biotechnol Bioeng* vol (73): 530-535.