

COMPLEMENTACIÓN FUNCIONAL DE UNA CEPA *E. coli* DAHPS⁻ CON UN PLÁSMIDO DE PRODUCCIÓN DE SHIKIMATO QUE INCLUYE EL GEN *aroG*^{Fbr}

Rubén Mendoza Flores¹, Dulce Catalina Díaz Quiroz¹, Andrea Sabido Ramos² y Adelfo Escalante¹

¹Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Cuernavaca, Morelos, CP: 62210.

²Departamento de Procesos y Tecnología, UAM Cuajimalpa, Cuajimalpa de Morelos, Ciudad de México CP: 05370.

Contacto: adelfo@ibt.unam.mx

Palabras clave: shikimato, complementación, DAHP sintasa.

Introducción. El shikimato (SHK) es un intermediario de la ruta del mismo nombre y ha cobrado relevancia por ser precursor de antivirales, anticancerígenos, antioxidantes, entre otros. La ruta del SHK está presente en hongos, bacterias y plantas y es usada para la producción de aminoácidos aromáticos (1). Por la importancia comercial del SHK varios grupos han explorado su sobreproducción en bacterias como *E. coli* usando ingeniería de vías metabólicas (1).

La enzima 3-desoxi-7-fosfoheptulonato sintasa (DAHPS) cataliza la primera reacción de la ruta condensando eritrosa-4-fosfato (E4P) con fosfoenolpiruvato (PEP) para formar 7-fosfo-2-ceto-3-desoxi-D-arabinoheptonato (DAH). *E. coli* tiene 3 isoenzimas de DAHPS (*aroFGH*) regulada por retroalimentación negativa por los tres aminoácidos aromáticos, para lidiar con esta desventaja se han desarrollado versiones de DAHPS insensibles a inhibición por retroalimentación. En nuestro laboratorio se cuenta con una de estas enzimas codificada por el gen *aroG*^{Fbr} (2). Para evaluar la funcionalidad de *aroG*^{Fbr} se realizó un estudio de complementación transformando a una cepa de *E. coli* DAHPS⁻ (*aroFGH*) con un plásmido de producción de SHK que incluye al gen *aroG*^{Fbr}. El plásmido restauró la vía del SHK de cepa transformante en sistemas de fermentación.

Metodología. La cepa usada en este trabajo es denominada ASR4 y tiene genotipo PB12 (PTS⁻ Glc⁺) *aroFGH aroK⁻ pykF lacI*. ASR4 es incapaz de producir intermediarios de la vía del SHK. pTrcAro5 (Fig. 1) es un plásmido multicopia para sobreproducción de SHK que incluye los genes *tktA*, *aroG*^{Fbr}, *aroD*, *aroB* y *aroE* dentro de un operón regulado por el promotor *trc* (2). La cepa ASR4 fue transformada por electroporación con el plásmido pTrcAro5, la cepa resultante fue denominada ASR45 (Fig. 1). Se realizaron cultivos por triplicado en matraz con ASR4 y ASR45 bajo las siguientes condiciones de operación: T=37°C, pH_{inicial}=7, Ω= 300 rpm, t=50 horas, V= 50 mL, se usó un medio de cultivo mineral adicionado con 20 g L⁻¹ de glucosa y 15 g L⁻¹ de extracto de levadura como sustratos. Se monitoreó la fermentación cuantificando metabolitos por HPLC y densidad óptica. Se calcularon los parámetros μ , q_{SHK} , q_{Glc} y $Y_{SHK\ Glc}$.

Resultados. La cepa ASR4 tuvo una tasa específica de crecimiento (μ) = 0.52 h⁻¹ alcanzó aproximadamente 9 DO a las 10 horas momento en el alcanza el estado estacionario, no mostró producción de intermediarios de la vía del SHK, pero se produjeron 8.25±0.15 g L⁻¹ de acetato con un rendimiento molar global de 1.49±0.07 mol mol⁻¹ (Fig. 2, tabla 1), los parámetros se muestran en la tabla 1.

ASR45 mostró una μ_{max} igual a 0.45 h⁻¹ con un título de shikimato de 8.15±0.82 g L⁻¹ y rendimiento de 0.45±0.05 mol mol⁻¹ y sin acetato al final del cultivo (fig. 2, tabla 1).

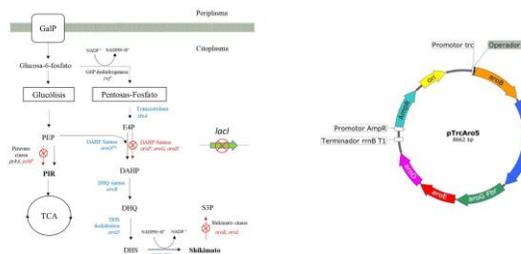


Fig. 1. Metabolismo de producción de shikimato de la cepa ASR45 (izquierda) Los genes en azul han sido sobreexpresados, los genes en rojo han sido inactivados. plásmido pTrcAro5 (derecha).

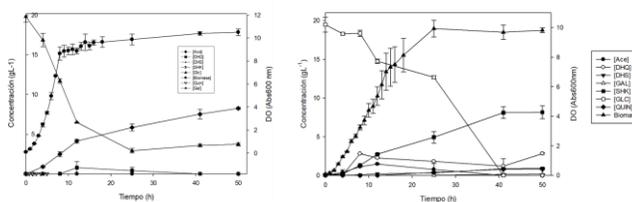


Fig. 2. Fermentaciones en matraz con la cepa ASR4 (izquierda) y ASR45 (derecha).

Tabla 1. Parámetros cinéticos de las cepas ASR4 y ASR45.

Cepa	μ_{max} (h ⁻¹)	X_{max} (g DWC h ⁻¹)	[SHK] (g L ⁻¹)	[ACE] (g L ⁻¹)	$Y_{SHK\ Glc}$ (mol mol ⁻¹)	q_{SHK} (g L ⁻¹ g ⁻¹)	q_{Glc} (g L ⁻¹ h ⁻¹)
ASR4	0.52±0.03	3.88±0.01	0.00	8.25±0.15	0.00	0.00	-2.70±0.27
ASR45	0.45±0.01	3.63±0.04	8.15±0.82	0.00	0.45±0.05	0.20±0.05	-2.20±0.40

Conclusiones. La cepa ASR4 es incapaz de producir intermediarios de la vía del SHK pero produce altos niveles de acetato (ACE). La ruta del SHK funciona como vía de asimilación del PEP sobreproducido y al estar bloqueada, las rutas de producción de ACE serían el destino del PEP (3). La cepa ASR45 produce SHK con rendimientos similares a los alcanzados en la cepa AR36 previamente reportado en nuestro grupo pero con una la tasa de crecimiento más baja (1), sin embargo, queda demostrado que ASR4 es incapaz de producir intermediarios de la vía del SHK y que el plásmido pTrcAro5 restaura la funcionalidad de esta vía, además de que reduce la producción de ACE y aumenta la capacidad de producción de SHK.

Agradecimientos. Este trabajo fue financiado por el proyecto PAPIIT-UNAM IN209618.

Bibliografía.

- Díaz-Quiroz *et al.* (2014) *Res Rep Med Chem.* 2 (4) pp: 35-46.
- Rodríguez *et al.* (2013) *Microb Cell Fact.* 12 (86).
- Rodríguez *et al.* (2017) *Biotech Bioeng.* 144 (6). pp:1319-1330.

