



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

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

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Doctor en Ciencias

PRESENTA:
Eugenio Arturo Meza Mora

TUTOR PRINCIPAL:
Dr. Guillermo Gosset Lagarda, Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Guadalupe Espín Ocampo, Instituto de Biotecnología
Dr. Edmundo Calva Mercado, Instituto de Biotecnología
Dr. Michael F. Dunn, Centro de Ciencias Genómicas

MÉXICO, D. F. Octubre, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A Santi, Gerar y Chema.
..... y a los que vienen.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Guillermo Gosset Lagarda en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Durante la realización de los estudios de doctorado se contó con una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro 161613.

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de los proyectos de CONACYT número 83039 y 126793.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Dr. Guillermo Gosset Lagarda, Instituto de Biotecnología, UNAM.

A mi comité tutorial:

Dra. Guadalupe Espín Ocampo, Instituto de Biotecnología, UNAM.

Dr. Edmundo Calva Mercado, Instituto de Biotecnología, UNAM.

Dr. Michael F. Dunn, Centro de Ciencias Genómicas, UNAM.

Al personal académico del Institute of Biochemical Engineering, Technische Universität Braunschweig, por la estrecha colaboración en este proyecto:

Dr. Christoph Wittmann.

Dra. Judith Becker.

A los miembros del jurado:

Dr. Edmundo Calva Mercado, Instituto de Biotecnología, UNAM.

Dr. Miguel Angel Cevallos Gaos, Centro de Ciencias Genómicas, UNAM.

Dra. Clara Olvera Carranza, Instituto de Biotecnología, UNAM.

Dr. Lorenzo Segovia, Instituto de Biotecnología, UNAM.

Dr. Mario Soberón Chávez, Instituto de Biotecnología, UNAM.

Al personal académico del laboratorio Bolivar-Gosset del IBT-UNAM:

Dr. Francisco Bolivar Zapata.

M.C. Ramón de Anda Herrera.

C.D. Mercedes Enzaldo Cruz.

Dr. Adelfo Escalante Lozada.

Dra. Noemí Flores Mejía.

M.C. Georgina Hernández Chávez.

Dr. Alfredo Martínez Jiménez.

Q.I. Luz María Martínez Mejía.

A la unidad de biblioteca del IBT-UNAM:

Sr. Omar Arriaga.

B.A. Dip. Lib. A. L. A. Shirley Ainsworth.

A la unidad de síntesis y secuenciación del IBT-UNAM:

Q.I. Santiago Becerra Ramírez.

Dr. Rubén Paul Gaytan Colín.
M.C. Eugenio López Bustos.
M.C. Jorge Arturo Yáñez Ponce de León.

A la unidad de docencia del IBT-UNAM:
Lic. J. Antonio Bolanos Guillen.
Ing. Jalil Saab Hassanille.
Gloria Villa Herrera.

A las personas que brindaron apoyo a este proyecto en forma de ideas y apoyo técnico:
Dra. María Inés Chávez Béjar.
Dr. Gerardo Huerta Beristaín.
Dr. Juan Carlos Sigala Alanís.

Gracias a todos los que me consideraron lo suficientemente valioso como para darme un consejo, apoyo, su amistad y cariño. Me llevo su ejemplo como el objetivo a seguir para tratar de ser un homínido integral y funcional en este mundo cada vez más y más complicado.

Angela Avila Fernández.
Judith Becker.
Edmundo Calva Mercado.
Ramón de Anda Herrera.
Mercedez Enzaldo Cruz.
Adelfo Escalante Lozada.
Noemí Flores Mejía.
Guillermo Gosset.
Georgina Hernández Chávez.
Alfredo Martínez Jimenez.
Luz María Martínez Mejía.
Ana Joyce Muñoz Arellano.
María Ortiz Soto.
Jalil Saab Hassanille.
Andrea Sabido Ramos.
Juan Carlos Sigala Alanís.
Raunel Tinoco Valencia.
Silvia Velázquez.
Irma Vichido Baez.
Christoph Wittmann

Cuando no hay suficientes palabras para agradecer:

Gracias Anita.

Gracias Esthelita.

Gracias Luci.

Gracias Mau.

Gracias Luis.

GRACIAS DIOS.

CONTENIDO.	
RESUMEN.	1
ABSTRACT.	2
INTRODUCCIÓN.	3
1. <i>Escherichia coli</i> en su nicho ecológico.	6
1.1. Relación huésped - hospedero.	8
2. Transporte de glucosa en <i>E. coli</i> .	9
2.1. Transporte en la membrana externa.	9
2.2. Sistema de fosfotransferasa.	9
2.3. Otros transportadores de glucosa.	10
2.4. Termodinámica del transporte de glucosa.	11
3. Metabolismo de glucosa.	12
3.1. Vía de las pentosas.	12
3.2. Metabolismo central de carbono.	12
3.3. Regulación transcriptional.	13
4. Regulación alostérica y transcripcional del nodo PEP.	16
4.1. Regulación de <i>pykA</i> y <i>pykF</i> .	16
4.2. PEP carboxilasa (Ppc) y PEP carboxicinas (Pck).	16
4.3. Efecto de PEP en el metabolismo.	17
5. Biosíntesis de aminoácidos aromáticos.	18
5.1. Vía del shikimato.	18
5.2. Biosíntesis de fenilalanina (PHE).	18
5.3. Usos industriales de los aminoácidos aromáticos.	19
6. Disponibilidad de PEP.	20
6.1. Cepas PTS ⁻ glc ⁺ .	20
7. Determinación de flujos de carbono.	22
7.1. Matriz estequiométrica.	22
7.2. Distribución isotópica.	22
7.3. Abundancia isotopomérica y flujos de carbono.	23
7.4. Flujos metabólicos.	25
8. Flujos de carbono en el nodo PEP.	27
JUSTIFICACIÓN.	28
OBJETIVO GENERAL.	28

HIPÓTESIS.	28
MATERIALES Y MÉTODOS.	29
9. Cepas.	29
9.1. Ceba PTS- <i>galP</i>⁺.	29
9.2. Cepas PTS- <i>galP</i>⁺ <i>pyk</i>.	30
9.3. Cepas PTS- <i>galP</i>⁺ <i>pyk</i>- <i>pck</i>.	30
9.4. Cepas productoras de aminoácidos aromáticos.	31
10. Perfiles cinéticos.	33
10.1. Preparación del cultivo.	33
10.2. Tratamiento de muestra.	33
10.3. Determinación de glucosa y ácidos orgánicos.	33
10.4. Cálculo de perfiles de fermentación.	34
11. Determinación de flujos de carbono.	36
11.1. Preparación del cultivo	36
11.2. Obtención del hidrolizado.	36
11.3. Análisis por espectrometría de masas de los hidrolizados.	36
11.4. Modelamiento metabólico y estimación de parámetros.	37
12. Producción de aminoácidos aromáticos.	38
12.1. Células en reposo.	38
12.2. Tratamiento de muestra.	38
12.3. Determinación de glucosa y ácidos orgánicos.	39
12.4. Cálculo de perfiles de producción de aminoácidos aromáticos.	39
13. Determinación de la actividad total de piruvato cinasa.	40
RESULTADOS.	41
14. Comprobación por PCR.	41
15. Parámetros cinéticos.	43
16. Actividad de la Pyk.	46
17. Determinación de flujos de carbono relativos.	47
17.1. El nodo de la G6P.	47
17.2. El nodo del PEP y del PYR.	47
17.3. El nodo de la AcCoA.	50
17.4. Producción de la biomasa.	50
18. Producción de los aminoácidos aromáticos.	52

18.1. Células en reposo.	52
18.2. Rendimiento de DHS, SHIK y PHE.	54
19. Generación y caracterización de las cepas Pck.	56
DISCUSIÓN.	57
CONCLUSIÓN.	62
BIBLIOGRAFÍA.	63

FIGURAS.

- FIGURA 1. FILOS BACTERIANOS EN LA MICROBIOTA DEL INTESTINO Y POSIBLE RELACIÓN SIMBIÓTICA ENTRE *BIFIDOBACTERIAEAE BIFIDUM* – *ESCHERICHIA COLI*. EN LA FIGURA SE MUESTRA EL EPITELIO INTESTINAL EN COLOR PÚRPURA, DEL CUAL LA MUCOSA SE ENCUENTRA FORMADA DE LA GLICOPROTEÍNA MUCINA. EL ENLACE GLICOPROTEÍCO SE DA ENTRE REGIONES RICAS EN CISTEÍNAS Y UN HIDROXILO DE LA GLUCOSA. EL ORGANISMO *B. BIFIDUM* (COLOR MARRÓN) ES CAPAZ DE DEGRADAR DICHO ENLACE Y LIBERAR AZÚCARES SIMPLES QUE PUEDE UTILIZAR PARA INCREMENTAR SU BIOMASA. LA INHIBICIÓN DEBIDO A LA PRESENCIA DE OXÍGENO SE MUESTRA COMO UNA LÍNEA ROJA. *E. COLI* (COLOR VERDE) AL SER AEROBIO FACULTATIVO CONSUME EL OXÍGENO MIENTRAS ASIMILA LOS AZÚCARES SIMPLES PARA GENERAR BIOMASA. 7
- FIGURA 2. A) CAMBIOS EN EL NÚMERO DE ESPECIES ENCONTRADAS EN LA MICROBIOTA DEL INTESTINO EN INDIVIDUOS JÓVENES Y ANCIANOS. SE MARCA EL GRUPO AL QUE PERTENECEN *B. BIFIDUM* Y *E. COLI*. PORCENTAJE DE CASOS QUE PRESENTAN DEFECTOS EN EL METABOLISMO CONFORME AUMENTA LA EDAD: B) SÍNDROME METABÓLICO, C) DIABETES. [9, 10]..... 8
- FIGURA 3. SISTEMA DE FOSFOTRANSFERASA. EN LA FIGURA SE MUESTRA LOS COMPONENTES DE PTS PARA EL TRANSPORTE DE GLUCOSA. EL GRUPO FOSFATO INVOLUCRADO EN LA CASCADA DE FOSFORILACIÓN ESTÁ EN COLOR ROJO. TAMBIÉN SE MUESTRA EL TRANSPORTE DEBIDO A LA GALACTOSA PERMEASA GALP..... 10
- FIGURA 4. PROPIEDADES CINÉTICAS Y TERMODINÁMICAS DE LOS DIFERENTES TRANSPORTES DE GLUCOSA. A) AFINIDAD DE LOS TRANSPORTADORES DE GLUCOSA. B) VELOCIDAD MÁXIMA DEL TRANSPORTE DE GLUCOSA. C) ENERGÍA LIBRE DE GIBBS DEL TRANSPORTE DE GLUCOSA POR PTS Y GALP-GLK Y DE LOS INTERMEDIARIOS GLUCOLÍTICOS. LA GRÁFICA DE ENERGÍA LIBRE DE GIBBS SE HIZO UTILIZANDO LOS DATOS REPORTADOS EN LI, X., ET AL. 2010. 11
- FIGURA 5. A) METABOLISMO CENTRAL DE CARBONO. EN LA FIGURA SE MUESTRAN LAS VÍAS DE LA GLUCÓLISIS, PENTOSAS Y TCA, TAMBIÉN SE MUESTRA EL SISTEMA PTS. SE DESCRIBE PARTE DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE PTS, GLUCÓLISIS Y PARTE DE TCA DEBIDO AL COMPLEJO CRP_{AMPc} Y CRA (ROJO ACTIVACIÓN Y VERDE INHIBICIÓN). TAMBIÉN SE MUESTRA LA REGULACIÓN ALOSTÉRICA DEBIDO A PEP (AZUL ACTIVACIÓN Y ANARANJADO INHIBICIÓN). B) EL EFECTO CRP_{AMPc} VS CRA. EN LA FIGURA SE MUESTRAN LOS TÉRMINOS GO DE LOS GENES REPORTADOS EN [32, 33] ANALIZADOS EN GO TERM FINDER ([HTTP://GO.PRINCETON.EDU/CGI-BIN/GOTERMFINDER](http://go.princeton.edu/cgi-bin/GOTermFinder)) [36] CON UN P-VALUE ≤ 0.01 15
- FIGURA 6. MÉTODO DE SELECCIÓN POR QUIMIOSTATO DE CEPAS PTS⁻ CON FENOTIPO GLC⁺. EL TIEMPO DE RESIDENCIA ES EL TIEMPO PROMEDIO QUE UNA CÉLULA PERMANECE EN EL CULTIVO ANTES DE SER LAVADA POR EL FLUJO DE MEDIO DE CULTIVO 21
- FIGURA 7. PROPIEDADES DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE AMINO ÁCIDOS AROMÁTICOS DE LAS CEPAS SILVESTRE, PTS⁻, PTS⁻ GLC⁺. A) VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO (HR⁻¹). B) VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CONSUMO DE GLUCOSA. C) ACTIVIDAD DE GLUCOCINASA. D) RENDIMIENTO DE AMINO ÁCIDOS AROMÁTICOS TOTALES. DATOS OBTENIDOS DE [39, 60, 62, 64]. 21
- FIGURA 8. CONSTRUCCIÓN DE MATRIZ ESTEQUIOMÉTRICA Y DESCRIPCIÓN DEL HIPERPLANO DE SOLUCIONES. 23
- FIGURA 9. GENERACIÓN DE MATRIZ DE ISOTOPÓMEROS POSICIONALES. LA ALANINA SE DERIVATIZA CON DIMETHILFORMAMIDE DIMETHILACETAL (DMF-DMA) Y DESPUÉS SE FRACCIONA EN UN ESPECTRÓMETRO DE MASAS. LOS IONES MOLECULARES FORMADOS CONTIENEN DOS Y TRES CARBONOS DE LA ALANINA (EN GRIS Y NEGRO RESPECTIVAMENTE)..... 24
- FIGURA 10. DETERMINACIÓN DE DISTRIBUCIÓN DE FLUJOS METABÓLICOS. EN LA PARTE IZQUIERDA SE MUESTRA EL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y EN LA PARTE DERECHA EL MODELAMIENTO MATEMÁTICO. 26
- FIGURA 11. ÁRBOL FILOGENÉTICO EN DÓNDE SE MUESTRA LA LÍNEA DE LAS CEPAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO (ÚLTIMO ANCESTRO COMÚN EN CÍRCULO ROJO). ADAPTADA DE [HTTP://BACPATHGENOMICS.WORDPRESS.COM/2011/06/15/SNP-BASE-PHYLOGENY-CONFIRMS-SIMILARITY-OF-E-COLI-OUTBREAK-TO-EAEC-EC55989/](http://bacpathgenomics.wordpress.com/2011/06/15/snp-base-phylogeny-confirms-similarity-of-e-coli-outbreak-to-eaec-ec55989/). 30
- FIGURA 12. DETERMINACIÓN DE PERFILES CINÉTICOS. 35
- FIGURA 13. A) COMPARACIÓN ENTRE LA REGIÓN CROMOSOMAL DEL GEN *pykA* EN LA CEPA VH33 CON LA CEPA VH34 QUE TIENE INTERRUPTIDO EL GEN POR EL CASETE DE RESISTENCIA A CLORANFENICOL. SE MUESTRA TAMBIÉN A LOS OLIGOS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAR DICHAS REGIONES. COMPARACIÓN ENTRE LA REGIÓN CROMOSOMAL DEL GEN *pykF* EN LA CEPA VH33 CON LA CEPA VH35 QUE TIENE INTERRUPTIDO EL GEN POR EL CASSETTE DE RESISTENCIA A GENTAMICINA. SE MUESTRA TAMBIÉN

A LOS OLIGOS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAR DICHAS REGIONES. C) FOTOGRAFÍA DE LA SEPARACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR DE LOS OLIGOS $P_{PYKA}(FW)$, $P_{PYKA}(REV)$, $P_{PYKF}(FW)$ Y $P_{GEN}(REV)$ POR ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 1%..... 42

FIGURA 14. CURVAS DE CRECIMIENTO, CONSUMO DE GLUCOSA Y PRODUCCIÓN DE ACÉTICO DE LAS CEPAS W3110 (PTS^-), VH33 ($PTS^- GALP^+$), VH34 ($PTS^- GALP^+ PYKA^-$) Y VH35 ($PTS^- GALP^+ PYKF^-$) EN MEDIO MÍNIMO SUPLEMENTADO CON GLUCOSA 10 G/L. TODOS LOS EXPERIMENTOS FUERON REALIZADOS POR TRIPLICADO. EN LA FIGURA SE MUESTRA UNA CURVA REPRESENTATIVA. 43

FIGURA 15. ACTIVIDAD TOTAL DE PIRUVATO CINASA EN LAS CEPAS W3110, VH33, VH34 Y VH35. LA ACTIVIDAD SE DETERMINÓ EN CÉLULAS EN FASE EXPONENCIAL. LOS RESULTADOS MOSTRADOS SON EL PROMEDIO DE TRES EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES CON UNA DESVIACIÓN ESTÁNDAR MENOR AL 10%..... 46

FIGURA 16. DISTRIBUCIÓN RELATIVA DE FLUJOS DE CARBONO DE LAS CEPAS W3110 (PTS^+), VH33 ($PTS^- GALP^+$), VH34 ($PTS^- GALP^+, PYKA^-$) Y VH35 ($PTS^- GALP^+, PYKF^-$). LOS VALORES PARA CADA CEPA SE MUESTRAN EN DIFERENTES TONOS DE AZUL. TAMBIÉN SE MUESTRAN LOS VALORES DE VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CONSUMO DE GLUCOSA (Q_s) EN MMOL / G / H. EN EL NODO DEL PEP SE INCLUYERON LOS VALORES DE LA ACTIVIDAD DE LA PIRUVATO CINASA, ASÍ COMO LA(S) PROTEÍNA(S) RESPONSABLE(S) DE DICHA ACTIVIDAD..... 49

FIGURA 17. CURVA DE CRECIMIENTO Y DE PRODUCCIÓN DEL DHS, SHIK Y DE LA PHE CON RESPECTO A LA GLUCOSA CONSUMIDA DE LAS CEPAS W3110 (PTS^+), VH33 ($PTS^- GALP^+$), VH34 ($PTS^- GALP^+, PYKA^-$) Y VH35 ($PTS^- GALP^+, PYKF^-$)..... 53

FIGURA 18. RENDIMIENTO DEL DHS, SHIK, PHE Y AROMÁTICOS TOTALES DE LAS CEPAS W3110 (PTS^+), VH33 ($PTS^- GALP^+$), VH34 ($PTS^- GALP^+, PYKA^-$) Y VH35 ($PTS^- GALP^+, PYKF^-$) TRANSFORMADAS CON LOS PLÁSMIDOS $PJLBAROG^{FBR}$ - $TKTA$ Y $PTRCPHEA^{EV2}$, QUE PERMITEN DIRIGIR EL FLUJO DE CARBONO A LA VÍA COMÚN DE SHIK Y LA VÍA DEL PRODUCTO FINAL PHE. 54

TABLAS

TABLA 1: CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* Y PLÁSMIDOS UTILIZADOS EN ESTE PROYECTO..... 32

TABLA 2: OLIGOS UTILIZADOS EN ESTE PROYECTO..... 41

TABLA 3: PARÁMETROS CINÉTICOS DE LAS CEPAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO. 44

TABLA 4: PARÁMETROS CINÉTICOS DE CÉLULAS EN REPOSO..... 52

ABREVIATURAS.

μ	Velocidad específica de crecimiento
AcCoA	Acetil coenzima A
AceB	malato sintasa
Ack	Acetato cinasa
ACP	Acetil fosfato
Acs	Acetil CoA sintasa
AroA	5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa
AroF	DAHP sintasa
AroG	DAHP sintasa
AroH	DAHP sintasa
CHO	Corismato
CIT	Citrato
Cra	Represor catabólico
Crp	Proteína receptora de AMP cíclico
DAHP	D-Arabino-heptulosonato 7 fosfato
dDW	Gramos de peso seco
DHAP	di-hidroacetona 1-fosfato
DHS	Dehidroshikimato
E4P	eritrosa 4-fosfato
EMP	Emden-Meyerhof-Parnas
Eno	enolasa
F16P	fructosa 1,6-difosfato
FbaB	F16P aldolasa
Fbp	fructosa 1,6-difosfato sintasa
G6P	Glucosa 6 fosfato
GalP	Galactosa Permeasa
GAP	gliceraldehido 3-fosfato
GLC	Glucosa
GltA	citrato sintasa
ICIT	Isocitrato
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
KGT	alfa ceto glutarato
MAL	Malato
Mlc	Proteína reguladora del PTS
OAA	Oxaloacetato
Pck	Fosfoenolpiruvato cinasa
PEP	Fosfoenolpiruvato
Pfk	fosfofructocinasa
Pgi	Fosfoglucoisomerasa
PHE	Fenilalanina

Ppc	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
Pps	Fosfoenolpiruvato sintasa
Pta	Fosfato acetil transferasa
PTS	sistema de fosfotransferencia fosfoenol piruvato (PEP):azúcar (PTS)
Pyk	Piruvato cinasa
PYR	Piruvato
q	productividad
qs	Velocidad específica de consumo de glucosa
SHIK	Shikimato
SUCC	Succinato
TCA	ciclo de los ácidos tricarbóxicos
Tkt	Transcetolasa
Tpi	triosa fosfato isomerasa
Trc	Promotor sintético resultado de la fusión de los promotores para los genes <i>Trp</i> y <i>lac</i>
TRP	Triptofano
TYR	Tirosina
Y	Rendimiento
Zwf	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
Cya	adenilato ciclasa

RESUMEN.

En *Escherichia coli*, el fosfoenol piruvato (PEP) es un metabolito intermediario clave que participa en el transporte de glucosa, como precursor de varias vías biosintéticas y regula alostéricamente varias enzimas del metabolismo central de carbono.

En este trabajo se utilizó una cepa PTS⁻ con la capacidad de crecer en glucosa, mediante la sustitución del promotor silvestre del gen *galP* por el promotor sintético fuerte *trc*. A esta cepa se le deletaron los genes *pykA* y *pykF* para poder determinar la distribución de flujos de carbono del metabolismo central en cepas en donde el flujo entre el PEP y el PYR es debido únicamente a una o ambas actividades de Pyk. Aún más, las cepas generadas se modificaron para producir amino ácidos aromáticos como una manera de medir la disponibilidad del PEP. Los resultados que se obtuvieron muestran que la distribución de flujos de carbono alrededor del nodo del PEP, principalmente entre el PEP y el OAA debidos a la Ppc (PEP→OAA) y la Pck (OAA→PEP), presentan los cambios más significativos. En la cepa PTS⁻ *pykF*⁻, el flujo entre el PEP y el OAA es alto, lo que genera un mayor flujo por el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) y una mayor disponibilidad del PEP para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. Por el contrario en la cepa PTS⁻ *pykA*⁻, se observó un bajo flujo entre el PEP y el OAA, que se refleja en un bajo flujo por el TCA. Esta cepa tiene un fenotipo de alto rendimiento de biomasa, lo que hace que la disponibilidad del PEP para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos esté reducida. Los resultados obtenidos muestran que las isoenzimas PykA y PykF tienen papeles distintos en el metabolismo central de carbono de *E. coli* y que la presencia de una u otra actividad genera cambios en la disponibilidad del PEP para la generación de biomasa y amino ácidos aromáticos.

ABSTRACT.

In *Escherichia coli*, the phosphoenolpyruvate (PEP) is a key metabolite that is part of glucose transport, as precursor of several metabolic pathways and can exert allosteric regulation on various enzymes of the central carbon metabolism.

In this work a PTS⁻ strain with the capacity to grow in glucose was used. This phenotype is due to the substitution of the wild type promoter of *galP* by the strong synthetic promoter *trc*. In this genetic background, the genes *pykA* and *pykF* were deleted with the aim to determine the carbon flux distribution of the central carbon metabolism where the flux between PEP and PYR is due to the activity of only one of the Pyk activities. Furthermore, the generated strains were modified to produce aromatic amino acids, as a manner to assess the PEP availability. The results show that the changes in the carbon flux distribution around PEP node are significant, mainly between PEP and OAA due to the activities of Ppc and Pck. In the PTS⁻ *pykF*⁻ strain, the flux between PEP and OAA had the highest value among the evaluated strains; this generates a high carbon flux through TCA cycle and a high PEP availability for aromatic amino acids production. Contrary to these observations, PTS⁻ *pykA*⁻ strain displayed the lowest flux between PEP and OAA among the tested evaluated strains; this had as consequence a diminished carbon flux through TCA. This strain had a high biomass yield, therefore the PEP availability for aromatic amino acids production was the lowest observed in this work. The results show that PykA and PykF activities have different roles in *E. coli*'s metabolism and that the presence of one of the activities generates changes in PEP availability for biomass and aromatic amino acids generation.

INTRODUCCIÓN.

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa que se ha utilizado ampliamente para la descripción de diversos procesos celulares que tienen su contraparte en otros organismos. Esta bacteria forma parte activa de la microbiota del ser humano y otros mamíferos, con implicaciones metabólicas. Este microorganismo se ha empleado como modelo en diversos procesos biotecnológicos para generar cepas de uso industrial debido a que su velocidad de crecimiento en medio definido es alta, además de que se dispone de una amplia gama de herramientas moleculares que permiten su manipulación genética para inducir fenotipos específicos.

El metabolismo de carbono es la manera en que un microorganismo asimila y distribuye los esqueletos de carbono que obtiene de diversos sustratos, con el objetivo de maximizar su producción de biomasa. La forma en que distribuye estos esqueletos de carbono le da un comportamiento fisiológico particular que depende de las condiciones en que se encuentra creciendo. Cuando *E. coli* crece en un medio que contiene glucosa (GLC) como única fuente de carbono, el metabolismo central de carbono se encuentra constituido por las vías Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), pentosas (PP) y ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA). Estas tres vías suplen de energía (ATP, GTP), poder reductor (NADH, NADPH, FADH₂) y precursores de biomasa al organismo (Figura 1.1).

El sistema de fosfotransferencia fosfoenol piruvato (PEP):azúcar (PTS) lleva a cabo el transporte de glucosa y regula su entrada al organismo. Este proceso ocurre mediante la transferencia del grupo fosfato del PEP a una cascada de fosforilación que involucra a las enzimas EI, HPr, EIIGlc y EIIBC^{Glc}, las primeras tres presentes en el citosol y la última transmembranal además de específica para la glucosa. El último receptor del grupo fosfato es la glucosa, que en esta acción se introduce a la célula como glucosa 6 fosfato (G6P) y el PEP, al perder el grupo fosfato, se convierte en piruvato (PYR). Esta actividad es la principal responsable del consumo del PEP y producción del PYR en *E. coli*.

El PEP es un metabolito en el cual convergen y emergen diferentes vías metabólicas, a lo cual se le define como el nodo PEP. En este nodo, la regulación alostérica de las enzimas que producen o consumen el metabolito hace de esta zona un punto de control metabólico. Además de su participación en el transporte de glucosa y como precursor de biomasa, el nodo PEP se encuentra en un punto central entre el metabolismo glucolítico y el gluconeogénico mediante la acción de PTS y las piruvato cinasas (PykA y PykF) y fosfoenolpiruvato sintasa (Pps), respectivamente. El PEP nutre de carbono al TCA de manera directa en el nodo de oxaloacetato (OAA) vía la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (Ppc) y de manera indirecta mediante la acción de la piruvato deshidrogenasa (Pdh) y de la citrato sintasa (GltA). También el PEP es precursor en la vía del shikimato (SHIK) debido a la acción de las isoenzimas 3 deoxi-D-arabino heptulosonato 6-fosfato (DAHP) sintasa (AroF, AroG y AroH). Esta vía genera los productos finales tirosina (TYR), fenilalanina (PHE) y triptófano (TRP), con valor comercial en la industria farmacéutica y alimentaria. Así mismo, la vía del SHIK genera una gran variedad de intermediarios y derivados de los productos finales que tienen alto valor comercial como el SHIK que es precursor del antiviral osetalmivir utilizado en el tratamiento de la influenza, o la dopamina (derivada de TYR) utilizado para el tratamiento de la enfermedad neurodegenerativa mal de Parkinson.

Debido al alto valor comercial de estos productos y a la necesidad de entender de manera más detallada la función del nodo PEP en la fisiología de *E. coli*, se han desarrollado trabajos enfocados a estudiar dicho nodo. Algunos de estos trabajos se han centrado en entender los cambios en el crecimiento y en los flujos de carbono en el metabolismo central debidos a la ausencia de PTS o a la ausencia de una o ambas Pyk. Con base en estos estudios se han diseñado y construido cepas productoras de aminoácidos aromáticos. Si bien estos trabajos han permitido un mejor entendimiento del metabolismo central de carbono y del nodo PEP, no se ha determinado de manera precisa el papel que juegan las isoenzimas de piruvato cinasa en *E. coli*. En este trabajo nos enfocamos en hacer una caracterización de los efectos en el metabolismo central de carbono asociados a la presencia de una o ambas piruvato cinasas en un fondo PTS-

. Para lograr esto se generaron dos cepas con los fondos genéticos PTS⁻ *pykA*⁻ y PTS⁻ *pykF*⁻. En este fondo genético el consumo del PEP y la producción del PYR se deben únicamente a la actividad de PykA o PykF, lo cual permite una descripción de los efectos reales de dichas actividades en el metabolismo. Se determinó la velocidad específica de crecimiento, la velocidad específica de consumo de glucosa, el rendimiento de biomasa, la producción de acetato y la actividad total de piruvato cinasa en las cepas W3110 (silvestre), VH33 (PTS⁻), VH34 (PTS⁻ *pykA*⁻) y VH35 (PTS⁻ *pykF*⁻). Con el objetivo de seguir a detalle el efecto de estas deleciones en la distribución de los flujos de carbono se calculó las fracciones isotópicas de los hidrolizados de cultivos con glucosa marcada en el carbono 1 (glucosa ¹³C₁). Además de la caracterización de la fisiología de estas cepas se evaluó el impacto que dichas modificaciones tienen en la sobre producción y el rendimiento de los aminoácidos aromáticos totales.

Los resultados muestran una clara diferencia en la fisiología de *E. coli* cuando sólo una de las piruvato cinasas es la responsable del flujo entre el PEP y el PYR. Esto se refleja en una gran plasticidad del metabolismo para adaptarse a los cambios debido a las deleciones de las *Pyk* en el fondo PTS⁻. Cuando estas cepas se modificaron para producir amino ácidos aromáticos, mostraron diferencias asociadas a la actividad responsable del flujo entre el PEP y el PYR.

1. *Escherichia coli* en su nicho ecológico.

E. coli es parte de la microbiota del intestino de los animales de sangre caliente y de los reptiles. Este organismo puede encontrarse en cualquier parte del colon y formando parte de las heces fecales [1, 2]. En este ecosistema, *E. coli* forma parte de una flora bacteriana constituida de alrededor de 396 filogenias, de las cuales las gamma proteobacterias representan un 0.25% (Figura 1). Este valor es aún más bajo (0.007%) cuando se compara el número de secuencias de *E. coli* con el número total de secuencias encontradas mediante amplificación de 16S DNA ribosomal [2, 3]. Lo anterior muestra que este organismo es común en la flora bacteriana del intestino en humanos, sin embargo, se encuentra en una baja proporción [4]. Según la teoría de Freter los numerosos nichos ecológicos del intestino se definen de acuerdo a la disponibilidad de nutrientes. Esto significa que la baja concentración de *E. coli* estaría relacionada a una baja disponibilidad de su fuente de carbono preferida, la glucosa [5].

La gran mayoría de azúcares simples ingeridos en nuestra dieta se absorben en el intestino delgado. El bolo alimenticio lleva al intestino grueso a los azúcares más complejos (polisacáridos), a los restos de las células microbianas y epiteliales, y parte de la mucosa que cubre el epitelio [6]. En este lugar los polisacáridos provenientes del alimento y de las mucosas (mucinas) se degradan a azúcares más simples por organismos como *Ruminococcus torques* y *Bifidobacterium bifidum*, entre otros [7]. Los distintos organismos en el ecosistema compiten por las fuentes de carbono fermentables como son los oligosacáridos, los disacáridos y los monosacáridos; esta competencia en cierta medida depende de la velocidad en que transportan y asimilan estas fuentes de carbono [4, 6]. *E. coli* es un organismo aerobio facultativo, lo cual significa que puede combinar la fermentación con la respiración. Esta característica le permite maximizar su crecimiento en comparación con el resto de la flora, sin embargo, se ha demostrado que su crecimiento depende de los organismos que pueblan el nicho en que se encuentra (Figura 1) [2]. Aun cuando las concentraciones del oxígeno en el intestino son bajas, tienen la concentración suficiente para inhibir el crecimiento de los organismos anaerobios estrictos [8]. Se especula que el

metabolismo respiratorio de *E. coli* es el responsable de consumir el oxígeno que pudiera inhibir el crecimiento y consecuentemente la función de las cepas anaerobias responsables de degradar los polisacáridos [2, 4] (Figura 1).

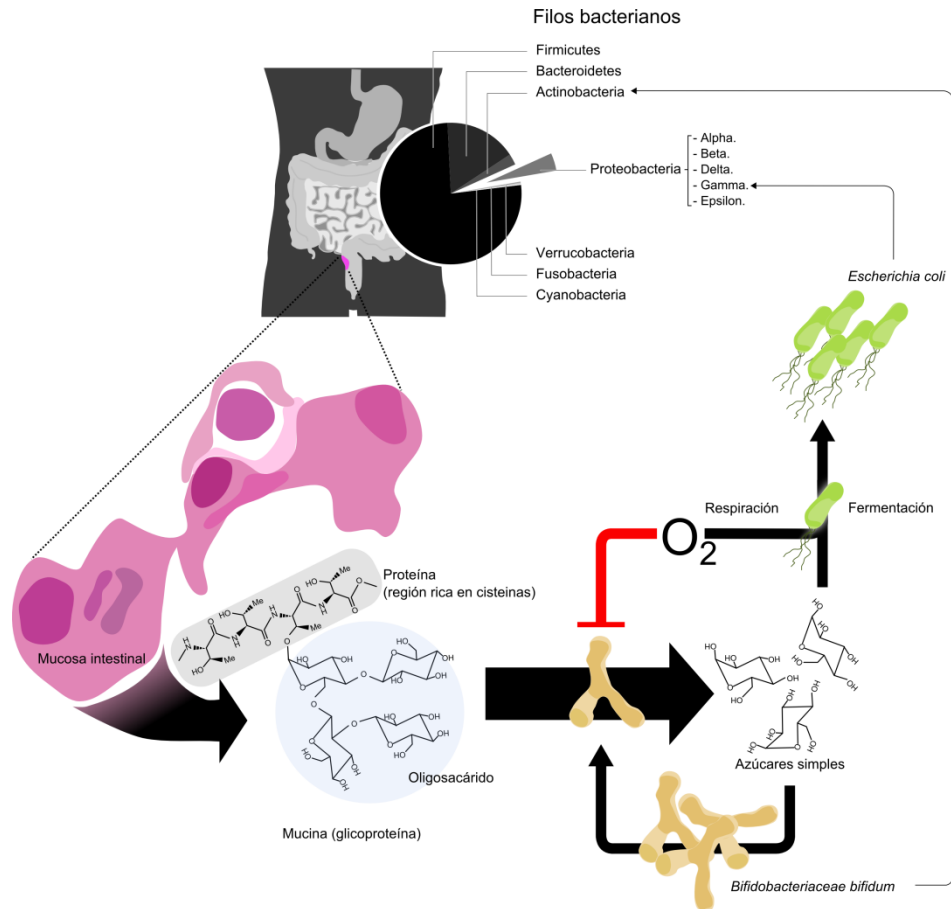


Figura 1. Filos bacterianos en la microbiota del intestino y posible relación simbiótica entre *Bifidobacteriaceae bifidum* – *Escherichia coli*. En la figura se muestra el epitelio intestinal en color púrpura, del cual la mucosa se encuentra formada por la glicoproteína mucina. El enlace glicoproteico se da entre regiones ricas en cisteínas y un hidroxilo de la glucosa. El organismo *B. bifidum* (color marrón) es capaz de degradar dicho enlace y liberar azúcares simples que puede utilizar para incrementar su biomasa. La inhibición debido a la presencia de oxígeno se muestra como una línea roja. *E. coli* (color verde) al ser aerobio facultativo consume el oxígeno mientras asimila los azúcares simples para generar biomasa.

1.1. Relación huésped - hospedero.

Si la relación que *E. coli* mantiene con otros organismos dentro del intestino es compleja, la relación que tiene con su hospedero lo es aún más. En el humano se ha demostrado que la microbiota es cambiante de acuerdo a diversos factores como la alimentación, el fondo genético, la salud y la edad del hospedero, entre otros. Particularmente la presencia de *E. coli* y de aerobios facultativos en el intestino humano disminuye conforme aumenta la edad del individuo, coincidentemente las enfermedades asociadas con el metabolismo de glucosa aumentan también [9, 10] (Figura 2). Esto no significa que los cambios en las concentraciones de estos microorganismos en el intestino sea la causa de dichos padecimientos, sin embargo permiten especular acerca del papel que juegan en la disponibilidad de glucosa.

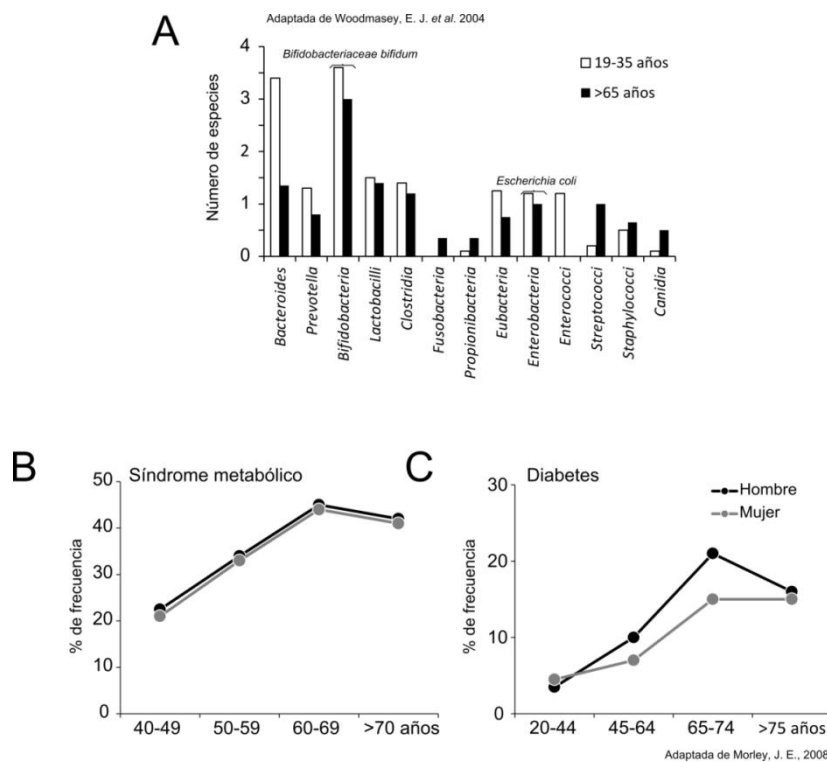


Figura 2. A) cambios en el número de especies encontradas en la microbiota del intestino en individuos jóvenes y ancianos. Se marca el grupo al que pertenecen *B. bifidum* y *E coli*. Porcentaje de casos que presentan defectos en el metabolismo conforme aumenta la edad: B) Síndrome metabólico, C) Diabetes. [9, 10]

2. Transporte de glucosa en *E. coli*.

Con la discusión anterior se busca poner en contexto la importancia que tiene el consumo de azúcares simples en *E. coli*. La velocidad con que los azúcares simples se consumen tiene impacto en la presencia de este organismo en su nicho (biomasa), en la presencia de otros organismos dentro del nicho y muy probablemente en el metabolismo del hospedero. Por lo anterior, *E. coli* necesita de una gran plasticidad respecto a su capacidad para censar y a la velocidad con la que transporta y asimila diversas fuentes de carbono simples.

2.1. Transporte en la membrana externa.

E. coli está rodeado por una doble membrana, por lo que toda fuente de carbono tiene que pasar dos barreras para poder ser consumida. La membrana externa tiene tres porinas: OmpC, OmpF y LamB, que pueden introducir la glucosa al periplasma de manera pasiva [11, 12]. Las porinas OmpC y OmpF se encuentran en mayor proporción cuando *E. coli* crece en medios con una concentración de glucosa mayor a 0.2 mM [13]. Se ha demostrado que OmpF tiene el doble de capacidad de difusión de glucosa que OmpC en liposomas reconstituidos [14]. En lo que respecta a LamB, cuando la célula crece en glucosa a concentraciones micromolares, LamB ejerce el 70% del transporte de glucosa y otros azúcares simples [15]. La velocidad con la que la glucosa se introduce al periplasma depende de la velocidad con la que se transporta al citosol y, puesto que la membrana interna es impermeable a glucosa, dicho transporte depende de transportadores no pasivos [11] (Figura 3).

2.2. Sistema de fosfotransferasa.

El sistema de transporte de fosfotransferasa fosfoenol piruvato : monosacárido o PTS (por sus siglas en inglés) es el principal sistema con el que *E. coli* detecta y transporta una gran variedad de fuentes de carbono (azúcares PTS). De manera general, este sistema puede transportar alrededor de 20 carbohidratos diferentes y se encuentra constituido por tres enzimas: EI, HPr y el complejo EII. Se han identificado 5

diferentes tipos de la enzima EI, 6 de la enzima HPr y 22 de la EII [16-19]. Particularmente para la glucosa, EII^{Glc} consta de una región citosólica (IIA^{Glc}) y una transmembranal (IIB^{Glc} y IIC^{Glc}), de las cuales IIA^{Glc} y IIB^{Glc} son específicas para glucosa. Durante el transporte de glucosa se utiliza una molécula de fosfoenol piruvato (PEP, por sus siglas en inglés) que transfiere su grupo fosfato a través de una cascada de fosforilación que involucra a todas las proteínas del PTS (Figura 3).

2.3. Otros transportadores de glucosa.

Además del sistema PTS hay por lo menos otros tres transportadores que pueden introducir a la glucosa a la célula [11]: el transportador PTS de manosa (II^{Man}) [20], el transportador (MglABC) (que acopla el transporte a la hidrólisis de una molécula de ATP) [21] y el transportador de galactosa (GalP) [22] (Figura 3). Aun cuando las afinidades por la glucosa de las proteínas II^{Glc} , II^{Man} y GalP son muy parecidas (Figura 4A), la velocidad con la que el transportador PTS para glucosa lleva a cabo la reacción es 1.75 y 8 veces las velocidades II^{Man} y GalP, respectivamente (Figura 4B). Además, cuando el medio contiene glucosa a una concentración > 0.2 mM se reprime la expresión de los genes que codifican para Mgl, II^{Man} y GalP se encuentra reprimida.

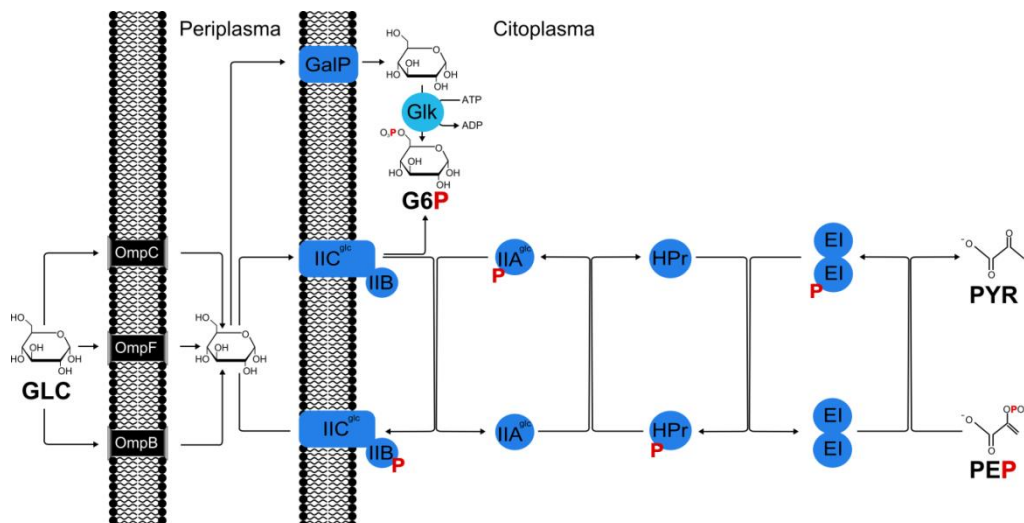


Figura 3. Sistema de fosfotransferasa. En la figura se muestra los componentes de PTS para el transporte de glucosa. El grupo fosfato involucrado en la cascada de fosforilación está en color rojo. También se muestra el transporte debido a la galactosa permeasa GalP.

2.4. Termodinámica del transporte de glucosa.

Termodinámicamente, el cambio de la energía libre de Gibbs asociado al grupo fosfato del PEP permite acoplar su transferencia al sistema PTS haciendo del PTS un proceso altamente favorable [23]. Puesto que la glucosa para ser metabolizada debe de estar fosforilada, el transporte de glucosa debido a GalP debe de combinarse con la actividad de la glucocinasa (Glk), que utiliza un ATP para dicho propósito [24]. Cuando se comparan las energías libres de Gibbs de estos dos procesos (PTS y Glk), el valor de -49 kJ mol^{-1} del PTS es menor que el -20 kJ mol^{-1} de la Glk [25, 26] lo que hace que el transporte PTS específico para glucosa sea no solo más rápido sino más favorable termodinámicamente (Figura 4C).

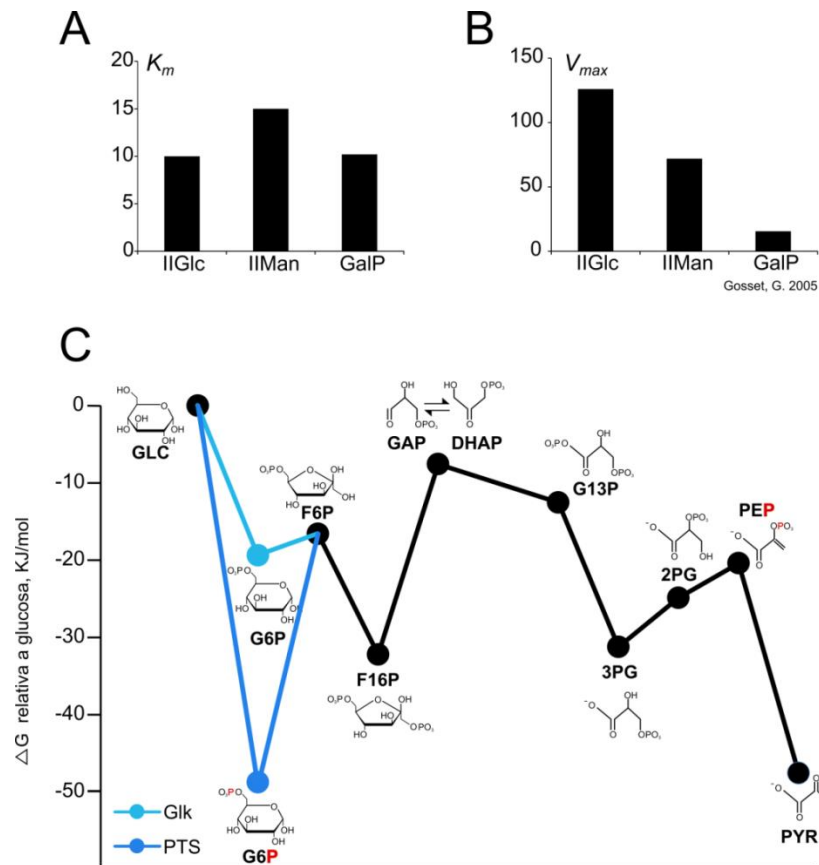


Figura 4. Propiedades cinéticas y termodinámicas de los diferentes transportes de glucosa. A) Afinidad de los transportadores de glucosa. B) velocidad máxima del transporte de glucosa. C) energía libre de Gibbs del transporte de glucosa por PTS y GalP-Glk y de los intermediarios glucolíticos. La gráfica de energía libre de Gibbs se hizo utilizando los datos reportados en Li, X., *et al.* 2010.

3. Metabolismo de glucosa.

3.1. Vía de las pentosas.

En la parte alta de la glucólisis, el nodo de la G6P es el punto de partición entre glucólisis y la vía de las pentosas (PP). La vía de las pentosas lleva a cabo una fase oxidativa y una no oxidativa; la fase oxidativa la inicia la G6P deshidrogenasa (Zwf) (Figura 5A). La acción conjunta de la Zwf y la fosfogluconolactona (Pgl) generan 2 moléculas de NADPH y esta vía se considera la principal fuente de NADPH en la célula [27]. En la parte no oxidativa de esta vía, se generan metabolitos de importancia para la biosíntesis de nucleótidos como la ribosa y de la vía de aminoácidos aromáticos como la eritrosa 4-fosfato (E4P). El PP no solo se conecta a la glucólisis vía la Zwf; también lo puede hacer mediante la acción de las transcetolasas (TktA,B) y de la transaldolasa (Tal) que producen F6P y GAP (Figura 16).

3.2. Metabolismo central de carbono.

Una vez que *E. coli* ha transportado y fosforilado a la glucosa, ésta se cataboliza a través del metabolismo central de carbono [27-29] (Figura 5A). De manera general, la G6P se transforma en fructosa-6-fosfato (F6P) por la fosfoglucoisomerasa (Pgi). F6P se fosforila en el carbono 6 mediante la acción de la fosfofructocinasa (Pfk), que acopla una molécula de ATP para llevar a cabo la reacción que produce a la fructosa 1,6-difosfato (F16P). La F16P se fracciona por la acción de la F16P aldolasa (FbaA,B) para generar di-hidroacetona 1-fosfato (DHAP) y gliceraldehido 3-fosfato (GAP); estas dos moléculas mantienen un equilibrio regulado por la triosa fosfato isomerasa (Tpi). El GAP recibe un grupo fosfato para generar gliceraldehido 1,3-fosfato (G13P): esta reacción la cataliza la GAP deshidrogenasa (GapA). El fosfato en el carbono 1 del G13P se transfiere a una molécula de ADP mediante la acción de la fosfoglicerato cinasa (Pgc), generando una molécula de ATP y 3-fosfoglicerato (3PG). La enzima fosfoglicerato mutasa (GpmA,M) transloca el grupo fosfato del carbono 3 al carbono 2 generando 2-fosfoglicerato (2PG). Este compuesto contiene un grupo hidroxilo en el carbono 3, el cual se reduce a un doble enlace para formar fosfoenolpiruvato (PEP):

esta reacción la cataliza la enzima enolasa (Eno). Finalmente, el grupo fosfato en el carbono 2 del PEP se transfiere a una molécula de ADP generando ATP y PYR: esta reacción la catalizan dos enzimas con actividad de piruvato cinasa, la PykA y la PykF) [30].

Las actividades de la citrato sintasa (GltA) y de la fosfato acetiltransferasa (Pta) compiten por la acetil-CoA (AcCoA) hacia el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) o a la producción de acetato, respectivamente. La actividad de la malato sintasa (AceB) también consume al AcCoA y es parte del “shunt” de glioxilato.

3.3. Regulación transcriptional.

La regulación transcripcional de los genes de la glucólisis la gobiernan esencialmente tres proteínas: Mlc, Crp_(AMPc) y Cra [12]. Esta regulación puede ser por la inducción o la represión de los genes del sistema PTS y de los genes glucolíticos (Figura 5A). Mlc inhibe los genes que codifican para los complejos del PTS para el transporte de la glucosa y la maltosa. Cuando hay glucosa en el medio de cultivo, ésta se fosforila y se introduce a la célula. Esta acción constante de fosforilación mantiene a los miembros de PTS en un estado no fosforilado. La proteína IIB^{Glc} en el estado no fosforilado forma un complejo con Mlc, que evita que inhiba la transcripción de los genes PTS específicos para glucosa [31]. La regulación que ejercen Crp_(AMPc) y Cra es más compleja e involucra a varios genes glucolíticos, gluconeogénicos, del TCA, del ciclo de las pentosas y de la respiración [31-33]. Cuando la disponibilidad de glucosa es baja, las proteínas PTS están fosforiladas. La proteína IIA^{Glc} fosforilada forma un complejo con la enzima adenilato ciclasa Cya cuya actividad transforma una molécula de ATP en AMP cíclico (AMPc), en donde el grupo fosfato de la ribosa hace un enlace con el hidroxilo en el carbono 3. Esta molécula forma un complejo con la proteína Crp, el cual es un factor de transcripción que activa genes que codifican para las proteínas involucradas en el transporte y la asimilación de otras fuentes de carbono y de otros procesos celulares (genes bajo represión catabólica). Es muy importante hacer notar que uno de los genes que se encuentran reprimidos por este complejo es *rpoS*, el cual

codifica para la subunidad de la RNA polimerasa σ^s o σ^{38} , que es específica para algunos genes glucolíticos y de estrés, entre otros [34]. Otra proteína reguladora del metabolismo central de carbono es el represor catabólico Cra [35]. Este represor se identificó primero como represor del operón *fru*, pero eventualmente fue asociado como represor de los genes glucolíticos e inductor de los gluconeogénicos. La proteína Cra se encuentra activa cuando hay bajas concentraciones de F16P. Cuando el organismo consume glucosa las pozas de los intermediarios metabólicos aumentan, entre ellos la F16P. Este metabolito puede formar un complejo con la proteína Cra inactivando la actividad como represor de Cra y como consecuencia se activan los genes glucolíticos y se inhiben los genes gluconeogénicos. En la Figura 5B se muestran los procesos de los genes reportados en [32, 33] que se encuentran regulados por estas dos proteínas (términos GO). De manera general, Crp induce el transporte y el catabolismo de fuentes de carbono, mientras que Cra inhibe la glucólisis e induce la gluconeogénesis. El antagonismo entre estas dos proteínas genera un balance estricto entre la glucólisis y la gluconeogenesis, lo que permite al organismo adaptarse rápidamente a cambios en la disponibilidad de fuentes de carbono.

3.4. Regulación post transcripcional.

Se ha observado que existe regulación post transcripcional del gen *ptsG* del PTS. En condiciones de estrés debido a la acumulación de G6P [36], el regulador transcripcional SgrR forma un complejo con este compuesto. Dicho complejo actúa como inductor transcripcional del sRNA SgrS. Esta molécula interacciona con el RNA mensajero *mptsG* inhibiendo su traducción e induciendo su degradación mediada por la RNAsaP [37-39] (Figura 5A).

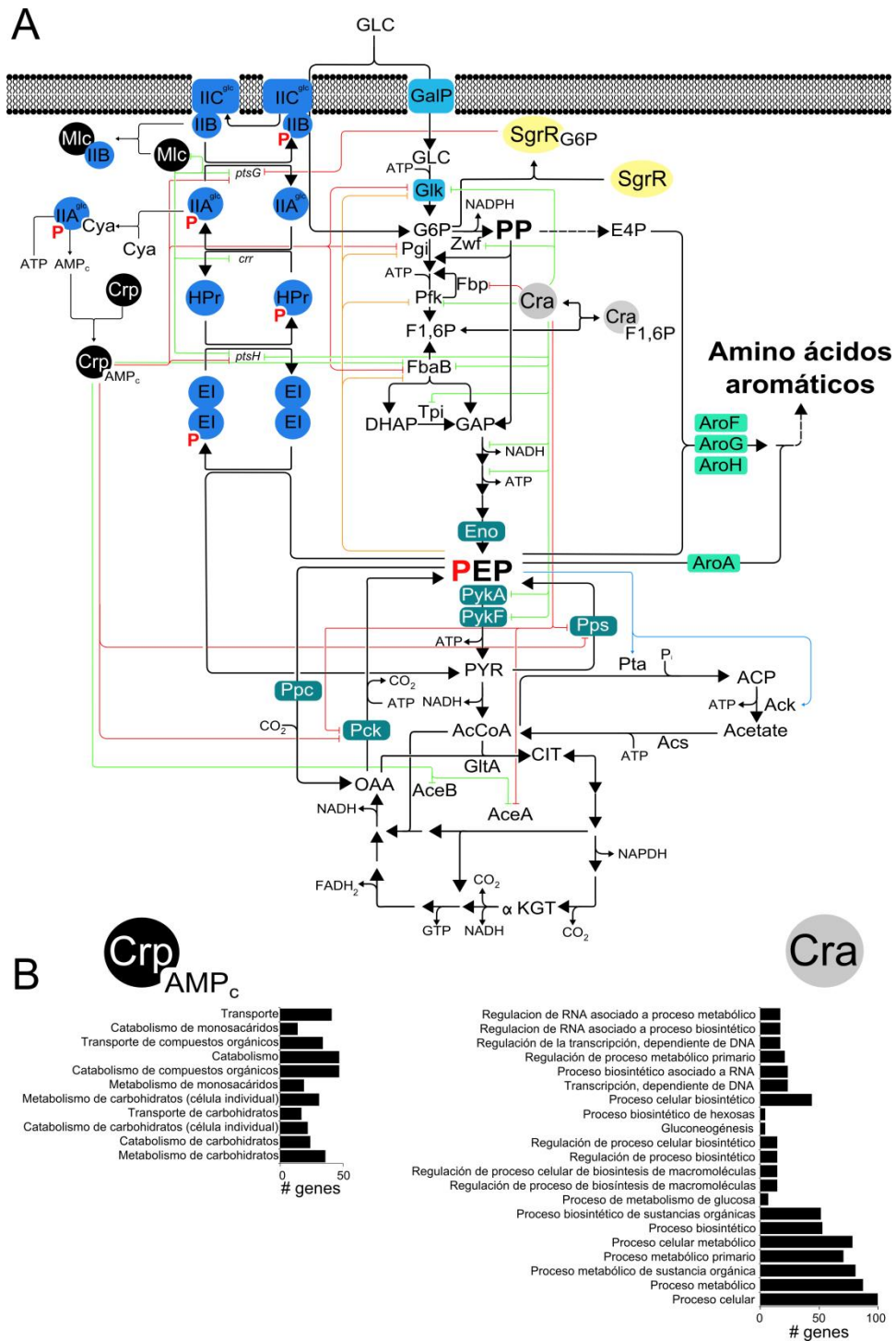


Figura 5. A) Metabolismo central de carbono. En la figura se muestran las vías de la glucólisis, pentosas y TCA, también se muestra el sistema PTS. Se describe parte de la regulación transcripcional de PTS, glucólisis y parte de TCA debido al complejo Crp_{AMP_c} y Cra (Rojo activación y verde inhibición). También se muestra la regulación alostérica debido a PEP (Azul activación y anaranjado inhibición). B) El efecto Crp_{AMP_c} Vs Cra. En la figura se muestran los términos GO de los genes reportados en [32, 33] analizados en GO term finder (<http://go.princeton.edu/cgi-bin/GOTermFinder>) [40] con un p-value ≤ 0.01.

4. Regulación alostérica y transcripcional del nodo PEP.

El nodo PEP puede estudiarse como la región del metabolismo central de carbono en dónde convergen el metabolismo glucolítico y el gluconeogénico. Éste también guarda una estrecha relación con el nodo de la F6P, por lo que tiene influencia en el transporte de glucosa. Aún más, las enzimas relacionadas de manera directa con este nodo son sensibles al estado energético del organismo, ya que pueden censar el AMP (PykA), el ATP (PykF, Pck) y el GTP (Ppc), estableciendo con esto una relación estrecha entre la glucólisis y el TCA. En el caso de la PykA, se regula de manera positiva por pentosas fosfatadas, esto hace que este nodo también sea sensible a los niveles de los metabolitos de la vía de las pentosas.

4.1. Regulación de *pykA* y *pykF*.

Las isoenzimas de la piruvato cinasa se encuentran codificadas por los genes *pykA* y *pykF*. La regulación del gen *pykF* la media la proteína reguladora Cra y recientemente se ha identificado también al gen *pykA* como un blanco de este regulador [33, 35]. La regulación alostérica es diferente en estas dos enzimas: PykF se regula de manera positiva por la F16P y de manera negativa por el ATP, el guanosin trifosfato (GTP) y la succinil coenzima A (SUCC CoA) [41]. Por otro lado, la PykA se activa por el adenosin monofosfato (AMP), el 6-fosfo-D-gluconato (6PGL), la D-ribulosa-5-fosfato (RU5P), la D-xilulosa-5-fosfato (XU5P), la D-ribosa-5-fosfato (R5P) y la D-sedoheptulosa-7-fosfato (S7P) y se inactiva por la SUCC CoA [42]. Se ha observado que la actividad de piruvato cinasa debida a PykF es 1.6 y 6 veces mayor que la debida a PykA, tanto en un fondo silvestre como en una cepa PTS⁻ evolucionada para poder crecer en glucosa como única fuente de carbono (PTS⁻ glc⁺) [43, 44]. Basado en esta observación, a la PykF se le considera como la enzima que tiene la actividad más importante de piruvato cinasa en *E. coli* [45-47].

4.2. PEP carboxilasa (Ppc) y PEP carboxicinas (Pck).

La enzima anaplerótica Ppc (codificada en el gen *ppc*) se activa por la F6P, el GTP y la AcCoA, mientras que se inactiva por varios intermediarios del ciclo del TCA: el citrato (CIT), el malato (MAL), el fumarato (FUM) y el succinato (SUCC). El aminoácido aspartato (ASP) también tiene un efecto negativo en la actividad de la Ppc [48]. Por otra parte, la regulación alostérica de la enzima gluconeogénica Pck se lleva a cabo de manera negativa por el PEP y el ATP [49]; mientras que a nivel genético la proteína Cra activa la transcripción del gen que la codifica.

4.3. Efecto del PEP en el metabolismo.

La regulación del nodo PEP puede tener un fuerte impacto en la regulación de la glucólisis. Se ha reportado que el metabolito PEP inhibe alostéricamente a las enzimas Glk, Pfk, Pgi, y FbaA (Figura 5A) [50, 51]. Esto tiene como consecuencia una acumulación de la F6P y la G6P, los cuales activan de manera indirecta a la RNAsaP la cual a su vez degrada al mensajero del gen *ptsG* (IIA^{glc}), el cual al ser componente del PTS, tiene como consecuencia que se interrumpa el transporte de glucosa (Figura 5A) [37-39, 52]. El PEP también puede activar a las enzimas fosfo acetiltransferasa (Pta) y acetato cinasa (Ack) [53].

5. Biosíntesis de aminoácidos aromáticos.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el PEP es el precursor de la vía del shikimato. Esta vía consta de 7 reacciones, cuyo producto final es el corismato (CHO). Del nodo del CHO se desprenden tres vías, que llevan a los productos finales de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos: tirosina (TYR), fenilalanina (PHE) y triptófano (TRP).

5.1. Vía del shikimato.

La primera reacción de la vía del shikimato la cataliza la enzima 3-deoxi-D-arabino heptulosonato 7-fosfato sintasa, la cual está codificada por los genes *aroF*, *aroG* y *aroH*. Estas isoenzimas utilizan una molécula de PEP y de E4P, las cuales se condensan para generar el 3-deoxi-D-arabino heptulosonato 7-fosfato (DAHP) (Figura 5A y 18) [54]. La primera reacción que hace uso del NADPH como poder reductor es la catalizada por la SHIK deshidrogenasa (AroE) que utiliza el dehidroshikimato (DHS) para generar el SHIK. Esta molécula se fosforila por la SHIK cinasa (AroK, AroL), que acopla una molécula de ATP para generar el shikimato-3-fosfato (S3P). Una molécula adicional de PEP es utilizada para condensarse con el S3P por la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (AroA), generando el 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSP) [55]. Finalmente, el producto final de la vía, el CHO se sintetiza a partir del 5-enol-piruvil shikimato-3-fosfato (EPSP) por la actividad de la CHO sintasa (AroC).

5.2. Biosíntesis de fenilalanina (PHE).

Una vez que se ha alcanzado el producto final de la vía (CHO), éste puede canalizarse a tres vías: la que genera la PHE y la TYR, a través del prefenato (PPH), y la que genera el TRP, a través del antranilato (ANTH) [56]. Particularmente la vía que genera la PHE comienza con la transformación del CHO a fenilpiruvato (PPY) por la acción de la enzima bifuncional corismato mutasa-prefenato deshidratasa (PheA); esta reacción tiene como intermediario el PPH. Finalmente, el grupo amino de una

molécula de glutamato (GLU) se transfiere al PPY para generar la PHE y el alfa cetoglutarato (α -KGT): esta reacción la lleva a cabo la amino transferasa (TyrB) (Figura 18).

5.3. Usos industriales de los aminoácidos aromáticos.

Los amino ácidos aromáticos, así como intermediarios de la vía del shikimato son compuestos que tienen aplicaciones industriales [11, 57-61]. Entre estos se encuentra el DHS, que es precursor de la hidroquinona que es utilizada en la industria del hule como agente oxidante [62], la PHE, que es precursor del edulcorante aspartame y de la L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) [63], y el SHIK como precursor del antiviral osetalmivir [58]. Diversos trabajos en el área han demostrado que la disponibilidad del PEP es un factor de suma importancia para el diseño de estrategias experimentales para la producción de estos metabolitos [64, 65].

6. Disponibilidad de PEP.

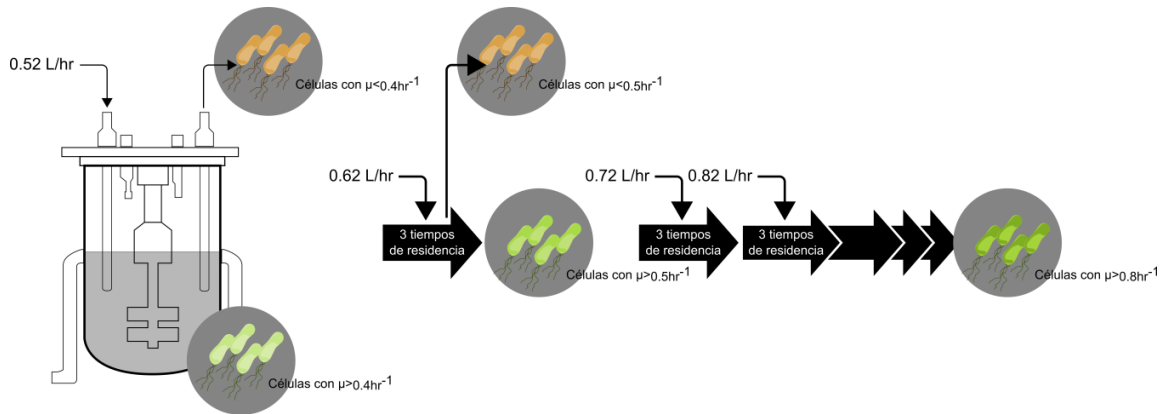
Debido a que en *E. coli* la principal actividad que consume el PEP es el PTS, seguida de las piruvato cinasas PykA y PykF, estas enzimas han sido objetivo de diversos estudios que buscan discernir el papel que sus actividades juegan en la fisiología de este organismo. El transporte PTS de una molécula de glucosa utiliza una molécula de PEP (generando una de PYR): esto causa un 100% de intercambio entre el PEP y el PYR por molécula de glucosa introducida (Figura 5A y 16) [16-19]. Debido a lo anterior, el PTS ha sido blanco de inactivación para generar cepas con mayor disponibilidad de PEP [11]. Sin embargo, la inactivación de PTS causa una reducción en la velocidad específica de crecimiento debido que en la cepa mutante participan sistemas de transporte de menor velocidad (Figura 4B). Aún más, algunas de las estrategias utilizadas en la ingeniería de vías metabólicas implican la delección de uno o de todos los genes del sistema PTS, lo que resulta en alteraciones en la regulación transcripcional de genes de glucólisis y otros sistemas del microorganismo.

6.1. Cepas PTS⁻ glc⁺.

Para fines industriales, el mayor problema asociado a la inactivación del PTS es la baja velocidad específica de crecimiento, que afecta esencialmente la productividad del compuesto de interés. Para solucionar esto se seleccionó una cepa PTS⁻ en cultivo continuo con glucosa como única fuente de carbono, la cual adquirió la capacidad de crecer a una velocidad específica de crecimiento cercana a la de la cepa silvestre (PTS⁺ glc⁺) (Figura 6) [43].

Cuando esta cepa se caracterizó se encontró que el transporte y la fosforilación de glucosa se llevaba a cabo por la acción conjunta de la GalP y la Glk, respectivamente [66, 67] (Figura 7C). Esta cepa fue probada para determinar la disponibilidad del PEP y se encontró que podía producir niveles de aminoácidos aromáticos mayores a los observados para la cepa silvestre (PTS⁺) (Figura 7D) [43, 64, 68]. Puesto que los cambios fenotípicos de esta cepa PTS⁻ glc⁺ no pueden ser asociados a un cambio específico en el genoma, sino a varias mutaciones [69], dicho fondo genético no

permite una descripción “limpia” de los cambios determinados en el microorganismo. Esto llevó a la generación de una cepa PTS⁻ a la que se le sustituyó el promotor nativo del gen *galP* por el promotor fuerte *Trc*, lo que permitió a esta cepa adquirir un



fenotipo PTS⁻ glc⁺ [70].

Figura 6. Método de selección por quimiostato de cepas PTS⁻ con fenotipo glc⁺. El tiempo de residencia es el tiempo promedio que una célula permanece en el cultivo antes de ser lavada por el flujo de medio de cultivo

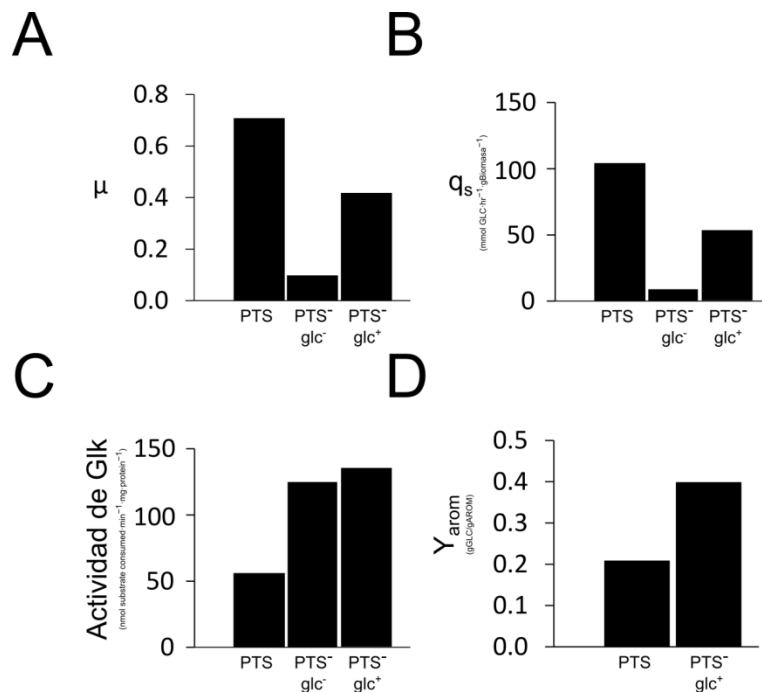


Figura 7. Propiedades de crecimiento y producción de amino ácidos aromáticos de las cepas silvestre, PTS⁻, PTS⁻ glc⁺. A) Velocidad específica de crecimiento (hr⁻¹). B) Velocidad específica de consumo de glucosa. C) Actividad de glucocinasa. D) Rendimiento de amino ácidos aromáticos totales. Datos obtenidos de [43, 64, 66, 68].

7. Determinación de flujos de carbono.

El flujo de carbono se define como la cantidad de moles de sustrato que se procesan por unidad de tiempo, por una actividad enzimática específica. La determinación de los flujos de carbono es una manera de describir *in vivo* las actividades en el metabolismo de un organismo.

7.1. Matriz estequiométrica.

Para poder determinar la distribución de los flujos de carbono, es importante conocer las reacciones del metabolismo central de carbono, en este caso de *E. coli*. Es fundamental hacer la suposición de que el comportamiento del sistema con el que se trabaja es cercano al equilibrio, en donde el cambio de la concentración de las pozas de metabolitos con respecto al tiempo es cero. Con esta información se construye una matriz estequiométrica, la cual agrupa en los renglones las reacciones de la vía metabólica (m) y en las columnas los coeficientes estequiométricos de los metabolitos involucrados en dichas reacciones (n). Esto genera una matriz de dimensión $M \times N$ con $M - N$ grados de libertad (Figura 8). Generalmente hay más metabolitos que reacciones, lo que significa que los grados de libertad tienen un valor positivo y por lo tanto la matriz no tiene una solución única, sino un hiperplano de soluciones [71] (Figura 8).

7.2. Distribución isotópica.

Si se asume que la vía metabólica descrita en la sección anterior se alimenta con glucosa marcada con un isótopo ^{13}C de carbón, cuyo peso por mol es 1 gr mayor al isótopo natural ^{12}C , entonces ¿cómo se distribuye el isótopo ^{13}C en los esqueletos de carbono en el metabolismo central de carbono? Si consideramos que el producto final del metabolismo central son los aminoácidos, entonces cuando la glucosa se encuentra marcada dichos productos finales tendrán diferentes isotopómeros. Pueden existir dos tipos de isotopómeros, aquellos que tienen el mismo peso molecular pero diferente posición del (los) isótopo(s) y aquellos con diferente peso y distribución del

éstos con un flujo en particular? El flujo de carbono es una propiedad del metabolismo que está asociada al tiempo y a los cambios en la composición del esqueleto de carbono analizado.

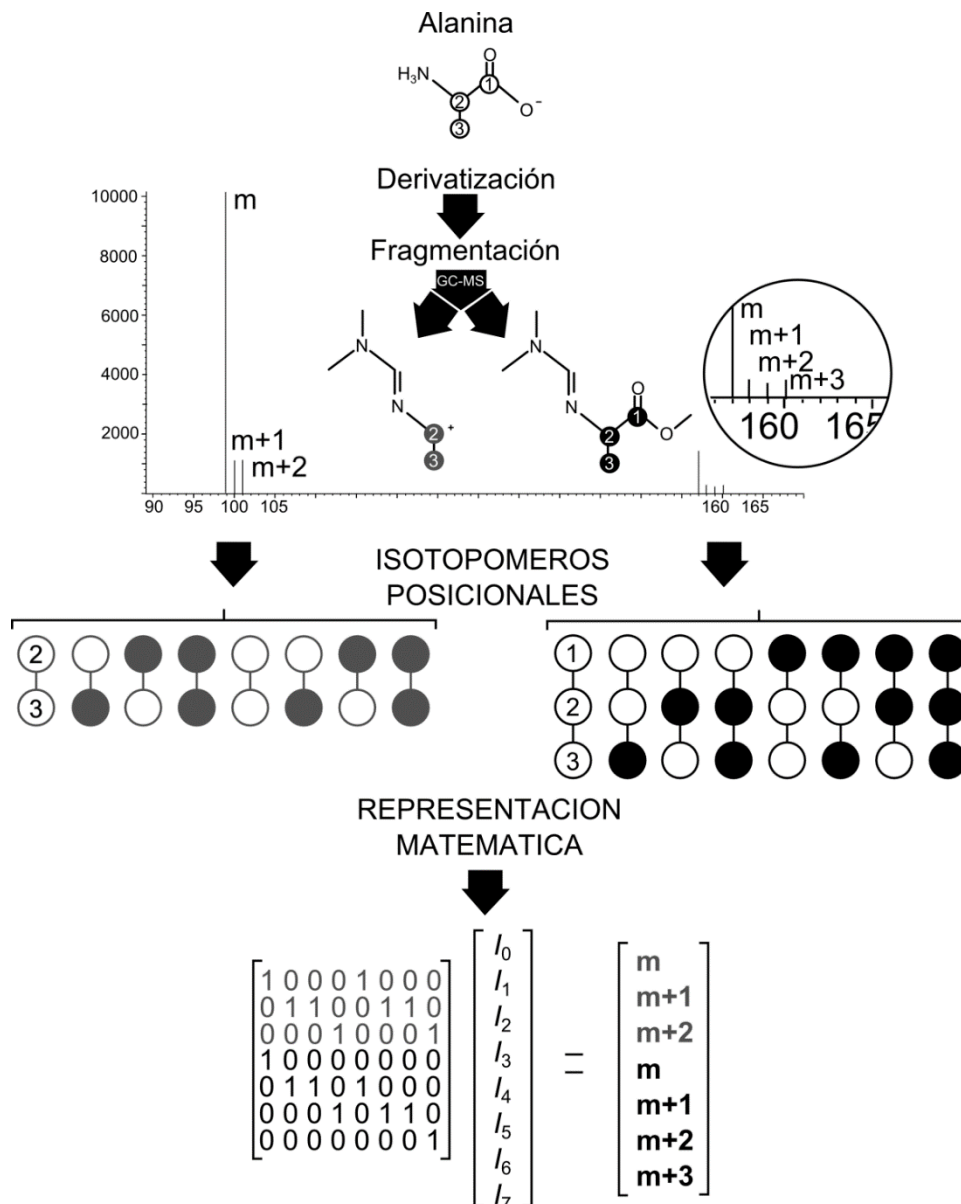
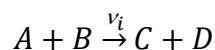


Figura 9. Generación de matriz de isotópómeros posicionales. La alanina se derivatiza con dimetilformamide dimetilacetil (DMF-DMA) y después se fracciona en un espectrómetro de masas. Los iones moleculares formados contienen dos y tres carbonos de la alanina (en gris y negro respectivamente).

El uso de matrices de mapeo de isotopómeros (IMM por sus siglas en inglés) permite seguir los cambios en el esqueleto de carbono conforme se transforma durante el metabolismo [75]. Si se tiene una reacción:



, en donde A y B son los reactivos y C y D son los productos de la reacción con un flujo v_i . Si se sabe la abundancia I_A e I_B de los isotopómeros que conforman a los reactivos A y B, entonces es posible determinar la abundancia I_C e I_D de los isotopómeros que conforman a los productos C y D mediante las ecuaciones:

$$I_C = (IMM_{A>C}I_A) \otimes (IMM_{B>C}I_B)$$

$$I_D = (IMM_{A>D}I_A) \otimes (IMM_{B>D}I_B)$$

, en dónde el operador \otimes denota a la multiplicación entre matrices. Si estos se multiplican por la velocidad de producción (flujo) de los isotopómeros I_C e I_D se obtiene las fórmulas:

$$\frac{dI_C}{dt} = r_C (IMM_{A>C}I_A) \otimes (IMM_{B>C}I_B)$$

$$\frac{dI_D}{dt} = r_D (IMM_{A>D}I_A) \otimes (IMM_{B>D}I_B)$$

, la solución de este sistema de ecuaciones diferenciales da como resultado el valor de la producción de los compuestos C y D, que es el flujo de carbono que transcurre en la reacción i [73].

7.4. Flujos metabólicos.

Encontrar los flujos de las reacciones que componen el metabolismo central de carbono y de síntesis de aminoácidos, implica resolver las ecuaciones diferenciales de las matrices de mapeo isopoméricas de cada metabolito de la vía. La solución de cada sistema de ecuaciones diferenciales (la matriz es un sistema de ecuaciones) es computacionalmente un proceso complejo, por lo que al tratar de determinar la

solución de cada metabolito es, en términos computacionales imposible. Para encontrar la distribución de flujos del metabolismo central de carbono, es necesario recurrir a la matriz estequiométrica, en donde las abundancias isotopoméricas de cada aminoácido (datos experimentales) se comparan con las abundancias isotopomérica de cada aminoácido obtenidas de “una” de las soluciones (vértice) del hiperplano (mínimos cuadrados) (Figura 8). La comparación se basa en un error mínimo establecido: si la comparación no es menor a este error entonces se hace otra ronda para encontrar “una” nueva solución de la matriz estequiométrica, la cual se establece como la distribución de flujos de carbono teóricos que mejor describe los valores obtenidos experimentalmente [73, 76] (Figura 10).

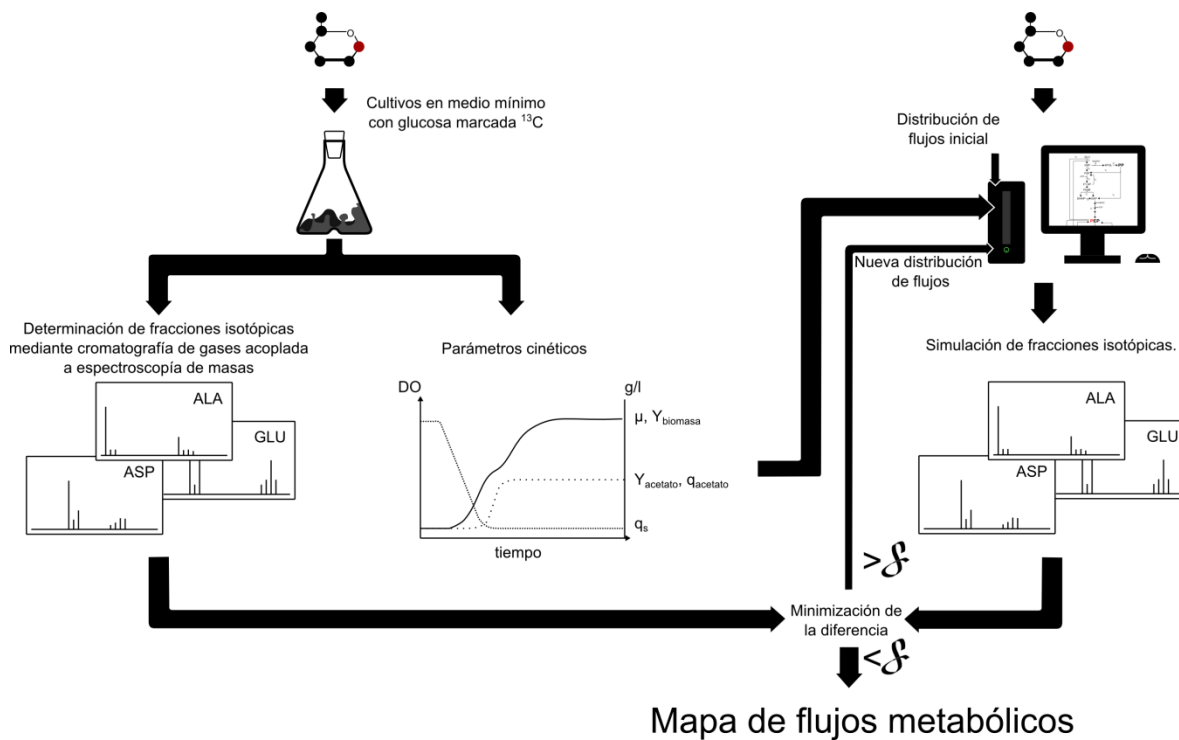


Figura 10. Determinación de distribución de flujos metabólicos. En la parte izquierda se muestra el procedimiento experimental y en la parte derecha el modelamiento matemático.

8. Flujos de carbono en el nodo PEP.

E. coli, al ser el organismo modelo por excelencia, ha sido objeto de un gran número de estudios relacionados al nodo del PEP. Estos estudios utilizan diversas estrategias experimentales para describir los cambios en este nodo. Particularmente la determinación de flujos de relativos carbono (fluxoma) permite describir la plasticidad que este organismo tiene para adaptarse a diversas condiciones. Flores S. et al., [66] determinaron las distribuciones de flujos de carbono relativos en cultivos-lote con glucosa mediante NMR en una cepa silvestre y en dos cepas $PTS^- glc^+$. Emmerling M. et al., [46] determinaron flujos de carbono, mediante NMR, de una cepa que carecía de la actividad de la *pyk*; esto se hizo en quimiostato con limitación de glucosa o limitación de amonio. Finalmente, Siddiquee, K. A. et al., [47] hicieron un trabajo en donde relacionaban la expresión genética, la actividad enzimática y los flujos de carbono de una cepa *pykF*⁻. Estos trabajos describen que en nodo del PEP, las actividades de la Ppc y la Pck tienen un papel importante en la capacidad del organismo a adaptarse a cambios en el flujo de carbono entre el PEP y el PYR.

JUSTIFICACIÓN.

Si bien los trabajos anteriores han sido de importancia en el entendimiento del metabolismo central de carbono de *E. coli*, debido a que han sido hechos en fondos PTS⁺, éstos no permiten describir los cambios del metabolismo asociados al flujo de carbono entre el PEP y el PYR debido únicamente a las piruvato cinasas. Este trabajo permitirá una mejor descripción del papel que juegan las isoenzimas piruvato cinasa en el metabolismo central de carbono y en la producción de aminoácidos aromáticos de *E. coli*.

OBJETIVO GENERAL.

Estudiar la relación entre el flujo PEP→PYR y su efecto en la capacidad de crecimiento y distribución de flujos de carbono en una cepa PTS⁻ *galP*⁺, así como su posible aplicación para la producción amino ácidos aromáticos.

HIPÓTESIS.

Si el flujo de carbono entre el PEP y el PYR depende solo de una de las piruvato cinasas PykA ó PykF, los efectos en el metabolismo central de carbono y producción de aminoácidos aromáticos dependerán no solo del flujo entre estos dos metabolitos, sino de la regulación transcripcional y alostérica a las que los genes *pyk* y las isoenzimas Pyk están sujetos(as).

MATERIALES Y MÉTODOS.

9. Cepas.

Los organismos utilizados en este trabajo se encuentran descritos en la Tabla 1. De manera general se generaron tres grupos: el grupo de estudio, el grupo productor de aminoácidos aromáticos (A) y el grupo *pck*. Cada grupo está compuesto de los fondos genéticos PTS⁻, PTS⁻ *galP*⁺, PTS⁻ *galP*⁺ *pykA*⁻ y PTS⁻ *galP*⁺ *pykF*⁻ (Tabla 1).

9.1. Cepa PTS⁻ *galP*⁺.

Las cepas generadas en este trabajo se derivan de la cepa VH32 *galP*⁺, la cual proviene de la cepa silvestre K-12 (F⁻ λ⁻ que utiliza galactosa) [77] (Figura 11). La cepa VH32 *galP*⁺ carece de los tres componentes del transporte de glucosa del PTS (Δ *ptsI*, *ptsH*, *crr::kan*) dejando el gen *kan* que confiere resistencia al antibiótico kanamicina [78]. También el gen que codifica para el represor LacI del operon *lac* está ausente. Como estrategia para aumentar el transporte de glucosa, a este organismo se le sustituyó el promotor silvestre del gen *galP* por el promotor fuerte *trc*, lo que le da un fenotipo PTS⁻ *glc*⁺ (PTS⁻ *galP*⁺). Teniendo en cuenta que LacI reprime al promotor *Tcr* y que el gene de este represor no está presente en este organismo, *galP* tiene expresión constitutiva [70]. El método mediante el cual se introdujo el promotor *trc* deja un cassette de resistencia a cloranfenicol (*cat*) flanqueado por los sitios de reconocimiento (FRT) de la λ Red recombinasa (FLP) [79]. En este trabajo, el cassette de resistencia *cat* se removió transformando a la cepa VH32 *galP*⁺ con el plásmido pCP20 que expresa a la FLP [80]. La cepa obtenida se nombró VH33 (PTS⁻ *galP*⁺), y puede ser sujeta a más modificaciones que hagan uso del gen de resistencia a cloranfenicol como marcador de selección.

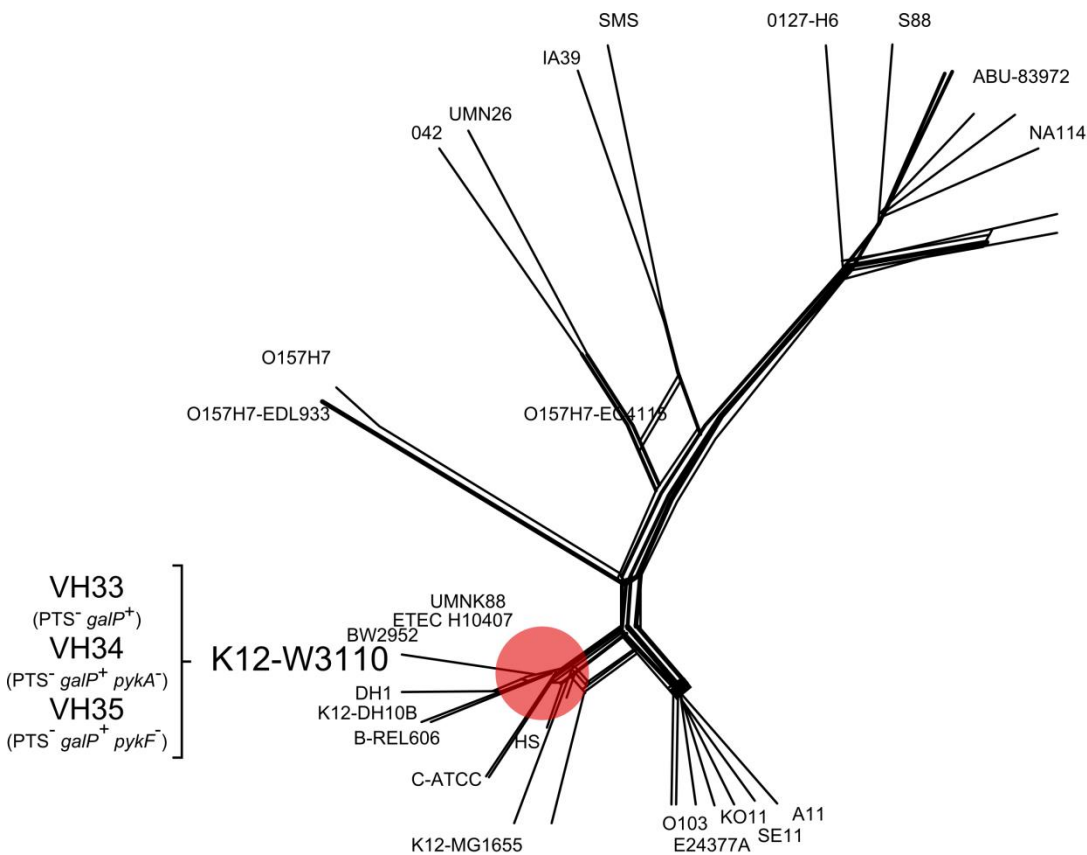


Figura 11. Árbol filogenético en donde se muestra la línea de las cepas utilizadas en este trabajo (último ancestro común en círculo rojo). Adaptada de: <http://bacpathgenomics.wordpress.com/2011/06/15/snp-base-phylogeny-confirms-similarity-of-e-coli-outbreak-to-eaec-ec55989/>.

9.2. Cepas $PTS^- galP^+ pyk^-$.

Utilizando la cepa VH33 ($PTS^- galP^+$), en este estudio los genes *pykA* y *pykF* se deletaron para generar las cepas $PTS^- galP^+ pykA^-$ y $PTS^- galP^+ pykF^-$, las cuales se nombraron como VH34 y VH35, respectivamente. La delección se hizo mediante transducción utilizando el fago P1: la cepa donadora fue la PB28 ($\Delta ptsI, ptsH, crr::kan, pykA::cat, pykF::aacC1$), la cual tiene interrumpidos los genes *pykA* y *pykF* por los casetes de resistencia a cloranfenicol (*cat*) y a gentamicina (*aacC1*), respectivamente. Las cepas VH34 y VH35 se seleccionaron en medio selectivo con cloranfenicol (10mg/ml) para el fondo $PTS^- galP^+ pykA^-$ y gentamicina (5 μ g/ml) para el fondo $PTS^- galP^+ pykF^-$, respectivamente.

9.3. Cepas $PTS^- galP^+ pyk^- pck^-$.

En este trabajo se generaron también versiones de las cepas W3110, VH33, VH34 y VH35 que carecen de la actividad de Pck (*pck*). Las versiones *pck* de las cepas W3110, VH33 y VH35 se construyeron mediante transducción con el fago P1 utilizando como cepa donadora a la JM101 *pck*⁻ (*supE*, *thi*, Δ (*lac-proAB*), F', *pck::cat*) [81]. En esta cepa el gen *pck* se sustituyó por el cassette de resistencia a cloranfenicol *cat*: el método mediante el cual fue generada esta cepa deja sitios FRT los cuales, como ya se había mencionado previamente, pueden removerse por la acción de la λ -Red recombinasa. Puesto que la cepa VH34 tiene integrado el casete de resistencia a cloranfenicol *cat*, la versión VH34 *pck* de esta cepa no puede generarse a partir del lisado del fago P1 derivado de la cepa JM101 *pck*⁻. Para resolver esto, a la cepa VH33 *pck* se le removió el casete *cat* y luego se transdujo con el fago P1 utilizando como cepa donadora a PB28 (Δ *ptsI*, *ptsH*, *crr::kan*, *pykA::cat*, *pykF::aacC1*). La cepa VH34 *pck* se seleccionó en medio con cloranfenicol.

9.4. Cepas productoras de aminoácidos aromáticos.

Con la finalidad de evaluar la disponibilidad del PEP para la producción de aminoácidos aromáticos, las cepas W3110, VH33, VH34 y VH35 se transformaron con los plásmidos pJLBaroG^{fbr}*tktA* y pTrcpheA^{ev2} [68, 82]. pJLBaroG^{fbr}*tktA* contiene una versión del gen *aroG* resistente a inhibición por la PHE. Además se encuentra bajo el promotor fuerte *lacUV5* inducible por isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). En este plásmido también se encuentra clonado, bajo su promotor nativo, el gen *tktA* (transcetolasa A), puesto que el primer paso de la vía común del SHIK es la condensación de PEP con la E4P, y puesto que estas cepas tienen un mayor flujo de PEP, el flujo de E4P debe de incrementarse aumentando el número de copias de TktA presentes. El plásmido pTrcpheA^{ev2} contiene una copia de una versión del gen *pheA* resistente a inhibición por la PHE, con esto se busca aumentar el flujo de carbono hacia el producto final PHE. Con estas modificaciones se asegura un aumento en el flujo de carbono hacia aminoácidos aromáticos.

Tabla 1: Cepas de *Escherichia coli* y plásmidos utilizados en este proyecto.

Cepa	Descripción	Referencia
PB28	$\Delta ptsI, ptsH, crr::kan, pykA::cat, pykF::aacC1$	[44]
JM101 <i>pck</i> ⁻	<i>SupE, thi, $\Delta(lac-proAB), F', pck::cat$</i>	[81]
W3110	F ⁻ λ -INV(<i>rrnD - rrnE</i>)1	[77]
VH32 <i>galP</i> ⁺	W3110 $\Delta ptsH, ptsI, crr::Km, \Delta lacI, lacZ::loxP$ $\Delta P_{galP}::cat, P_{Trc}$	[70]
VH33	VH32 <i>galP</i> ⁺ $\Delta P_{galP}::P_{Trc}$	Este trabajo
VH34	VH33 <i>pykA::cat</i>	Este trabajo
VH35	VH33 <i>pykF::aacC1</i>	Este trabajo
W3110 <i>pck</i> ⁻	W3110 <i>pck::cat</i>	Este trabajo
VH33 <i>pck</i> ⁻	VH33 <i>pck::cat</i>	Este trabajo
VH34 <i>pck</i> ⁻	VH34 <i>pck::cat</i>	Este trabajo
VH35 <i>pck</i> ⁻	VH35 <i>pck::cat</i>	Este trabajo
W3110A	W3110/JLBaroG ^{fbr} <i>tktA, pTrcpheA^{ev2}</i>	Este trabajo
VH33A	VH33/JLBaroG ^{fbr} <i>tktA, pTrcpheA^{ev2}</i>	Este trabajo
VH34A	VH34/JLBaroG ^{fbr} <i>tktA, pTrcpheA^{ev2}</i>	Este trabajo
VH35A	VH35/JLBaroG ^{fbr} <i>tktA, pTrcpheA^{ev2}</i>	Este trabajo
Plásmidos		
pCP20	FLP ⁺ , $\lambda ci857^+$, $\lambda pRRep^{ts}$, Ap ^R , Cm ^R	[80]
pJLBaroG ^{fbr} <i>tktA</i>	<i>aroG^{fbr}</i> bajo el control del promotor <i>lacUV5</i> ; y <i>tktA</i> bajo su promotor nativo, lleva el represor <i>lacIq</i> y el marcador <i>tet</i> que confiere Resistencia al antibiotico tetraciclina. Origen de replicación pACYC184	[82]

10. Perfiles cinéticos.

10.1. Preparación del cultivo.

Se hicieron cinéticas de cultivos lote en medio mínimo suplementado con glucosa como única fuente de carbono a una concentración de 10 g/l. La composición del medio mínimo fue: K_2HPO_4 90 mM, KH_2PO_4 10 mM, $(NH_4)_2SO_4$ 40 mM, NaCl 20 mM, $MgSO_4 \cdot 2H_2O$ 1.6 mM, $CaCl_2$ 0.05 mM, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.072 mM y vitamina B1 0.05 mM. Todos los cultivos stock se guardaron a $-70^\circ C$ en medio LB con glicerol 25% (v/v). Se preparó un preinóculo en 5ml de medio rico LB; se dejó durante la noche a 300rpm y $37^\circ C$; se lavó el preinóculo dos veces con medio mínimo frío y se utilizó para inocular 50ml de medio mínimo con glucosa 5g/l comenzando con una densidad óptica de 0.1. El cultivo se incubó durante 12 horas a 300rpm y $37^\circ C$ en una incubadora con rotación (G25, New Brunswick Scientific, Inc., New Brunswick, NJ). El inóculo se lavó con medio mínimo frío y se utilizó para inocular 30ml de medio mínimo con glucosa 10g/l a una densidad óptica (DO_{600}) de 0.01, se tomaron muestras a distintos intervalos de tiempo durante 24 horas. En el preinóculo e inóculo se utilizaron los antibióticos Km ($10 \mu g/\mu l$), Cm ($10 \mu g/\mu l$) y Gm ($5 \mu g/\mu l$) para las cepas VH33, VH34 y VH35 respectivamente.

10.2. Tratamiento de la muestra.

A las muestras recolectadas se les midió densidad óptica utilizando un espectrómetro Biomate 5, ThermoSpectronic. Las células se centrifugaron y el sobrenadante se filtró utilizando un filtro de $0.45 \mu m$ e inmediatamente se guardaron a $-20^\circ C$ para su posterior caracterización por HPLC. La determinación de gramos de peso seco se realizó multiplicando la densidad óptica por un factor de 0.45 el cual se comprobó para la cepa W3110 (esto se hizo por triplicado, el valor tiene una desviación estándar menor al 10%).

10.3. Determinación de glucosa y ácidos orgánicos.

Se determinó la concentración de glucosa y de ácido acético mediante HPLC utilizando una columna Aminex HPX-87H (300 X 7.8 mm; 9 Am Bio-Rad, Hercules, CA). Las condiciones de corrida fueron: fase móvil, 5mM H₂SO₄; flujo, 0.5 ml/min y temperatura 50°C. Bajo estas condiciones la glucosa se determinó utilizando índice de refracción, mientras que los productos de fermentación como el ácido acético se determinaron utilizando arreglo de diodos a 210 nm. Estas mediciones se hicieron en un sistema Waters HPLC; bomba cuaternaria 600E, inyector automático 717, índice de refracción 2410 y arreglo de diodos 996.

10.4. Cálculo de perfiles de fermentación.

Con los datos obtenidos del análisis anterior se calcularon los valores de la velocidad específica de crecimiento (μ), el rendimiento de biomasa (Y_X), la velocidad específica de consumo de glucosa (q_s), el rendimiento de ácido acético (Y_{ac}) y la velocidad específica de producción de ácido acético (q_{ac}) (Figura 12). La μ se obtuvo de la pendiente de la recta que se obtiene de graficar el logaritmo base 10 de los gramos de biomasa contra el tiempo. El rendimiento de biomasa se obtiene de la pendiente de la recta que se forma al graficar los gramos de biomasa producidos contra los gramos de glucosa consumidos. La velocidad específica de consumo de glucosa se obtiene al dividir μ entre Y_X . El rendimiento de acético se determina de la misma forma que se Y_X , La productividad de acético se calcula multiplicando μ por Y_{ac} .

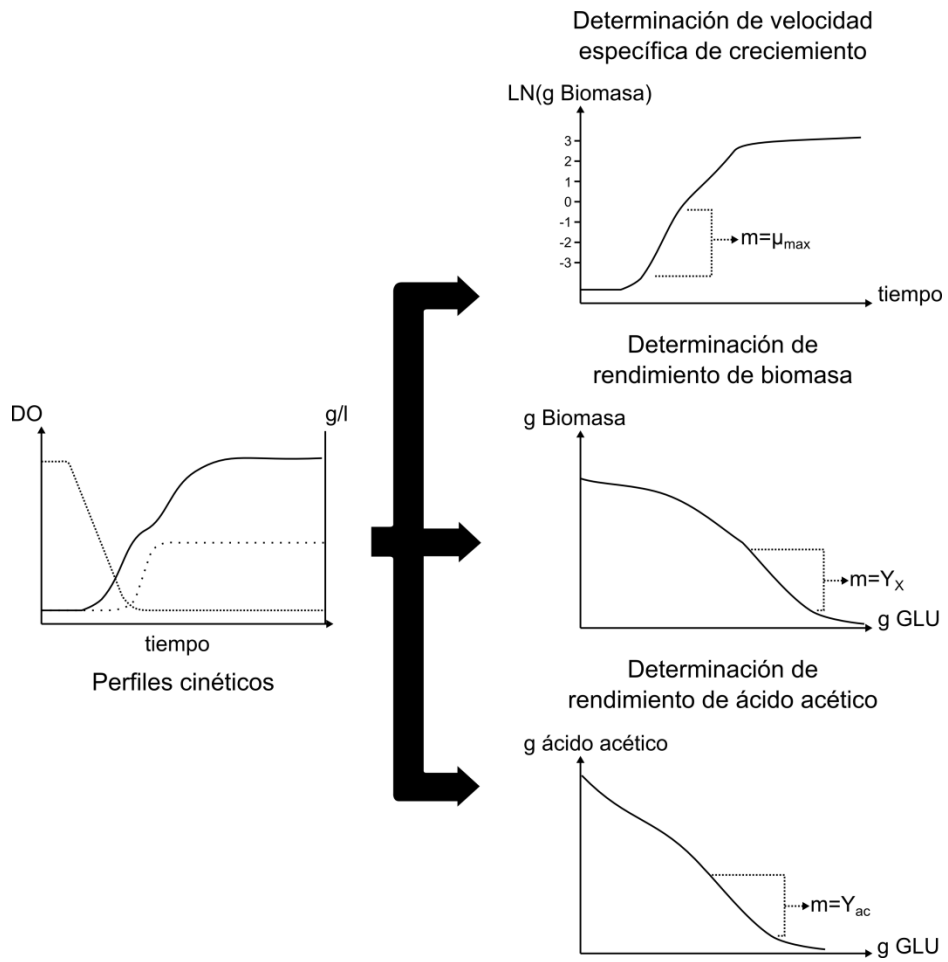


Figura 12. Determinación de perfiles cinéticos.

11. Determinación de flujos de carbono.

11.1. Preparación del cultivo

Se preparó un preinóculo en 5ml de medio rico LB y se dejó durante la noche a 300rpm y 37°C. Se lavó el preinóculo dos veces con medio mínimo frío y se utilizó para inocular 50ml de medio mínimo con glucosa 5g/l comenzando con una densidad óptica de 0.1, se incubó durante 12 horas a 300rpm y 37°C en una incubadora con rotación (G25, New Brunswick Scientific, Inc., New Brunswick, NJ). Se lavó el inóculo una vez con medio mínimo frío y se utilizó para inocular, a una densidad óptica de 0.01, 10ml de medio mínimo que contiene glucosa marcada en el carbono 1 con el isótopo de peso 13 ($^{13}\text{C}_1$ glucosa) a una concentración de 10g/l. En el preinóculo e inóculo se utilizó antibiótico. Km (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), Cm (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y Gm (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) para las cepas VH33, VH34 y VH35 respectivamente. Se recolectó todo el cultivo (10ml) en fase exponencial, 9 horas ($\text{DO}_{600\text{nm}}=3.72$) para la cepa W3110, 15 horas ($\text{DO}_{600\text{nm}}=6.68$) para la cepa VH33 y 16 horas para las cepas VH34 y VH35 ($\text{DO}_{600\text{nm}}=7.68$ y $\text{DO}_{600\text{nm}}=5.1$ respectivamente). Las células fueron centrifugadas (9000rpm, 10 minutos) y se guardó el sobrenadante a -20°C para su posterior análisis por HPLC.

11.2. Obtención del hidrolizado.

La pastilla celular se secó (Eppendorf 5301 VacuFuge Centrifugal Vacuum Concentrator) y posteriormente se hidrolizó con 50 μl de HCl 6 M por cada miligramo de peso seco. La hidrólisis se llevó a cabo durante 24 horas a 110°C, una vez transcurridas las 24 horas se neutralizó el hidrolizado con NaOH 6 M y se filtró para separar los restos celulares (Titan 2 HPLC filter purple, 0.2 μm nylon membrane), se secó y se guardó a -20°C.

11.3. Análisis por espectrometría de masas de los hidrolizados.

La determinación de las fracciones isotopoméricas de los aminoácidos de las proteínas celulares se determinó por cromatografía de gases acoplada a

espectrometría de masas (GC-MS) [83, 84]. El análisis de los aminoácidos se hizo después de derivatizar con t-butil-dimetilsilil [85, 86]. Todas las muestras se midieron en modo “scan” para comprobar que no hubiera interferencia isobárica entre los aminoácidos y otros componentes del hidrolizado. Hecho esto, el patrón de aminoácidos se determinó por triplicado vía monitoreo del ion seleccionado de un grupo de iones, que representa la fracción [M-57] la cual contiene el esqueleto de carbono completo de los aminoácidos.

11.4. Modelamiento metabólico y estimación de parámetros.

Todas las simulaciones metabólicas se llevaron a cabo en una computadora personal utilizando Matlab 7.0 (Mathworks Inc.) Los detalles de las herramientas computacionales están reportadas en varias fuentes [86-88]. La red metabólica modelada incluye a las vías EMP, PP, TCA, las reacciones anapleróticas (Ppc y Pck), las enzimas málicas (Mae), el shunt de glioxalato (AceA y AceB). El cálculo de la demanda anabólica de precursores se basó en la composición de la biomasa de *E coli*. Los datos de marcaje de los aminoácidos proteínicos y los datos estequiométricos de tres experimentos independientes se combinaron para el cálculo de los flujos metabólicos. Los flujos metabólicos que dan una desviación mínima entre las fracciones isotopoméricas simuladas y las experimentales se tomaron como la distribución de flujos de la red metabólica. Puesto que el número de reacciones (ecuaciones) es mayor que el número de metabolitos (incógnitas), la red estaba sobre determinada, es decir, tenía un número finito de soluciones. Esto permitió realizar un tratamiento de mínimos cuadrados, con la finalidad de encontrar la mejor solución del sistema. El análisis estadístico de los flujos determinados se hizo mediante el método de Monte Carlo [86]. La presentación de la distribución de flujos se hace relativos a la glucosa, esto es, se considera el transporte de glucosa como un flujo de 100% y los otros flujos se presentan relativos a este valor.

12. Producción de aminoácidos aromáticos.

12.1. Células en reposo.

Para determinar la disponibilidad del PEP se generaron cepas productoras de aminoácidos aromáticos (W3110A, VH33A, VH34A y VH35A). La capacidad de estas cepas para canalizar carbono hacia la vía común del SHIK fue evaluada mediante células en reposo. El objetivo de esta técnica de cultivo es que el organismo utilice el carbono que introduce únicamente en el metabolismo central, esto es, que el carbono no sea dirigido hacia la producción de biomasa. Para ello se hicieron cinéticas de cultivos lote en medio mínimo suplementado con glucosa como única fuente de carbono, a una concentración de 10 g/l adicionando el antibiótico cloranfenicol con el objetivo de detener el crecimiento celular. Se preparó un preinóculo en 5ml de medio rico LB y se dejó durante la noche a 300rpm y 37°C. Se lavó el preinóculo dos veces con medio mínimo con 10 g/l de extracto de levadura (MM+YE) frío y se utilizó para inocular 50ml de MM+YE con glucosa 5g/l comenzando con una densidad óptica de 0.1, se incubó durante 12 horas a 300rpm y 37°C en una incubadora con rotación. Se lavó el inóculo con medio mínimo frío y se utilizó para inocular 50ml de medio mínimo con glucosa 10g/l a una densidad óptica (DO_{600}) de 0.1. Se adicionó cloranfenicol (50 μ g/ml) e IPTG (100 μ M) para detener el crecimiento e inducir los genes *aroG^{fbr}* y *pheA^{ev2}*. Es importante mencionar que aun cuando la cepa VH34 contiene el cassette de resistencia para cloranfenicol, después de los lavados con medio mínimo el crecimiento de esta cepa es reducido, esto mimetiza el efecto de la adición de cloranfenicol por lo que el fenotipo es el de las células en reposo (Figura 17). Los cultivos se incubaron a 37°C y 300 rpm durante 10 horas tomando muestras cada hora.

12.2. Tratamiento de muestra.

A las muestras recolectadas se les midió la densidad óptica utilizando un espectrómetro Biomate 5, ThermoSpectronic. Las células fueron centrifugadas y el

sobrenadante fue filtrado utilizando un filtro de 0.45µm e inmediatamente se guardaron a -20°C para su posterior caracterización por HPLC.

12.3. Determinación de glucosa y ácidos orgánicos.

Se determinó la concentración de la glucosa y el ácido acético mediante HPLC utilizando una columna Aminex HPX-87H (300 X 7.8 mm; 9 Am Bio-Rad, Hercules, CA). Las condiciones de corrida fueron: fase móvil, 5mM H₂SO₄; flujo, 0.5 ml/min y temperatura 50°C. Bajo estas condiciones la glucosa se determinó utilizando índice de refracción, mientras que el ácido acético, el DHS y el SHIK se determinaron utilizando arreglo de diodos a 210 nm. Estas mediciones se hicieron un sistema Waters HPLC; bomba cuaternaria 600E, inyector automático 717, índice de refracción 2410 y arreglo de diodos 996. La determinación de la concentración de la PHE se hizo con una columna Phenomenex Synergy Hydro RP18 (150x4.6 mm; 4m) conectada a un sistema Agilent 1100 HPLC (Agilent technologies, Palo Alto, CA). Las condiciones de corrida fueron: fase móvil, 0.2% TFA en metanol 40%; flujo, 0.5 ml/min. La detección se llevó a cabo con un arreglo de diodos a 280 nm.

12.4. Cálculo de perfiles de producción de aminoácidos aromáticos.

Con los datos obtenidos del análisis anterior se calcularon los valores de la velocidad específica de crecimiento (μ), el rendimiento de biomasa (Y_X), la velocidad específica de consumo de glucosa (q_s), el rendimiento y la velocidad específica de producción del ácido acético, el DHS, el SHIK y la PHE. La velocidad específica de consumo de glucosa se obtuvo mediante la fórmula: $q_s = \frac{\Delta[GLC]}{(\bar{X})\Delta(t)}$, en donde $\Delta[GLC]$ es el cambio en la concentración de la glucosa, \bar{X} es la biomasa promedio y $\Delta(t)$ es el cambio en el tiempo. La misma fórmula se utilizó para el cálculo de las velocidades específicas de producción del ácido acético, el DHS, el SHIK y la PHE. Los rendimientos se calculan como se mencionó en la sección 10.4.

13. Determinación de la actividad total de piruvato cinasa.

Durante las fermentaciones en medio mínimo con glucosa 10g/l, en fase exponencial, se recolectaron las células mediante centrifugación (10,000 g por 10 minutos), se lavaron dos veces con buffer de fosfato de sodio (pH 7.2 a 4°C) 50 mM, se resuspendieron en el mismo buffer y se sonicaron (Ultrasonic Disrupter, Soniprep 150) para romperlas usando cuatro pulsos de 15 segundos en baño frío (0°C). Los restos celulares se separaron por centrifugación (10,000 g por 10 minutos a 4°C) y el extracto resultante se utilizó para determinar la actividad enzimática. Las actividades enzimáticas se determinaron de manera espectroscópica a 340nm y 30°C (Biomate 5, ThermoSpectronic) usando 1 U de lactato deshidrogenasa (Ldh) acoplado la reacción a la reducción del NADH [89]. La mezcla de reacción contiene KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, ADP 2 mM, NADH 0.2 mM, PEP 100 mM, fructosa-1,6 biphosphate (FBP) 1 mM, AMP 1 mM and ribose-5-phosphate (R5P) 1 mM. Los valores de actividad están reportados en unidades internacionales (IU) de actividad específica enzimática los cuales se definen como la cantidad de enzima requerida para convertir 1 mmol de sustrato en el producto por minuto por miligramo de proteína a 30°C. La concentración de proteína se midió usando el método de Lowry [90]. Las actividades enzimáticas se reportan como el promedio de tres experimentos independiente, con lo que se obtuvo una desviación estándar menor al 10%.

RESULTADOS.

14. Comprobación por PCR.

Se comprobó mediante PCR la inactivación de los genes, utilizando los oligos descritos en la Tabla 2. En la Figura 13A se muestran las regiones cromosomales en donde se encuentran los genes *pykA* y *pykF*, así como dichas regiones después de la interrupción con los casetes *cat* y *gen*, respectivamente. En la figura 13B se presenta el gel de agarosa en el que se separó el DNA producto de la reacción de PCR, utilizando los oligos para amplificar la región del gen *pykA* y del gen *pykF*. En la reacción que utiliza los oligos para el gen *pykA*, se observa un producto de 1.5 kb aproximadamente en la cepa silvestre; mientras que cuando el gen se interrumpe por el gen *cat*, el producto de la amplificación es de 2.5 kb. De manera más sencilla para la región del gen *pykF*, el oligo “reverso” alinea en la región del gen *aacC1* por lo que solo habrá producto (2 kb) en la región interrumpida.

Tabla 2: Oligos utilizados en este proyecto.

Nombre	Secuencia	Referencia
$P_{pykA}(fw)$	TGA AGG AAT CGC GTT TTG ATA	Este trabajo
$P_{pykA}(rv)$	GTA TTA GTA GAA CCC ACG GTA	Este trabajo
$P_{pykF}(fw)$	CGT AAC CTT TTC CCT GGA ACG	Este trabajo
$P_{aacC1}(rv)$	GAG TCC GGC TGA TGT TGG GAG TAG GTG GCT	Este trabajo
$P_{Pck}(fw)$	AATTATCGCATCCGGGCAG	[91]
$P_{pck}(rev)$	CAGGGCACGACAAAAGAAG	[91]

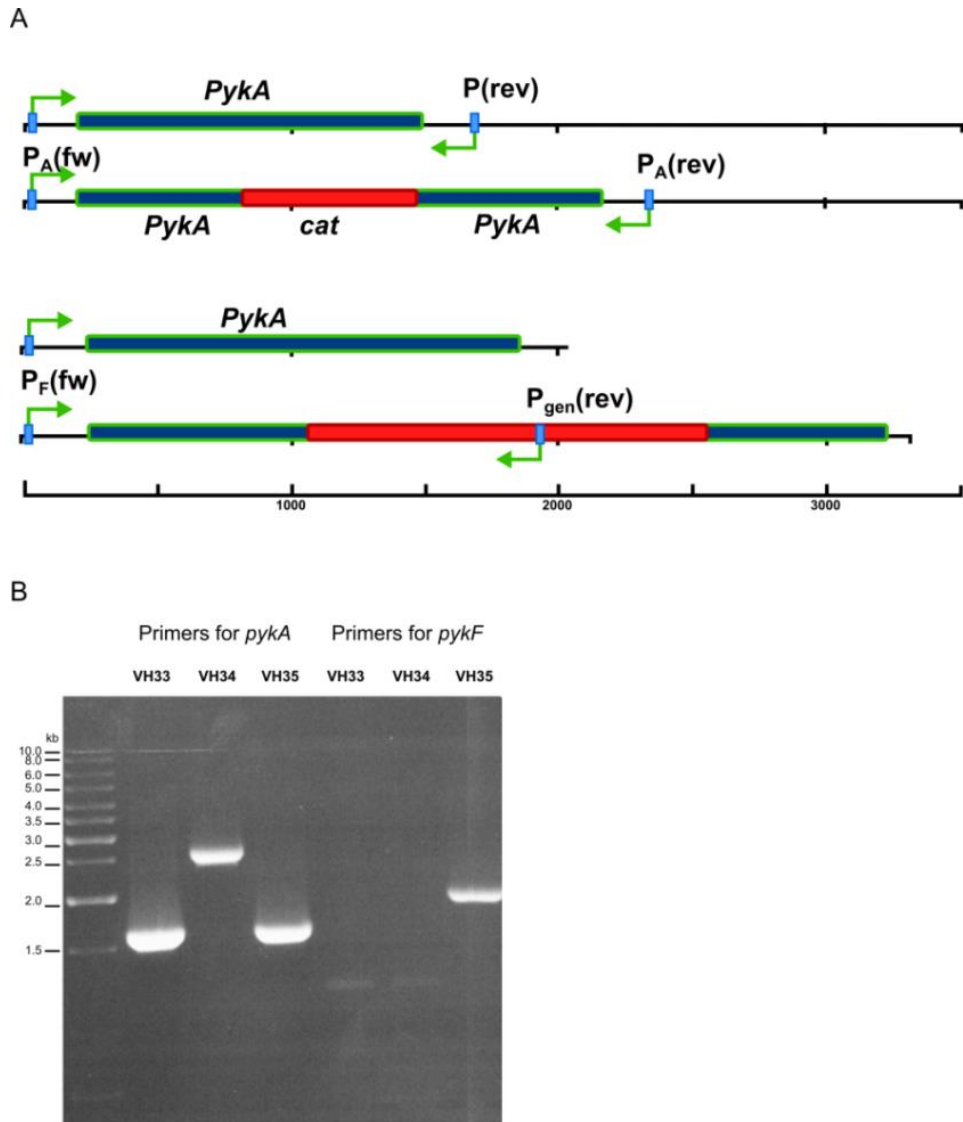


Figura 13. A) Comparación entre la región cromosomal del gen *pykA* en la cepa VH33 con la cepa VH34 que tiene interrumpido el gen por el cassette de resistencia a cloranfenicol. Se muestra también a los oligos utilizados para amplificar dichas regiones. Comparación entre la región cromosomal del gen *pykF* en la cepa VH33 con la cepa VH35 que tiene interrumpido el gen por el cassette de resistencia a gentamicina. Se muestra también a los oligos utilizados para amplificar dichas regiones. C) Fotografía de la separación de los productos de PCR de los oligos $P_{pykA}(fw)$, $P_{pykA}(rev)$, $P_{pykF}(fw)$ y $P_{gen}(rev)$ por electroforesis en gel de agarosa 1%.

15. Parámetros cinéticos.

Las curvas de producción de biomasa, consumo de glucosa y producción de ácido acético se muestran a continuación en la figura 14.

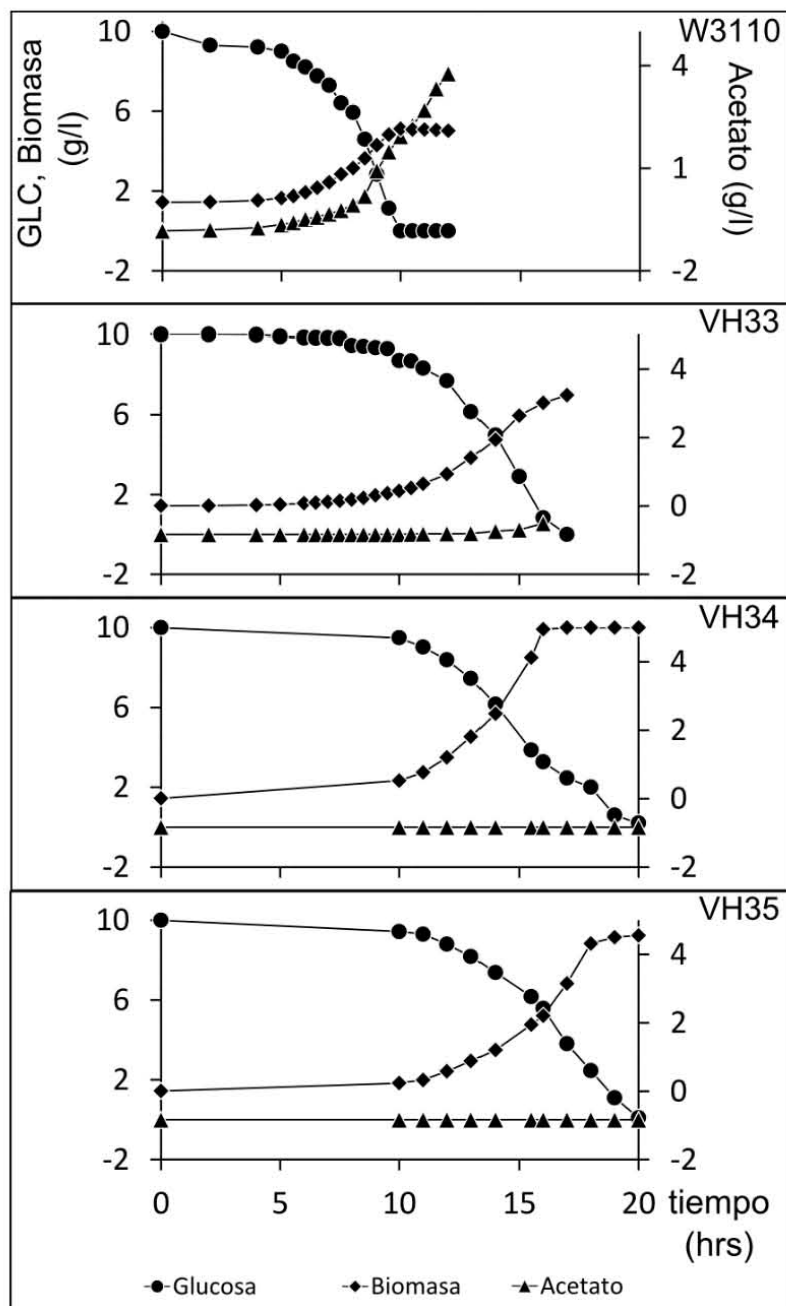


Figura 14. Curvas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de acético de las cepas W3110 (PTS⁻), VH33 (PTS⁻ galP⁺), VH34 (PTS⁻ galP⁺ pykA⁻) y VH35 (PTS⁻ galP⁺ pykF⁻) en medio mínimo suplementado con glucosa 10 g/L. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. En la figura se muestra una curva representativa.

De estas curvas se calcularon los parámetros cinéticos velocidad específica de crecimiento (μ), rendimiento de biomasa (Y_x), velocidad específica de consumo de glucosa (q_s), rendimiento de acético (Y_{ac}) y velocidad específica de producción de acético (q_{ac}), que se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Parámetros cinéticos de las cepas utilizadas en este trabajo.

Cepa	μ (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g / mol)	q_s (mmol / g / h)	$Y_{Ac/Glc}$ (mol / mol)	q_{Ac} (mmol / g / h)
W3110 (WT)	0.69 ± 0.01	52.44 ± 4.42	16.1 ± 0.33	1.2 ± 0.01	4.31 ± 0.12
VH33 (PTS ⁻)	0.45 ± 0.00	63 ± 3.60	6.9 ± 0.61	0.09 ± 0.00	0.23 ± 0.00
VH34 (PTS ⁻ PykA ⁻)	0.44 ± 0.00	104.4 ± 16.20	4.2 ± 0.61	--	--
VH35 (PTS ⁻ PykF ⁻)	0.36 ± 0.01	84.6 ± 9.00	4.2 ± 0.41	--	--
W3110 Pck ⁻	0.64 ± 0.04	51.76 ± 1.93	12.44 ± 0.23	0.32 ± 0.03	1.14 ± 0.01
VH33 <i>pck</i> ⁻ (PTS ⁻ Pck ⁻)	0.37 ± 0.00	80.47 ± 0.86	4.61 ± 0.09	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.00
VH34 <i>pck</i> ⁻ (PTS ⁻ PykA ⁻ Pck ⁻)	0.33 ± 0.02	101.00 ± 2.87	3.35 ± 0.13	--	--
VH35 <i>pck</i> ⁻ (PTS ⁻ PykF ⁻ Pck ⁻)	0.29 ± 0.00	73.32 ± 2.06	3.96 ± 0.13	--	--

La cepa silvestre W3110 mostró los valores de la μ , la q_s , la q_{ac} y el Y_{ac} más altos entre las cepas estudiadas en este trabajo (Tabla 3). Se observó un comportamiento decreciente conforme el número de actividades responsables del flujo entre el PEP y el PYR disminuye (PTS⁺→PTS⁻→PTS⁻pykA⁻ ó PTS⁻ PykF⁻). Es importante hacer notar que mientras que la cepa W3110 alcanza la fase estacionaria en alrededor de 10 horas, para las cepas con fondo PTS⁻ (VH33, VH34 y VH35) esto sucede alrededor de las 16 horas (Figura 14). De acuerdo a lo anterior es el hecho de que la velocidad específica de glucosa es dos y cuatro veces mayor en la cepa W3110 comparado con los fondos PTS⁻ (VH33) y PTS⁻ PykA o PTS⁻ PykF⁻ (VH34 y VH35) respectivamente. Respecto a la producción y rendimiento del acético, W3110 presentó los valores más altos entre las cepas evaluadas. La delección del sistema PTS en la cepa VH33 causó una caída del 97% en la magnitud del $Y_{Ac/Glc}$, y cuando alguno de los genes *pyk* se deleta en el fondo PTS⁻, no se detectó producción de acético.

En lo que respecta al rendimiento de biomasa, el comportamiento es al contrario del observado para los otros parámetros (PTS⁺<PTS⁻< PTS⁻pykA⁻ ó PTS⁻PykF⁻), en donde el valor mínimo se observa en W3110 y el máximo en VH34 con una relación 1:2.

16. Actividad de la piruvato cinasa.

Las actividades de piruvato cinasa se determinaron en las cepas estudiadas (Figura 15). Las cepas W3110 y VH33 tienen presentes las dos isoenzimas de piruvato cinasa, por lo que el valor reportado es la suma de ambas actividades. En las cepas VH34 y VH35 la actividad reportada es debido a la PykF ó la PykA respectivamente.

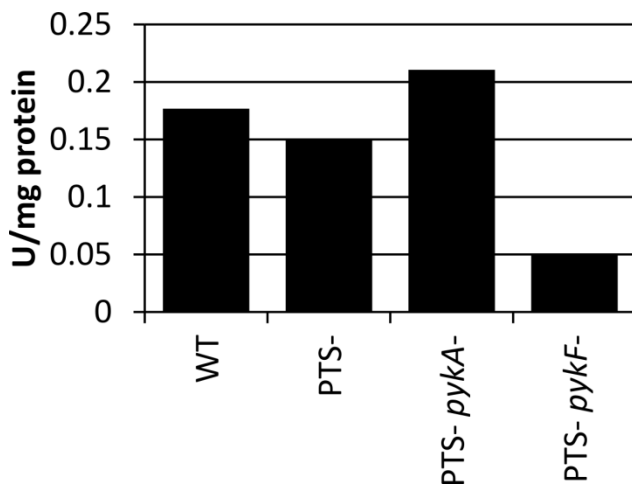


Figura 15. Actividad total de piruvato cinasa en las cepas W3110, VH33, VH34 y VH35. La actividad se determinó en células en fase exponencial. Los resultados mostrados son el promedio de tres experimentos independientes con una desviación estándar menor al 10%.

En las cepas W3110 y VH33 la actividad reportada es similar. Interesantemente la actividad de la PykF en VH34 es la máxima observada en las cepas evaluadas. Por otra parte este valor es bajo en la cepa VH35, el cual corresponde a la PykA y es una cuarta parte de la actividad de la PykF en VH34.

17. Determinación de flujos de carbono relativos.

Los flujos de carbono calculados para las cepas estudiadas se muestran en la Figura 16, donde se ven los valores relativos con respecto a la glucosa (100%), de tal forma que cuando se observa un valor sobre la reacción que genera un metabolito en particular este es la proporción, con respecto a la glucosa, de moles que transcurren por dicha reacción. Tomemos como ejemplo el nodo de la G6P para la cepa W3110. El transporte de glucosa en esta cepa se debe al PTS, por ello el valor de 100% se encuentra al lado de la representación de la reacción debida al PTS. En este nodo hay dos actividades que consumen a la G6P, Pgi y Zwf, de acuerdo a los datos obtenidos de la distribución de flujos de carbono, 83% de las moléculas de la G6P van hacia la glucólisis via la Pgi, mientras que 16% van hacia la PP via la Zwf.

17.1. El nodo de la G6P.

Analizando la distribución de flujos de carbono, comenzando con el nodo de la G6P, se observa que la cepa W3110 canaliza la mayor proporción de esqueletos de carbono hacia glucólisis vía la Pgi. Las cepas con el fondo PTS⁻ (VH33, VH34 y VH35) muestran una disminución de 15% en este valor. Como consecuencia, las cepas VH33, VH34 y VH35 duplican el flujo de carbono hacia la PP.

17.2. El nodo del PEP y del PYR.

Los flujos de carbono hacia el nodo del PEP, debido la actividad de enolasa (Eno) en las cepas VH33, VH34 y VH35 mostraron una disminución en dónde la cepa VH34 tuvo el valor más bajo entre estas cepas. Sin embargo, si se toma en cuenta las actividades responsables de la reacción entre y el PEP y el PYR (PTS, PykA y PykF), se tiene que la cepa W3110 tiene las tres actividades, VH33 sólo las actividades de las Pyk, y VH34 y VH35 una de las actividades de las Pyk. W3110, por el hecho de tener activo el PTS asegura un flujo de 100% entre el PEP y el PYR, lo que deja un 63% de flujo de carbono debido a las actividades de las Pyk, lo que en suma da un total de 163%. En VH33, al no tener el PTS, el valor calculado de flujo corresponde a las dos

actividades de las Pyk (142%), mientras que el flujo de 126 y 127% calculado en las cepas VH34 y VH35 se debe a la PykA y la PykF, respectivamente. Lo anterior muestra que el flujo de carbono relativo entre el PEP y el PYR debido a la(s) actividad(es) de la(s) Pyk en realidad aumenta en los fondos PTS⁻ con respecto a la cepa silvestre W3110.

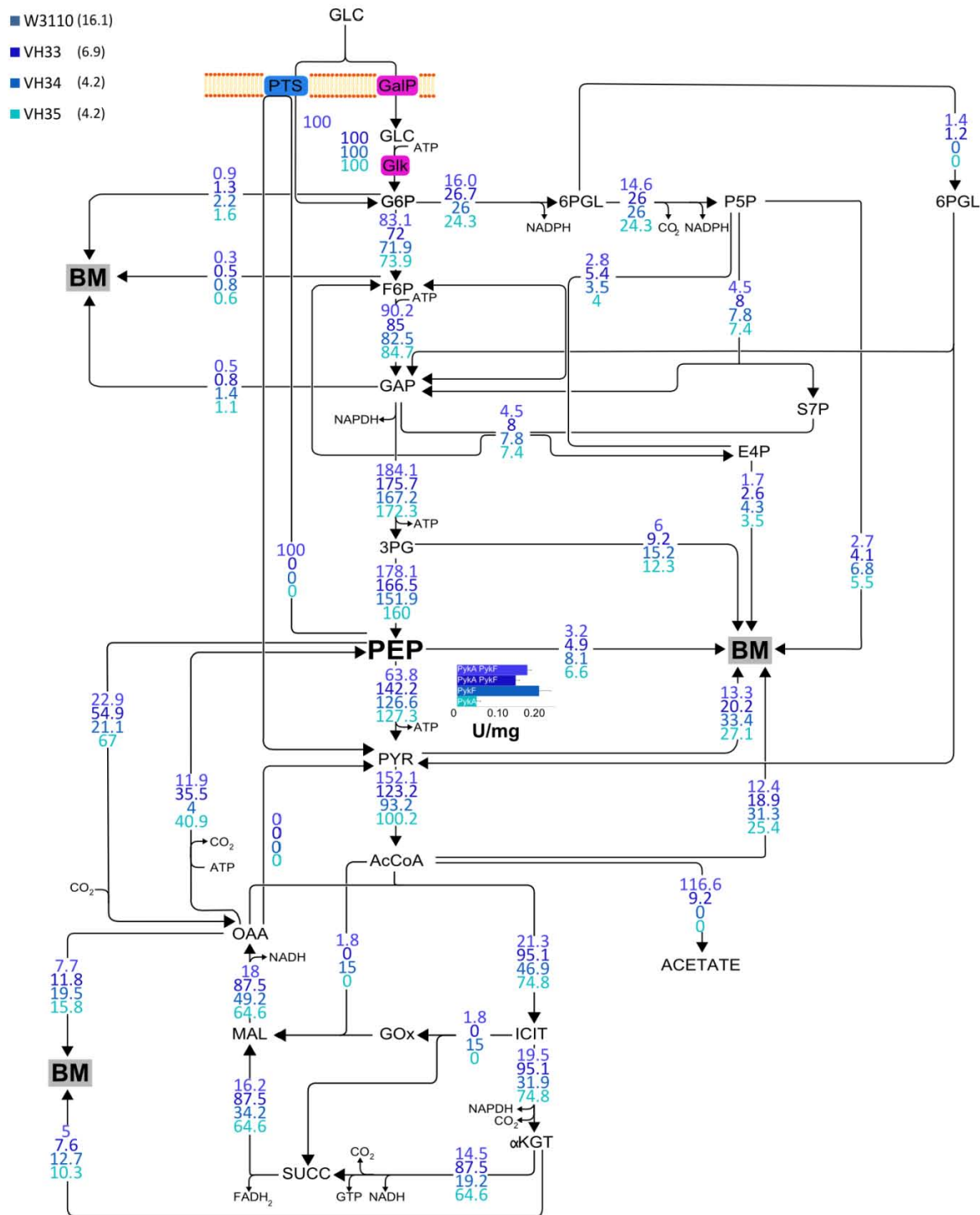


Figura 16. Distribución relativa de flujos de carbono de las cepas W3110 (PTS⁺), VH33 (PTS⁻ galP⁺), VH34 (PTS⁻ galP⁺ pykA⁻) y VH35 (PTS⁻ galP⁺ pykF⁻). Los valores para cada cepa se muestran en diferentes tonos de azul. También se muestran los valores de velocidad específica de consumo de glucosa (q_s) en mmol / g / h. En el nodo del PEP se incluyeron los valores de la actividad de la piruvato cinasa, así como la(s) proteína(s) responsable(s) de dicha actividad.

Se observó un ciclo entre el PEP y el OAA que se lleva a cabo por la reacción anapleurótica catalizada por la Ppc y la gluconeogénica catalizada por la Pck. El flujo neto de este ciclo es hacia el OAA y su magnitud es diferente en las cepas evaluadas. En W3110 el valor del flujo neto es de 11%, este valor aumenta a 19%, 17% y 26% en las cepas VH33, VH34 y VH35, respectivamente.

17.3. El nodo de la AcCoA.

La distribución de flujos de carbono alrededor de este nodo son los que muestran las diferencias más pronunciadas en los valores calculados en este trabajo. En el modelo utilizado, este nodo se nutre únicamente de la actividad del complejo de la piruvato deshidrogenasa. La cepa W3110 canaliza el 76% del carbono que llega a la AcCoA (152%) hacia la producción del acetato (fermentación) el flujo restante es canalizado a el TCA vía la citrato sintasa (GltA) y una muy pequeña proporción al shunt del glioxalato via la malato sintasa (AceB). La distribución de flujos es diferente en las cepas PTS⁻, en dónde la cepa VH33 canaliza solo 7% a la producción de acetato mientras que las VH34 y VH35 no lo hacen. Por otra parte, la cepa VH33 canaliza 77% de los esqueletos de carbono hacia el TCA, seguida de las cepas VH34 con un 64% y VH35 un 50%. Además, las cepas W3110 y VH35 presentaron flujo de carbono por el shunt del glioxalato de 1.8% y 15%, respectivamente, mientras que en las cepas VH33 y VH35 no se observó flujo de carbono a través de esta vía.

17.4. Producción de la biomasa.

Dentro de los cambios observados entre las cepas estudiadas, se encuentra el flujo destinado a la producción de la biomasa. Mientras que la cepa W3110 presentó los valores de flujo de carbono hacia la biomasa más bajos, las cepas VH33, VH34 y VH35 tuvieron altos flujos, siendo la cepa VH34 la que canalizó mayor flujo de carbono. Es particularmente ilustrativo el nodo de la AcCoA en donde la cepa W3110 canaliza un alto flujo de carbono hacia la producción del acético; sin embargo las cepas VH33, VH34 y VH35 reducen o no producen del todo el acético, pero utilizan de maneras distintas el flujo de carbono que llega a la AcCoA. La cepa VH33 canaliza 95%

del AcCoA hacia el TCA siendo el flujo de carbono hacia la biomasa de 19%, apenas 30% mayor que el de la cepa W3110. La cepa VH34 por el contrario canaliza 31% de la AcCoA hacia la producción de la biomasa a expensas de un flujo de 47% hacia el TCA. Finalmente, en la cepa VH35, la distribución de la AcCoA hacia el TCA y la biomasa fue de 74% y 25% respectivamente.

18. Producción de los aminoácidos aromáticos.

Puesto que el PEP es un precursor de la vía del SHIK de la cual se generan los aminoácidos aromáticos PHE, TYR y TRP, una manera de medir la disponibilidad del PEP es modificar las cepas a evaluar para que puedan canalizar el PEP hacia la biosíntesis de los aminoácidos previamente mencionados. Dichas modificaciones se describieron en la sección 9.4.

18.1. Células en reposo.

El objetivo de probar las cepas modificadas, para producir aminoácidos aromáticos en condiciones de células en reposo, radica en que dicho tratamiento permite que las células no utilicen la glucosa para la producción de la biomasa (gracias al efecto inhibitorio de la síntesis de proteínas del antibiótico cloranfenicol). Esto permite que la glucosa pueda ser dirigida al producto de interés, en este caso la PHE. En la Figura 17 se muestra la curva de crecimiento de las cepas evaluadas en este trabajo. De esta figura es claro que no se observa crecimiento significativo en las cuatro cepas evaluadas.

Tabla 4: Parámetros cinéticos de células en reposo.

Cepa	q_s (mmol / g / h)	q_{Ac} (mmol / g / h)	Y_{DHS} / Glc (mol / mol)	Y_{SHIK} / Glc (mol / mol)	Y_{PHE} / Glc (mol / mol)	$Y_{DHS+SHIK+PHE} / Glc$ (mol / mol)
W3110A	2.51±0.10	7.52±0.4	0.01±0.00	0.00±0.00	0.04±0.01	0.05±0.01
VH33A	0.70±0.04	--	0.13±0.03	0.06±0.01	0.25±0.03	0.44±0.06
VH34A	1.96±0.02	--	0.05±0.01	0.04±0.00	0.08±0.00	0.17±0.01
VH35A	0.91±0.04	--	0.24±0.01	0.06±0.00	0.03±0.01	0.33±0.02

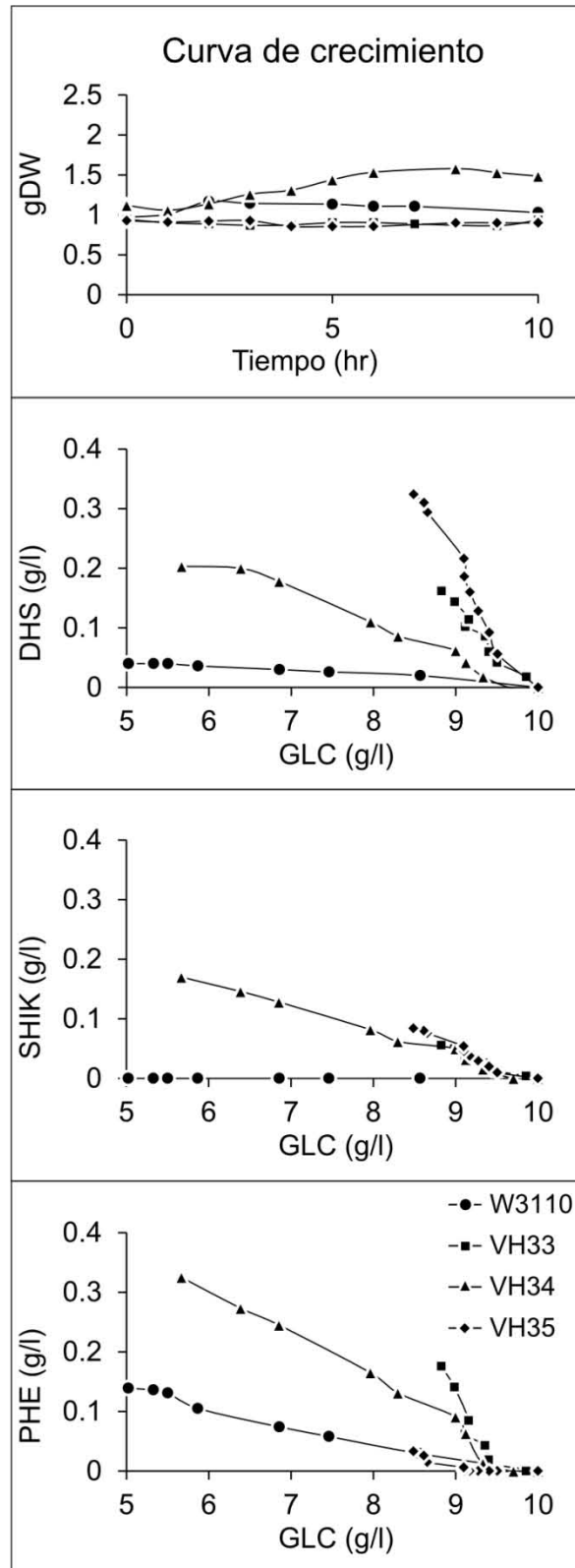


Figura 17. Curva de crecimiento y de producción del DHS, SHIK y de la PHE con respecto a la glucosa consumida de las cepas W3110 (PTS⁺), VH33 (PTS⁻ galP⁺), VH34 (PTS⁻ galP⁺, pykA⁻) y VH35 (PTS⁻ galP⁺, pykF⁻).

18.2. Rendimiento del DHS, el SHIK y la PHE.

Puesto que el PEP es un metabolito precursor de la vía del SHIK, y de acuerdo a los resultados anteriores que muestran cambios importantes alrededor de este nodo, se decidió evaluar la capacidad de las cepas estudiadas para producir intermediarios aromáticos y el producto final PHE. En la figura 18 se muestran los rendimientos de los intermediarios DHS y SHIK y del aminoácido aromático PHE.

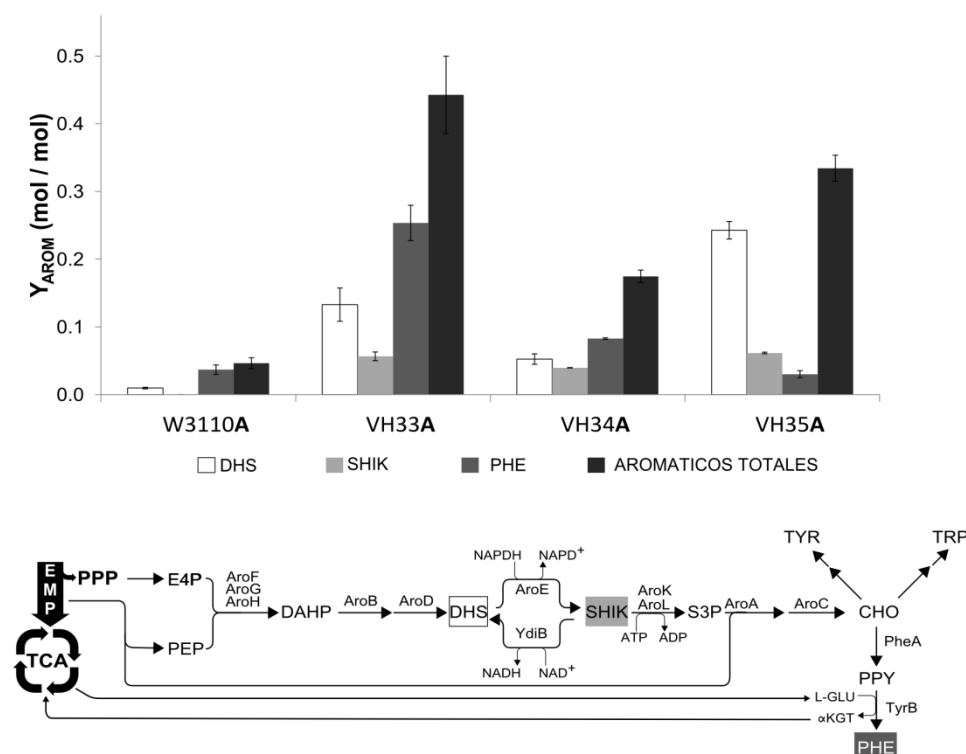


Figura 18. Rendimiento del DHS, el SHIK, la PHE y aromáticos totales de las cepas W3110 (PTS⁺), VH33 (PTS⁻ galP⁺), VH34 (PTS⁻ galP⁺, pykA⁻) y VH35 (PTS⁻ galP⁺, pykF⁻) transformadas con los plásmidos pJLBaroG^{fbtrktA} y pTrcpheA^{ev2}, que permiten dirigir el flujo de carbono a la vía común del SHIK y la vía del producto final PHE.

Los resultados obtenidos indican que las cepas evaluadas muestran fenotipos distintos en los rendimientos del DHS, el SHIK y de la PHE. La cepa VH35A produce DHS con mayor rendimiento (0.24), este valor es 24, 1.8 y 4.8 veces mayor que los valores observados en las cepas W3110A, VH33A y VH34A, respectivamente. El SHIK no se observó en los sobrenadantes de la cepa W3110A, mientras que las cepas con fondo PTS⁻ tuvieron valores similares de rendimiento de este metabolito (0.06, 0.04 y

0.06 para las cepas VH33, VH34A y VH35A, respectivamente). Al respecto de los rendimientos reportados de la PHE, la cepa VH33A es la que tuvo el máximo rendimiento con un valor de 0.25 mol / mol GLC, este valor es 4.8, 3 y 8.3 veces mayor que el observado para las cepas W3110A, VH34A y VH35A. La cepa W3110A fue la que presentó los menores valores de rendimiento en los tres metabolitos evaluados DHS, SHIK y PHE. Cuando los rendimientos de cada metabolito se sumaron para evaluar la capacidad de la cepa para producir aminoácidos aromáticos totales, la cepa VH33A presentó el valor más alto (0.44). Las cepas VH35A, VH34A y W3110A presentaron rendimientos totales que fueron del 75%, 38% y 11% del observado en la cepa VH33A.

19. Generación y caracterización de las cepas *Pck*.

En los resultados de flujos relativos se observó un ciclo entre los nodos del PEP y del OAA: éste tenía valores de flujo neto del 11%, 19%, 17% y 26% para las cepas W3110 *Pck*, VH33 *Pck*, VH34 *Pck* y VH35 *Pck*, respectivamente. Para tratar de entender el papel que este ciclo juega en la fisiología de las cepas evaluadas, se deletó el gen que codifica para la proteína responsable de la actividad de la PEP carboxicinasa (*pck*). Elegimos esta proteína y no la PEP carboxilasa (*ppc*) porque la *Pck* es una enzima gluconeogénica, que no debería estar activa en las condiciones estudiadas. Los parámetros cinéticos de las cepas *Pck* se muestran en la Tabla 3.

La inactivación de la *Pck* generó una disminución en la μ en todas las cepas evaluadas, siendo más pronunciado este efecto en la cepa VH34 *pck*. Interesantemente, el rendimiento de la biomasa de la cepa VH33 *pck* tuvo un aumento del 30% con respecto a la cepa VH33. Los consumos de glucosa fueron menores en todas las cepas evaluadas, en donde la cepa VH35 *pck* fue la menos afectada. Finalmente, la producción del acético disminuyó en las cepas W3110 *pck* y VH33 *pck*, pasando de 1.2 a 0.32 y 0.09 a 0.01 mol / mol, respectivamente.

DISCUSIÓN.

El objetivo de este trabajo fue hacer una evaluación detallada acerca de la fisiología de *Escherichia coli*, cuando tiene modificaciones en las actividades responsables del flujo de carbono entre el PEP y el PYR. Existen tres actividades responsables de este flujo: el sistema PTS y las actividades de PykA y de PykF. Se generó una cepa derivada del fondo W3110 con el sistema PTS ausente, pero con la capacidad de crecer en glucosa como única fuente de carbono (VH33). A esta cepa se le inactivaron una de las piruvato cinasas PykA o PykF para generar las cepas VH34 y VH35.

En la cepa de referencia W3110, cuando crece en glucosa como única fuente de carbono, el consumo de glucosa debido al PTS causa un 100% de flujo de carbono entre el PEP y el PYR. Esto hace que los niveles del PEP sean bajos, lo que genera poca disponibilidad de este metabolito, esto lo confirma el hecho de que esta cepa es la que tiene el menor rendimiento de aromáticos totales. Los bajos niveles del PEP evitan la inhibición alostérica de las enzimas Glk, Pgi, Pfk, FbaB y del transporte de glucosa vía la RNAsaP, lo que tendría como efecto un aumento en las pozas de intermediarios glucolíticos [50-52]. Particularmente, una mayor disponibilidad de la F1,6P inactivaría a la proteína represora Cra induciendo los genes glucolíticos y generando un flujo alto en la glucólisis. El alto flujo entre el PEP y el PYR (163%) podría generar altos niveles de PYR, los cuales a su vez inducirían la acción de la Pta, la cual adiciona un fosfato a la AcCoA comprometiendo el flujo de carbono hacia la producción de acetato [53]. Ha sido demostrado que la acción de la acetil CoA sintasa (Acs) se inhibe debido al alto consumo de glucosa, lo que en este caso haría que el acetato se acumule. Este metabolismo fermentativo explica por qué, en la cepa W3110, el flujo en el TCA se encuentra reducido. En esta cepa se determinó que hay flujo de carbono a través del shunt de glioxalato, aunque este valor es muy pequeño: esto se podría deber a que el acetato generado comienza a ser consumido. El resultado de la producción de acetato es una disminución en el pH (datos no mostrados) y la pérdida de carbono vía

producción de acetato, siendo ambos un problema en cepas industriales en dónde un mayor rendimiento de biomasa y utilización de carbono son requeridas.

La delección del sistema PTS en esta cepa tiene dos tipos de efectos: uno debido a la actividad del PTS (disminución en el consumo de glucosa) y otro debido a las propiedades regulatorias del PTS (ausencia del complejo Crp-AMP_c). En esta cepa la fosforilación de GLC no depende del PEP; en lugar de éste, el ATP es el donador de fosfato en la reacción catalizada por la Glk. La cepa progenitora VH30 (PTS⁻) tiene una μ de 0.03 hr⁻¹; y este valor aumenta a 0.45 hr⁻¹ en la cepa VH33 (PTS⁻ glc⁺) debido a la sustitución del promotor silvestre de la *galP* por el promotor fuerte *trc* [70].

En este estudio, la q_s de la cepa VH33 es 43% de la determinada en la cepa W3110 (16.2 mmol / g · h). Una consecuencia de la disminución en este valor es la reducción del flujo glucolítico. Con la determinación de flujos relativos de carbono fue posible determinar que el cambio más importante observado en esta cepa, con respecto a la cepa W3110, es un cambio en la distribución de flujos en el nodo de la AcCoA, que resulta en una alta reducción en la q_{ac} . La AcCoA no se dirige a la producción de acetato sino al TCA; esto tiene como consecuencia un incremento en la biosíntesis de los metabolitos precursores de la biomasa, el α -cetoglutarato (α -KGT) y el OAA, así como el poder reductor en la forma del NADH y del FADH₂, que puede generar moléculas de ATP mediante la fosforilación oxidativa. La inactivación de cualquiera de las isoenzimas piruvato cinasas (PykA, PykF) en el fondo PTS⁻ glc⁺ causa una reducción adicional del 50% en la q_s y en el flujo entre los metabolitos PEP y PYR, con respecto a la cepa W3110. Esto significa que ambas enzimas son necesarias para mantener el flujo en esta parte de la glucólisis cuando *E. coli* crece en glucosa como única fuente de carbono. Sin embargo, es interesante el hecho que el flujo entre el PEP y el PYR, debido únicamente a las isoenzimas piruvato cinasas es mayor en las cepas VH33, VH35 y VH34 comparadas con la cepa W3110 (142%, 127%, 126% y 63%, respectivamente). Particularmente para la PykA, lo anterior muestra que, a pesar de tener una actividad que es alrededor de 25% de la observada para la PykF, esta isoenzima es capaz de generar el mismo flujo entre el PEP y el PYR. En estas cepas no

se observó producción de acetato y el flujo dirigido al TCA fue mayor comparado con la cepa W3110 pero menor cuando se comparó con la cepa VH33. Otra respuesta observada en la cepa PTS⁻ glc⁺ y en las cepas PTS⁻ PykA,F⁻ fue un aumento en la distribución de flujos en el metabolismo central que generan la biomasa. El rendimiento de la biomasa es alrededor de dos veces mayor en las cepas VH34 y VH35, cuando se compararan con la cepa VH33. Esta respuesta pudiera tener el efecto de conservar la reducida cantidad de metabolitos debido a la reducción en la q_s y capacidad catabólica de las cepas con fondo PTS⁻ glc⁺ y PTS⁻ PykA,F⁻. Como era de esperarse, los valores de flujos de carbono que llevan a la producción de la biomasa, muestran una correlación positiva con el rendimiento de la biomasa en todas las cepas estudiadas.

En las cuatro cepas se observa un ciclo entre el PEP y el OAA debido a la acción de la enzima anapleurótica Ppc y la gluconeogénica Pck. Este ciclo ya había sido reportado por otros autores en cepas silvestres de *E. coli* [46, 66]. Una comparación entre las cepas generadas en este trabajo provee la oportunidad de estudiar el papel de este ciclo en este organismo. El análisis de flujo revela que la inactivación del PTS genera un aumento en este ciclo, cuyo flujo neto hacia el OAA también aumenta. Una respuesta similar, pero mayor en magnitud es observada cuando la PykF se inactiva en el fondo PTS⁻ glc⁺ (VH35). En contraste, el valor más pequeño de este ciclo se observa en la cepa VH34 (PTS⁻ glc⁺ PykA⁻). Estos resultados sugieren una correlación inversa entre la q_s y el flujo neto en este ciclo metabólico cuando se comparan las cepas W3110, VH33 y VH35. No es claro porqué esta correlación no aplica para la cepa VH34. Esto puede estar relacionado a los diferentes efectos en la distribución de flujos, alrededor del nodo del PEP, obtenidos de la inactivación de la PykA o la PykF.

El cociente entre el ATP / ADP es un importante parámetro fisiológico que modula varias funciones celulares. Se ha observado que una reducción de este cociente, debido a un aumento en la hidrólisis del ATP, estimula el flujo por el EMP [92]. Cada ciclo que involucra a la Ppc y la Pck implica el consumo de una molécula de ATP (gracias a la actividad de cinasa de la Pck). Entonces, una reducción en el cociente

entre el ATP / ADP es de esperarse en cepas con altos flujos en el ciclo de la Ppc y la Pck, y esto podría estimular el flujo por el EMP. La correlación inversa entre las cepas W3110, VH33 y VH35 sugiere este efecto que en las cepas mutantes y consecuentemente un aumento en la capacidad de crecimiento en las cepas VH33 y VH35. Para comprobar esta hipótesis, se generaron y caracterizaron (parámetros cinéticos) cepas derivadas de W3110, VH33, VH34 y VH35 con la actividad de la Pck inactivada (*pck*⁻). Se observó una reducción en la q_s y la μ en todas las cepas *Pck*⁻, lo que sugiere que la función del ciclo Ppc – Pck es la de estimular el flujo por el EMP. Es muy interesante el hecho que la inactivación de la Pck en la cepa VH33 genera un aumento en el Y_x , lo que sugiere que un bajo flujo a través de la Pck en la cepa VH34 podría tener un papel importante en el alto valor del Y_x observado en esta cepa.

Algunas de las respuestas metabólicas discutidas previamente, que incluyen la reducción de la q_s y la redistribución de flujos de carbono en varios puntos en el metabolismo central, pueden ser explicadas parcialmente considerando la regulación alostérica que el PEP ejerce sobre varias enzimas del EMP. Aún más, se ha reportado que el PEP puede inhibir la actividad de la Glk [51]. Considerando las modificaciones genéticas hechas a las cepas estudiadas, podría esperarse un aumento en la poza del PEP en las cepas VH33, VH34 y VH35, cuando se comparan con la cepa W3110. Lo anterior se ha demostrado al observarse una mayor disponibilidad del PEP para la producción de aminoácidos aromáticos en los fondos PTS⁻ glc⁺ y PTS⁻ glc⁺ PykAF⁻.

Las cepas W3110A, VH33A, VH34A y VH35A se modificaron con los plásmidos pJLBaroG^{fb}rtktA y pTrcpheA^{ev2}, para poder incrementar el flujo de carbono hacia la vía del SHIK y la biosíntesis de la PHE (Tabla 2). Cuando se calcula el rendimiento total de los aromáticos $Y_{DHS+SHIK+PHE}$, en experimentos de células en reposo en medio mínimo con glucosa se observa que, como se esperaba, la inactivación del PTS causa un aumento en este parámetro. Debido a la subsecuente inactivación de la PykA o la PykF, se esperaría un incremento en la disponibilidad del PEP para la producción de los aminoácidos aromáticos. Sin embargo, el valor del $Y_{DHS+SHIK+PHE}$ es menor que el determinado para la cepa VH33. Esto puede ser entendido considerando que las cepas

VH34 y VH35 canalizan más carbono para la producción de la biomasa comparadas con la cepa VH33. En las cepas VH34 y VH35 se observa una relación inversa entre el Y_x y el $Y_{DHS+SHIK+PHE}$. Lo anterior indica que, en medio mínimo con glucosa, un estado de limitación de carbono reduce la disponibilidad del PEP para la producción de aminoácidos aromáticos en las cepas VH34 y VH35, como resultado de la competencia por precursores del metabolismo central de carbono, incluido el PEP, entre las reacciones que generan la biomasa y la vía modificada de aminoácidos aromáticos en las cepas VH34A y VH35A. El consumo de estos precursores de biomasa puede reducirse, si se adicionan al medio de cultivo. Para esto se realizaron experimentos de células en reposo en medio mínimo, suplementado con extracto de levadura, en donde se determinó un aumento de 19, 14 y 25 veces en el $Y_{DHS+SHIK+PHE}$ para las cepas VH33A, VH34A y VH35A comparadas con la cepa W3110A. Otros dos trabajos han reportado que cepas con los fenotipo $PTS^- glc^+ PykA^-$ o $PTS^- glc^+ PykF^-$ muestran mayor capacidad para producir aminoácidos aromáticos en medio rico comparadas con una cepa isogénica $PTS^- glc^+$ [58, 93].

Se ha mostrado que una cepa con el mismo fenotipo que la cepa VH33 tiene una mayor producción de proteína recombinante cuando se compara con la cepa W3110 [70]. Esto se explica por la reducción de la q_{ac} y el aumento del Y_x observados en la cepa $PTS^- glc^+$ comparados con la cepa silvestre. Al respecto, es notable el hecho que la subsecuente inactivación de la $PykA$ o la $PykF$ en la cepa VH33 causa una reducción adicional en la q_{ac} a tal grado que este ácido orgánico no se puede observar mediante HPLC. Interesantemente, la cepa VH34 no produce acetato y presenta un incremento del 66% en el Y_x con el mismo valor de la μ comparada con la cepa VH33. En un reporte reciente, la cepa VH34 transformada con un plásmido que contiene una vacuna de DNA (pDNA) y creciendo en medio rico con glucosa produce 50% menos acetato y cerca de 4 veces más pDNA cuando se compara con la cepa VH33 / pDNA [94]. Estos datos muestran que la cepa VH34 tiene características que le permiten ser un mejor organismo de producción de pDNA o proteína recombinante.

CONCLUSIÓN.

En este trabajo, la contribución que el PTS y de cada una de las isoenzimas de piruvato cinasa tiene en el flujo entre PEP → PYR, así como las consecuencias en el metabolismo central de carbono que tiene la inactivación de estas actividades, fue valorado mediante la determinación de flujos de carbono. Este análisis reveló que la presencia de una o ambas isoenzimas de la Pyk genera diferentes escenarios fisiológicos y respuestas en la distribución de flujos de carbono. La respuesta general observada a la inactivación del PTS o la Pyk es consistente con una redirección de los flujos de carbono en el metabolismo central de carbono, para compensar la reducción en el flujo del EMP observada en estas cepas. La caracterización detallada presentada en este trabajo genera una mayor descripción de la flexibilidad del metabolismo central de carbono en *E. coli*. Esto será de utilidad para el diseño de estrategias de ingeniería de vías metabólicas para la generación de cepas productoras de aminoácidos aromáticos, pDNA o proteína recombinante.

Este trabajo se publicó en la revista Microbial Cell Factories con el nombre “Consequences of phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system and pyruvate kinase isozymes inactivation in central carbon metabolism flux distribution in Escherichia coli”. <http://www.microbialcellfactories.com/content/11/1/127>.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Berg RD: **The indigenous gastrointestinal microflora.** *Trends Microbiol* 1996, **4**:430-435.
2. Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E: **The population genetics of commensal *Escherichia coli*.** *Nat Rev Microbiol* 2010, **8**:207-217.
3. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA: **Diversity of the human intestinal microbial flora.** *Science* 2005, **308**:1635-1638.
4. Jones SA, Chowdhury FZ, Fabich AJ, Anderson A, Schreiner DM, House AL, Autieri SM, Leatham MP, Lins JJ, Jorgensen M, et al: **Respiration of *Escherichia coli* in the mouse intestine.** *Infect Immun* 2007, **75**:4891-4899.
5. Freter R: *Human Intestinal Microflora in Health and Disease.* Academic, New York; 1983.
6. Peekhaus N, Conway T: **What's for dinner?: Entner-Doudoroff metabolism in *Escherichia coli*.** *J Bacteriol* 1998, **180**:3495-3502.
7. Hoskins LC, Agustines M, McKee WB, Boulding ET, Kriaris M, Niedermeyer G: **Mucin degradation in human colon ecosystems. Isolation and properties of fecal strains that degrade ABH blood group antigens and oligosaccharides from mucin glycoproteins.** *J Clin Invest* 1985, **75**:944-953.
8. He G, Shankar RA, Chzhan M, Samouilov A, Kuppusamy P, Zweier JL: **Noninvasive measurement of anatomic structure and intraluminal oxygenation in the gastrointestinal tract of living mice with spatial and spectral EPR imaging.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:4586-4591.
9. Morley JE: **Diabetes and aging: epidemiologic overview.** *Clin Geriatr Med* 2008, **24**:395-405, v.
10. Woodmansey EJ, McMurdo ME, Macfarlane GT, Macfarlane S: **Comparison of compositions and metabolic activities of fecal microbiotas in young adults and in antibiotic-treated and non-antibiotic-treated elderly subjects.** *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**:6113-6122.
11. Gosset G: **Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system.** *Microb Cell Fact* 2005, **4**:14.
12. Escalante A, Salinas Cervantes A, Gosset G, Bolivar F: **Current knowledge of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system: peculiarities of regulation and impact on growth and product formation.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2012, **94**:1483-1494.
13. Death A, Notley L, Ferenci T: **Derepression of LamB protein facilitates outer membrane permeation of carbohydrates into *Escherichia coli* under conditions of nutrient stress.** *J Bacteriol* 1993, **175**:1475-1483.
14. Nikaido H, Vaara M: **Molecular basis of bacterial outer membrane permeability.** *Microbiol Rev* 1985, **49**:1-32.
15. Nikaido H, Rosenberg EY: **Porin channels in *Escherichia coli*: studies with liposomes reconstituted from purified proteins.** *J Bacteriol* 1983, **153**:241-252.
16. Tchieu JH, Norris V, Edwards JS, Saier MH, Jr.: **The complete phosphotransferase system in *Escherichia coli*.** *J Mol Microbiol Biotechnol* 2001, **3**:329-346.
17. Deutscher J, Francke C, Postma PW: **How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2006, **70**:939-1031.

18. Postma PW, Lengeler JW, Jacobson GR: **Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria.** *Microbiol Rev* 1993, **57**:543-594.
19. Lang VJ, Leystra-Lantz C, Cook RA: **Characterization of the specific pyruvate transport system in Escherichia coli K-12.** *J Bacteriol* 1987, **169**:380-385.
20. Curtis SJ, Epstein W: **Phosphorylation of D-glucose in Escherichia coli mutants defective in glucosephosphotransferase, mannosephosphotransferase, and glucokinase.** *J Bacteriol* 1975, **122**:1189-1199.
21. Death A, Ferenci T: **Between feast and famine: endogenous inducer synthesis in the adaptation of Escherichia coli to growth with limiting carbohydrates.** *J Bacteriol* 1994, **176**:5101-5107.
22. Flores N, Flores S, Escalante A, de Anda R, Leal L, Malpica R, Georgellis D, Gosset G, Bolivar F: **Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in an Escherichia coli strain lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system.** *Metab Eng* 2005, **7**:70-87.
23. Ould-Moulaye CB, Dussap, C. G., Gros, J. B.: **Estimation of Gibbs energy changes of central metabolism reactions.** *Biotechnology Techniques* 1999, **13**:187-193.
24. Lunin VV, Li Y, Schrag JD, Iannuzzi P, Cygler M, Matte A: **Crystal structures of Escherichia coli ATP-dependent glucokinase and its complex with glucose.** *J Bacteriol* 2004, **186**:6915-6927.
25. Li X, Dash RK, Pradhan RK, Qi F, Thompson M, Vinnakota KC, Wu F, Yang F, Beard DA: **A database of thermodynamic quantities for the reactions of glycolysis and the tricarboxylic acid cycle.** *J Phys Chem B* 2010, **114**:16068-16082.
26. Li X, Wu F, Qi F, Beard DA: **A database of thermodynamic properties of the reactions of glycolysis, the tricarboxylic acid cycle, and the pentose phosphate pathway.** *Database (Oxford)* 2011, **2011**:bar005.
27. Fraenkel DG: *Glycolysis, pentose phosphate pathway, and Entner-Duodoroff pathway. In Escherichia coli and Salmonella typhimurium.* Washington DC: American Society for Microbiology; 1987.
28. Keseler IM, Collado-Vides J, Santos-Zavaleta A, Peralta-Gil M, Gama-Castro S, Muniz-Rascado L, Bonavides-Martinez C, Paley S, Krummenacker M, Altman T, et al: **EcoCyc: a comprehensive database of Escherichia coli biology.** *Nucleic Acids Res* 2011, **39**:D583-590.
29. Keseler IM, Mackie A, Peralta-Gil M, Santos-Zavaleta A, Gama-Castro S, Bonavides-Martinez C, Fulcher C, Huerta AM, Kothari A, Krummenacker M, et al: **EcoCyc: fusing model organism databases with systems biology.** *Nucleic Acids Res* 2013, **41**:D605-612.
30. Munoz ME, Ponce E: **Pyruvate kinase: current status of regulatory and functional properties.** *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2003, **135**:197-218.
31. Yao R, Hirose Y, Sarkar D, Nakahigashi K, Ye Q, Shimizu K: **Catabolic regulation analysis of Escherichia coli and its crp, mlc, mgsA, pgi and ptsG mutants.** *Microb Cell Fact* 2011, **10**:67.
32. Shimada T, Fujita N, Yamamoto K, Ishihama A: **Novel roles of cAMP receptor protein (CRP) in regulation of transport and metabolism of carbon sources.** *PLoS One* 2011, **6**:e20081.
33. Shimada T, Yamamoto K, Ishihama A: **Novel members of the Cra regulon involved in carbon metabolism in Escherichia coli.** *J Bacteriol* 2011, **193**:649-659.

34. Lange R, Hengge-Aronis R: **The cellular concentration of the sigma S subunit of RNA polymerase in Escherichia coli is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability.** *Genes Dev* 1994, **8**:1600-1612.
35. Saier MH, Jr., Ramseier TM: **The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria.** *J Bacteriol* 1996, **178**:3411-3417.
36. Kadner RJ, Murphy GP, Stephens CM: **Two mechanisms for growth inhibition by elevated transport of sugar phosphates in Escherichia coli.** *J Gen Microbiol* 1992, **138**:2007-2014.
37. Vanderpool CK, Gottesman S: **Involvement of a novel transcriptional activator and small RNA in post-transcriptional regulation of the glucose phosphoenolpyruvate phosphotransferase system.** *Mol Microbiol* 2004, **54**:1076-1089.
38. Vanderpool CK, Armstrong SK: **Integration of environmental signals controls expression of Bordetella heme utilization genes.** *J Bacteriol* 2004, **186**:938-948.
39. Sun Y, Vanderpool CK: **Regulation and function of Escherichia coli sugar efflux transporter A (SetA) during glucose-phosphate stress.** *J Bacteriol* 2011, **193**:143-153.
40. Boyle EI, Weng S, Gollub J, Jin H, Botstein D, Cherry JM, Sherlock G: **GO::TermFinder--open source software for accessing Gene Ontology information and finding significantly enriched Gene Ontology terms associated with a list of genes.** *Bioinformatics* 2004, **20**:3710-3715.
41. Boiteux A, Markus M, Plesser T, Hess B, Malcovati M: **Analysis of progress curves. Interaction of pyruvate kinase from Escherichia coli with fructose 1,6-bisphosphate and calcium ions.** *Biochem J* 1983, **211**:631-640.
42. Valentini G, Chiarelli L, Fortin R, Speranza ML, Galizzi A, Mattevi A: **The allosteric regulation of pyruvate kinase.** *J Biol Chem* 2000, **275**:18145-18152.
43. Flores N, Xiao J, Berry A, Bolivar F, Valle F: **Pathway engineering for the production of aromatic compounds in Escherichia coli.** *Nat Biotechnol* 1996, **14**:620-623.
44. Ponce E, Flores N, Martinez A, Valle F, Bolivar F: **Cloning of the two pyruvate kinase isoenzyme structural genes from Escherichia coli: the relative roles of these enzymes in pyruvate biosynthesis.** *J Bacteriol* 1995, **177**:5719-5722.
45. Al Zaid Siddiquee K, Arauzo-Bravo MJ, Shimizu K: **Metabolic flux analysis of pykF gene knockout Escherichia coli based on 13C-labeling experiments together with measurements of enzyme activities and intracellular metabolite concentrations.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2004, **63**:407-417.
46. Emmerling M, Dauner M, Ponti A, Fiaux J, Hochuli M, Szyperski T, Wuthrich K, Bailey JE, Sauer U: **Metabolic flux responses to pyruvate kinase knockout in Escherichia coli.** *J Bacteriol* 2002, **184**:152-164.
47. Siddiquee KA, Arauzo-Bravo MJ, Shimizu K: **Effect of a pyruvate kinase (pykF-gene) knockout mutation on the control of gene expression and metabolic fluxes in Escherichia coli.** *FEMS Microbiol Lett* 2004, **235**:25-33.
48. Morikawa M, Izui K, Taguchi M, Katsuki H: **Regulation of Escherichia coli phosphoenolpyruvate carboxylase by multiple effectors in vivo. Estimation of the activities in the cells grown on various compounds.** *J Biochem* 1980, **87**:441-449.
49. Chao YP, Patnaik R, Roof WD, Young RF, Liao JC: **Control of gluconeogenic growth by pps and pck in Escherichia coli.** *J Bacteriol* 1993, **175**:6939-6944.
50. Blangy D: **Phosphofructokinase from E. Coli: Evidence for a tetrameric structure of the enzyme.** *FEBS Lett* 1968, **2**:109-111.
51. Ogawa T, Mori H, Tomita M, Yoshino M: **Inhibitory effect of phosphoenolpyruvate on glycolytic enzymes in Escherichia coli.** *Res Microbiol* 2007, **158**:159-163.

52. Morita T, El-Kazzaz W, Tanaka Y, Inada T, Aiba H: **Accumulation of glucose 6-phosphate or fructose 6-phosphate is responsible for destabilization of glucose transporter mRNA in Escherichia coli.** *J Biol Chem* 2003, **278**:15608-15614.
53. Campos-Bermudez VA, Bologna FP, Andreo CS, Drincovich MF: **Functional dissection of Escherichia coli phosphotransacetylase structural domains and analysis of key compounds involved in activity regulation.** *FEBS J* 2010, **277**:1957-1966.
54. Jensen RA, Nasser DS: **Comparative regulation of isoenzymic 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthetases in microorganisms.** *J Bacteriol* 1968, **95**:188-196.
55. Bondinell WE, Vnek J, Knowles PF, Sprecher M, Sprinson DB: **On the mechanism of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthetase.** *J Biol Chem* 1971, **246**:6191-6196.
56. Sprenger GA: **From scratch to value: engineering Escherichia coli wild type cells to the production of L-phenylalanine and other fine chemicals derived from chorismate.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2007, **75**:739-749.
57. Chotani G, Dodge T, Hsu A, Kumar M, LaDuca R, Trimbur D, Weyler W, Sanford K: **The commercial production of chemicals using pathway engineering.** *Biochim Biophys Acta* 2000, **1543**:434-455.
58. Escalante A, Calderon R, Valdivia A, de Anda R, Hernandez G, Ramirez OT, Gosset G, Bolivar F: **Metabolic engineering for the production of shikimic acid in an evolved Escherichia coli strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system.** *Microb Cell Fact* 2010, **9**:21.
59. Gosset G: **Production of aromatic compounds in bacteria.** *Curr Opin Biotechnol* 2009, **20**:651-658.
60. Leuchtenberger W, Huthmacher K, Drauz K: **Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2005, **69**:1-8.
61. Yi J, Draths KM, Li K, Frost JW: **Altered glucose transport and shikimate pathway product yields in E. coli.** *Biotechnol Prog* 2003, **19**:1450-1459.
62. Hundall PM: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.* Wiley-VCH, Weinheim; 2002.
63. Munoz AJ, Hernandez-Chavez G, de Anda R, Martinez A, Bolivar F, Gosset G: **Metabolic engineering of Escherichia coli for improving L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) synthesis from glucose.** *J Ind Microbiol Biotechnol* 2011, **38**:1845-1852.
64. Baez JL, Bolivar F, Gosset G: **Determination of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate productivity and yield from glucose in Escherichia coli devoid of the glucose phosphotransferase transport system.** *Biotechnol Bioeng* 2001, **73**:530-535.
65. Patnaik R, Liao JC: **Engineering of Escherichia coli central metabolism for aromatic metabolite production with near theoretical yield.** *Appl Environ Microbiol* 1994, **60**:3903-3908.
66. Flores S, Gosset G, Flores N, de Graaf AA, Bolivar F: **Analysis of carbon metabolism in Escherichia coli strains with an inactive phosphotransferase system by (13)C labeling and NMR spectroscopy.** *Metab Eng* 2002, **4**:124-137.
67. Parker C, Barnell WO, Snoep JL, Ingram LO, Conway T: **Characterization of the Zymomonas mobilis glucose facilitator gene product (glf) in recombinant Escherichia coli: examination of transport mechanism, kinetics and the role of glucokinase in glucose transport.** *Mol Microbiol* 1995, **15**:795-802.
68. Baez-Viveros JL, Osuna J, Hernandez-Chavez G, Soberon X, Bolivar F, Gosset G: **Metabolic engineering and protein directed evolution increase the yield of L-phenylalanine synthesized from glucose in Escherichia coli.** *Biotechnol Bioeng* 2004, **87**:516-524.

69. Aguilar C, Escalante A, Flores N, de Anda R, Riveros-McKay F, Gosset G, Morett E, Bolivar F: **Genetic changes during a laboratory adaptive evolution process that allowed fast growth in glucose to an Escherichia coli strain lacking the major glucose transport system.** *BMC Genomics* 2012, **13**:385.
70. De Anda R, Lara AR, Hernandez V, Hernandez-Montalvo V, Gosset G, Bolivar F, Ramirez OT: **Replacement of the glucose phosphotransferase transport system by galactose permease reduces acetate accumulation and improves process performance of Escherichia coli for recombinant protein production without impairment of growth rate.** *Metab Eng* 2006, **8**:281-290.
71. Pfeiffer T, Sanchez-Valdenebro I, Nuno JC, Montero F, Schuster S: **METATOOL: for studying metabolic networks.** *Bioinformatics* 1999, **15**:251-257.
72. Christensen B, Nielsen J: **Isotopomer analysis using GC-MS.** *Metab Eng* 1999, **1**:282-290.
73. Schmidt K, Nielsen J, Villadsen J: **Quantitative analysis of metabolic fluxes in Escherichia coli, using two-dimensional NMR spectroscopy and complete isotopomer models.** *J Biotechnol* 1999, **71**:175-189.
74. Wittmann C, Heinzle E: **Mass spectrometry for metabolic flux analysis.** *Biotechnol Bioeng* 1999, **62**:739-750.
75. Zupke CaS, G.: **Modeling of Isotope Distributions and Intracellular Fluxes in Metabolic Networks Using Atom Mapping Matrices.** *Biotechnol Prog* 1994, **10**:10.
76. Kohlstedt M, Becker J, Wittmann C: **Metabolic fluxes and beyond-systems biology understanding and engineering of microbial metabolism.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2010, **88**:1065-1075.
77. Bachmann BJ: **Pedigrees of some mutant strains of Escherichia coli K-12.** *Bacteriol Rev* 1972, **36**:525-557.
78. Hernandez-Montalvo V, Martinez A, Hernandez-Chavez G, Bolivar F, Valle F, Gosset G: **Expression of galP and glk in a Escherichia coli PTS mutant restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation products.** *Biotechnol Bioeng* 2003, **83**:687-694.
79. Datsenko KA, Wanner BL: **One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:6640-6645.
80. Cherepanov PP, Wackernagel W: **Gene disruption in Escherichia coli: TcR and KmR cassettes with the option of FIp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant.** *Gene* 1995, **158**:9-14.
81. Sigala JC, Flores S, Flores N, Aguilar C, de Anda R, Gosset G, Bolivar F: **Acetate metabolism in Escherichia coli strains lacking phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system; evidence of carbon recycling strategies and futile cycles.** *J Mol Microbiol Biotechnol* 2009, **16**:224-235.
82. Balderas-Hernandez VE, Sabido-Ramos A, Silva P, Cabrera-Valladares N, Hernandez-Chavez G, Baez-Viveros JL, Martinez A, Bolivar F, Gosset G: **Metabolic engineering for improving anthranilate synthesis from glucose in Escherichia coli.** *Microb Cell Fact* 2009, **8**:19.
83. Kiefer P, Heinzle E, Zelder O, Wittmann C: **Comparative metabolic flux analysis of lysine-producing Corynebacterium glutamicum cultured on glucose or fructose.** *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**:229-239.
84. Wittmann C, Kiefer P, Zelder O: **Metabolic fluxes in Corynebacterium glutamicum during lysine production with sucrose as carbon source.** *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**:7277-7287.

85. Kromer JO, Sorgenfrei O, Klopprogge K, Heinzle E, Wittmann C: **In-depth profiling of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* by combined analysis of the transcriptome, metabolome, and fluxome.** *J Bacteriol* 2004, **186**:1769-1784.
86. Wittmann C: **Metabolic flux analysis using mass spectrometry.** *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2002, **74**:39-64.
87. Wittmann C, Heinzle E: **Modeling and experimental design for metabolic flux analysis of lysine-producing *Corynebacteria* by mass spectrometry.** *Metab Eng* 2001, **3**:173-191.
88. Wittmann C, Kim HM, Heinzle E: **Metabolic network analysis of lysine producing *Corynebacterium glutamicum* at a miniaturized scale.** *Biotechnol Bioeng* 2004, **87**:1-6.
89. Maitra PK, Lobo Z: **A kinetic study of glycolytic enzyme synthesis in yeast.** *J Biol Chem* 1971, **246**:475-488.
90. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J Biol Chem* 1951, **193**:265-275.
91. Oh MK, Rohlin L, Kao KC, Liao JC: **Global expression profiling of acetate-grown *Escherichia coli*.** *J Biol Chem* 2002, **277**:13175-13183.
92. Koebmann BJ, Westerhoff HV, Snoep JL, Nilsson D, Jensen PR: **The glycolytic flux in *Escherichia coli* is controlled by the demand for ATP.** *J Bacteriol* 2002, **184**:3909-3916.
93. Gosset G, Yong-Xiao J, Berry A: **A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*.** *J Ind Microbiol* 1996, **17**:47-52.
94. Pablos TE, Soto R, Mora EM, Le Borgne S, Ramirez OT, Gosset G, Lara AR: **Enhanced production of plasmid DNA by engineered *Escherichia coli* strains.** *J Biotechnol* 2012, **158**:211-214.

RESEARCH

Open Access

Consequences of phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system and pyruvate kinase isozymes inactivation in central carbon metabolism flux distribution in *Escherichia coli*

Eugenio Meza^{1†}, Judith Becker^{2†}, Francisco Bolivar¹, Guillermo Gosset¹ and Christoph Wittmann^{2*}

Abstract

Background: In *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate (PEP) is a key central metabolism intermediate that participates in glucose transport, as precursor in several biosynthetic pathways and it is involved in allosteric regulation of glycolytic enzymes. In this work we generated W3110 derivative strains that lack the main PEP consumers PEP:sugar phosphotransferase system (PTS⁻) and pyruvate kinase isozymes PykA and PykF (PTS⁻ *pykA*⁻ and PTS⁻ *pykF*⁻). To characterize the effects of these modifications on cell physiology, carbon flux distribution and aromatics production capacity were determined.

Results: When compared to reference strain W3110, strain VH33 (PTS⁻) displayed lower specific rates for growth, glucose consumption and acetate production as well as a higher biomass yield from glucose. These phenotypic effects were even more pronounced by the additional inactivation of PykA or PykF. Carbon flux analysis revealed that PTS inactivation causes a redirection of metabolic flux towards biomass formation. A cycle involving PEP carboxylase (Ppc) and PEP carboxykinase (Pck) was detected in all strains. In strains W3110, VH33 (PTS⁻) and VH35 (PTS⁻, *pykF*⁻), the net flux in this cycle was inversely correlated with the specific rate of glucose consumption and inactivation of Pck in these strains caused a reduction in growth rate. In the PTS⁻ background, inactivation of PykA caused a reduction in Ppc and Pck cycling as well as a reduction in flux to TCA, whereas inactivation of PykF caused an increase in anaplerotic flux from PEP to OAA and an increased flux to TCA. The wild-type and mutant strains were modified to overproduce L-phenylalanine. In resting cells experiments, compared to reference strain, a 10, 4 and 7-fold higher aromatics yields from glucose were observed as consequence of PTS, PTS PykA and PTS PykF inactivation.

Conclusions: Metabolic flux analysis performed on strains lacking the main activities generating pyruvate from PEP revealed the high degree of flexibility to perturbations of the central metabolic network in *E. coli*. The observed responses to reduced glucose uptake and PEP to pyruvate rate of conversion caused by PTS, PykA and PykF inactivation included flux rerouting in several central metabolism nodes towards anabolic biosynthetic reactions, thus compensating for carbon limitation in these mutant strains. The detected cycle involving Ppc and Pck was found to be required for maintaining the specific growth and glucose consumption rates in all studied strains. Strains VH33 (PTS⁻), VH34 (PTS⁻ *pykA*⁻) and VH35 (PTS⁻ *pykF*⁻) have useful properties for biotechnological processes, such as increased PEP availability and high biomass yields from glucose, making them useful for the production of aromatic compounds or recombinant proteins.

Keywords: PTS, Pyruvate kinase, Aromatic amino acids

* Correspondence: c.wittmann@tu-braunschweig.de

[†]Equal contributors

²Institute of Biochemical Engineering, Technische Universität Braunschweig, Gaußstr. 17, D-38106, Braunschweig, Germany

Full list of author information is available at the end of the article

Background

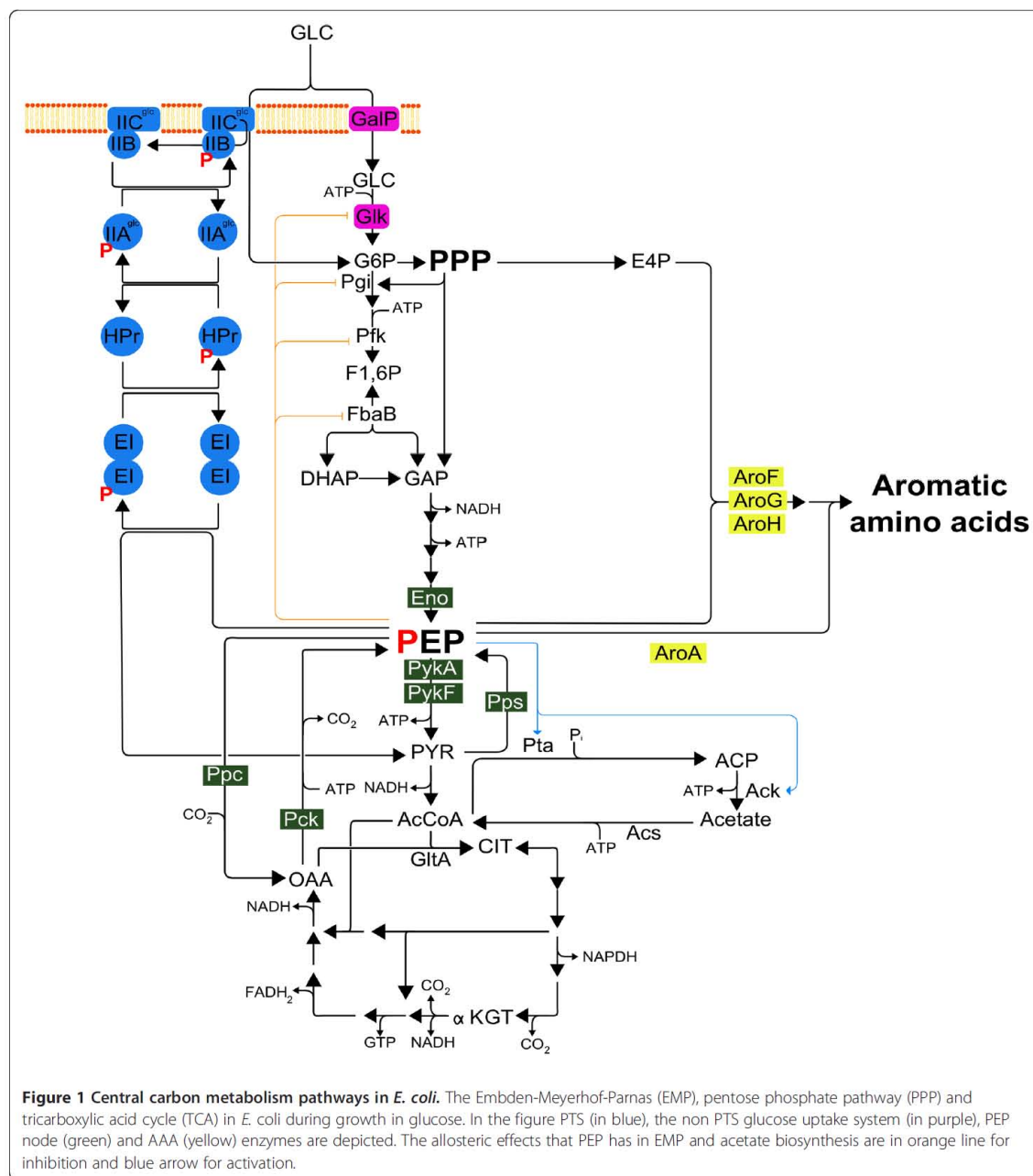
Escherichia coli is a fast growing microorganism that can be modified by a wide variety of molecular tools, thus enabling the generation of industrial strains for the production of metabolites and recombinant proteins. This bacterium can grow in defined media using glucose as sole carbon source, and under this condition, central metabolism is mainly constituted by the Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway, the pentose phosphate pathway (PPP) and the tricarboxylic acid (TCA) cycle. Together, these three pathways provide energy (ATP, GTP), reducing power (NADH, NADPH, FADH₂) and biomass precursors for the cell [1]. When *E. coli* grows on glucose as carbon source, this sugar is imported by the phosphoenolpyruvate (PEP):sugar phosphotransferase system (PTS) that couples the transfer of the phosphate group from PEP to this sugar, thus generating as products glucose 6-phosphate (G6P) and pyruvate (PYR) [2-4] (Figure 1). In *E. coli*, PEP also participates as substrate in the reaction catalyzed by the pyruvate kinase (Pyk) isozymes (PykA and PykF), yielding PYR and ATP [5]. Furthermore, PEP connects the EMP pathway and the TCA cycle via an anaplerotic reaction catalyzed by PEP carboxylase (Ppc) that generates oxaloacetate (OAA) [6,7]. During gluconeogenic metabolism PEP synthase (Pps) converts PYR to PEP and PEP carboxykinase (Pck) forms PEP from OAA [7,8]. In addition to its participation in metabolic reactions, PEP also plays a regulatory role. An inhibitory effect of PEP has been described on the EMP pathway enzymes glucokinase (Glk), phosphoglucosomerase (Pgi), phosphofructokinase (Pfk) and aldolase (FbaA) [9] whereas an activation effect has been described in the enzymes phosphate acetyltransferase (Pta) and acetate kinase (Aks) [10] (Figure 1).

The first step in the common aromatic pathway or shikimate (SHIK) pathway consists in the condensation of PEP and erythrose 4 phosphate (E4P) to yield 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate 7 phosphate (DAHP). In *E. coli*, this reaction is catalyzed by the DAHP synthase isozymes (AroF, AroG and AroH) [11] (Figures 1 and 2b). Within this pathway, the synthesis of dehydroshikimate (DHS) to yield SHIK, a reaction catalyzed by the enzyme SHIK dehydrogenase (AroE), is a step that requires reducing power in the form of NADPH. An additional PEP molecule is required to condense with SHIK-3-phosphate (S3P) to yield 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) by the enzyme EPSP synthase (AroA) [12]. The final product of the SHIK pathway is chorismate (CHO), a precursor molecule for the synthesis of the aromatic amino acids tryptophan (TRP), tyrosine (TYR) and phenylalanine (PHE) [13] (Figure 2b). The PHE biosynthetic pathway starts with the conversion of CHO to prephenate and subsequently to phenylpyruvate (PPY) by the bifunctional enzyme CHO

mutase-prephenate dehydratase (CM-PDT), encoded by gene *pheA*. In the last step of this pathway, the enzyme PHE aminotransferase (TyrB) transfers an amino group from glutamate to PPY to yield PHE (Figure 2b).

The aromatic amino acids and some intermediates of the SHIK pathway are metabolites having industrial applications [14-19]. These include the aromatic amino acid PHE as precursor of the low-calorie sweetener aspartame, L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) used for treatment of Parkinson's disease [20] and the intermediate SHIK as precursor of the antiviral oseltamivir [21,22]. Several reports indicate that PEP availability is one of the main factors to be considered when designing a strategy to generate aromatics production strains [19,23,24]. In this regard, PTS, PykA and PykF, as the main PEP consuming reactions in *E. coli*, have been the subject of several studies to understand their role on the cell's physiology [25-29]. In *E. coli*, PTS is the main PEP-consuming activity during growth on glucose [2-4]. For this reason, PTS can be considered the most promising cellular target to inactivate in order to increase PEP availability and therefore, aromatics yield from glucose [15]. A mutant strain lacking PTS activity (PTS⁻) displays poor growth on glucose (PTS⁻ glc⁻ phenotype) which is clearly an undesirable trait in the context of an industrial production process. To improve the characteristics of a PTS⁻ glc⁻ strain, a chemostat selection method was employed, thereby it was possible to isolate mutants that display rapid growth on glucose (PTS⁻ glc⁺ phenotype) [30]. Characterization of one of such mutants revealed that glucose import and phosphorylation are dependent on the GalP symporter and glucokinase (Glk), respectively [27,31] (Figure 1). This mutant was modified for aromatics production and it was determined that it can produce PHE with a higher yield from glucose when compared to an isogenic PTS⁺ strain [23,30,32].

In *E. coli* the total Pyk activity is dependent on the PykA and PykF isozymes which constitute the second main PEP-consuming activity in the cell [5,33-35]. These isozymes are encoded by genes *pykA* and *pykF*, whereby *pykF* is regulated by the catabolite repressor/activator protein (Cra) [36,37]. It has recently been demonstrated that *pykA* might also be regulated by Cra [38]. Both Pyk isozymes are subject to metabolic control of enzyme activity. The enzyme PykF is activated by fructose-1, 6-bisphosphate (FBP), whereas ATP, GTP and succinyl coenzyme A (SUCC CoA) are negative effectors [36,39-44]. The enzyme PykA is activated by adenosine monophosphate (AMP) and sugars from the PPP (gluconate 6-phosphate, ribose 5-phosphate, ribulose 5-phosphate, heptulosonate 7-phosphate and xylulose 5-phosphate) whereas SUCC CoA is a negative effector [45,46]. It has been observed in *E. coli* that PykF displays the highest enzyme activity when compared to PykA in wild type as well as the PTS⁻ background during growth on



glucose as sole carbon source [28]. Based on these data, PykF is considered the main Pyk activity in *E. coli* [25,26,29].

Both PykA and PykF are well characterized proteins, however, their specific roles in central carbon metabolism are still not completely clear. Carbon flux studies in Pyk deficient *E. coli* strains have been performed in a genetic background where PTS is active, therefore, PTS-dependent

synthesis of PYR from PEP is still occurring by this activity in the mutant strains [25,26,29]. An *E. coli* strain lacking PTS activity provides a background where the PEP to PYR reaction is dependent only on Pyk activity, thus enabling a study designed to provide further insight into the roles of PTS, PykA and PykF on central metabolism. The use of several “omics” tools to unravel *E. coli*'s cellular responses

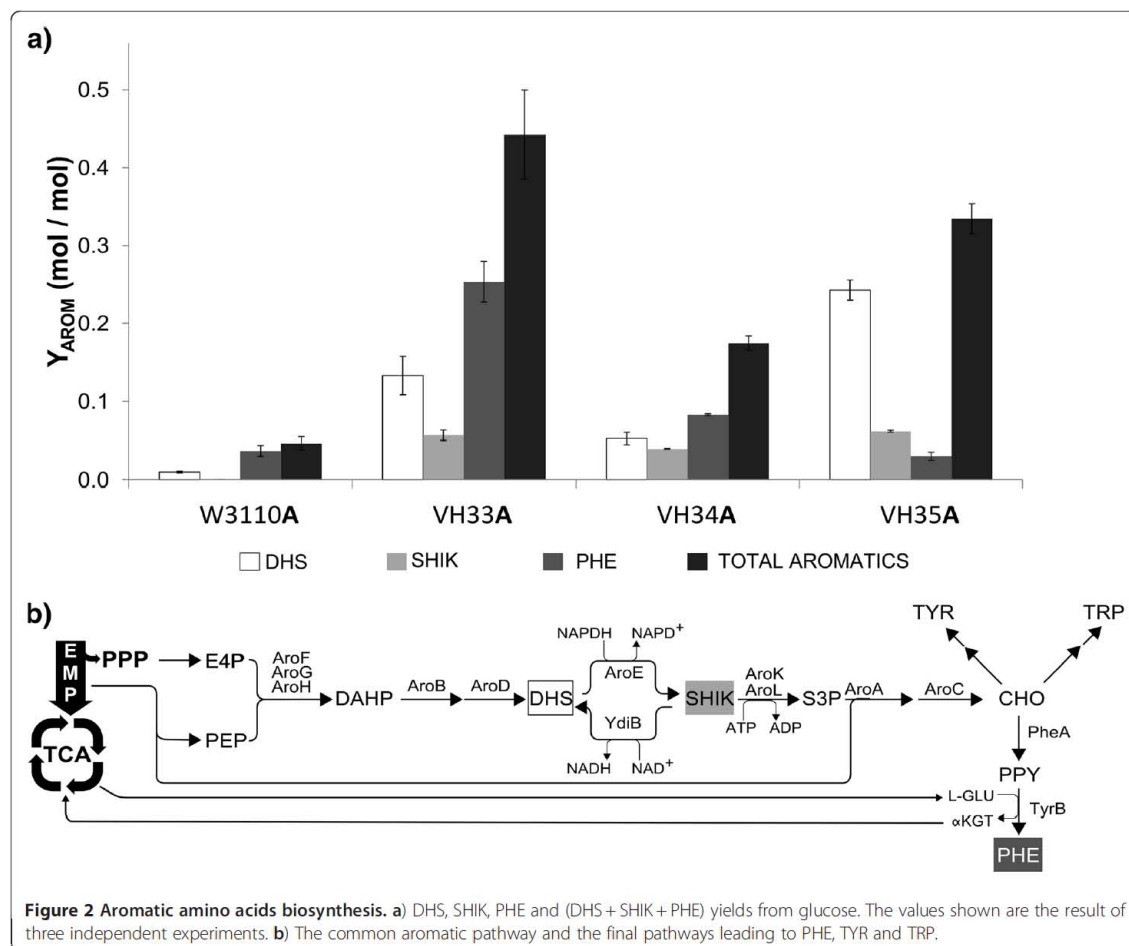


Figure 2 Aromatic amino acids biosynthesis. **a)** DHS, SHIK, PHE and (DHS + SHIK + PHE) yields from glucose. The values shown are the result of three independent experiments. **b)** The common aromatic pathway and the final pathways leading to PHE, TYR and TRP.

has allowed a better understanding of the physiology of this important industrial microorganism [25,26,29]. In this work we used a fluxome [47] approach to describe the phenotypic response (carbon fluxes) to the absence of PTS and also to a condition when the PYR to PEP reaction is dependent only on PykA or PykF activity.

Methods

Strains and plasmids

The strains used in this work are described in Table 1. The reference strain *E. coli* W3110 is an F^λ galactose fermenting derivative of *E. coli* K-12 [48]. Strain VH32 is a $\Delta ptsI, ptsH, crr::kan \Delta lacI, lacZ::loxP$ (PTS⁻) derivative of W3110 displaying a PTS⁻ glc⁻ phenotype [49]. Strain VH32 *galP*⁺ is a derivative of VH32 that was constructed by replacing the native galactose permease gene (*galP*) promoter by the *trc* promoter [50]. The method employed for this purpose leaves a stable chloramphenicol (Cm) resistance cassette (*cat*) flanked by phage λ Red recombinase

(FLP) recognition target (FRT) sites [51]. In this strain, glucose import is dependent on GalP and glucose phosphorylation on glucokinase (Glk) activity encoded by the chromosomal *glk* gene. Since the *lacI* gene was deleted in strain VH32 *galP*⁺, expression of *galP* from the *trc* promoter is constitutive. To generate strain VH33, the *cat* resistance cassette was removed from VH32 *galP*⁺ by transforming it with plasmid pCP20 that expresses FLP [52]. Strains VH34 ($\Delta ptsI, ptsH, crr::kan, pykA::cat$) and VH35 ($\Delta ptsI, ptsH, crr::kan, pykF::aacC1$) were generated by P1 transduction of VH33 using PB28 strain ($\Delta ptsI, ptsH, crr::kan, pykA::cat, pykF::aacC1$) [28] lysate as a donor and selecting with the corresponding antibiotic: chloramphenicol (Cm) or gentamicin (Gen). Verification of the desired genotype was made by PCR; in the case of *pykA* interruption by *cat* the 5' primer was TGA AGG AAT CGC GTT TTG ATA and the 3' primer: GTA TTA GTA GAA CCC ACG GTA. For verification of *pykF* interruption with *aacC1* the PCR reaction included the 5'

Table 1 *Escherichia coli* strains and plasmids used

Strain	Description	Reference
PB28	$\Delta ptsI, ptsH, crr::kan, pykA::cat, pykF::gen$	[28]
JM101 <i>pck</i> ⁻	<i>SupE, thi, Δ(lac-proAB), F', pck::cat</i>	[53]
W3110	$F' \lambda^{-} INV(rrnD - rrnE)1$	[48]
VH32 <i>galP</i> ⁺	W3110 $\Delta ptsH, ptsI, crr::Km, \Delta lacI, lacZ::loxP \Delta P_{galP}::cat, P_{trc}$	[50]
VH33	VH32 <i>galP</i> ⁺ $\Delta P_{galP}::P_{trc}$	This work
VH34	VH33 <i>pykA::cat</i>	This work
VH35	VH33 <i>pykF::gen</i>	This work
W3110 <i>pck</i> ⁻	W3110 <i>pck::cat</i>	This work
VH33 <i>pck</i> ⁻	VH33 <i>pck::cat</i>	This work
VH34 <i>pck</i> ⁻	VH34 <i>pck::cat</i>	This work
VH35 <i>pck</i> ⁻	VH35 <i>pck::cat</i>	This work
W3110A	W3110/JLBaroG ^{fbt} <i>tktA, pTrcpheA</i> ^{ev2}	This work
VH33A	VH33/JLBaroG ^{fbt} <i>tktA, pTrcpheA</i> ^{ev2}	This work
VH34A	VH34/JLBaroG ^{fbt} <i>tktA, pTrcpheA</i> ^{ev2}	This work
VH35A	VH35/JLBaroG ^{fbt} <i>tktA, pTrcpheA</i> ^{ev2}	This work
Plasmids		
pCP20	FLP ⁺ , λ ci857 ⁺ , λ p _{trc} Rep ^{ts} , Ap ^R , Cm ^R	[52]
pJLBaroG ^{fbt} <i>tktA</i>	<i>aroG</i> ^{fbt} under control of the <i>lacUV5</i> promoter; and <i>tktA</i> under its native promoter, carries <i>lacIq</i> and <i>tet</i> genes. Replication origin from pACYC184	[55]
<i>pTrcpheA</i> ^{ev2}	Evolved <i>pheA</i> ^{ev2} under the control of <i>lacUV5</i> promoter. Ev2 superscript means 2nd version of evolved <i>pheA</i> ^{fbt} gene.	[32]

primer: CGT AAC CTT TTC CCT GGA ACG and the 3' primer: GAG TCC GGC TGA TGT TGG GAG TAG GTG GCT. *pck*⁻ derivatives were generated by P1 transduction in W3110, VH33, and VH35 using a JM101 *pck*⁻ strain [53] (*supE, thi, Δ(lac-proAB), F', pck::cat*) lysate as donor and selecting with Cm. In these *pck*⁻ strains the *cat* cassette is flanked by FRT sites, so in order to generate strain VH34 *pck*⁻, the *cat* resistance cassette was removed from VH33 *pck*⁻ strain by transforming it with plasmid pCP20, and then performing P1 transduction in the resulting strain using a lysate from PB28 ($\Delta ptsI, ptsH, crr::kan, pykA::cat, pykF::gen$) as a donor. Resulting strain VH33 *pck*⁻ *pykA*⁻ (VH34 *pck*⁻) strain was selected using medium with Cm. Verification of the *pck::cat* mutation in derivative strains was done by PCR using primers reported elsewhere [54] (data not shown). Two plasmids were used in this work (Table 1). pJLBaroG^{fbt}*tktA* [55] is a pACYC184 derivative that harbors gene *aroG*^{fbt} encoding a feedback resistance version of DAHP synthase. This plasmid also contains a copy of the gene *tktA* that encodes transketolase, an enzyme that catalyzes the reversible conversion of D-fructose-6-phosphate (F6P) and D-glyceraldehyde-5-phosphate (G5P) into D-xylulose-5-phosphate (XU5P) and E4P. The *aroG*^{fbt} gene is under transcriptional control

of the *lacUV5* strong promoter that is inducible by isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG), whereas the *tktA* gene is under control of its native promoter. Plasmid *pTrcpheA*^{ev2} contains a second evolved version of a mutant version of chorismate mutase-prephenate dehydratase enzyme (PheA) [32]. This gene is under transcriptional control of the *trc* promoter. Strains W3110, VH33, VH34 and VH35 were sequentially transformed with plasmids pJLBaroG^{fbt}*tktA* and *pTrcpheA*^{ev2} to generate strains W3110A, VH33A, VH34A and VH35A, respectively.

Growth media and cultivation conditions

The medium used during mutant strains construction and selection was Luria-Bertani (LB) with the corresponding antibiotic: Cm 10 μg/ml, Km 10 μg/ml and Gm 5 μg/ml (Table 1). In shake flask cultures and labeling experiment, minimal medium was used. It contained glucose as the sole carbon source at a concentration of 10 g/l, K₂HPO₄ 90 mM, KH₂PO₄ 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 40 mM, NaCl 20 mM, MgSO₄·2H₂O 1.6 mM, CaCl₂ 0.05 mM, FeSO₄·7H₂O 0.072 mM and vitamin B1 0.05 mM. Glucose and salts solution were sterilized separately at 121°C during 20 minutes and vitamin B1 was sterilized by filtration. All stock cultures were stored at -70°C in LB medium containing glycerol (25% v/v). For fermentation profiles, 5 ml of LB overnight cultures were used as inoculum, washed twice with minimal medium and then subcultured in shake flask containing 30 ml of minimal medium with 5 g/l glucose starting with an OD_{600nm} = 0.1 and incubated at 37°C, 300 rpm during 12 hours in an orbital shaker (G25, New Brunswick Scientific, Inc., New Brunswick, NJ). These cultures were used to inoculate 30 ml of minimal medium with 10 g/l glucose at an OD_{600nm} = 0.01 and then incubated at 37°C, 300 rpm during 24 hours. Every 2 hours 1 ml of culture was harvested, OD was determined (Biomate 5, ThermoSpectronic), cells were centrifuged (10,000 g for 10 min) and the supernatant used for metabolite determination by HPLC. For labeling experiments, the naturally labeled glucose was substituted by 99% [1- ¹³C] labeled glucose (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA). Cells were harvested during the exponential growth phase at 9 hours (OD_{600nm} = 3.72) for W3110, 15 hours (OD_{600nm} = 6.68) for VH33, 16 hours for VH34 (OD_{600nm} = 7.68) and 16 hours for VH35 (OD_{600nm} = 5.1). Cultures for determining the correlation between optical density (600 nm) and cell dry mass (CDM) were started with 5 ml of LB overnight cultures that were used as inoculum, washed twice with minimal medium and then used to inoculate a shake flask containing 50 ml of minimal medium with glucose 5 g/l starting at an OD_{600nm} = 0.1 and incubated at 37°C, 300 rpm for 12 hours in an orbital shaker. To determine the correlation between optical density and CDM, 10 ml of cells grown in minimal medium were harvested and

filtered at different optical densities, washed twice with water and dried at 80°C until constant weight. The correlation between OD_{600nm} and CDM [g/L] was determined as CDM = 0.45 x OD_{600nm}.

Sample preparation for labeling analysis and estimation of metabolic flux

The total volume of cultures grown with [1- ¹³C] labeled glucose (10 ml) was centrifuged and the pellet (about 1 mg dry cell mass) was washed twice with cold water (4°C). Hydrolysis was performed with 50 µL of HCl 6 N at 110°C for 24 hours. The insoluble debris was separated by filtration (Titan 2 HPLC filter purple, 0.2 µm nylon membrane, Sun-Sri), neutralized with NaOH 6 N and lyophilized. Derivatization with (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) of the lyophilized cell protein was performed to determine ¹³C labeling pattern of proteinogenic amino acids by GC-MS as previously described [56]. The metabolic network for simulation was comprised of the EMP pathway, the PPP, the TCA cycle and the Ender Duodoroff pathway. Glyoxylate shunt, anaplerotic reactions and malic enzyme were included. The simulation was done as previously described [56].

Resting cells experiments

To determine PHE production and yield in W3110A, VH33A, VH34A and VH35A strains, a resting cells method was used. 5 ml of LB overnight cultures were used as inoculum, washed twice with minimal medium supplemented with 10 g/l of yeast extract (MM+YE) and then sub-cultured in shake flask containing 50 ml of MM+YE with 5 g/l glucose starting with an OD_{600nm} = 0.1 and incubated at 37°C, 300 rpm until optic density of 2.0. At this point, cells were harvested, washed twice with minimal medium and suspended in 50 ml of minimal medium with 10 g/l glucose. To arrest cellular growth 50 µg/ml of chloramphenicol was added as well as 100 µM IPTG for *aroC*^{fbr} and *pheA*^{ev2} transcriptional induction. Cell cultures were incubated during 12 hours in an orbital shaker. Every hour, 1 ml of culture was harvested, OD_{600nm} was determined, cells were centrifuged (10,000 g for 10 min) and the supernatant used for metabolite determination by HPLC.

Determination of glucose, organic acids, DHS, SHIK and PHE

For determination concentrations of D-glucose and organic acids, an Aminex HPX-87 H column (300 X 7.8 mm; 9 Am Bio-Rad, Hercules, CA) was used. Separation was carried out isocratically with 5 mM H₂SO₄ at a flow rate of 0.5 ml/min and a temperature of 50°C. Under these conditions glucose was detected by refraction index and acetic acid, DHS and SHIK by photodiode array at 210 nm. For these measurements a Waters HPLC system

was used: 600E quaternary pump, 717 automatic injector, 2410 refraction index, and 996 photodiode array.

PHE concentration in culture supernatants was quantified with a Phenomenex Synergy Hydro RP18 column (150 by 4.6 mm; 4 m) attached to an Agilent 1100 HPLC system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Running conditions were: mobile phase, 0.2% TFA in 40% methanol; flow, 0.5 ml/min. Detection was performed with a photodiode array at 280 nm.

Determination of Pyk enzyme activity

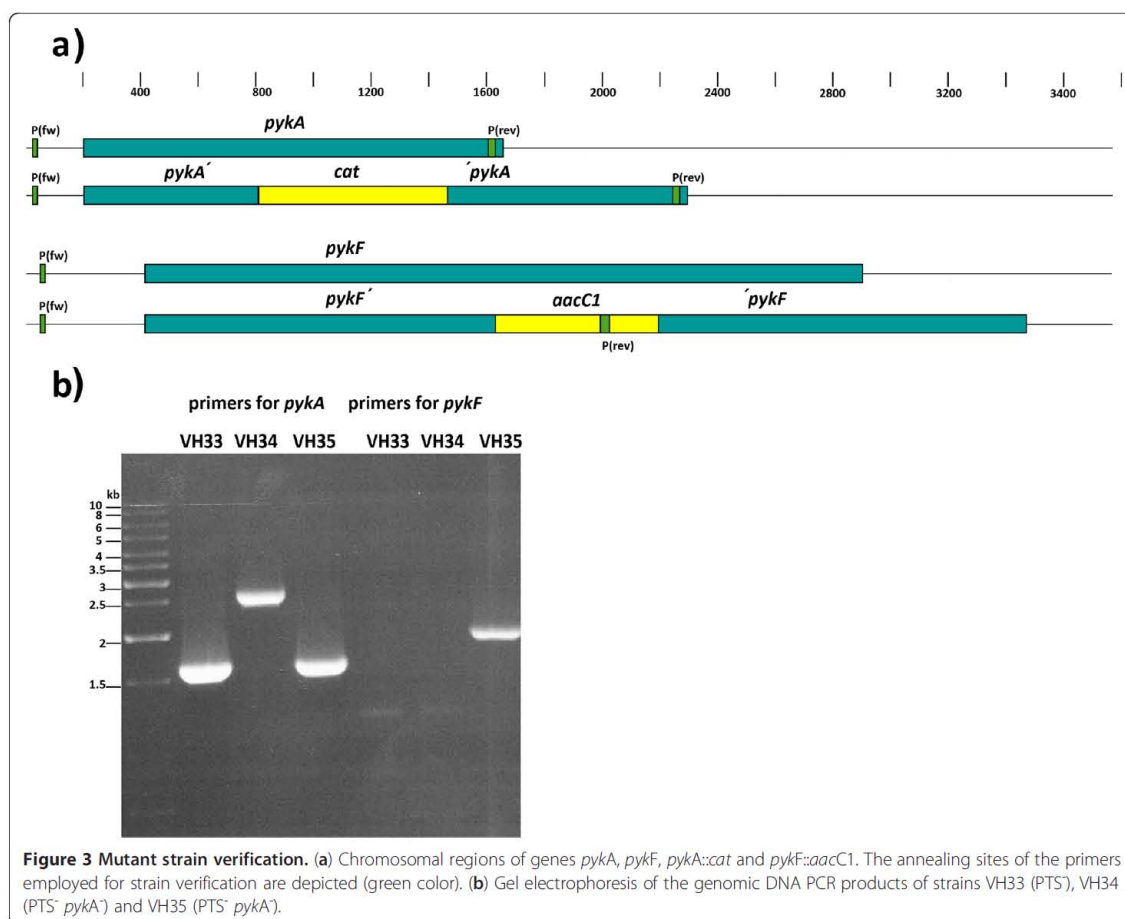
Cells in exponential growth phase were harvested by centrifugation (10,000 g for 10 min), washed twice with 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2 at 4°C), suspended in the same buffer, and disrupted by sonication using four 15-second, λ = 10 µm, pulses in a cold bath (Ultrasonic Disrupter, Soniprep 150). The cell debris was removed by centrifugation (10,000 g, 10 min, 4°C), and the resulting crude cell extracts were immediately used to determine enzyme activities. Pyk enzyme activities were determined spectrophotometrically (Biomate 5, Thermo-Spectronic) using 1 U of lactate dehydrogenase (LDH) as coupling enzyme [57]. The reaction mix contained KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, ADP 2 mM, NADH 0.2 mM, PEP 100 mM, fructose-1,6 biphosphate (FBP) 1 mM, AMP 1 mM and ribose-5-phosphate (R5P) 1 mM. One unit of specific enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to convert 1 µmol of substrate into the specific product per minute per milligram of protein at 30°C. Protein concentrations were measured using the Lowry method. Enzyme activities reported are the average of three independent experiments.

Results

Pyk mutant strains verification

Strain VH33 is a W3110 mutant derivative lacking PTS activity as a result of deleting genes *ptsI*, *ptsH* and *crr*. This strain was also modified in order to increase its glucose import capacity by replacing the native promoter of gene *galP* by the strong *trc* promoter and inactivating the *lacI* gene. As a result of these modifications VH33 displays a constitutive PTS⁻ glc⁺ phenotype. In this work, strain VH33 was further modified by inactivating either *pykA* or *pykF*, to generate strains VH34 and VH35, respectively.

Figure 3a depicts the genomic regions of *pykA* and *pykF* and the resulting modifications after interruption with *cat* (VH34) or *aacC1* (VH35) antibiotic resistance genes. The forward primer for verification of *pykA* interruption anneals outside of the *pykA* region while the reverse primer binds at the end of the gene. PCR amplification using genomic DNA from VH33, VH34 and VH35 as template showed two expected bands: one of 1.6 kb for VH33 and VH35 and one of 2.3 kb for VH34 due to the insertion of the *cat* gene in the *pykA* gene (Figure 3b). For verifying strain VH35, the



forward primer employed anneals outside of the *pykF* coding region while the reverse primer binds to the *aacC1* gene. When using genomic DNA from VH33, VH34 and VH35 as template, no PCR product was observed for VH33 or VH34 while the expected 2 kb band was observed for VH35 (Figure 3b). These results, together with the expected antibiotic resistance phenotypes, indicated that interruptions of *pykA* by *cat* and *pykF* by *aacC1* were present in VH34 and VH35.

Measurement of Pyk enzyme activity

In the wild type strain W3110 the activities that determine the PEP → PYR flux are PTS, PykA and PykF, while in strain VH33 this reaction is catalyzed only by both Pyk isozymes. In strains VH34 and VH35, the PEP → PYR reaction is dependent only on PykF or PykA, respectively. The measured total Pyk enzyme activity (PykA + PykF) in strain W3110 was 0.18 ± 0.03 U/mg and a similar value was observed in strain VH33 (Figure 4). In strain VH34, where only the PykF isozyme is active, the Pyk specific

activity was 0.21 ± 0.01 U/mg, whereas in the VH35 strain the Pyk activity, dependent only on PykA, was 0.05 ± 0.01 U/mg (Figure 4).

Batch culture profiles

To determine the effects on kinetic and stoichiometric parameters caused by PTS, PTS *pykA* and PTS *pykF* inactivations, batch cultures in minimal medium with 10 g/l of glucose as sole carbon source were performed (Table 2). Under these conditions, reference strain W3110 displayed a μ of 0.69 h^{-1} and a q_{Glc} of 16.1 mmol/g/h ; both values were the highest among the tested strains. A high q_{Ac} of 4.31 mmol/g/h was determined and no other by-products were observed. The biomass yield from glucose ($Y_{x/s}$) was 52.44 g/mol , the lowest value observed among strains in this study. Strain VH33 displayed a μ of 0.45 h^{-1} and a specific glucose uptake rate (q_{Glc}) of 6.9 mmol/g/h . The specific acetate production rate (q_{Ac}) was 5% of the value observed in W3110. When compared to the wild type strain, the $Y_{x/s}$ in VH33 increased 20%. Deletion of *pykA*

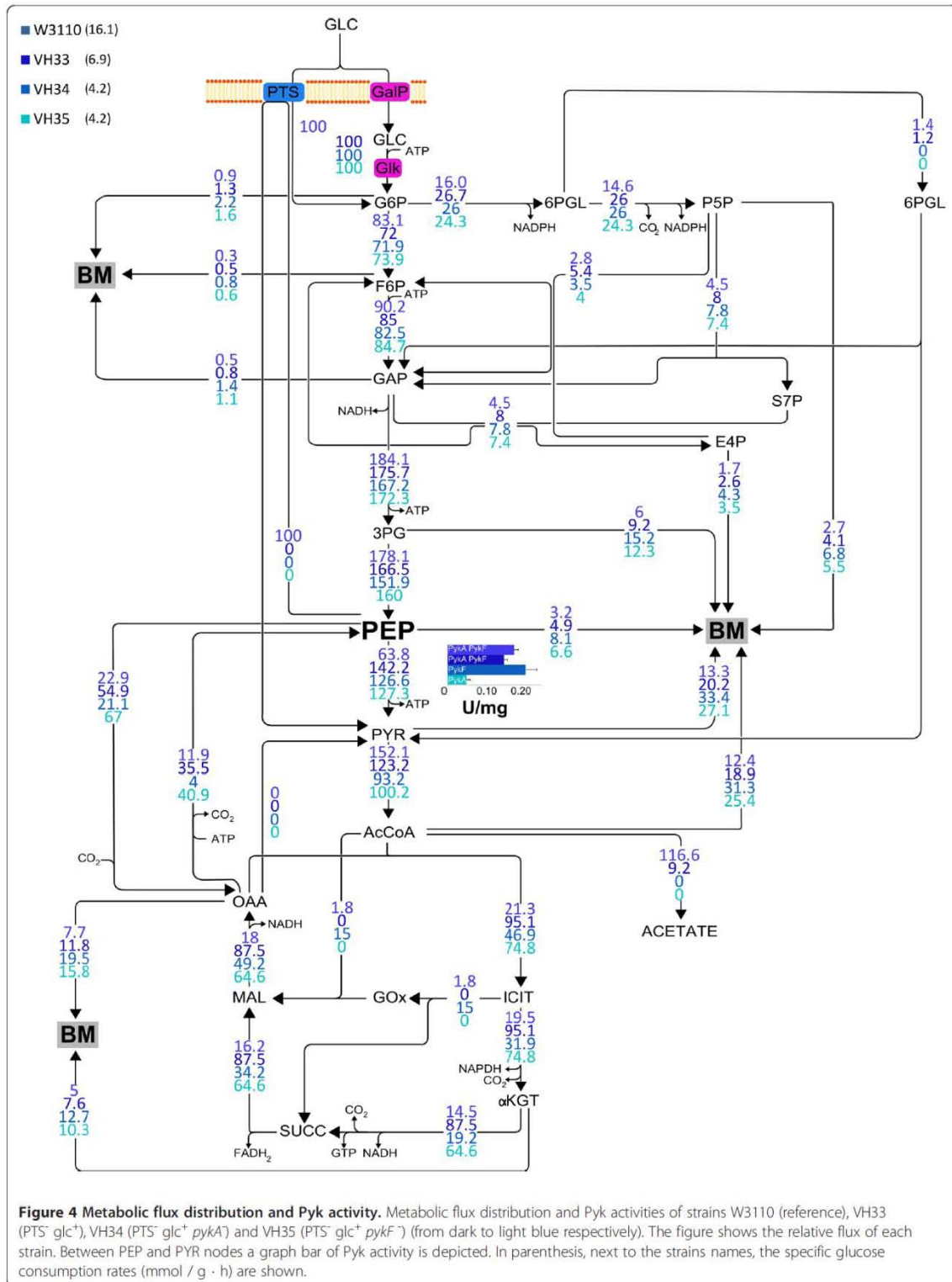


Table 2 Growth kinetic parameters in minimal media

Strain	μ (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g / mol)	q_s (mmol / g / h)	$Y_{Ac/Glc}$ (mol / mol)	q_{Ac} (mmol / g / h)
W3110 (WT)	0.69 ± 0.01	52.44 ± 4.42	16.1 ± 0.33	1.2 ± 0.01	4.31 ± 0.12
VH33 (PTS ⁻)	0.45 ± 0.00	63 ± 3.60	6.9 ± 0.61	0.09 ± 0.00	0.23 ± 0.00
VH34 (PTS ⁻ <i>pykA</i> ⁻)	0.44 ± 0.00	104.4 ± 16.20	4.2 ± 0.61	–	–
VH35 (PTS ⁻ <i>pykF</i> ⁻)	0.36 ± 0.01	84.6 ± 9.00	4.2 ± 0.41	–	–
W3110 <i>pck</i> ⁻	0.64 ± 0.04	51.76 ± 1.93	12.44 ± 0.23	0.32 ± 0.03	1.14 ± 0.01
VH33 <i>pck</i> ⁻ (PTS ⁻ <i>pck</i> ⁻)	0.37 ± 0.00	80.47 ± 0.86	4.61 ± 0.09	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.00
VH34 <i>pck</i> ⁻ (PTS ⁻ <i>pykA</i> ⁻ <i>pck</i> ⁻)	0.33 ± 0.02	101.00 ± 2.87	3.35 ± 0.13	–	–
VH35 <i>pck</i> ⁻ (PTS ⁻ <i>pykF</i> ⁻ <i>pck</i> ⁻)	0.29 ± 0.00	73.32 ± 2.06	3.96 ± 0.13	–	–

(VH34) had no significant effect on the μ (0.44 h⁻¹), whereas deletion of *pykF* (VH35) had a negative effect (0.36 h⁻¹). Both strains showed the same q_{Glc} value (4.2 mmol/g/h) and no acetate production was detected. The highest $Y_{x/s}$ value among all tested strains was observed for strain VH34 (Table 2).

Metabolic flux responses to PTS inactivation

To determine in fine detail the consequences of PTS and *PykA* or *PykF* inactivation on central carbon metabolism, ¹³C metabolic flux analysis was performed. In reference strain W3110, the EMP pathway was identified as the main metabolic route involved in glucose catabolism, the PPP had a minor role and the Entner-Duodoroff pathway (EDP) was hardly active. The TCA cycle displayed a low carbon flux value and the glyoxylate shunt was slightly active (Figure 4). It is noteworthy that a low level of carbon exchange was detected between PEP and OAA (catalyzed by *Ppc* and *Pck*), forming a cycle where one ATP molecule is hydrolyzed.

PTS inactivation had a strong effect on the metabolic flux distribution throughout the whole central metabolic network. The EMP pathway relative flux was reduced while PPP and TCA cycle fluxes were increased. When compared to data from strain W3110, an increase in the exchange rate between PEP and OAA, involving *Ppc* and *Pck*, was observed. Also, strain VH33 displayed higher carbon flux to biomass when compared to the wild-type strain. At the lower part of the EMP pathway, the total PEP → PYR flux decreased from 163% in W3110 to 142% in VH33; however, the flux dependent only on *Pyk* isozymes activity increased from 63.8% in W3110 to 142.2% in the PTS⁻ *glc*⁺ strain. The flux from acetyl coenzyme A (AcCoA) to acetate was reduced from 116% in W3110 to 9% in VH33. When compared to W3110, a 4 fold higher flux into the TCA was observed in strain VH33.

Metabolic flux responses to *Pyk* isozyme inactivation in the PTS⁻ *glc*⁺ background.

Inactivation of either *Pyk* isozyme in the PTS⁻ *glc*⁺ background caused a similar level of reduction in q_s and q_{Ac}

and the magnitude of the flux from PEP to PYR was similar in both strains. However, values for μ , $Y_{x/s}$ and *Pyk* activity, differed between strains VH34 and VH35. Compared to strain VH34, the anaplerotic flux from PEP to OAA was 3 fold higher in VH35, and the flux directed to the TCA cycle via *GltA* was also higher (Figure 4). Flux from AcCoA to acetate was absent in both strains and the glyoxylate shunt was found to be active only in VH34. A high carbon exchange flux between PEP and OAA was found in VH35, whereas for VH34 the exchange flux value was the lowest of all studied strains. When compared to strain VH33, it was observed that inactivation of either *Pyk* isozyme caused an increase in carbon flux directed to biomass formation.

Physiological responses to *Pck* inactivation

The flux analysis data revealed the existence of a metabolic cycle involving *Ppc* and *Pck* in all studied strains. In order to gain more insight into the role of this cycle, we generated *pck*⁻ mutant derivatives of W3110, VH33, VH34 and VH35. When these derivative strains were cultured in minimal medium with glucose as sole carbon source, a reduction in μ and q_s was observed. Also, a 75% and 87% reduction in the rate of acetate production was observed in strains W3110 and VH33, respectively (Table 2).

Aromatic amino acids production

The effects of PTS and *Pyk* inactivation on aromatics production capacity, was determined on strains W3110A, VH33A, VH34A and VH35A that carry plasmids *pJLBaroG^{fbt}tkA* and *pTrecpheA^{ev2}* having genes encoding enzymes that increase carbon flow from central metabolism to the common aromatic and PHE biosynthetic pathways. These modifications cause an increase in PHE production capacity. However, accumulation and secretion of pathway intermediates such as DHS and SHIK also occurs as consequence of pathway bottlenecks in the common aromatic pathway.

Metabolites DHS and SHIK as well as PHE, were quantified from supernatants of resting cells cultures. Figure 2a and Table 3 show the calculated yields from glucose for DHS, SHIK and PHE, as well as the sum of

Table 3 Batch profiles and common shikimate pathway intermediaries and phenylalanine yields from glucose of W3110A, VH33A, VH34A and VH35A resting cells in minimal media

Strain	q_s (mmol / g / h)	q_{Ac} (mmol / g / h)	$Y_{DHS / Glc}$ (mol / mol)	$Y_{SHIK / Glc}$ (mol / mol)	$Y_{PHE / Glc}$ (mol / mol)	$Y_{DHS+SHIK+PHE / Glc}$ (mol / mol)
W3110A	2.51 ± 0.10	7.52 ± 0.46	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01
VH33A	0.70 ± 0.04	–	0.13 ± 0.03	0.06 ± 0.01	0.25 ± 0.03	0.44 ± 0.06
VH34A	1.96 ± 0.02	–	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.17 ± 0.01
VH35A	0.91 ± 0.04	–	0.24 ± 0.01	0.06 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.33 ± 0.02

these three compounds ($Y_{DHS+SHIK+PHE/Glc}$). A yield value that includes the sum of the amounts detected for DHS, SHIK and PHE is the best indicator of aromatics production capacity, which itself is directly related to PEP biosynthetic availability. Inactivation of PTS caused a near 10-fold increase in $Y_{DHS+SHIK+PHE/Glc}$ when compared to wild-type strain W3110. This is the result of replacing PEP-dependent glucose transport in the wild-type strain by an ATP-dependent mechanism in strain VH33 [23,30]. In the $PTS^- glc^+$ background, inactivation of PykA (VH34) or PykF (VH35) caused 3.4 and 6.6-fold increases in $Y_{DHS+SHIK+PHE/Glc}$ when compared to W3110.

Discussion

The objective of the present work consisted on determining the effects of PTS and Pyk isozymes inactivation on cell physiology, metabolic flux distribution and PEP availability for aromatics biosynthesis. The inactivation of PTS in *E. coli* abolishes PEP-dependent glucose transport; therefore PYR production from PEP is dependent only on Pyk isozyme activities. In this study, by inactivating each Pyk isozyme in a $PTS^- glc^+$ background, strains were generated where the PEP to PYR reaction was dependent only on PykA or PykF activity. These strains were characterized by flux analysis, thus providing the first quantitative description of the metabolic consequences of the sequential elimination of activities catalyzing the PEP to PYR reaction.

The inactivation of PTS in *E. coli* causes a strong reduction in q_{Glc} and μ , therefore, such mutant strains display a $PTS^- glc^-$ phenotype. To improve q_{Glc} and μ , strain VH33 has a chromosomal modification that increases its capacity for non PTS-dependent glucose transport and thus displays a $PTS^- glc^+$ phenotype. In strain VH33 glucose phosphorylation is not dependent on PEP; instead, ATP is the phosphate donor in a reaction catalyzed by glucokinase. The μ of the $PTS^- glc^-$ progenitor strain VH32 is $0.03 h^{-1}$, whereas this value increased to $0.45 h^{-1}$ in VH33 as a result of replacing the native promoter of gene *galP* with the strong promoter *trc* [50]. In this study, the q_{Glc} of strain VH33 was determined and it corresponded to 43% of that measured in wild-type W3110. An expected consequence of the lower

q_{Glc} in VH33 is a decreased flux in the EMP pathway. The flux analyses performed in this report revealed that the main observed response to PTS inactivation was flux rerouting at the AcCoA node, resulting in a highly reduced q_{Ac} . This metabolic response is expected to compensate for the reduced glycolytic flux in strain VH33, diverting the AcCoA not consumed for acetate production mainly into the TCA cycle. The net result is an augmented flux into the TCA cycle with an expected increase in the synthesis rate of biomass precursors αKGT and OAA, as well as reduced cofactors that can lead to ATP synthesis by oxidative phosphorylation. Inactivation of either PykA or PykF in the $PTS^- glc^+$ background caused an approximately further 50% reduction in q_{Glc} and flux in the PEP to PYR reaction when compared to data from VH33. These results indicate that both isozymes should be active to sustain the high flux level in this part of the EMP pathway when *E. coli* grows on glucose. Acetate production was not detected in strains VH34 and VH35. In these strains, the relative flux to the TCA cycle was higher than that observed for W3110 but lower than the value for VH33. A second observed response to PTS or PTS and Pyk inactivation consisted in flux rerouting in the central metabolic network leading to increased flux to biomass generation. The flux value to biomass was nearly twofold higher in strains VH34 and VH35, when compared to VH33. This metabolic response can be expected to have the effect of conserving the reduced amount of intermediate metabolites resulting from the diminished glucose import and catabolism capacity in the PTS^- and Pyk^- mutant strains. As expected, the flux values leading from the central metabolic pathways to biomass formation showed a positive correlation with the observed $Y_{x/s}$ in all studied strains.

Evidence of cycling via Ppc and Pck was detected in the wild-type strain W3110. This metabolic cycle has also been reported by other authors in wild-type *E. coli* [26,27]. A comparison among the mutant strains generated in this study provides the opportunity to explore the role of this cycle in *E. coli*. Flux analysis revealed that PTS inactivation causes an increase in the cycle net flux. A similar response is observed by simultaneous PTS and PykF inactivation (strain VH35). In contrast, the lowest net flux value was observed in strain VH34 that lacks

PTS and PykA activities. These results suggest a partial inverse correlation between q_s and the net flux in this metabolic cycle, which can be observed when comparing strains W3110, VH33 and VH35. It is not clear why this correlation does not apply for strain VH34. This might be related to the differential effects of PykA or PykF inactivation on the metabolic flux distribution around the PEP node. In a previous report, when comparing a wild-type strain and a derivative lacking both PykA and PykF activities, the Pyk double mutant displayed a higher cycle net flux [26]. However, in this case, the q_{Glc} of the strains were similar, so the observed effect must be mainly related to the reduced flux in the PEP to PYR reaction.

The ATP/ADP ratio is an important physiologic parameter that modulates several cellular functions. It has been observed that a reduction in the ATP/ADP ratio, caused by increasing ATP hydrolysis activities, stimulates flux in the EMP pathway [58]. Each cycle involving Ppc and Pck activities consumes one ATP molecule. Thus, a reduction in the cellular ATP/ADP ratio could be expected at high Ppc-Pck cycle flux values, and this could stimulate EMP pathway flux. The observed inverse correlation between q_{Glc} and the net cycle flux in strains W3110, VH33 and VH35 suggests this cycle might be contributing to increasing EMP pathway flux and thus, growth capacity in the mutant strains. To test this hypothesis, mutant derivatives of strains W3110, VH33, VH34 and VH35 lacking Pck activity were constructed and characterized. A reduction in q_{Glc} and μ was observed in all derivative Pck⁻ strains, suggesting that the Ppc-Pck cycle's function is related to stimulating flux in the EMP pathway.

Some of the metabolic responses discussed above, that include q_{Glc} reduction and flux rerouting at several points in central metabolism can be partially explained considering that PEP has a role in the allosteric regulation of several enzymes of the EMP pathway. In addition, inhibition of glucokinase by PEP has been reported [9]. Considering the genetic modifications performed, a larger PEP pool would be expected in strains VH33, VH34 and VH35 when compared to W3110. This assumption is consistent with the higher metabolic PEP availability demonstrated in PTS⁻ glc⁺ strains that have been shown to produce aromatic compounds with a higher yield from glucose and with data from PTS⁻ Pyk-mutants that will be discussed below [23,30].

Strains W3110A, VH33A, VH34A and VH35A carry plasmids with genes encoding enzymes that increase carbon flow into the common aromatic and the PHE biosynthetic pathways (Figure 2a and Table 3). When considering the $Y_{DHS+SHIK+PHE/Glc}$ from resting cells experiments in minimal medium with glucose, it can be observed, as expected, that PTS inactivation causes an increase in this parameter. In the PTS⁻ glc⁺ background, inactivation of PykA (VH34A) or PykF (VH35A), would

be expected to further increase PEP availability for aromatics biosynthesis. However, the $Y_{DHS+SHIK+PHE/Glc}$ value was lower in these two strains when compared to VH33A. These results can be explained considering that in strains VH34 and VH35 a higher flux value is directed from central metabolism to biomass formation when compared to VH33. In strains VH34 and VH35, an inverse correlation was observed between $Y_{x/Glc}$ and $Y_{DHS+SHIK+PHE/Glc}$. These data indicates that a carbon-limitation state in minimal medium with glucose reduces PEP availability for aromatics production in strains VH34 and VH35 as a result of competition for central metabolic precursors, including PEP, between biomass formation reactions and the modified aromatic pathways in strains VH34A and VH35A. Consumption of precursors for biomass synthesis from central metabolism could be reduced in these two strains if they are provided in the culture medium. When resting cells experiments were performed in minimal medium supplemented with yeast extract (10 g/l), a 19, 14 and 25-fold increase was observed in VH33A, VH34A and VH35A in $Y_{DHS+SHIK+PHE/Glc}$ values when compared with W3110 (data not shown). In addition, two reports have shown that strains with PTS⁻ glc⁺ PykA⁻ or PTS⁻ glc⁺ PykF⁻ phenotypes display higher production capacity for aromatic compounds in complex media when compared to an isogenic PTS⁻ glc⁺ strain [17,22].

It has been shown that a strain having the same phenotype as VH33 displays a better production performance for recombinant protein production when compared to W3110 [50]. This result can be explained by the lower q_{Ac} and higher $Y_{x/Glc}$ displayed by the PTS⁻ glc⁺ mutant, when compared to the wild-type strain. In this regard, it is noteworthy that inactivation of either Pyk isozyme in VH33 caused a further reduction in $Y_{Ac/Glc}$ to the point where this organic acid was not detected by HPLC. Interestingly, strain VH34 displayed no acetate production, a 66% increase in $Y_{x/s}$ over VH33 and the same μ . In a recent report, strain VH34 transformed with a plasmid DNA vaccine (pDNA) and grown in complex medium supplemented with glucose produced 50% less acetate and nearly 4-fold more pDNA when compared to strain VH33/pDNA [59]. These data shows that strain VH34 has advantageous characteristics for a microbial host that could be employed for the development of fermentative process for plasmid DNA or recombinant protein production.

Conclusions

In this study, the contribution of PTS and each of the Pyk isozymes to the PEP to PYR flux as well as the consequences of their inactivation on central metabolism were determined by metabolic flux analysis. This work showed that the presence of either one of the two Pyk isozymes generates quite different physiological and central carbon

metabolism flux responses. The general observed response to PTS or Pyk inactivation is consistent with central metabolism flux rerouting to compensate for the lower EMP flux observed in these mutant strains. The detailed characterization presented here provides further insight into the flexibility of the central metabolic network in *E. coli* and will be useful in the design of strategies for generating strains for the production of aromatic metabolites, plasmid DNA or recombinant proteins.

Abbreviations

Metabolic pathways

EMP: Embden Meyerhof Parnas; TCA: Tricarboxylic acid cycle; PPP: Pentose pathway.

Enzymes

GalP: Galactose permease; Gap: Glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase; Glk: Glucokinase; GltA: Citrate synthase; Gnd: 6-phosphogluconate dehydrogenase; Mdh: Malate dehydrogenase; Mez: NAD- and NADP dependent malic enzymes; Pck: Phosphoenolpyruvate carboxylase; Pgi: Phosphoglucose isomerase; Ppc: Phosphoenolpyruvate carboxylase; PTS: Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system; PykAF: Pyruvate kinases A and F; Zwf: Glucose 6-phosphate dehydrogenase.

Compounds and others

AcCoA: Acetyl-coenzyme A; CIT: Citrate; E4P: Erythrose 4-phosphate; F6P: Fructose 6-phosphate; α KG: α -ketoglutarate; GAP: Glyceraldehydes 3-phosphate; G6P: Glucose 6-phosphate; Glc: Glucose; GOx: Glyoxylate shunt; ICI: Isocitrate; MAL: Malate; NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form); NADH: Nicotinamide adenine dinucleotide (reduced form); OAA: Oxaloacetate; 2PG: 2-phosphoglycerate; 3PG: Phosphoglycerate; 6PGL: 6-phosphogluconolactone; PEP: Phosphoenolpyruvate; PYR: Pyruvate; R5P: Ribose 5-phosphate; SUCC: Succinate; BM: Biomass.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

EM, FB, GG and CW participated in the design of this study. EM constructed the strains, realized the batch cultures and performed Pyk activity and HPLC determinations. JB designed the ^{13}C glucose labeled experiments, the derivatization and GC-MS analysis of the hydrolyzates. JB and CW did the modeling of the network for relative flux determination. EM, JB, FB, GG and CW participated in the analysis of the results as well as in writing and critical review of the manuscript. All authors have read and approved the manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by CONACyT grants 83039 and 126793. EM was supported by a fellowship from CONACyT. We thank Georgina Hernandez-Chavez and Mercedes Enzaldo for technical assistance.

Author details

¹Cellular Engineering and Biocatalysis Department, Biotechnology Institute, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico. ²Institute of Biochemical Engineering, Technische Universität Braunschweig, Gaußstr. 17, D-38106, Braunschweig, Germany.

Received: 23 July 2012 Accepted: 6 September 2012

Published: 13 September 2012

References

1. Fraenkel DG: *Glycolysis, pentose phosphate pathway, and Entner-Duodoroff pathway. In Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. Washington DC: American Society for Microbiology; 1987.
2. Deutscher J, Franke C, Postma PW: How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006, **70**:939–1031.
3. Lang VJ, Leystra-Lantz C, Cook RA: Characterization of the specific pyruvate transport system in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 1987, **169**:380–385.
4. Postma PW, Lengeler JW, Jacobson GR: Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* 1993, **57**:543–594.
5. Munoz ME, Ponce E: Pyruvate kinase: current status of regulatory and functional properties. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2003, **135**:197–218.
6. Morikawa M, Izui K, Taguchi M, Katsuki H: Regulation of *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate carboxylase by multiple effectors in vivo. Estimation of the activities in the cells grown on various compounds. *J Biochem* 1980, **87**:441–449.
7. Sauer U, Eikmanns BJ: The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2005, **29**:765–794.
8. Chao YP, Patnaik R, Roof WD, Young RF, Liao JC: Control of gluconeogenic growth by *pps* and *pck* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1993, **175**:6939–6944.
9. Ogawa T, Mori H, Tomita M, Yoshino M: Inhibitory effect of phosphoenolpyruvate on glycolytic enzymes in *Escherichia coli*. *Res Microbiol* 2007, **158**:159–163.
10. Campos-Bermudez VA, Bologna FP, Andreo CS, Drincovich MF: Functional dissection of *Escherichia coli* phosphotransacetylase structural domains and analysis of key compounds involved in activity regulation. *FEBS J* 2010, **277**:1957–1966.
11. Jensen RA, Nasser DS: Comparative regulation of isoenzymic 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthetases in microorganisms. *J Bacteriol* 1968, **95**:188–196.
12. Bondinell WE, Vnek J, Knowles PF, Sprecher M, Sprinson DB: On the mechanism of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthetase. *J Biol Chem* 1971, **246**:6191–6196.
13. Sprenger GA: From scratch to value: engineering *Escherichia coli* wild type cells to the production of L-phenylalanine and other fine chemicals derived from chorismate. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007, **75**:739–749.
14. Chotani G, Dodge T, Hsu A, Kumar M, LaDuca R, Trimbur D, Weyler W, Sanford K: The commercial production of chemicals using pathway engineering. *Biochim Biophys Acta* 2000, **1543**:434–455.
15. Gosset G: Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Microb Cell Fact* 2005, **4**:14.
16. Gosset G: Production of aromatic compounds in bacteria. *Curr Opin Biotechnol* 2009, **20**:651–658.
17. Gosset G, Yong-Xiao J, Berry A: A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol* 1996, **17**:47–52.
18. Leuchtenberger W, Huthmacher K, Drauz K: Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005, **69**:1–8.
19. Yi J, Draths KM, Li K, Frost JW: Altered glucose transport and shikimate pathway product yields in *E. coli*. *Biotechnol Prog* 2003, **19**:1450–1459.
20. Munoz AJ, Hernandez-Chavez G, de Anda R, Martinez A, Bolivar F, Gosset G: Metabolic engineering of *Escherichia coli* for improving L: -3,4-dihydroxyphenylalanine (L: -DOPA) synthesis from glucose. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2011, **19**:1845–1852.
21. Dewick PM (Ed): *Medicinal natural products: A biosynthetic Approach*. 3rd edition. Great Britain: Antony Rowe Ltd; 2009.
22. Escalante A, Calderon R, Valdivia A, de Anda R, Hernandez G, Ramirez OT, Gosset G, Bolivar F: Metabolic engineering for the production of shikimic acid in an evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Microb Cell Fact* 2010, **9**:21.
23. Baez JL, Bolivar F, Gosset G: Determination of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate productivity and yield from glucose in *Escherichia coli* devoid of the glucose phosphotransferase transport system. *Biotechnol Bioeng* 2001, **73**:530–535.
24. Patnaik R, Liao JC: Engineering of *Escherichia coli* central metabolism for aromatic metabolite production with near theoretical yield. *Appl Environ Microbiol* 1994, **60**:3903–3908.
25. Al Zaid Siddiquee K, Arauzo-Bravo MJ, Shimizu K: Metabolic flux analysis of *pykF* gene knockout *Escherichia coli* based on ^{13}C -labeling experiments

- together with measurements of enzyme activities and intracellular metabolite concentrations. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004, **63**:407–417.
26. Emmerling M, Dauner M, Ponti A, Fiaux J, Hochuli M, Szyperski T, Wuthrich K, Bailey JE, Sauer U: Metabolic flux responses to pyruvate kinase knockout in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2002, **184**:152–164.
 27. Flores S, Gosset G, Flores N, de Graaf AA, Bolivar F: Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by (13)C labeling and NMR spectroscopy. *Metab Eng* 2002, **4**:124–137.
 28. Ponce E, Flores N, Martinez A, Valle F, Bolivar F: Cloning of the two pyruvate kinase isoenzyme structural genes from *Escherichia coli*: the relative roles of these enzymes in pyruvate biosynthesis. *J Bacteriol* 1995, **177**:5719–5722.
 29. Siddiquee KA, Arauzo-Bravo MJ, Shimizu K: Effect of a pyruvate kinase (*pykF*-gene) knockout mutation on the control of gene expression and metabolic fluxes in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 2004, **235**:25–33.
 30. Flores N, Xiao J, Berry A, Bolivar F, Valle F: Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 1996, **14**:620–623.
 31. Parker C, Barnell WO, Snoep JL, Ingram LO, Conway T: Characterization of the *Zymomonas mobilis* glucose facilitator gene product (*glf*) in recombinant *Escherichia coli*: examination of transport mechanism, kinetics and the role of glucokinase in glucose transport. *Mol Microbiol* 1995, **15**:795–802.
 32. Baez-Viveros JL, Osuna J, Hernandez-Chavez G, Soberon X, Bolivar F, Gosset G: Metabolic engineering and protein directed evolution increase the yield of L-phenylalanine synthesized from glucose in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 2004, **87**:516–524.
 33. Malcovati M, Kornberg HL: Two types of pyruvate kinase in *Escherichia coli* K12. *Biochim Biophys Acta* 1969, **178**:420–423.
 34. Saeki T, Hori M, Umezawa H: Pyruvate kinase of *Escherichia coli*. Its role in supplying nucleoside triphosphates in cells under anaerobic conditions. *J Biochem* 1974, **76**:631–637.
 35. Valentini G, Stoppini M, Iadarola P, Malcovati M, Ferri G, Speranza ML: Divergent binding sites in pyruvate kinases I and II from *Escherichia coli*. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1993, **374**:69–74.
 36. Bledig SA, Ramseier TM, Saier MH Jr: FruR mediates catabolite activation of pyruvate kinase (*pykF*) gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1996, **178**:280–283.
 37. Saier MH Jr, Ramseier TM: The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria. *J Bacteriol* 1996, **178**:3411–3417.
 38. Shimada T, Yamamoto K, Ishihama A: Novel members of the Cra regulon involved in carbon metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2011, **193**:649–659.
 39. Boiteux A, Markus M, Plesser T, Hess B, Malcovati M: Analysis of progress curves. Interaction of pyruvate kinase from *Escherichia coli* with fructose 1,6-bisphosphate and calcium ions. *Biochem J* 1983, **211**:631–640.
 40. Boyer PD: The inhibition of pyruvate kinase by ATP: a Mg⁺⁺ buffer system for use in enzyme studies. *Biochem Biophys Res Commun* 1969, **34**:702–706.
 41. Holmsen H, Storm E: The adenosine triphosphate inhibition of the pyruvate kinase reaction and its dependence on the total magnesium ion concentration. *Biochem J* 1969, **112**:303–316.
 42. Mattevi A, Bolognesi M, Valentini G: The allosteric regulation of pyruvate kinase. *FEBS Lett* 1996, **389**:15–19.
 43. Valentini G, Chiarelli L, Fortin R, Speranza ML, Galizzi A, Mattevi A: The allosteric regulation of pyruvate kinase. *J Biol Chem* 2000, **275**:18145–18152.
 44. Waygood EB, Mort JS, Sanwal BD: The control of pyruvate kinase of *Escherichia coli*. Binding of substrate and allosteric effectors to the enzyme activated by fructose 1,6-bisphosphate. *Biochemistry* 1976, **15**:277–282.
 45. Mort JS, Sanwal BD: The control of pyruvate kinases of *Escherichia coli*: further studies of the enzyme activated by ribose-5-phosphate. *Can J Biochem* 1978, **56**:647–653.
 46. Waygood EB, Rayman MK, Sanwal BD: The control of pyruvate kinases of *Escherichia coli*. II. Effectors and regulatory properties of the enzyme activated by ribose 5-phosphate. *Can J Biochem* 1975, **53**:444–454.
 47. Kohlstedt M, Becker J, Wittmann C: Metabolic fluxes and beyond-systems biology understanding and engineering of microbial metabolism. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010, **88**:1065–1075.
 48. Bachmann BJ: Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol Rev* 1972, **36**:525–557.
 49. Hernandez-Montalvo V, Martinez A, Hernandez-Chavez G, Bolivar F, Valle F, Gosset G: Expression of *galP* and *glk* in a *Escherichia coli* PTS mutant restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation products. *Biotechnol Bioeng* 2003, **83**:687–694.
 50. De Anda R, Lara AR, Hernandez V, Hernandez-Montalvo V, Gosset G, Bolivar F, Ramirez OT: Replacement of the glucose phosphotransferase transport system by galactose permease reduces acetate accumulation and improves process performance of *Escherichia coli* for recombinant protein production without impairment of growth rate. *Metab Eng* 2006, **8**:281–290.
 51. Datsenko KA, Wanner BL: One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:6640–6645.
 52. Cherepanov PP, Wackernagel W: Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 1995, **158**:9–14.
 53. Sigala JC, Flores S, Flores N, Aguilar C, de Anda R, Gosset G, Bolivar F: Acetate metabolism in *Escherichia coli* strains lacking phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system; evidence of carbon recycling strategies and cycles. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2009, **16**:224–235.
 54. Oh MK, Rohlin L, Kao KC, Liao JC: Global expression profiling of acetate-grown *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2002, **277**:13175–13183.
 55. Balderas-Hernandez VE, Sabido-Ramos A, Silva P, Cabrera-Valladares N, Hernandez-Chavez G, Baez-Viveros JL, Martinez A, Bolivar F, Gosset G: Metabolic engineering for improving anthranilate synthesis from glucose in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 2009, **8**:19.
 56. Kiefer P, Heinzle E, Zelder O, Wittmann C: Comparative metabolic flux analysis of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* cultured on glucose or fructose. *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**:229–239.
 57. Maitra PK, Lobo Z: A kinetic study of glycolytic enzyme synthesis in yeast. *J Biol Chem* 1971, **246**:13.
 58. Koebmann BJ, Westerhoff HV, Snoep JL, Nilsson D, Jensen PR: The glycolytic flux in *Escherichia coli* is controlled by the demand for ATP. *J Bacteriol* 2002, **184**:3909–3916.
 59. Pablos TE, Soto R, Mora EM, Le Borgne S, Ramirez OT, Gosset G, Lara AR: Enhanced production of plasmid DNA by engineered *Escherichia coli* strains. *J Biotechnol* 2011, **158**(4):211–214.

doi:10.1186/1475-2859-11-127

Cite this article as: Meza et al.: Consequences of phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system and pyruvate kinase isozymes inactivation in central carbon metabolism flux distribution in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* 2012 **11**:127.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

