



## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

### Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio del efecto de la inactivación de las enzimas shikimato cinasas sobre el crecimiento y la producción de shikimato en medio mínimo en una cepa de *Escherichia coli* PTS<sup>-</sup>

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Fabián Moreno Avitia

TUTOR PRINCIPAL

Dr. José Adelfo Escalante Lozada

Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Lorenzo Segovia

Dr. Leobardo Serrano

Instituto de Biotecnología

México, D.F, Enero 2016



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.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. José Adelfo Escalante Lozada en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para la realización del mismo se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca CONACyT con N° de registro:

Este trabajo contó con el apoyo financiero del proyecto CONACYT-Ciencia Básica Proyecto 240519.

## MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Dr. Lorenzo Segovia	Instituto de Biotecnología/ UNAM
Dr. Leobardo Serrano Carreón	Instituto de Biotecnología/ UNAM
Dr. José Adelfo Escalante Lozada	Instituto de Biotecnología/ UNAM

## MIEMBROS DEL JURADO

<b>Presidente</b>	Dr. Agustín López Munguía Canales	Instituto de Biotecnología/ UNAM
<b>Secretario</b>	Dra. Cinthia Ernestina Núñez López	Instituto de Biotecnología/ UNAM
<b>Vocal</b>	Dr. Carlos Peña Malacara	Instituto de Biotecnología/ UNAM
<b>Vocal</b>	Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos	CCG/ UNAM
<b>Vocal</b>	Dr. Juan Carlos Sigala Alanís	DCNI/ UAM

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Dr. José Adelfo Escalante Lozada por la oportunidad que me brindó para formar parte de este grupo de investigación y por la confianza que en mí depositó para llevar a cabo este proyecto.

A los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Leobardo Serrano y el Dr. Lorenzo Segovia, les agradezco sus observaciones y recomendaciones que ayudaron a llevar este trabajo a buen término.

Es necesario agradecer también el asesoramiento y apoyo técnico de los siguientes miembros de nuestro grupo de investigación: Dr. Guillermo Gosset Lagarda, Dr. Alfredo Martínez Jiménez, Dra. Noemí Flores, M. en C. Ramón de Anda Herrera, M. en C. Georgina Hernández Chávez, C. D. Mercedes Enzaldo Cruz y a la Sra. Aurelia Gonzáles Guzmán. También agradezco la ayuda de la M. en C. María Helena Rodríguez Alegría.

## Índice

<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>1.2 Abstract</b> .....	2
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>3. ANTECEDENTES</b> .....	6
<b>3.1 Vía del shikimato</b> .....	6
<b>3.2 Estrategias para incrementar la producción de compuestos aromáticos</b> .....	7
<b>3.2.1 Mayor disponibilidad de fosfoenolpiruvato</b> .....	7
<b>3.2.2 Incrementar la producción de eritrosa-4-fosfato</b> .....	9
<b>3.2.3 Sobreexpresión de genes de la VSHK</b> .....	9
<b>3.2.4 Inactivación de las shikimato cinasa I (<i>aroK</i>) y II (<i>aroL</i>)</b> .....	10
<b>3.2.5 Estrategias aplicadas en nuestro grupo de investigación para la producción de SA</b> .....	12
<b>4 JUSTIFICACIÓN</b> .....	16
<b>5 HIPOTESIS</b> .....	17
<b>6 OBJETIVO</b> .....	18
<b>6.1 OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	18
<b>7 METODOLOGÍA</b> .....	19
<b>7.1 Obtención del fondo genético PB12 <i>pykF</i><sup>-</sup>, <i>ydiB</i><sup>-</sup>, <i>aroK</i><sup>-</sup> o <i>aroL</i><sup>-</sup></b> .....	19
<b>7.2 Transformación con el plásmido pTrcAro6</b> .....	21
<b>7.3 Caracterización cinética: crecimiento y producción de AS y otros intermediarios</b> .....	23
<b>7.5 Medición de la actividad enzimática de las SKs en el extracto crudo</b> .....	25
<b>8 RESULTADOS</b> .....	27
<b>8.1. Construcción de las mutantes en las shikimato cinasas</b> .....	27
<b>8.2. Evaluación cinética de las cepas PBKL, PBK y PBL</b> .....	28
<b>8.3 Evaluación de la actividad SA cinasa en las cepas PBKL6, PBK6 y PBL6</b> ... 30	
<b>8.4 Evaluación del crecimiento, consumo de Glc y acumulación de SA en las cepas PBKL6, PBL6 y PBK6</b> .....	31
<b>9 CONCLUSIONES</b> .....	37
<b>10 PERSPECTIVAS</b> .....	38
<b>11 REFERENCIAS</b> .....	39

<b>MATERIAL ADICIONAL.....</b>	<b>44</b>
--------------------------------	-----------

## Índice de figuras

Figura 1. Metabolismo central de carbono y su relación con la vía del SHK..	7
Figura 2. Transporte de Glc mediado por PTS. .	8
Figura 3. Modificaciones para favorecer la producción de SA en E. coli. ....	13
Figura 4. Plásmido pTrcAro6.....	22
Figura 5. Comprobación de las inactivaciones del gen pykF. Electroforesis en geles de agarosa de los amplicones obtenidos.....	27
Figura 6. Curvas de crecimientos de las cepas construidas.....	29
Figura 7. Curva de desaparición del SA por acción de las shikimato cinasas.....	30
Figura 8. Cinética de crecimiento y producción de SHK de las cepas PBKL6, PBK6 y PBL6. ....	32
Figura 9. Cinética de crecimiento y producción de SA de la cepa PBK6 en reactor...	35

## Índice de tablas

Tabla 1. Estrategias aplicadas para la producción de SA y resultados obtenidos.....	14
Tabla 2. Combinación de volúmenes de fago P1 y células para el protocolo de transducción .....	20
Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos utilizados .....	21
Tabla 4. Plásmidos y cepas de E. coli utilizados en este trabajo. ....	22
Tabla 5. Componentes del medio M9 .....	25
Tabla 6. Resultados de la evaluación cinética de los fondos genéticos. ....	29
Tabla 7. Resultados de actividad de la enzima shikimato cinasa del extracto crudo de las cepas PBKL6, PBK6 y PBL6. ....	31
Tabla 8. Resultados de las cinéticas de crecimiento y producción de SA de las cepas PBKL6, PBK6 y PBL6. ....	33

## Abreviaturas

$\mu$	Velocidad específica de crecimiento
AAA	Aminoácidos aromáticos
Ac	Ácido acético
ACoA	Acetil-coenzima A
AQ	Ácido quínico
CHA	Corismato
D.O.600nm	Densidad óptica a 600 nm
DAH <sub>P</sub>	3-deoxi-D- <i>arabino</i> heptuloseonato
DAH <sub>PS</sub>	3-deoxi-D- <i>arabino</i> heptuloseonato sintasa
DHQ	Dehidroquinato
DHQD	Dehidroquinato deshidratasa
DHQS	Dehidroquinato sintasa
DHS	Dehidroshikimato
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
E4P	Eritrosa-4-fosfato
EPSP	5-enoil-piruvilshikimato-3-fosfato
fbr	Resistente a inhibición por retroalimentación
FRT	Sitios de reconocimiento de la flipasa
G3P	Gliceraldehído-3-fosfato
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
gDCW	Gramos de células secas
gGlc	Gramos de glucosa
Glc	Glucosa
Glc-6P	Glucosa-6-fosfato
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
IVM	Ingeniería de vías metabólicas
MOPS	ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
Pb	Pares de bases
PEP	Fosfoenol piruvato
Phe	Fenilalanina
PPP	Vía de las pentosas fosfato
PTS	Sistema fosfotransferasa de carbohidratos
Pyr	Piruvato
Rpm	revoluciones por minuto
SA	Ácido shikímico
SHK-3P	Shikimato-3-fosfato
SKI	Shikimato cinasa I
SKII	Shikimato cinasa II

## Abreviaturas

TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
Tyr	Tirosina
U	Unidades enzimáticas
VSHK	Vía del shikimato
YE	Extracto de levadura

## 1. RESUMEN

El ácido shikímico es un compuesto de interés industrial por su versatilidad estructural y principalmente por ser precursor del antiviral Oseltamivir. Para incrementar la producción de este compuesto se han implementado estrategias de ingeniería de vías metabólicas para la producción en microorganismos, principalmente *E. coli*. En este estudio, se evaluó la posibilidad de producir ácido shikímico en medio mineral utilizando glucosa como única fuente de carbono. Se partió de una cepa de *E. coli* carente del sistema fosfotrasferasa de carbohidratos y se inactivaron los genes *pykF* y *ydiB*. Se inactivaron por separado los genes que codifican para las enzimas shikimato cinasa I y II (*aroK* y *aroL*), obteniendo las cepas PBL6 y PBK6. Para redirigir el flujo de carbono hacia la síntesis de compuestos aromáticos estas cepas se transformaron con el plásmido pTrcAro6, en el cual se encuentran clonados cuatro genes de la vía del shikimato (*aroG<sup>fb</sup>*, *aroB*, *aroD* y *aroE*) y dos de las vía de las pentosas fosfato (*tktA* y *zwf*).

El primer efecto observado por la inactivación de las shikimato cinasas es la reducción en la velocidad específica de crecimiento. Ésta se redujo un 10 % para la cepa PBL6 respecto a la parental; la inactivación de la shikimato cinasa II tuvo un mayor impacto pues esta provocó una reducción del 45 % de la velocidad de crecimiento. Por otro lado, se midió la actividad shikimato cinasa del extracto crudo de estas cepas. Los valores de actividad enzimática encontrados corresponden a un 85 % y 38 % del control para la cepa PBL6 y PBK6 respectivamente. Esta mayor actividad mostrada por la cepa PBL6, se reflejó en una nula acumulación de ácido shikímico. Por otro lado, la cepa PBK6 acumuló 1.1 g/L de ácido shikímico en cultivos en matraz. Se probó una estrategia de cultivo en reactor en lote de 1 L con limitación de nitrógeno, buscando una mayor utilización de la fuente de carbono para la síntesis de ácido shikímico y no de biomasa. Mediante ésta estrategia se obtuvo una concentración de 5.3 g/L de ácido shikímico, con un rendimiento de 0.30 mol/mol.

## 1.2 Abstract

Shikimic acid is a compound of industrial interest due to its structural versatility and mainly for being a precursor of the antiviral Oseltamivir. To increase the production of this compound, metabolic engineering strategies has been applied for microbial synthesis, principally *E. coli*. In this study, we evaluated the possibility of the shikimic acid production in mineral medium using glucose as sole carbon source. From an *E. coli* strain lacking the carbohydrate:phosphotransferase system, we deleted the genes *pykF* and *diB*. We also deleted separately the genes that code for the shikimate kinase I and II (*aroK* and *aroL*), getting the strains PBL6 and PBK6. To redirect the carbon flux to the aromatic compound biosynthesis, we transformed these strains with the plasmid pTrcAro6, where the first four genes of the shikimic pathway are cloned (*aroG<sup>fbr</sup>*, *aroB*, *aroD* y *aroE*) and two genes of the pentose phosphate pathway (*tktA* y *zwf*).

The first showed effect by the shikimate kinase inactivation was the reduction of the specific growth rate. It was reduced a 10 % for the strain PBL6 respect the parental strain; the inactivation of the shikimate kinase II had a higher impact, with a growth rate decrease of 45 %. In the other hand, shikimate kinase activity was measured from the crude extract oh this two strains. The shikimate kinase activity values were a 85 % and 38 % of the control for the strain PBL6 and PBK6 respectively. This higher activity displayed by the strain PBL6 was also reflected in a null shikimic acid accumulation. However, the strain PBK6 reached a shikimic acid titer of 1.1 g/L in shacked flaks cultures. A nitrogen-limiting strategy was performed, looking for a higher carbon utilization for shikimic acid synthesis and a less biomass production. Through this strategy, a shikimic acid titer of 5.3 g/L and yield of 0.3 mol/mol were reached.

## 2. INTRODUCCIÓN

El ácido shikímico (SA) es un intermediario de la vía del shikimato (VSHK), la cual está presente en bacterias y plantas, el producto final de esta vía es el corismato (CHA), compuesto que es precursor de los aminoácidos aromáticos (AAA) L-tirosina (Tyr), L-fenilalanina (Phe) y L-triptófano (Trp) (Saptarshi *et al.* 2012; Rodríguez *et al.*, 2014; Carmona *et al.*, 2015). El SA al ser un compuesto hidroaromático con tres carbonos quirales, y un grupo carboxilo, resulta ser un precursor potencial para la síntesis de diversos compuestos de interés comercial. Uno de los principales productos sintetizados a partir del SA es el oseltamivir fosfato (comercialmente distribuido como Tamiflu<sup>®</sup>) (Chandran *et al.* 2003, Díaz-Quiroz *et al.*, 2014), un antiviral efectivo contra el virus de la influenza aviar (H5N1) e influenza estacional que ha ganado gran importancia dada la atención que ha prestado el sector salud en evitar la extensión de pandemias de influenza, como la sucedida en 2009 en México causada por el virus A/H1N1 (Neuman *et al.*, 2009; Díaz-Quiroz *et al.*, 2014).

Originalmente el SA se obtuvo a partir de diversas fuentes vegetales haciendo uso de métodos físicos para su extracción entre las que destacan el anís estrella japonés (*Illicium anisatum*) y el anís estrella chino (*I. verum*) (Saptarshi *et al.* 2012; Díaz-Quiroz *et al.*, 2014). El principal problema asociado a la extracción de SA a partir de fuentes vegetales es que su rendimiento relativamente es bajo (1 Kg de SA por cada 30 Kg de semilla seca), además de que su producción está sujeta a factores ambientales. La gran importancia del SA y la problemática asociada a su obtención de fuentes vegetales, determinó la búsqueda de otras alternativa para asegurar su disponibilidad, explorándose el uso de sistemas bacterianos en procesos de fermentación haciendo uso principalmente de cepas modificadas genéticamente para optimizar la producción de este compuesto, siendo *Escherichia coli* (*E. coli*) el microorganismo más utilizado para este fin (Krämer *et al.*, 2003; Saptarshi *et al.*, 2012; Díaz-Quiroz, 2014; Martínez *et al.*, 2015).

Para lograr la producción de SA con títulos y rendimiento de interés industrial se han aplicado en cepas de *E. coli* diferentes estrategias de ingeniería de vías metabólica (IVM). Una de las

estrategias que se utilizó para construir estas cepas productoras fue incrementar la disponibilidad de los intermediarios como el fosfoenolpiruvato (PEP) de la glicólisis y la eritrosa-4-fosfato (E4P) de la vía de las pentosas fosfato que alimentan a la VSHK y la inactivación parcial o doble de los genes que codifican a las enzimas que utilizan SA como sustrato (shikimato cinasa (SK, SKs en plural) I y II, *aroK* y *aroL*) en la VSHK (Draths *et al.*, 1999; Chandran *et al.*, 2003; Krämer *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 2014).

Con la finalidad de dirigir el flujo de carbono dentro de la VSHK se ha reportado la introducción de una copia adicional en plásmido de los genes que codifican versiones resistentes a retroinhibición (fbr, por sus siglas en inglés) de la primera enzima de la vía del SA(3-deoxi-D-*arabino*heptuloseonato (DAHP) sintasa, AroG<sup>fbr</sup> y AroF<sup>fbr</sup>) así como la clonación de una copia adicional en plásmido de los genes que codifican a las enzimas involucradas en la síntesis del SA, dehidroquinato sintasa (AroB), dehidroshikimato sintasa (AroD) y shikimato deshidrogenasa (AroE) (codificados por los genes *AroB*, *AroD*, *AroE* respectivamente) (Draths *et al.*, 1999; Chandran *et al.*, 2003; Krämer *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 2014).

Se ha observado que la enzima YdiB (shikimato/quinato deshidrogenasa codificada por el gen *ydiB*) está involucrada en la formación de subproductos de la vía como el ácido quínico (AQ). Por esto, se determinó que la inactivación de este gen conlleva a una reducción de subproductos (García-Cañedo, 2013).

En las cepas de *E. coli* de producción de SA reportadas en la literatura se han inactivado los genes *aroK* y *aroL*, los cuales codifican para las enzimas SK I y II respectivamente, y que interrumpen totalmente la VSHK, provocando una auxotrofia a los AAA Phe, Trp y Tyr. Los tres AAA deben ser suplementados al medio empleando extracto de levadura (YE por sus siglas en inglés), por esta razón el medio de producción que se utiliza es un medio complejo por la gran cantidad de nutrientes presentes en el YE (Chandran *et al.*, 2003, Rodríguez *et al.*, 2013). Algunos estudios han demostrado la importancia de los componentes en el extracto de levadura, ya que se ha observado que el microorganismo disminuye o detiene su

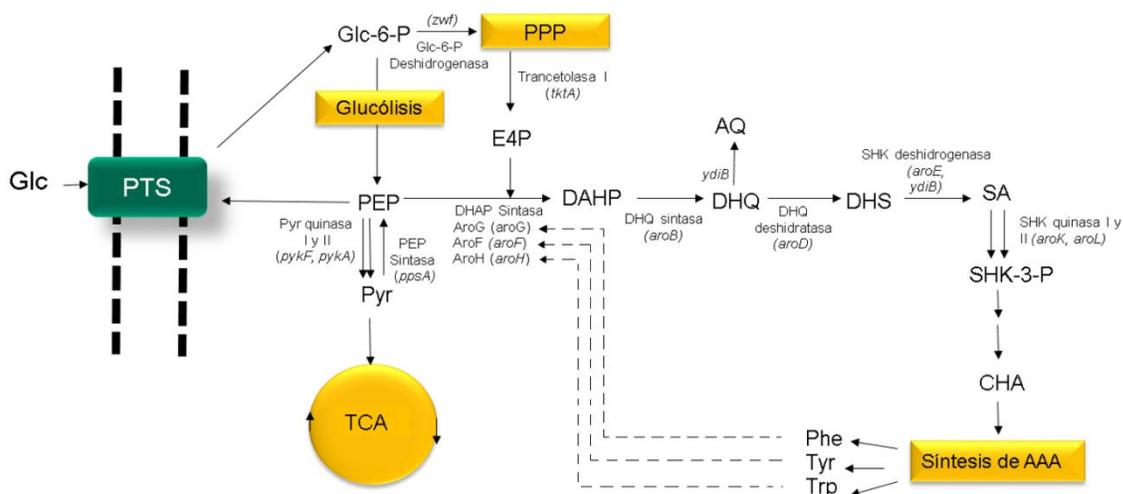
crecimiento aun cuando existe glucosa (Glc) y otros compuestos aromáticos presentes en el medio de producción, situación que se achaca a que algunos de estos componentes presentes en el extracto de levadura y que se supone la cepa es incapaz de sintetizar, se agotan (Cortés-Tolalpa *et al.*, 2014).

En el presente estudio se buscó una alternativa para la producción de SA en *E. coli* con la finalidad de simplificar el medio de cultivo, es decir, eliminar el YE. Para ello, se planteó la construcción de cepas a las cuales se inactivaría sólo una SK; esto para conseguir la acumulación de SA y a la vez continuar con la síntesis de compuestos aromáticos que son esenciales para el crecimiento y funciones fisiológicas en general.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Vía del shikimato

La VSHK comienza con la condensación de los intermediarios de la vía de las pentosas, fosfato eritrosa-4-fosfato (E4P) y de la glucólisis, fosfoenolpiruvato (PEP), lo que da como resultado la producción de 3-deoxi-D-*arabino*heptuloso-7-fosfato (DAHP). Este metabolito, a través de 6 reacciones secuenciales, se convierte en corismato (CHA), precursor de los compuestos aromáticos y AAA. La primera reacción de la vía la cataliza la enzima DAHP sintasa, de la cual existen 3 isoenzimas (AroG, AroF y AroG), codificadas por los genes *aroG*, *aroF* y *aroH*, respectivamente e inhibidas alostéricamente por los aminoácidos L-fenilalanina, L-tirosina y L-triptófano respectivamente. La expresión de estas enzimas está regulada a nivel transcripcional por los represores TyrR y TrpR, aunque el efecto de esta represión se observa en menor medida que la regulación alostérica (Pittard *et al.*, 1991). El siguiente paso es la conversión del DAHP en 3-dehidroquinato (DHQ) por la DHQ sintasa codificada por *aroB*. El DHQ se convierte en dehidroshikimato (DHS) por deshidratación por la enzima DHQ deshidratasa (*aroD*). Posteriormente, la enzima shikimato deshidrogenasa, codificada por *aroE* reduce el DHS para dar lugar a SA. Se ha encontrado que la actividad de la enzima codificada por el gen *ydiB* (YdiB, la cual se ha reportado como una SHK/DHQ deshidrogenasa) consiste en utilizar DHQ y convertirlo en ácido quínico (AQ), reacción que resulta contraproducente para la acumulación de SA (Yaniv *et al.*, 1955; García-Cañedo 2013). Las SA cinasas I (*aroK*) y II (*aroL*) pueden fosforilar al SA y generar shikimato-3-fosfato (SHK-3-P), sin embargo, sólo una de estas enzimas es sensible a la acumulación de compuestos aromáticos, este a su vez es convertido en 5-enoil-piruvilshikimato-3-fosfato (EPSP) por la EPSP sintasa (*aroA*). La última reacción de la vía produce CHA a partir del EPSP por acción de la enzima CHA sintasa (*aroC*) (Saptarshi *et al.*, 2012). En la figura 1 se muestra un esquema acerca de cómo se relaciona la vía de síntesis de compuestos aromáticos con el metabolismo central de carbono.



**Figura 1. Metabolismo central de carbono y su relación con la vía del SHK.** En esta figura se muestra la ruta seguida por la Glc a través del metabolismo central y como se relaciona este con la vía del shikimato. Glc: glucosa, PTS: sistema fosfotransferasa, Pyr: Piruvato, TCA: ciclo de los ácidos tricarbónicos, Glc-6-P: glucosa-6-fosfato, PEP: fosfoenolpiruvato, DHAP: 3-deoxi-D-arabinoheptulosa-7-fosfato, E4P: eritrosa-4-fosfato, DHQ: 3-dehidroquinato, AQ: ácido quínico, DHS: dehidroshikimato, SHK: shikimato, SHK-3P: shikimato-3-fosfato, CHA: corismato, Phe: fenilalanina, Tyr: tirosina, Trp: triptófano, PPP: vía de las pentosas fosfato, AAA: aminoácidos aromáticos. Las líneas continuas representan reacciones químicas mientras que las líneas punteadas representan inhibición alostérica.

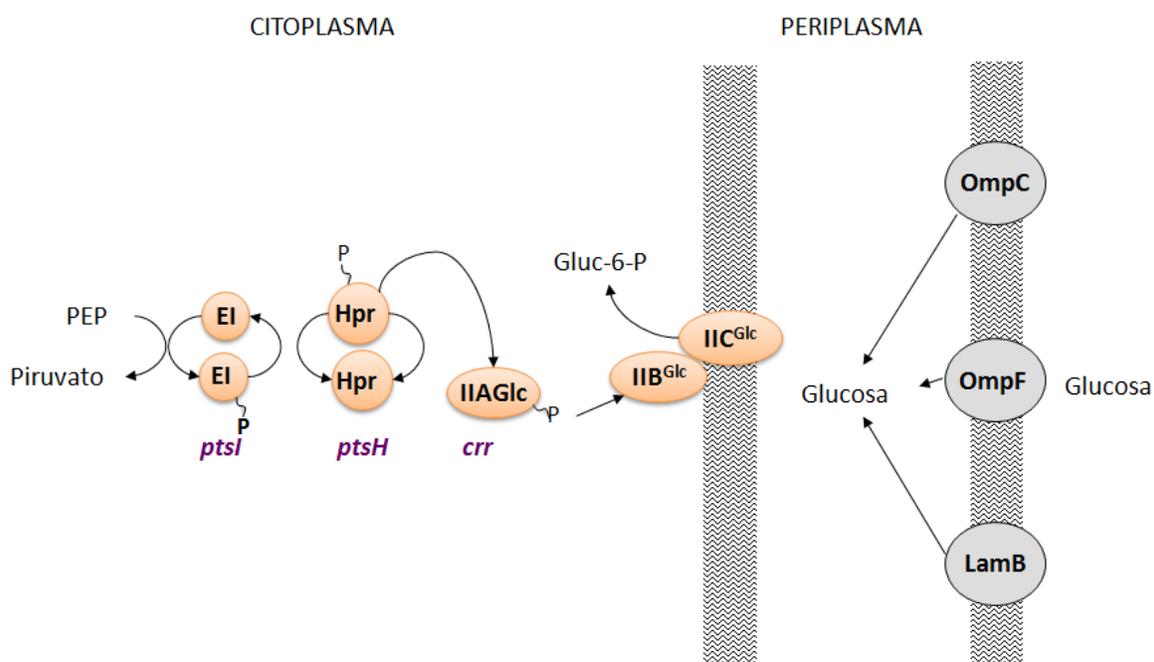
### 3.2 Estrategias para incrementar la producción de compuestos aromáticos

#### 3.2.1 Mayor disponibilidad de fosfoenolpiruvato

La primera estrategia aplicada para incrementar la disponibilidad de PEP fue la eliminación de los genes *ptsH*, *ptsI* y *crr*, los cuales codifican para los componentes citoplasmáticos (EI, Hpr y EIIA<sup>Glc</sup>) del principal sistema de internalización/fosforilación de carbohidratos (figura 2), la quimiotaxis hacia estas fuentes de carbono y el control catabólico (PTS, sistema de fosfotransferasa) (Flores *et al.*, 1996; Gosset, 2005; Escalante *et al.*, 2012; Carmona *et al.*, 2015). Este sistema de transporte está acoplado a la fosforilación de los carbohidratos y utiliza como fuente de energía el PEP proveniente de la glucólisis. Es tan grande la demanda de PEP por el PTS, que el 50% se consume por éste, mientras que las reacciones catalizadas por la PEP carboxilasa, Pyr cinasas, UDP-N-acetilglucosamina enolpiruvil-transferasa y

DAHPS sintasa consumen aproximadamente 16%, 15%, 16% y 3% de este compuesto, respectivamente (Holms, 1996; Moat, 2002; Gosset, 2005).

Como se mencionó antes, otra fracción importante del PEP se utiliza en la síntesis de Pyr. Esta reacción la catalizan dos isoenzimas, la Pyr cinasa I (*pykF*) y II (*pykA*) (Garrido-Pertierra *et al.*, 1983; Sabido *et al.*, 2014).



**Figura 2. Transporte de Glc mediado por PTS.** Transporte de Glc en la cepa silvestre de *E. coli*; OmpC, OmpF, LamB: porinas; GalP: galactosa permeasa; EI, EIIA, EIIB, EIIC, Hpr: sistema de transporte de azúcares dependiente de PEP. Modificado de Gosset, 2005.

La inactivación de estas enzimas conduce a la acumulación de PEP. Esto se ha demostrado previamente a través del análisis de mutantes sencillas en los genes *pykF* *pykA*, las cuales mostraron incrementos considerables en el flujo de carbono hacia la síntesis de compuestos aromáticos: de 5.8 veces al inactivar *pykF* y 2.8 veces al inactivar *pykA*, lo que convierte al producto de la primera en la principal responsable del consumo de PEP en este paso (Ponce *et al.*, 1995; Berry, 1996; Gosset *et al.*, 1996). La inactivación de los genes que codifican estas enzimas provoca una disminución importante en la velocidad de crecimiento pues

afecta de manera directa la vía de obtención de energía. Una forma de evadir estos problemas es la utilización de otras fuentes de carbono además de la Glc, tales como acetato o glicerol. El uso de acetato es efectivo pues su metabolismo no implica a la vía glucolítica y puede asimilarse en forma de acetil coenzima A (ACoA) para participar en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) (Sabido *et al.*, 2014). En glicerol, en caso de usarse como fuente de carbono, es capaz de integrarse a la glucólisis como gliceraldehído-3- fosfato (G3P). Además, se ha reportado que la Pyr cinasa II se sobreexpresa cuando se utiliza glicerol como fuente de carbono lo que podría aliviar en cierta medida los requerimientos energéticos de la célula (Oh y Liao, 2000).

### **3.2.2 Incrementar la producción de eritrosa-4-fosfato**

Para incrementar la disponibilidad de E4P la estrategia se basa en sobreexpresar algunos genes de la vía de las pentosas fosfato (VPP), tal es el caso de la Glc-6-fosfato deshidrogenasa (*zwf*), la primera enzima de la vía que cataliza la oxidación de la G6P a gluconolactona-6-fosfato, lo que finalmente se traduciría como una mayor entrada de carbono a la VSHK en forma de E4P. También se ha optado por incrementar el número de copias de la enzima transcetolasa I (*tktA*) introduciendo este gen en un plásmido. Esta enzima cataliza la transferencia de grupos cetos entre diferentes donadores y aceptores, conduce a la formación de D-ribosa-5-fosfato y provee a la vía de aromáticos de E4P, por lo que la sobreexpresión de esta enzima conduce a un incremento en el abastecimiento de dicho compuesto (Josephson y Fraenkel, 1974; Escalante *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 2014, Martínez *et al.*, 2015).

### **3.2.3 Sobreexpresión de genes de la VSHK**

Una gran producción y disponibilidad de los precursores de la VSHK no son suficientes para incrementar la producción de SA, se ha visto que es necesaria la sobreexpresión de las enzimas de la VSHK para dirigir el flujo de carbono por ésta y así obtener un mayor rendimiento de compuestos aromáticos.

Como ya se mencionó antes, las isoenzimas que catalizan la primera reacción de la VSHK (AroH, AroG y AroF) están reguladas por inhibición alostérica por los tres AAA (Figura 1); lo que provoca que al llegar a cierta concentración de dichos compuestos, la actividad de estas enzimas disminuya. Este problema se ha podido evitar con la obtención y clonación de la enzima DAHP sintasa (AroG) resistente a inhibición por retroalimentación (AroG<sup>fbr</sup>), la cual es igualmente activa aún con el aumento de la concentración de fenilalanina (Escalante *et al.*, 2010).

El incremento de E4P y PEP disponibles para la biosíntesis de aromáticos aunado a la sobreexpresión de genes que dirijan el flujo de carbono hacia compuestos aromáticos no garantiza el óptimo funcionamiento de la estrategia aplicada. Esto se debe a la formación de cuellos de botella originados por la diferencia de expresión entre las enzimas de la vía (Darmawi *et al.*, 2012). El paso limitante en la VSHK se origina por la expresión del gen *aroB* que codifica para la enzima DHQ sintasa, la cual presenta problemas de traducción (Darmawi *et al.*, 2012). Esto se ha solucionado mediante la construcción de operones que incluyen esta vía, insertando el gen *aroB* justo después del promotor para favorecer la transcripción de éste y evitar así la acumulación de intermediarios que podrían conducir a la producción de metabolitos indeseables (Rodríguez *et al.*, 2013). Este problema de expresión de *aroB*, también se debe a la presencia de codones raros en la secuencia de este gen. La solución de este problema se logró mediante la optimización de codones (Darmawi *et al.*, 2012).

### **3.2.4 Inactivación de las shikimato cinasa I (*aroK*) y II (*aroL*)**

A pesar de que las SK I y II desempeñan el mismo papel de convertir el SA a SA-3P, se considera que el flujo de carbono lo determina principalmente la SK II, ya que la SK I muestra una menor actividad. Esta diferencia se debe a que la SK II tiene una Km cien veces menor a la SK I (0.2 mM y 20 mM respectivamente), por lo que a una menor concentración de DHS la SK II es capaz de alcanzar su mayor actividad, lo que la convierte en la enzima dominante de este punto (Pittard, 1986).

Cuando se comparan la regulación genética de los genes que codifican la SK I y la SKII, sólo el segundo es regulado por los represores TyrR y TrpR, los cuales responden a incrementos en la concentración de Tyr y Trp respectivamente. Por ello, la expresión de este gen al acumularse estos aminoácidos. En contraste, la SK I, se expresa constitutivamente y sólo en condiciones en las que los compuestos aromáticos se acumulan, se considera importante (Lobner-Olesen, 1992).

La presencia de isoenzimas en procariontes se origina generalmente por duplicaciones de los genes que las codifican. Estas copias adicionales de un mismo gen suelen desaparecer si esto no se traduce en una ventaja para el microorganismo. Por otra parte, en ocasiones, estas copias adicionales suelen divergir en isoenzimas con diferentes propiedades, actividades catalíticas o con diferentes formas de regulación. Con las enzimas SKs podemos ver un ejemplo de cómo esta duplicación provocó una regulación más fina de la vía de síntesis de compuestos aromáticos, pues ahora al poseer una SK sin regulación transcripcional negativa debida por Tyr o Trp, el gen puede transcribirse y generar una enzima capaz de mantener su actividad, aunque baja, para continuar con la síntesis de compuestos aromáticos diferentes que estos aminoácidos. (Serres *et al.*, 2009)

Se ha establecido que la inactivación de ambas SKs es una estrategia común y eficiente para producir SA ya que conduce a que todo el tiempo se produzca y acumule SA (Chandran *et al.* 2003; Krämer *et al.*, 2003; Johansson *et al.*, 2005; Escalante *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2013;). Esta estrategia impide realizar procesos de producción en medio mínimo lo que encarece el medio de cultivo al requerir del uso de extracto de levadura, lo que se considera como una gran desventaja. La utilización de medio rico también acarrea otros problemas, por ejemplo, complica o impide el uso de herramientas propias de la metabolómica y del estudio del flujo del carbono.

Existen pocos estudios donde se consideren mantener flujo de carbono a través del nodo SA-SA-3P por medio de la inactivación de sólo una de estas enzimas. Dentro de los estudios realizados se reporta inactivar solamente la SK II para evitar la auxotrofia a AAA, encontrando que la actividad de la SK I es capaz de mantener el crecimiento de esta cepa en

medio mínimo (Johansson *et al.*, 2005). También se ha encontrado que al no inactivar *aroK* se mantiene un flujo considerable a través de este punto, lo que indica la posibilidad de obtener cepas productoras de SA capaces de crecer en medio mínimo (Kai *et al.*, 2012).

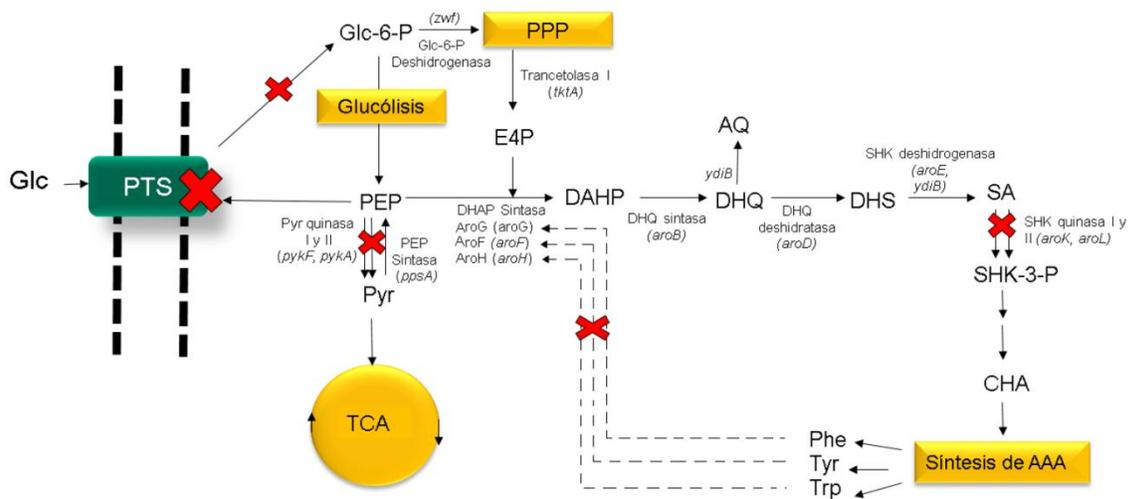
### 3.2.5 Estrategias aplicadas en nuestro grupo de investigación para la producción de SA

Nuestro grupo de investigación ha trabajado desde hace varios años con la aplicación de diversas estrategias de IVM en cepas de *E. coli* PTS<sup>-</sup> para la obtención de cepas sobre productoras de SHK. Una de las cepas que nuestro laboratorio ha construido es la cepa PB12.SA22 (PTS<sup>-</sup>  $\Delta$ *aroL*  $\Delta$ *aroK* *pJLBaroG<sup>fbr</sup>* *tktA* *pTOPO* *aroB* *aroE*), la cual produce 7 g/L SA con un rendimiento de 0.29 mol SHK/mol Glc, en cultivos en fermentador en lote de 0.5 L, empleando un medio de cultivo complejo el cual incluye en sus componentes YE (Escalante *et al.*, 2010). Recientemente, se obtuvo la cepa AR36 (PB12 *lacI* *aroK*<sup>-</sup> *aroL*<sup>-</sup> *pykF*<sup>-</sup> *trc/aroB*<sup>+</sup> *tktA*<sup>+</sup> *aroGfbr*<sup>+</sup> *aroE*<sup>+</sup> *aroD*<sup>+</sup> *zwf*<sup>+</sup>), que es capaz de producir 43 g/L de SA, con un rendimiento de 0.42 mol SHK/mol Glc cultivada bajo las mismas condiciones que la cepa PB12.SA22. Estas dos cepas son las que hasta la fecha poseen los mayores rendimientos reportados (tabla 1) (Rodríguez *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2015).

Resulta de interés para nuestro grupo de trabajo la aplicación de metodologías “ómicas” para la caracterización de las cepas productoras de SA bajo condiciones de producción. Un primer antecedente en este contexto fue el análisis transcriptómico global de la cepa PB12.SA22 por medio de microarreglos de alta densidad (Cortés-Tolalpa *et al.*, 2014), y se ha desarrollado una metodología para el análisis de flujo de carbono marcado a través del metabolismo central de carbono determinando su incorporación a aminoácidos proteínogénicos por GC-MS (Carmona-Contreras, 2013). Sin embargo, los principales problemas asociados a la aplicación de esta última metodología son: 1), la interferencia de los componentes del YE incluido en la formulación del medio de producción y 2), contar con una cepa productora de SA capaz de crecer en un medio de cultivo mínimo.

El presente proyecto buscó la obtención de una cepa de *E. coli* PTS<sup>-</sup> con un fondo genético *pykF*<sup>-</sup>, *ydiB*<sup>-</sup>, capaz de producir SA al clonar una copia adicional de los genes que ya se ha

observado que son determinantes para asegurar la sobreproducción de éste compuesto: *aroG<sup>fb</sup>*, *aroB*, *aroD*, *aroE*, *zwf* y *tktA*. A la par, se buscó asegurar su capacidad de crecer en un medio mínimo con Glc como única fuente de carbono al inactivar de forma individual el gen *aroK* o *aroL*. Esto para mantener un flujo de SA hacia CHA y permitir la síntesis de los metabolitos aromáticos, evitando así la auxotrofia (Defeyter y Pittard, 1985). En la figura 3 se esquematiza la estrategia a utilizar en este trabajo para la construcción del fondo genético.



**Figura 3. Modificaciones para favorecer la producción de SA en *E. coli*.** En esta figura se muestran las modificaciones sobre el metabolismo reportadas como esenciales para la acumulación de shikimato. Las cruces en rojo representan la inactivación del gen cuyo producto es responsable de la catálisis de dicha reacción.

**Tabla 1. Estrategias aplicadas para la producción de SA y resultados obtenidos**

<b>Cepa productora</b>	<b>Características relevantes</b>	<b>Comentarios especiales</b>	<b>Condiciones de cultivo</b>	<b>Concentración de SA (g/L)</b>	<b>Rendimiento (mol SA/mol glc)</b>	<b>Referencias</b>
SA112	BW25113 $\Delta$ <i>aroKL</i> , <i>P<sub>pps</sub>::P<sub>lac</sub>Q1,P<sub>csrB</sub>::P<sub>lac</sub>Q1Pt5- pps,P<sub>T5</sub>-csrB, 5P<sub>lac</sub>-tktA</i>	CiChE evolucionada para producir SA.	Matraz agitado, 10 g/L Glc, 1 g/L peptona	1.70	0.25	Cui <i>et al.</i> ,2014
DHPYAAS-T7	DH5a $\Delta$ <i>ptsH</i> <i>l</i> <i>crr</i> , $\Delta$ <i>aroKL</i> , $\Delta$ <i>ydiB</i> pAOC-TGEFB: <i>aroE</i> , <i>aroB</i> , <i>glk</i> , <i>tkta</i> , <i>aroF</i> <sup>fbr</sup>	Expresión de la VSHK en plásmido.	Matraz agitado de 50 mL, medio M9 con 25 g/l de glicerol, 10 g/L peptona, 15 g/L de YE.	1.066	0.23	Chen <i>et al.</i> , 2012
PB12.SA22	JM101 $\Delta$ <i>ptsH</i> , <i>ptsI</i> , <i>crr</i> ::Km <sup>r</sup> $\Delta$ <i>arokL</i> ::cm <sup>r</sup> pJLBaroG <sup>fbr</sup> <i>tktA</i> , pTOPO- <i>aroBaroE</i>	Evolucionada en laboratorio para restablecer el consume de Glc	Reactor en lote de 1 L, 25 g/L Glc y 15 g/L YE.	7.05	0.22	Escalante <i>et al.</i> , 2010
SA5	B0013 $\Delta$ <i>arokL</i> :: <i>dif</i> $\Delta$ <i>ptsG</i> :: <i>dif</i> $\Delta$ <i>ydiB</i> :: <i>dif</i> $\Delta$ <i>ackA</i> - <i>pta</i> :: <i>dif</i> pTH- <i>aroG</i> <sup>fbr</sup> - <i>ppsA</i> - <i>tktA</i>	Expresión de la VSHK en plásmido	Reactor alimentado de 7L ,15 g/L Glc, con AAA y vitaminas.	14.6	0.3	Chen <i>et al.</i> , 2014

**Tabla 1. Estrategias aplicadas para la producción de SA y resultados obtenidos (continuación)**

SA114	BW25113 $\Delta$ aroKL, $P_{pps}::P_{lac}Q1$ , $P_{csrB}::P_{lac}Q1$ $P_{T5-pps}$ , $P_{T5-csrB}$ , $5P_{tac-iktA}$ , $5P_{tac-pntAB}$	CIChE evolucionada para producir SA.	Matraz agitado, 10 g/L Glc, 1 g/L peptona	2.99	0.31	Cui <i>et al.</i> , 2014
SP1.1pts- /pSC6.090B	$DH5\alpha$ $\Delta$ ptsH-ptsI-crr $\Delta$ serA::aroB $\Delta$ aroL::Tn10 $\Delta$ aroK::Cm <sup>r</sup> $P_{tac}glf$ glk, aroF <sup>fbt</sup> tktA, $P^{tac}$ aroE, serA	Expresión heterologa de glk and glf de <i>Z. mobilis</i> para restaurar el consume de Glc	Reactor en lote agitado 10 L, 55-170 mM Glc + 15 g/L YE	84	0.33	Chandran <i>et al.</i> , 2003
SA116	BW25113 $\Delta$ aroKL, $P_{pps}::P_{lac}Q1$ , $P_{csrB}::P_{lac}Q1$ $P_{T5-pps}$ , $P_{T5-csrB}$ , $5P_{tac-}$ $iktA$ , $5P_{tac-nadK}$	CIChE evolucionada para producir SA.	Matraz agitado, 10 g/L glc, 1 g/L peptona	3.12	0.33	Cui <i>et al.</i> , 2014
AR36	JM101 $\Delta$ ptsH, ptsI, crr::Km <sup>r</sup> $\Delta$ arokL::cm <sup>r</sup> $\Delta$ pykF $\Delta$ lacI pTrcAro6-aroB, iktA, aroG <sup>fbt</sup> , aroE, aroD zwf	Expresión constitutiva de la VSHK en plásmido.	Reactor en lote 1 L, 100 g/L Glc + 15 g/L YE	41.8	0.42	Rodríguez <i>et al.</i> , 2013

Martínez *et al.*, 2015.

## 4 JUSTIFICACIÓN

Existen pocas investigaciones donde se estudie el efecto sobre el crecimiento y acumulación de SA en cepas *aroK* o *aroL*, por lo que la evaluación del efecto de la inactivación individual de las enzimas SKs sobre el crecimiento y la producción de SA en medio mínimo sería de gran utilidad, abriendo la posibilidad de generar cepas productoras de SA protótrofas, capaces de crecer en un medio mínimo.

La elaboración de una cepa productora que conserve una fracción del flujo de carbono hacia la síntesis de aromáticos manteniendo la expresión de una de las SKs para superar la auxotrofia, permitiría realizar análisis de flujo de carbono extrapolables a otras cepas o incluso evaluar su potencial industrial.

## 5 HIPOTESIS

La inactivación sencilla de los genes *aroK* y *aroL*, que codifican respectivamente a las enzimas SK I y II, en combinación con un sistema de expresión de los genes clave en la síntesis de SA permitirá la obtención de una cepa de *E. coli* capaz de acumular SA y crecer en un medio de cultivo mínimo con Glc como única fuente de carbono.

## 6 OBJETIVO

Evaluar la capacidad individual de la SK I y II para sustentar el crecimiento y acumulación de SA de una cepa *E. coli* PTS<sup>-</sup>  $\Delta$ aroK o  $\Delta$ aroL en medio mínimo.

### 6.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Construir mutantes con el fondo genético PB12 *pykF*<sup>-</sup>, *ydiB*<sup>-</sup>, *aroK*<sup>-</sup> o *aroL*<sup>-</sup>, que exprese los genes *aroG*<sup>fb</sup>, *aroB*, *aroD*, *aroE*, *tktA* y *zwf* una vez transformadas con el plásmido pTrcAro6.
- Medir la actividad SK del extracto crudo de los cultivos de las cepas PBKL6, PBL6 y PBK6.
- Caracterización cinética (crecimiento y producción de SA y otros intermediarios de la VSHK) de las cepas resultantes en cultivos en matraz y en fermentador en lote empleando medio mineral M9 con Glc como única fuente de carbono.
- Evaluación en reactor de la mutante con mejores capacidades de producción de SA.

## 7 METODOLOGÍA

### 7.1 Obtención del fondo genético PB12 *pykF*<sup>-</sup>, *ydiB*<sup>-</sup>, *aroK*<sup>-</sup> o *aroL*<sup>-</sup>

Primeramente se inactivaron en la cepa PB12 (PTS<sup>-</sup> Glc<sup>+</sup>, *kan*<sup>-</sup>) los genes *pykF* y *ydiB* por medio de transducción mediada por el fago P1 (Miller, 1992) tomando como cepas donadoras las mutantes respectivas (JW1666, *pykF*<sup>-</sup>; JW1682 *ydiB*<sup>-</sup>) del banco de Keio (Baba *et al.*, 2006). Posteriormente se realizó la inactivación sencilla de *aroK* o *aroL* también por transducción mediada por el fago P1 tomando como cepas donadoras a las mutantes JW5947 (*aroK*<sup>-</sup>) y JW0379 (*aroL*<sup>-</sup>). Las mutantes del banco de Keio fueron inactivadas en los respectivos genes mediante inactivación cromosomal de un solo paso descrita por Datsenko y Wanner, 2000. Las secuencias de los oligos con las que se inactivaron los genes antes mencionados poseían 50 pb de homología a partir del codón de inicio y 50 pb justo antes del codón de término. Estas secuencias estaban separadas por un casete de kanamicina flanqueado por 2 sitios FRT. El primero de ellos se utiliza para seleccionar a la colonia con la transducción correcta y el segundo para poder escindir el casete posteriormente.

Para la obtención del fago P1 portando la secuencia requerida para inactivar el gen en cuestión, se realizó un cultivo de toda la noche (37 °C por 12 h) de la cepa donadora. Al día siguiente, éste se centrifugó a 13000 rpm por un min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 750 µL de la solución MC (MgSO<sub>4</sub> 10 mM y CaCl<sub>2</sub> 5 mM). Como se muestra en la tabla 2, se agregaron 100 µL a tres tubos de 1.5 mL y 100 µL de la solución MC, luego se añadieron 0, 50 y 100 µL de una solución con el fago P1 a los tubos con células resuspendidas (el tubo sin fago funciona como control de contaminación) y 10 µL de esta misma al tubo con solución MC (este como control de contaminación también). Por último se mezcló por inversión y dejó reposar 45 min. Pasado este tiempo se mezclaron las soluciones con agar LB suave fundido con la misma concentración de sales que la solución MC, se vertió esta mezcla en cajas de Petri con medio LB sin antibiótico y se incubaron a 37 °C por 12 h. Después de este tiempo se verificó que el control con células no presentara lisis y que el control sólo con el fago P1 no mostrara crecimiento celular. Se seleccionó aquella caja que presentara un mayor número de colonias lisadas. Se recuperó el agar suave con una espátula estéril y se colocó en un tubo se centrifuga de 50 mL. A este se agregaron

5 mL de medio de cultivo LB, 100  $\mu$ L de cloroformo frío y se centrifugó a 13000 rpm a 4 °C por 30 min. Con una jeringa se tomaron 3 mL del sobrenadante y se filtraron (tamaño de poro de 45  $\mu$ m), la solución resultante se almacenó a 4 °C.

**Tabla 2. Combinación de volúmenes de fago P1 y células para el protocolo de transducción**

<b>Tubo</b>	<b>Vol. de células (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Vol. del fago (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Notas</b>
1	100	-	Control de contaminación con bacteriófagos
2	100	10	Diferentes concentraciones de bacteriófago para encontrar la que provoque una mayor efectividad del fago, es decir una buena infección y mayor lisis celular.
3	100	50	
4	100	100	
5	*	10	Control de contaminación con bacterias

Para la transducción se realizaron cultivos en medio LB (a 37 °C por 12 h) con las cepas receptoras. Se prepararon para la infección con el fago como se mencionó antes. Esta vez se infectó con 100 mL del fago P1 recuperado del paso anterior el cual contenía la secuencia con identidad al gen a inactivar y el casete de kanamicina. Se mezcló por inversión y se dejó reposar por 45 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo se agregaron 100  $\mu$ L de citrato de sodio 1 M y se mezcló. Toda esta solución se plaqueó en cajas de Petri con medio LB con kanamicina 30  $\mu$ g/mL. Se incubaron a 37 °C. Las colonias comenzaron a apreciarse a partir de las 14 h de incubación.

La inactivación de cada uno de los genes se verificó por PCR de la región cromosomal correspondiente con oligos que flaqueaban al menos 250 pb río arriba y abajo del gen en cuestión (tabla 3). Las inactivaciones se realizaron en el siguiente orden, *pykF*, *ydiB* y *aroK* o *aroL*.

**Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos utilizados**

Oligonucleótido	Secuencia
aroKFwd	AATAGTCTTAGTAGTACCGAAAAAATGGCAGAGAAACGCAATATCTGTGT AGGCTGGAGCTGCTTCG
aroKRv	AGACGAGTGTATATAAAGCCAGAATTAGTTGCTTTCCAGCATGTGATGGG AATTAGCCATGGTCC
aroLFwd	GCGACCTATTGGGGAAAACCCACGATGACACAACCTCTTTTCTGTGTGT AGGCTGGAGCTGCTTC
aroLRv	CGTTAAGTATAGGCGCTCGAAAATCAACAATTGATCGTCTGTGCATGGGA ATTAGCCATGGTCC
ydiBFwd	TCATGTCAGAGTTTTTTCC
ydiBRv	TTTCTGGCATGGTCTCACGG

Los fondos genéticos obtenidos fueron tres: PBL (*pykF*<sup>-</sup>, *ydiB*<sup>-</sup>, *aroK*<sup>-</sup>), PBK (*pykF*<sup>-</sup>, *ydiB*<sup>-</sup>, *aroL*<sup>-</sup>) y PBKL (*pykF*<sup>-</sup>, *ydiB*<sup>-</sup>) (tabla 4). Estas cepas fueron almacenadas a -70 °C para su resguardo.

## 7.2 Transformación con el plásmido pTrcAro6

Las cepas con el fondo genético obtenido de las transducciones se transformaron con el plásmido pTrcAro6 el cual contiene una copia de las primeras cuatro enzimas de la VSHK, la primera de ellas en una versión resistente a inhibición alostérica por AAA (*aroG*<sup>br</sup>, *aroB*, *aroD* y *aroE*), *zwf* y *tktA* (Rodríguez *et al.*, 2013). El gene *aroB* que codifica para la enzima dehidroquinato sintasa, considera como el paso limitante de la vía, se clonó en el plásmido pTrcAro6, justo después del promotor para favorecer su expresión y así abolir la acumulación de sustrato en este punto. Posteriormente, se clonaron los genes: *tktA*, *aroG*<sup>br</sup>, *aroE*, *aroD* y *zwf* al final del operón. Las cepas se transformaron con las construcciones descritas seleccionando su resistencia a tetraciclina. Las cepas obtenidas se denominaron PBKL6, PBL6 y PBK6 (tabla 4). En la figura 4 se muestra el diseño del plásmido pTrcAro6 y algunas de sus características, como tamaño, origen y sitios de restricción.

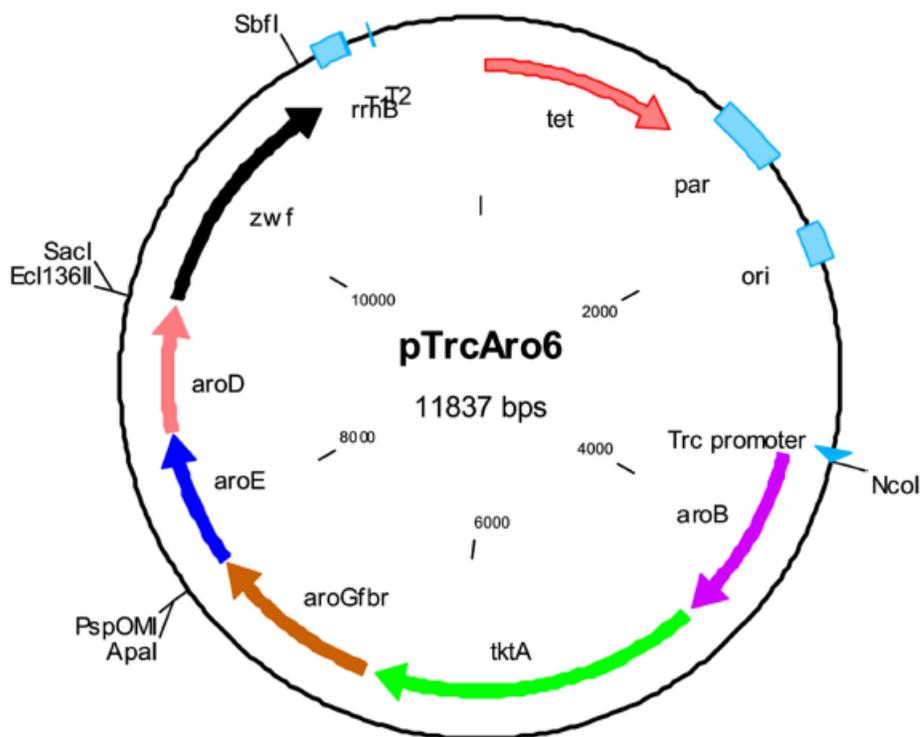


Figura 4. Plásmido pTrcAro6.

Tabla 4. Plásmidos y cepas de *E. coli* utilizados en este trabajo.

Cepa	Características	Referencia
PB12	PTS <sup>-</sup> Glc <sup>+</sup> ; cepa evolucionada en laboratorio	Flores <i>et al.</i> 1996
PBKL	PB12 <i>pykF</i> <sup>-</sup> , <i>ydiB</i> <sup>-</sup>	Este trabajo
PBK	PBKL <i>aroL</i> <sup>-</sup>	Este trabajo
PBL	PBKL <i>aroK</i> <sup>-</sup>	Este trabajo
PBKL6	PBKL + pTrcAro6	Este trabajo
PBK6	PBL + pTrcAro6	Este trabajo
PBL6	PBK + pTrcAro6	Este trabajo

---

**Tabla 4. Plásmidos y cepas de *E. coli* utilizados en este trabajo (continuación).**

---

Plásmido	Características	Referencias
pCP20	FLP, plásmido de expresión de la recombinasa	Cherepanov y Wackernagel, 1995
pTrcAro6	pTrc327par conteniendo <i>aroB</i> , <i>tkatA</i> , <i>aroG<sup>fb</sup></i> , <i>aroE</i> , <i>aroD</i> , <i>zwf</i>	Rodríguez <i>et al.</i> 2013

---

### 7.3 Caracterización cinética: crecimiento y producción de AS y otros intermediarios

Todas las cinéticas de cultivo en matraz se realizaron mediante la metodología que se describe a continuación, a partir del cultivo en glicerol almacenado a -70 °C, se inocularon 4 mL de medio LB con 2 g/L de Glc y se incubó a 37 °C por 12 h. Del cultivo anterior, se determinó la densidad óptica a 600nm (D.O.<sub>600nm</sub>) y se tomó el volumen necesario para inocular 25 mL de medio M9 en un matraz de 250 mL (10 g/L de Glc y cuyas características se describen en la tabla 5) e iniciar el cultivo a una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.1 (0.037 gDCW/L), nuevamente se incubó a 37 °C y a 300 rpm. Durante este cultivo de adaptación al medio mineral se midió la D.O.<sub>600nm</sub> buscando alcanzar una D.O.<sub>600nm</sub> aproximada a 1.5 (0.055 gDCW/L) (fase exponencial). Una vez obtenida ésta, se tomó el volumen necesario para inocular 50 mL de medio M9 en un matraz de 500 mL para iniciar nuevamente a 0.1 de D.O.<sub>600nm</sub> utilizando las condiciones antes mencionadas. Para los cultivos de las cepas transformadas con el plásmido pTrcAro6, se les adicionó IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración de 0.1 mM y tetraciclina a una concentración de 30 µg/mL. Esto para la inducción del operón sintético y evitar la segregación del plásmido respectivamente.

El cultivo se llevó a cabo a 37°C y a 300 rpm y se le dio seguimiento de 35 a 70 horas dependiendo de la cepa a evaluar. La toma de muestra se realizó cada cuatro horas (cada ocho horas para aquellas cepas con tiempos de duplicación de alrededor de 10 horas) para medir el crecimiento (D.O.<sub>600nm</sub>). La alícuota de 1 mL, se centrifugó a velocidad máxima durante tres minutos. El sobrenadante se guardó en un tubo limpio de 1.5 mL y almacenó a -70 °C para un posterior análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC por sus

siglas en inglés,). Los valores de crecimiento se reportan en g/L de biomasa, los cuales se obtienen mediante el factor de conversión de 0.36, el cual se determinó mediante una curva de peso seco, la cual arrojó la ecuación Biomasa g/L = 0.36\* D.O.<sub>600nm</sub> (Rodríguez *et al.*, 2013).

También se realizaron cultivos en reactor en lote de 1L, con un volumen de operación de 500 mL para aquella cepa que mostrara características más favorables para la producción de SA en medio mineral.

Con la finalidad de no exceder la biomasa alcanzada en matraz, se trató de controlar este parámetro mediante la limitación de nitrógeno. El rendimiento de biomasa/nitrógeno se calculó adicionando la cantidad justa de nitrógeno (en forma de NH<sub>4</sub>Cl) requerida para generar 1.2 g/L de biomasa (biomasa alcanzada por la cepa PBK6 en matraz de 50 mL). Inicialmente se calculó el nitrógeno requerido para tal biomasa utilizando la fórmula química empírica de *E. coli*: CH<sub>1.77</sub>O<sub>0.49</sub>N<sub>0.24</sub> (Stockar, 1999), de donde se deduce el porcentaje de nitrógeno de un mol de biomasa. Posteriormente se hizo el cálculo para conocer cuántos gramos de NH<sub>4</sub>Cl se requerían para satisfacer tal cantidad de nitrógeno. Con este valor (0.13065 g/L de nitrógeno) se agregaron 20 g/L de Glc, concentración que según el mismo cálculo, no sería limitante. Por cultivos previos, donde se ajustó el pH con hidróxido de amonio, este al servir como fuente de nitrógeno, se dedujo que las sales de fosfato no eran limitantes. Una vez conocido el rendimiento biomasa/nitrógeno (0.7323 g DCW/gNH<sub>4</sub>Cl), este fue utilizado para limitar la biomasa a la concentración de 1 g/L. El preinóculo e inóculo se realizaron como se describió anteriormente. Como medio de cultivo se utilizó medio M9 con 30 g/L de glucosa, 30 µg/mL del antibiótico tetraciclina y 0.1 mM de IPTG. Estos cultivos se iniciaron a una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.1. Las condiciones utilizadas fueron 37 °C, agitación de 600 rpm, se utilizó un impulsor Rushton de hoja sencilla de 15 mm de diámetro, 1 vvm de flujo de aires, siempre manteniendo un nivel superior al 20 % de oxígeno disuelto. El pH se ajustó a 7 mediante la adición de hidróxido de potasio 3 M, agregado por una bomba peristáltica a lo largo de todo el cultivo. A estos cultivos se le dio seguimiento hasta observar un paro en el consumo de glucosa (70 h).

**Tabla 5. Componentes del medio M9**

<b>Componente</b>	<b>g/L</b>
Glucosa	10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3
NaCl	0.5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6
NH <sub>4</sub> Cl	1
MgSO <sub>4</sub>	0.49
CaCl <sub>2</sub>	0.015
Tiamina	0.1

Los compuestos determinados por HPLC fueron SA, DHS, AQ, DHQ, Glc y ácido acético (Ac) en un sistema de HPLC 600E bomba cuaternaria, 717 inyector automático (Waters, Milford, MA) y separados en una columna de ácidos Aminex C-18 de BioRad. El tiempo de corrida de cada muestra fue de 20 min, ya que el mayor tiempo de retención es de 18 min, correspondiente al Ac.

### **7.5 Medición de la actividad enzimática de las SKs en el extracto crudo**

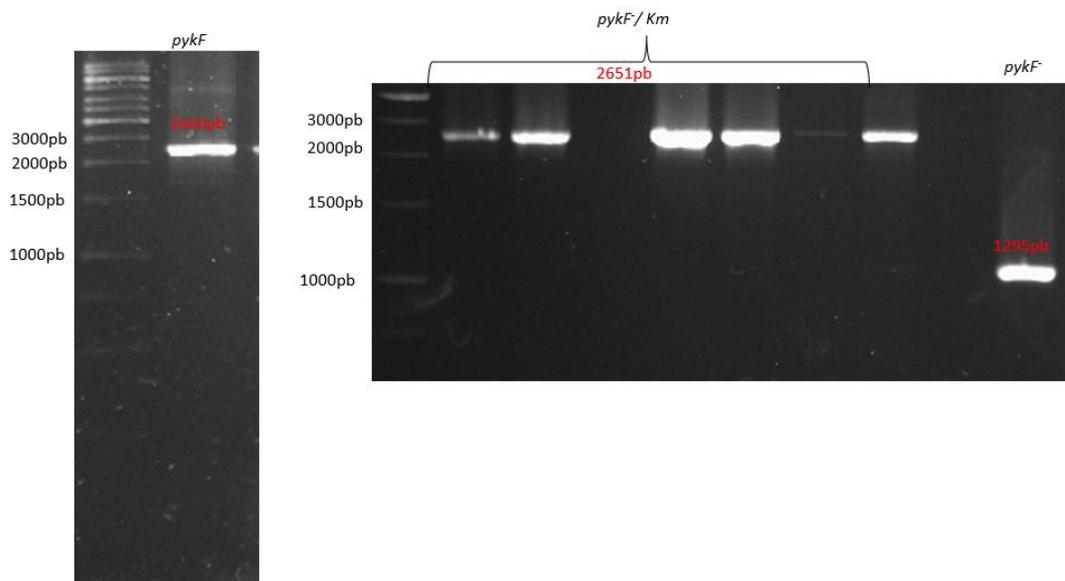
Para medir la actividad de las enzimas SKs se realizaron cultivos tal y como se describe para la evaluación de la producción de SHK. Una vez que el cultivo alcanzó una D.O.<sub>600nm</sub> igual a 1, se centrifugó a 13000 rpm en tubos de centrifuga de 50 mL y se desechó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en una solución de NaCl 0.9 % P/V y centrifugaron nuevamente a 13000 rpm. El paquete celular se resuspendió en una solución amortiguadora de ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS) a pH 7.5 y se lisó en un sonicador MSE (UK) Ltd Soniprep 150, colocando el tubo dentro de un contenedor con hielo para disminuir el calentamiento de la solución. Se administraron 6 pulsos de 10 s con una amplitud de onda de 10 micrones intercalados con 1 min de reposo.

Las reacciones para la determinación de la actividad enzimática se llevaron a cabo en 1.5 mL de buffer MOPS a pH 7.5 con 2 mg de proteína del extracto crudo en presencia de MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NaF 10 mM, SA 4 mM y ATP 4 mM. Esta mezcla se incubó a 37 °C durante 50 min y se extrajeron 0.1 mL de la solución cada tres horas. La reacción se detuvo por ebullición. Cada muestra se analizó por HPLC, como se describe anteriormente para determinar la velocidad de reacción mediante la desaparición de SHK respecto al tiempo. Este protocolo es una adaptación del método utilizado por Ely y Pittard, (1979). Dicha actividad se reporta como unidades enzimáticas por miligramo de proteína total. La concentración de proteína se determinó según la metodología descrita por Bradford en 1979.

## 8 RESULTADOS

### 8.1. Construcción de las mutantes en las shikimato cinasas

Las transducciones realizadas para inactivar los genes *pykF* y *ydiB* permitieron obtener la cepa PBKL. Esta cepa se utilizó como el control para comparar el crecimiento y así poder adjudicar cualquier variación en la velocidad de crecimiento o rendimiento en biomasa a las inactivaciones de una u otra SK. Partiendo de la cepa PBKL se realizaron las inactivaciones individuales de la SK I y II, obteniendo así las cepas PBL y PBK. Cada inactivación se verificó por PCR, comparando las diferencias de tamaño de los amplicones de los genes nativos, de los genes interrumpidos por el casete de kanamicina y de los genes una vez escindido el casete. Esto se ejemplifica con la inactivación del gen *pykF* en la Figura 5.

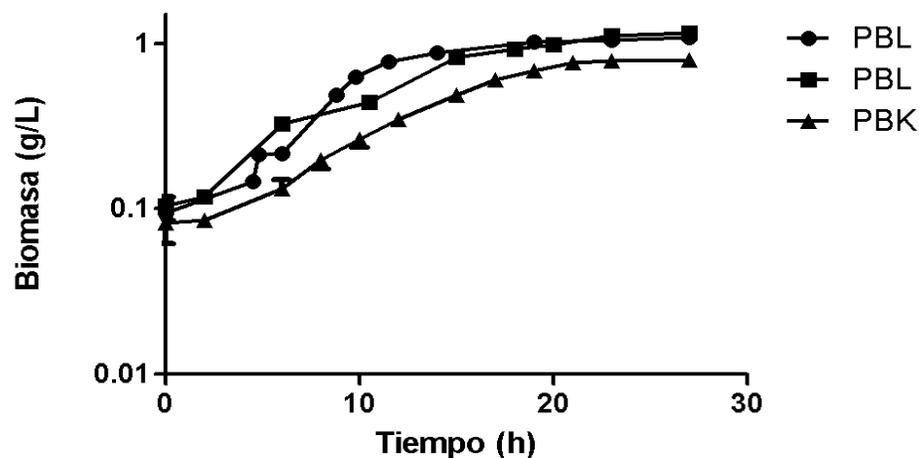


**Figura 5. Comprobación de las inactivaciones del gen *pykF*. Electroforesis en geles de agarosa de los amplicones obtenidos.** En la imagen de la izquierda se muestra el gen *pykF* nativo amplificado. En la imagen de la derecha se muestra dentro de la llave, las bandas correspondientes al amplicón del mismo gen interrumpido por un casete de kanamicina más las distancias añadidas por los sitios de hibridación de los oligos utilizados para la amplificación. En el último carril se muestra la secuencia amplificada del gen en cuestión el cual ha perdido el casete de resistencia a kanamicina (1300 pb aprox.).

## 8.2. Evaluación cinética de las cepas PBKL, PBK y PBL

Se realizó una cinética de crecimiento para evaluar el comportamiento de las cepas en medio M9 con 10 g/L de Glc y poder comparar sus velocidades de crecimiento, consumo de Glc, producción de SA y Ac resultados una vez se haya transformado con el plásmido pTrcAro6. La cepa control PBKL tuvo un valor de  $\mu = 0.25 \text{ h}^{-1} \pm 0.012$ , mientras que las cepas PBL y PBK alcanzaron un valor de  $\mu = 0.16 \text{ h}^{-1} \pm 0.012$  y de  $0.13 \text{ h}^{-1} \pm 0.012$ , respectivamente (tabla 6). Estos muestran que las inactivaciones realizadas tienen un efecto importante sobre la velocidad de crecimiento si se comparan con la cepa parental PB12 ( $\mu = 0.42 \text{ h}^{-1}$ , Flores *et al.*, 2004). Sin embargo se ha visto que combinaciones de Glc con acetato o glicerol pueden restaurar en un porcentaje importante la velocidad de crecimiento (Martínez *et al.*, 2008; Sabido *et al.*, 2014). La biomasa alcanzada por las tres cepas fue cercana a 1 g/L. La cepa con la inactivación de *aroL* fue la que alcanzó una menor concentración celular, lo que es congruente con el hecho de que AroL tiene un papel más importante para generar AAA y en este caso biomasa.

La diferencia de las velocidades de crecimiento de las mutantes en *aroK*<sup>-</sup> y *aroL*<sup>-</sup> es de esperarse ya que éstas tienen una menor capacidad de producir AAA. Sin embargo, la inactivación de *aroK* tuvo un efecto más importante de lo esperado en el crecimiento, lo que demuestra que el papel en la síntesis de compuestos aromáticos de la SK I, en estas condiciones y fondo genético es más importante que sólo mantener un pequeño flujo a través de la vía cuando los aminoácidos Tyr y Phe comienzan a acumularse, como se considera en general para *E. coli* (Lobner-Olesen, 1992).



**Figura 6. Curvas de crecimientos de las cepas construidas.** En la gráfica se muestra el crecimiento de los fondos genéticos generados para las cepas PBKL, PBL y PBK en matraz con 50mL de medio mineral M9 con 10 g/L de Glc incubados a 37 °C y 300 rpm. Los datos mostrados son el promedio de tres réplicas.

De los tres fondos genéticos evaluados, sólo para PBK, la combinación de la expresión de los genes de la VSHK a nivel cromosomal y la inactivación de la SK II permitió la acumulación de SA, con un rendimiento global de 0.03 mol SA/mol Glc (tabla 6). Tal parece que la actividad SK en los fondos PBKL y PBL es aún alta para permitir que el SA se acumule. Esto se puede apreciar más adelante con la determinación de la actividad enzimática en la sección 8.3. Los tres fondos genéticos tienen una velocidad de consumo de Glc baja así como una velocidad de producción también baja o difícil de determinar en el caso de aquellas que no acumulan el producto de interés.

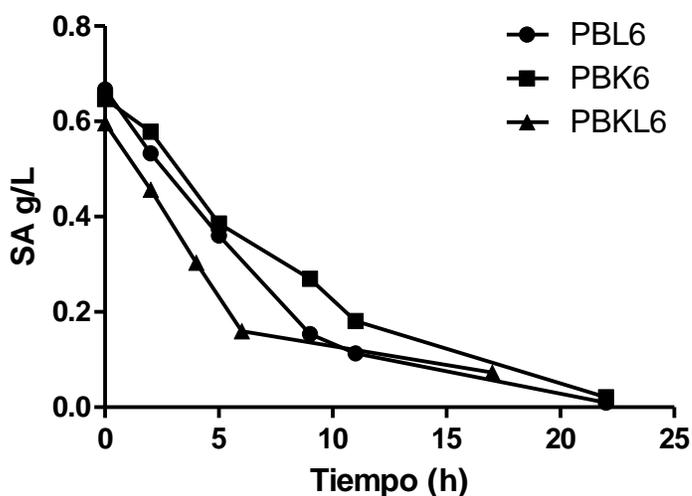
**Tabla 6. Resultados de la evaluación cinética de los fondos genéticos.**

Cepa	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	SA (g/L)	$Y_{SA/Glc}$ (mol/mol)	$Y_{Ac/Glc}$ (mol/mol)	qs (gGlc/gDCW*h)	qp (gSA/gDCW*h)
PBKL	0.25 ± 0.012	*****	*****	0.33 ± 0.011	1.78 ± 0.006	*****
PBK	0.13 ± 0.012	0.22 ± 0.007	0.03 ± 0.004	0.21 ± 0.050	1.10 ± 0.002	0.003 ± 0.002
PBL	0.16 ± 0.012	*****	*****	0.15 ± 0.062	1.14 ± 0.003	*****

\*\*\*\*\* Valores menores a 0.001. DCW: peso celular seco por sus siglas en ingles.

### 8.3 Evaluación de la actividad SA cinasa en las cepas PBKL6, PBK6 y PBL6.

La actividad enzimática en el nodo SHK/SHK-3P es crucial, ya que en este punto es donde se puede acumular el metanolito de interés al inactivar cualquiera de las dos SKs. Cuando ambas enzimas se encuentran activas, la velocidad a la que se fosforila el SA es tan alta como las condiciones de cultivo lo permiten y en general la cepa no es auxótrofa, a compuestos aromáticos. Una vez que se inactiva una de las isoenzimas, se reduce el flujo de carbono hacia compuestos aromáticos y limita la velocidad para generar biomasa. La importancia de esta actividad radica en que debe existir un compromiso entre el consumo del SA producido por la cepa para poder crecer y la posibilidad de que el metabolito también sea acumulado. El seguimiento de la reacción enzimática se muestra en la figura 7; a partir de los valores obtenidos de dicha curva, se calcularon los valores de actividad, la cual es la pendiente máxima de la cinética de desaparición de SA, los cuales corresponden a los puntos anteriores a la hora 10 para la cepa PBK6, la hora 8 para la cepa PBL6 y la hora 6 para la cepa PBKL6 (tabla 7).



**Figura 7. Curva de desaparición del SA por acción de las shikimato cinasas.** En la figura se muestra el decremento en la concentración de SA durante la evaluación de la actividad SK presentes en el extracto crudo de cultivos de las mutantes PBL6, PBK6 y PBKL6. Los puntos mostrados son un promedio de tres réplicas.

**Tabla 7. Resultados de actividad de la enzima shikimato cinasa del extracto crudo de las cepas PBKL6, PBK6 y PBL6.**

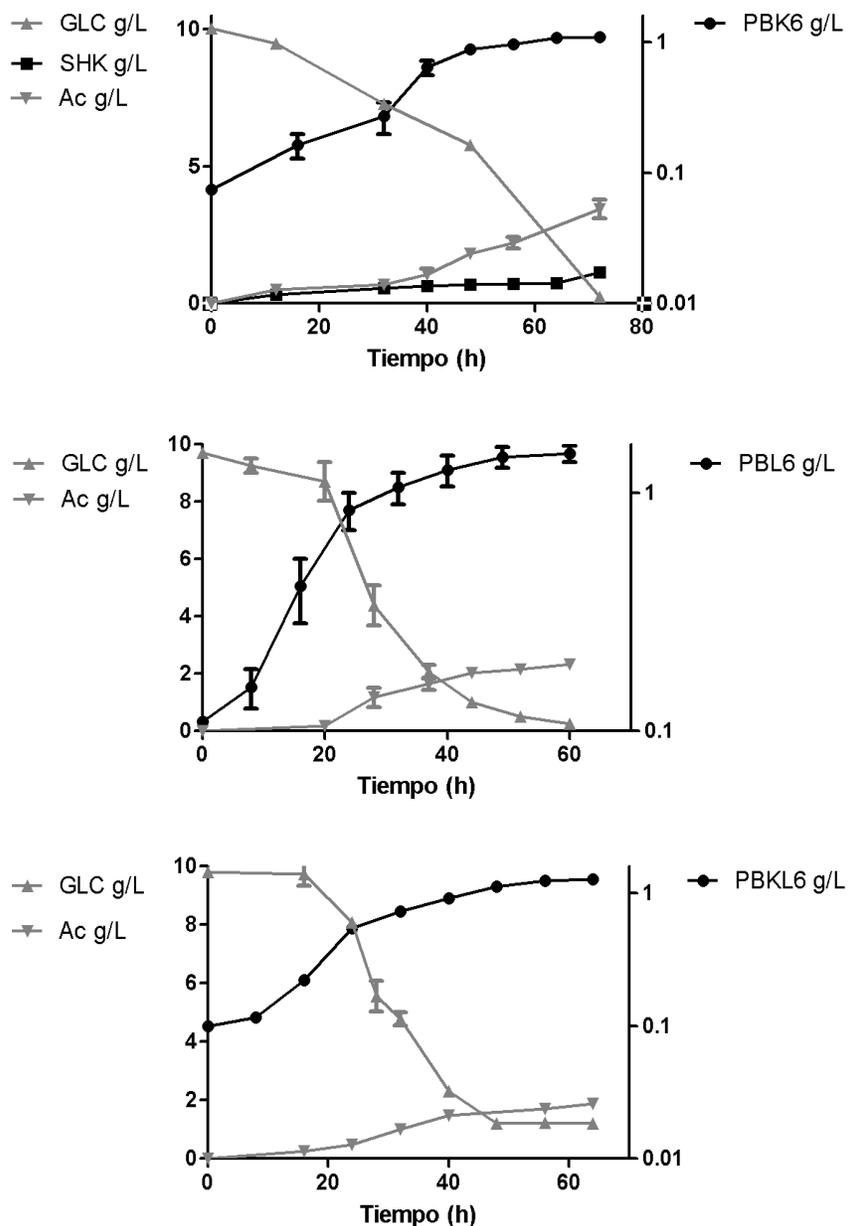
Cepa	Actividad del Extracto Crudo (U/mg)
PBKL6	$6.3 \times 10^{-3} \pm 0.48 \times 10^{-5}$
PBL6	$5.4 \times 10^{-3} \pm 0.71 \times 10^{-5}$
PBK6	$2.4 \times 10^{-3} \pm 0.43 \times 10^{-5}$

La mayor actividad se encontró en la cepa control PBKL6, mutante que posee ambas SKs I y II. Esta actividad decayó para las mutantes PBL6 y PBK6, las cuales poseen la inactivación de la SK I y II respectivamente. La mutante PBL6 mostró el 86% de la actividad del control (PBKL6), corroborando que la enzima AroL (SK II) es la principal SK. Por otro lado, la mutante PBK6, mostró un 40% de la actividad del control, con lo que se determina que el papel de la SK I no es insignificante como se le considera normalmente, cuando se expresa sin compañía de la SK II. Este resultado permite suponer que la SK I es la enzima candidata para sustentar el crecimiento en medio mineral y probablemente acumular SA.

#### **8.4 Evaluación del crecimiento, consumo de Glc y acumulación de SA en las cepas PBKL6, PBL6 y PBK6**

Las cinéticas realizadas para las cepas transformadas con el plásmido pTrcAro6 se llevaron a cabo en matraces de 500 mL tal y como se describió en la sección 7.3, pero se adicionó IPTG a una concentración de 0.1 mM para inducir la expresión de los genes del operón. Como se puede observar en la figura 8, la presencia e inducción del plásmido representa una carga metabólica importante para las tres cepas portadoras de este. Lo anterior se refleja en a las velocidades de crecimiento, se observó que estas son de  $0.1 \text{ h}^{-1}$  para PBKL6 y PBL6, este mismo parámetro descendió hasta  $0.06 \text{ h}^{-1}$  para las PBK6. Esto concuerda con el hecho de que estas últimas tienen una menor capacidad de producir AAA y estos al ser los compuestos al ser limitantes, su crecimiento es más lento. Lo anterior se traduce en una disminución en la velocidad de crecimiento de 56 % para la cepa PBKLE6, 38 % para la cepa PBL6 y 54 % para la cepa PBK6 comparadas con estas mismas cepas sin plásmido.

En cuanto a producción de SA, los resultados obtenidos por HPLC demuestran que sólo la cepa PBK6 es capaz de acumular SHK. Esto pudo deberse a que sólo en esta cepa se presenta una reducción del flujo de carbono en este punto de la VSHK suficiente para que se acumule dicho compuesto, alcanzando una concentración máxima de  $1.1 \pm 0.10$  g/L con un rendimiento de  $0.12 \pm 0.010$  mol SHK/mol Glc (tabla 8).



**Figura 8. Cinética de crecimiento y producción de SHK de las cepas PBKL6, PBK6 y PBL6.** Crecimiento (círculos negros, eje derecho) de los fondos genéticos generados para la cepa PBK6, PBL6 y PBKL6

en medio mineral M9 con 10 g/L de Glc, así como la producción de SA (cuadros negros, eje izquierdo, sólo detectable en cultivos de la mutante PBK6) Ac (triángulos invertidos grises, eje izquierdo) y consumo de Glc (triángulos grises, eje izquierdo). Los datos mostrados son un promedio de tres réplicas.

**Tabla 8. Resultados de las cinéticas de crecimiento y producción de SA de las cepas PBKL6, PBK6 y PBL6.**

Cepa	$\mu$ (1/hr)	SA (g/L)	$Y_{SA/Glc}$ (mol/mol)	$Y_{Ac/Glc}$ (mol/mol)	qs (gGlc/gDCW*h)	qp (gSA/gDCW*h)
PBKL6	$0.11 \pm 0.011$	$0.002 \pm 0.000$	*****	$0.65 \pm 0.03$	$0.92 \pm 0.007$	*****
PBK6	$0.06 \pm 0.011$	$1.1 \pm 0.1$	$0.12 \pm 0.01$	$1.08 \pm 0.20$	$0.51 \pm 0.002$	*****
PBL6	$0.10 \pm 0.012$	$0.004 \pm 0.000$	*****	$0.85 \pm 0.03$	$0.71 \pm 0.004$	$0.05 \pm 0.001$

\*\*\*\*\* Valores menores 0.001. DCW: peso celular seco por sus siglas en ingles.

Un elemento que debe destacar del comportamiento de estas cepas, es la velocidad de consumo de Glc, la cual es muy baja comparada con otras cepas reportadas para la producción de SA (Rodríguez *et al.*, 2013; Escalante *et al.*, 2010). Este resultado es contrario a lo reportado previamente en el que la expresión constitutiva de éste operón provoca el incremento de consumo de Glc (Rodriguez *et al.*, 2014). Este comportamiento inesperado puede deberse a que la expresión del operón no es eficiente y por consiguiente no se está redirigiendo eficazmente el PEP acumulado en el nodo Pyr cinasa (recordemos que se inactivó *pykF* para incrementar la disponibilidad de PEP). Se probó incrementar la concentración de IPTG a 0.2 mM. Sin embargo, esto no solucionó el problema, por el contrario, los microorganismos no mostraron crecimiento. Se sabe que la velocidad de consumo de Glc se afecta por la disminución de la actividad de enzimas en la vía glucolítica. Tal es el caso de la glucocinasa, fosfo glucosa isomerasa, fosfofructocinasa I y la triosa fosfato isomerasa, enzimas cuya expresión se ve afectada por la acumulación de PEP o bien son inhibidas alostéricamente, resultando en una disminución del flujo glicolítico (Siddiquee *et al.*, 2004). Cabe destacar que este fondo genético *pykF*<sup>-</sup>, en cepas productoras, no se ha evaluado utilizando Glc como única fuente de carbono. Estas cepas sólo han sido evaluadas

en mezclas con Glc/acetato, donde el consumo de acetato puede enmascarar el efecto de ralentización de esta vía y así recuperar de forma considerable su velocidad de crecimiento (Sabido *et al.*, 2014).

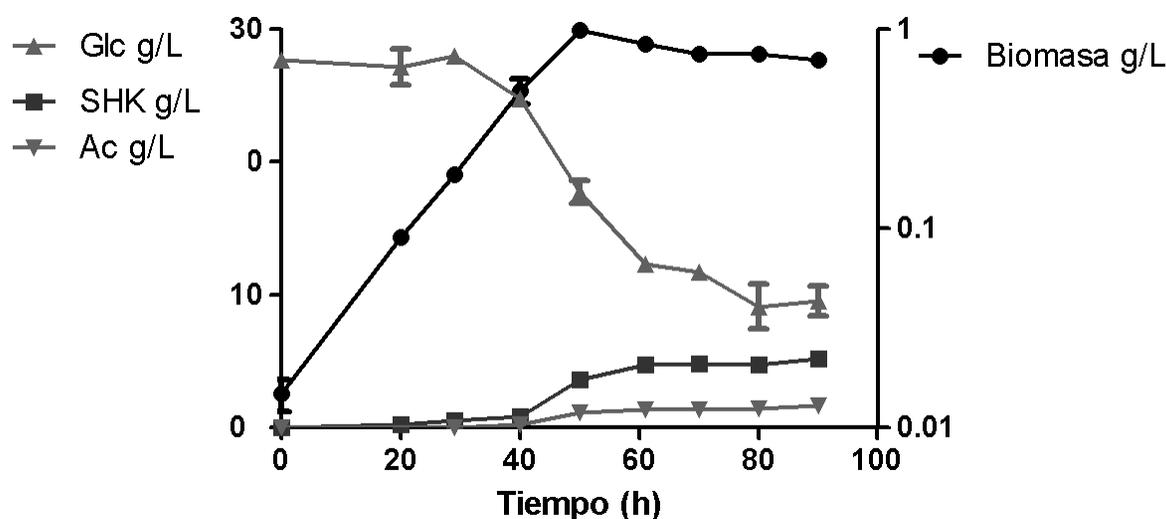
Adicionalmente, en estudios de flujos carbono y transcritos en cepas de *E. coli*, se ha visto que la eliminación de *pykF* provoca una disminución de los niveles de la enzima adenilato ciclasa (Cya) (Siddiquee *et al.*, 2004). El AMPc sintetizado por esta enzima forma un complejo con la proteína CAP (CAP-AMPc). Este complejo tiene como función (entre otras) inducir la transcripción de genes involucrados en el TCA. Dichos genes son *acnA*, *acnB* (aconitasa), *mdh* (malato deshidrogenasa), *glcA* (citrato sintasa) y *sdhCDAB* (succinato deshidrogenasa) (Wild y Guest, 1986; Vogel *et al.*, 1987; Cunningham y Guest, 1997). El efecto de la acumulación de PEP podría no sólo estar disminuyendo la velocidad de consumo de Glc, sino que también podría estar afectando la obtención de energía de estas cepas. Un TCA disminuido podría explicar la formación inesperada de acetato para una cepa con una velocidad de consumo de Glc tan reducido (Siddiquee *et al.*, 2004; Perrenoud y Sauer 2005).

En reportes pasados, se ha visto que no existe problema en la expresión de los genes clonados en el plásmido pTrcAro6 cuando se utiliza medio rico (Rodríguez *et al.* 2013). No obstante, también hay reportes donde se hace notar que la precariedad en nutrientes del medio mineral conlleva no sólo una menor producción de proteína y problemas de replicación de los plásmidos que no mantienen el número de copias por célula esperado (Fuentes *et al.*, 2013). Aunado al bajo consumo de Glc mencionado anteriormente, se puede inferir que la combinación utilizada a pesar de lograr producir SA en cantidades superiores a algunas cepas reportadas utilizando medios ricos en nutrientes podría mejorarse.

De los resultados anteriores se puede concluir que la cepa con un mejor desempeño para la producción de SA en un medio mineral con sólo Glc como fuente de carbono es la cepa PBK6. En la figura 8 a), se observa un despunte en la velocidad de producción de SA una vez próxima la fase estacionaria. Se realizaron cultivos de la cepa PBK6 en reactor de 1 L usando 10 g/L de glucosa donde se observa que al ser la glucosa el sustrato limitante, la fuente de carbono se utiliza principalmente para la formación de biomasa y se obtienen

menores rendimientos de SA (0.05 mol SA/mol Glc). Por otra parte, cuando el nutriente limitante es otro diferente a la fuente de carbono, la producción de biomasa se detiene y la fuente de carbono remanente puede ser utilizada para la producción de SA.

Por lo mencionado antes, se decidió implementar una estrategia de cultivo donde el nitrógeno es limitante para poder aprovechar la fuente de carbono (30 g/L de Glc) para la producción de SA. El seguimiento de este cultivo se muestra en la figura 9.



**Figura 9. Cinética de crecimiento y producción de SA de la cepa PBK6 en reactor.** Este gráfico muestra el crecimiento de la cepa PBK6 (círculos negros, eje derecho) en un cultivo en reactor con 30 g/L de glucosa, así como la producción de SA (cuadros negros, eje izquierdo) Ac (triángulos invertidos grises, eje izquierdo) y consumo de Glc (triángulos grises, eje izquierdo). Los datos mostrados son un promedio de tres réplicas.

Como se puede observar en la figura 9, la estrategia utilizada fue exitosa para los propósitos perseguidos, ya que se obtuvo una concentración de 5.3 g/L de SA a las 60 h de cultivo. Este es el primer reporte de producción de SA en medio mineral sin utilizar ninguna fuente de carbono adicional a la glucosa. Esto es comparable con reportes anteriores de producción de SA en reactor en lote utilizando medios de cultivo con concentraciones semejantes de Glc (25 g/L) y complementado con cantidades elevadas de extracto de levadura (15 g/L), donde se obtuvieron hasta 7 g/L de SA (Escalante *et al*, 2010).

Otro dato importante es el rendimiento alcanzado de 0.30 mol SA/mol Glc, 6 veces superior al obtenido sin limitación de nitrógeno y bajo las mismas condiciones. Este valor se puede ubicar entre los rendimientos más altos reportados usando cualquier estrategia de cultivo (Escalante *et al.*, 2010; Draths *et al.* 1999), con un 70% del rendimiento más alto reportado de 0.43 mol SA/mol Glc (Tabla 1) (Rodríguez *et al.* 2013). Cabe destacarse que este último reporte, se basa en la generación de una gran cantidad de biomasa a través de cantidades elevadas de YE (15 g/L) y lo que permitió que la Glc en el medio (100 g/L) fuese utilizada en su mayoría para la producción de SA; a diferencia de este trabajo donde la única fuente de carbono, la Glc, debe ser utilizada tanto para la obtención de biomasa como para la producción de SA.

La limitación de nitrógeno redujo la producción de biomasa y permitió que gran parte de la glucosa restante se utilizara para la producción de SA. También puede observarse en el gráfico que la producción de Ac disminuye de forma considerable al entrar el cultivo en fase estacionaria, alcanzando una concentración máxima de 1.67 g/L, concentración comparable a la obtenida en matraz, aun si se utiliza tres veces la concentración de glucosa. El rendimiento de Ac no excede los 0.28 mol Ac/mol Glc, mucho menor a lo obtenido para esta misma cepa en matraz.

En la figura 9 se observa que el SA es producido desde la fase de crecimiento exponencial donde se alcanza un 70 % de la concentración final de SA. Una vez que el cultivo alcanza la biomasa máxima, el consumo de Glc continúa durante 30 h; es aquí durante la fase estacionaria donde se produce el 30 % de SA restante. Otros trabajos con cepas de *E. coli* PTS<sup>+</sup>  $\Delta$ aroL han obtenido comportamientos similares. Esta cepa fue evaluada en condiciones de limitación de fosfatos y limitación de Glc. De la misma forma que en este trabajo, se encontró que la limitación en la producción de biomasa permite la utilización de un mayor porcentaje de glucosa para la producción de SA, pasando de un rendimiento de 0.024 a 0.59 mol SA/mol Glc (Johansson *et al.*, 2005).

## 9 CONCLUSIONES

Las inactivaciones realizadas para la construcción de las cepas PBKL, PBL y PBK tienen un fuerte impacto sobre la velocidad de crecimiento respecto a la cepa parental PB12, observándose una mayor disminución de esta en las cepas PBL y PBK (69% y 62% respectivamente). El patrón de disminución en la velocidad de crecimiento concuerda con lo reportado para la actividad de SK que las enzimas de estos fondos genéticos poseen. La inactivación del gen *ydiB* permitió llevar la concentración de subproductos de la VSHK por debajo de los niveles detectables por HPLC.

De las tres mutantes PBKL6, PBL6 y PBK6 generadas y evaluadas, esta última al tener una menor actividad SK (40% del control PBKL6), demostró que su papel de forma individual puede llegar a ser más importante de lo que originalmente se creía. La actividad enzimática en la cepa PBL6 de un 85 % del control, por lo que es de esperarse que tengan un desempeño similar en la acumulación de SA.

La estrategia implementada en este trabajo para la producción de SA en medio mineral fue efectiva sólo para la cepa PBK6. La actividad SK en las cepas PBKL6 y PBL6, no permitió que el carbono dirigido hacia la VSHK se acumulara en forma de SA.

El rendimiento de SA alcanzado por la mutante PBK6 en matraz es de una cuarta parte del rendimiento máximo reportado para *E. coli* utilizando medio rico (0.43 mol SA/mol Glc), además de ser, a la fecha, el único reporte de producción de SA en medio mineral con Glc como única fuente de carbono.

De los resultados se puede concluir que la limitación en la generación de biomasa es una opción para favorecer la acumulación de SA. Por lo que la estrategia de limitación de nitrógeno es factible para alcanzar títulos competitivos de SA, pues se lograron obtener 5.3 g/L de SA y un incremento de 3 veces con respecto al rendimiento obtenido en matraz (0.30 mol SA/mol Glc).

## 10 PERSPECTIVAS

A pesar de observar una acumulación de SA en la mutante PBK6, lo que probaría el funcionamiento de las enzimas codificadas en el plásmido pTrcAro6, es notorio que este sistema puede mejorarse. Las velocidades de crecimiento de estas cepas son muy bajas (menores a  $0.11 \text{ h}^{-1}$ ), además de que muestran todas ellas una alta producción de Ac. Se plantea como perspectiva la determinación de transcritos de los genes involucrados con el metabolismo central de carbono, es decir, la vía glucolítica, TCA y las vías de síntesis de Ac. Esto podría dar la pauta para entender el motivo de la producción de acetato, al igual que podría esclarecer el motivo del lento consumo de Glc.

En este trabajo se obtuvo una cepa productora de SA capaz de crecer en medio mineral y ya no se cuenta con el ruido de los metabolitos que se encuentran en la composición del YE. Esto facilita enormemente la aplicación de estudios del metaboloma. Ahora sería posible ver a nivel global la distribución del carbono consumido dentro del metabolismo. Esto también hace posible el análisis de flujo de carbono marcado, una de las estrategias más utilizadas para incrementar la producción de cualquier compuesto.

En este estudio se inactivó una u otra SK, sin embargo, resulta en una modulación de la actividad poco fina. Una alternativa a lo realizado en este estudio es la modulación de la expresión de los genes *aroK* o *aroL* mediante el uso de bibliotecas de promotores. También es posible la modulación haciendo uso de RNAi con diferentes niveles de expresión de este mismo. O bien, estrategias que permitan una modulación más fina de la expresión de estos genes o bien de la actividad de SK.

De los resultados obtenidos, se cree que el lento consumo de glucosa es debido a una acumulación de PEP. Sería interesante, probar una cepa que mantenga la expresión del gen *pykF* y así incrementar la velocidad de crecimiento, pudiendo tal vez compensar un menor rendimiento con una mejor productividad.

## 11 REFERENCIAS

- Aguilar C., Escalante A., Flores N., de Anda R., Riveros-Mckay F., Gosset G., Morett E., Bolivar F. 2012. Genetic changes during laboratory adaptive evolution process that allows fast growth in glucose to an *Escherichia coli* strain lacking the major glucose transport system. *BMC Genomics*. 10: 385.
- Baba T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K.A. Datsenko, M. Tomita, B.L. Wanner, H. Mori. 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2: 1-1.
- Berry A. 1996. Improving production of aromatic compounds in *Escherichia coli* by metabolic engineering. *Trends in Biotechnology*. 14: 250-56.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248–254.
- Bustin S. A., Benes V., Garson J. A., Hellemans J., Huggett H. J., Kubista M., Muller R., Nolan T., Pfaffl M. W., Shipley G. L., Vandesompele J., Witter C. T. 2009. The MIQUE guidelines: Minimum information for publication of expression realtime PCR experiments. *Clinical Chemistry*. 55: 611-622.
- Carmona-Contreras S. B. 2013. Tesis de maestría, Desarrollo de una metodología ara el análisis de la distribución de flujos de carbono en una cepa de *Escherichia coli* productora de shikimato. Instituto de Biotecnología, Universidad Autónoma Nacional de México.
- Carmona S.B., Moreno F., Bolivar F., Gosset G., Escalante A. 2015. Inactivation of the PTS as a Strategy to Engineer the Production of Aromatic Metabolites in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 25, 195-208.
- Chandran S.S., J. Yi, K.M. Draths, R. von Daeniken, W. Weber, J.W. Frost. 2003. Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. *Biotechnology Progress*. 19: 808-814.
- Cherepanov P. y Wackernagel W. 1995 Gene disruption in *Escherichia coli*: Tcr and Kmr cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene*. 158:9–14.
- Cortés-Tolalpa L., Gutiérrez-Ríos R., Martínez L., de Andan R., Gosset, G., Bolívar F., Escalante A. 2014. Global transcriptomic analysis of an engineered *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system during shikimic acid production in rich culture medium. *Microbial Cell Factories*. 13: 28.
- Cui Y., Ling C., Zhang Y., Huang J., Liu, J.-Z. 2014. Production of shikimic acid from *Escherichia coli* through chemically inducible chromosomal evolution and cofactor metabolic engineering. *Microbial Cell Factories* 13, 21

- Cunningham L., Gruer M., and Guest R. 1997. Transcriptional regulation of the aconitase genes (*acnA* and *acnB*) of *Escherichia coli*. *Microbiology* 143:3795-3805.
- Darmawi J., Baidoo E., Redding-Johansson A., Tanveer S. B, Helcio Burd, Aindrila, Redding-Johansson, Batth T., Burd H., Mukhopadhyay A., Petzold, Keasling J. 2012. Modular engineering of l-tyrosine production in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 78: 89.
- Datsenko KA, BL Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97: 6640-45.
- Defeyter R. C., Pittard J. 1985. Genetic and molecular analysis of *aroL*, the gene for shikimate kinase II in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*. 165: 226-232.
- Diaz-Quiroz D.C., Carmona S.B., Bolivar F., Escalante A. 2014. Current perspectives on applications of shikimic and aminoshikimic acids in pharmaceutical chemistry. *Research and Reports in Medicinal Chemistry*. 4: 35-46.
- Draths K.M., D.R. Knop, J.W. Frost. 1999. Shikimic acid and quinic acid: replacing isolation from plant sources with recombinant microbial biocatalysis. *Journal of the American Chemical Society*. 121: 1603-1604.
- Ely B., Pittard J. 1979. Aromatic Amino Acid Biosynthesis: Regulation of Shikimate Kinase in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*. 138:3.
- Escalante,A. Salinas-Cervantes A. Gosset,G. Bolivar,F. 2012. Current knowledge of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system: peculiarities of regulation and impact on growth and product formation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 94, 1483-1494.
- Escalante A., R. Calderón, A. Valdivia, R. De Anda, G. Hernández, O.T. Ramírez, G. Gosset, and F. Bolivar. 2010. Metabolic engineering for the production of shikimic acid in an evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Microbial Cell Factories*. 9: 21.
- Flores N., Xiao J., Berry A., Bolivar F., Valle F. 1996. Pathway engineering for production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*. 14:620-23.
- Flores N., Flores S., Escalante A., de Anda R., Leal L., Malpica R., Georgellis D., Gosset G., Bolívar F. 2004. 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. *Metabolic Engineering*. 7: 70-87.

- Fuentes L., Lara A., Martínez L., Ramírez O., Martínez A., Bolívar F., Gosset G., 2013. Modification of glucose import capacity in *Escherichia coli*: physiologic consequences and utility for improving DNA vaccine production. *Microbial Cell Factories*, 12, 42.
- García-Cañedo S. 2013. Tesis de maestría, Efecto del gen *ydiB* sobre la producción de shikimate en una cepa evolucionada de *Escherichia coli* que posee la inactivación del sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferasa. Instituto de Biotecnología, Universidad Autónoma Nacional de México.
- Garrido-Pertierra A. y Cooper R. A. 1983. Evidence for two distinct pyruvate kinase genes in *Escherichia coli* K-12. *FEBS Letters*. 162: 420-2.
- Gosset G. 2005. Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *Microbial Cell Factories*. 4: 1-14.
- Gosset G., Yong-Xiao J., Berry A. 1996. A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 17: 47-52.
- Holms H. 1996. Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Reviews*. 19: 85-116.
- Johansson L., Lindskog A., Silfversparre G., Cimander C., Nielsen K., Liden G. 2005. Shikimic acid production by a modified strain of *E. coli* (W3110.shik1) under phosphate-limited and carbon-limited conditions. *Biotechnology and Bioengineering*. 92(5):541-52.
- Josephson B. y Fraenkel G. 1974. Sugar metabolism in transketolase mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 118: 1082.
- Kai Chen, Jie Dou, Shirui Tang, Yishun Yang, Hui Wang, Hongqing Fang, Changlin Zhou. 2012. Deletion of the *aroK* gene is essential for high shikimic acid accumulation through the shikimate pathway in *E. coli*. *Bioresource Technology*. 119: 141-147.
- Krämer M., J. Bongaerts, R. Bovenberg, S. Kremer, U. Müller, S. Orf., M. Wubbolts, L. Raeven. 2003. Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid. *Metabolic Engineering*. 5: 277-83.
- Livak K. J. y Schmittgen T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and 2(-Delta Delta C (T)) method. *Methods*. 25: 402-408.
- Lobner-Olesen A. y Marinus M. G. 1992. Identification of the gene (*aroK*) encoding shikimic acid kinase I of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 174: 225-229.
- Marínez J., Escalante A., Bolívar F. 2015. Shikimic acid production in *Escherichia coli*: From classical metabolic engineering strategies to omics applied to improve its production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 23; 3:145.
- Martínez K., de Anda R. Hernández G., Escalante A., Gosset G., Ramírez O., Bolívar F. 2008. Couitilization of glucose and glycerol enhances the production of aromatic compounds

in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Microbial cell factories*. 7:1.

Miller J. H. 1992. A short Course in Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. pp: 268-274.

Min-Kyu Oh y Liao J. C. 2000. Gene expression profiling by DNA microarrays and metabolic fluxes in *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*. 16: 278-286.

Moat G. A., Foster W., Spector M. 2002. Microbial physiology. 4 Ed. Editorial Wiley-Liss. New York, EE.UU. pp: 390-393.

Neumann G., T. Noda, Y. Kawaoka. 2009. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*. 459: 931-9.

Pittard J. 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology, vol 1. Editorial Neidhardt FC ASM, Washington, DC, pp: 458–484.

Pittard A. J y Davidson B. 1991. TyrR protein of *Escherichia coli* and its role as repressor and activator. *Molecular Microbiology*. 5: 1585-1592.

Pittard J. y Defeyter R. 1986. Purification and properties of shikimate kinase II from *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*. 165: 331-333.

Ponce E., Flores N., Martinez A., Valle F., Bolivar F. 1995. Cloning of the two pyruvate kinase isoenzymes structural genes from *Escherichia coli*: the relative roles of these enzymes in pyruvate biosynthesis, *Journal of Bacteriology*. 177: 5719-22.

Oh M. y J. Liao. 2000. Gene Expression Profiling by DNA Microarrays and Metabolic Fluxes in *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*. 16:278-286.

Rodríguez A., Martínez J.A., Báez-Viveros J.L., Flores N., Hernández-Chávez G., Ramírez O. T., Gosset G., Bolivar F. 2013. Constitutive expression of selected genes from the pentose phosphate and aromatic pathways increases the shikimic acid yield in high-glucose batch cultures of an *Escherichia coli* strain lacking PTS and *pykF*. *Microbial Cell Factories*. 12: 86.

Rodriguez,A. Martinez,J.A. Flores,N. Escalante,A. Gosset,G. Bolivar,F. 2014. Engineering *Escherichia coli* to overproduce aromatic amino acids and derived compounds. *Microbial Cell Factories*. 13, 126.

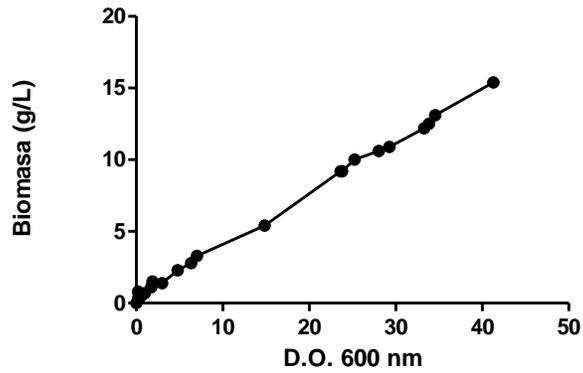
Sabido A., Sigala J. C., Hernandez-Chávez G., Flores N., Gosset G., Bolivar F. 2014. Physiological and transcriptional characterization of *Escherichia Coli* strains lacking interconversion of phosphoenolpyruvate and pyruvate when glucose and acetate are coutilized. *Biotechnology and Bioengineering*. 111: 1150-60.

Saptarshi G., Yusuf C., Uttam C. B. 2012. Production of shikimic acid. *Biotechnology Advances*. 30: 1425–1431.

- Serres M., Kerr A., McCormack T., Riley M. 2009. Evolution by leaps: gene duplication in bacteria. *Biology Direct*. 4:46.
- Siddiquee K., Arauzo-Bravo M., Shimizu K. 2004. Effect of a pyruvate kinase (*pykF*-gene) knockout mutation on the control of gene expression and metabolic fluxes in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*. 235:25-33.
- Stockar V., Liu U. 1999. Does microbial life always feed on negative entropy? Thermodynamic analysis of microbial growth. *Biochimica et Biophysica Acta*. 3:142.
- Vogel R., Entian K., and Mecke D. 1987. Cloning and sequence of the mdh structural gene of *Escherichia coli* coding for malate dehydrogenase. *Archives of Microbiology*. 149:36-42.
- Wilde R., and Guest J. 1986. Transcript analysis of the citrate synthase and succinate dehydrogenase genes of *Escherichia coli* K12. *Journal of General Microbiology*. 132:3239-3251.
- Yaniv H., Gilvarg C. 1955. Aromatic biosynthesis. XIV. 5-Dehydroshikimate reductase. *Journal of Biological Chemistry*. 213: 787-95.

## MATERIAL ADICIONAL

### Curva estándar para la determinación de peso seco



La pendiente del gráfico es de 0.360, por esto se establece que la fórmula para la conversión de D.O.<sub>600nm</sub> a g/L para éste microorganismo es la siguiente:

$$\text{Biomasa g/L} = 0.36 * \text{D.O.600nm}$$