



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA SOBRE-EXPRESIÓN E
INTERRUPCIÓN DE GENES RELACIONADOS A LA
PRODUCCIÓN DE SHIKIMATO EN CEPAS DE *Escherichia
coli* QUE CARECEN DEL SISTEMA DE FOSFOTRANSFERASA
(PTS)”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
P R E S E N T A:
IBQ. ROCÍO VANESSA CALDERÓN PASCACIO



DIRECTOR DE TESIS:
DR. JOSÉ ADELFO ESCALANTE LOZADA

CUERNAVACA, MORELOS.

2011



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.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. J. Adelfo Escalante Lozada.

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico del CONACyT a través del proyecto Fondo Salud 44126, 126793 y DGAPA PAPIIT IN224709, así como la beca para realizar estudios de posgrado del CONACyT

A la memoria de mis tres tíos más queridos,

Concepción Pascacio Ruíz (1954-2006)

Esteban Pascacio Ruíz (1949-2007)

Magnolia Calderón Muñoz (1938-2008)

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y a mis hermanos, que en ningún momento dejaron de apoyarme.

A los integrantes del laboratorio Bolívar-Gosset, desde técnicos, alumnos y jefazos, que en algún momento me auxiliaron y/o dieron algún consejo o sugerencia para la realización de este trabajo, en especial a la M. en C. Georgina Hernández Chávez por su ayuda técnica en el equipo de HPLC y a Mercedes Enzaldo por su invaluable ayuda, gran ejemplo de trabajo arduo y disposición.

Al dr.E, por haberse aventurado en este trabajo a pesar de que en un principio no tuviéramos mucha idea de hacia a dónde íbamos, también por aguantar todos mis altibajos y no perder la fe en mi.

A mis amigos, que han sido como una familia para mí durante estos años. No quiero nombrarlos para que no se me vaya a escapar alguno con mi memoria de teflón. Solo he de mencionar a Cris y a Paul, creo que sin ellos no habría pasado del primer semestre. Gracias a todos ustedes por tantos buenos momentos, por sus ánimos, por sus consejos, por toda su buena vibra, los quiero.

ÍNDICE

1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. ANTECEDENTES	7
3.1. Importancia del shikimato	7
3.1.1. Biosíntesis de shikimato en <i>E. coli</i>	8
3.2. Estrategias para el aumento en la producción de compuestos aromáticos	9
3.2.1. Aumento de la disponibilidad de PEP	9
3.2.1.1. Re-utilización de piruvato: sobre-expresión de PEP sintasa (<i>pps</i>)	11
3.2.1.2. Eliminación de enzimas consumidoras de PEP	12
a) Inactivación de PEP carboxilasa (<i>ppc</i>)	12
b) Sistema de transporte de azúcares en <i>E. coli</i>	12
c) Mutantes en Piruvato cinasas (<i>pykF</i> y <i>pykA</i>), evitando el flujo de carbono hacia TCA	15
3.2.2. Aumento de la disponibilidad de E4P	16
3.2.3. Enzimas limitantes de la vía	16
3.2.4. Acumulación de shikimato	19
3.3. Cepas productoras de shikimato	20
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVOS	23
5.1. Objetivo General	23
5.2. Objetivos Particulares	24
6. METODOLOGÍA	25
6.1. Cepas bacterianas	25
6.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	25
6.3. Interrupción de las Shikimato cinasas <i>I</i> , <i>II</i> y la Piruvato cinasa <i>I</i>	28
a) <i>aroL</i>	29

b) <i>aroK</i>	29
c) <i>pykF</i>	30
6.4. Amplificación y clonación del gen <i>aroB</i> y <i>aroE</i>	30
6.4.1. Diseño de oligonucleótidos	30
6.4.2. Clonación del gen <i>aroB</i> y <i>aroE</i>	33
6.5. Métodos analíticos	34
6.5.1. Cuantificación de shikimato y otros metabolitos	34
6.5.2. Cuantificación de glucosa	34
7. RESULTADOS Y DISCUSIONES	35
7.1. Construcción de los plásmidos TOPO <i>aroB</i> y TOPO <i>aroBE</i>	35
7.2. Crecimiento y producción de shikimato de la cepa PB12 y cepas sobre- productoras en cultivos en fermentadores	35
7.2.1. Cepa parental PB12	35
7.2.2. Inactivación de las Shikimato cinasas <i>I</i> y <i>II</i>	38
7.2.3. Sobre-expresión de <i>aroG^{fabr}</i> , <i>tktA</i> , <i>aroB</i> y <i>aroE</i> en plásmidos	42
7.2.4. Inactivación de la Piruvato cinasa <i>I</i>	50
7.3. Comparación de la concentración y rendimiento de SHK de las cepas PB12.SA con cepas reportadas	56
8. CONCLUSIONES	58
9. PERSPECTIVAS	59
10. REFERENCIAS	60
11. APÉNDICE	65
11.1. Preparación de células competentes	65
11.2. Electrotransformación	65
11.3. Preparación de ADN plasmídico por lisis alcalina (minipreps)	66
Anexo 1. Producción de fosfato de oseltamivir (Tamiflu [®]) a partir de SHK	67
Anexo 2. Composición del medio de cultivo mínimo ARO	68
Anexo 3. Artículo	69

Índice de tablas

Tabla 1. Cepas de <i>E. coli</i> productoras de SHK	21
Tabla 2. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este estudio	26
Tabla 3. Medio de fermentación	28
Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados en este estudio para la interrupción de <i>aroK</i> , <i>aroL</i> y para la amplificación y clonación de <i>aroB</i> y <i>aroE</i>	32
Tabla 5. Componentes de las reacciones de amplificación de ADN	33
Tabla 6. Velocidad específica de crecimiento y consumo de sustrato en cepas PB12 y las productoras de SHK, PB12.SAn	36
Tabla 7. Características de la mejor cepa reportada para la producción de SHK por Chandran <i>et al.</i> (2003) comparada con las mejores cepas PB12.SAn obtenidas durante este trabajo	57

Índice de figuras

Figura 1. Vía del SHK en <i>E. coli</i>	10
Figura 2. Transporte de glucosa en <i>E. coli</i> mediante el sistema de fosfotrasferasa	14
Figura 3. Modificaciones del metabolismo central de carbono y vía de síntesis de compuestos aromáticos aplicadas para la obtención de una cepa sobre-productora de SHK	18
Figura 4. Ubicación de los genes <i>aroB</i> y <i>aroE</i>	31
Figura 5. Construcción de plásmidos	35
Figura 6. Diagrama de modificaciones de PB12 (JM101/PTS ⁻ , Glu ⁺)	37
Figura 7. Diagrama de modificaciones de PB12.SA1 (PB12/ Δ <i>aroL</i>)	39
Figura 8. Diagrama de modificaciones de PB12.SA2 (PB12.SA1/ <i>aroK::cat</i>)	41
Figura 9. Diagrama de modificaciones de PB12.SA11 (PB12.SA1/pJLBaroG ^{fbr} <i>tktA</i> , TOPO <i>aroB</i>)	43
Figura 10. Diagrama de modificaciones de PB12.SA21 (PB12.SA2/pJLBaroG ^{fbr} <i>tktA</i> , TOPO <i>aroB</i>)	47
Figura 11. Diagrama de modificaciones de PB12.SA22 (PB12.SA2(pJLBaroG ^{fbr} <i>tktA</i> , TOPO <i>aroBE</i>)	49
Figura 12. Diagrama de modificaciones de PB12.SA3 (PB12.SA2/ Δ <i>pykF::gen</i>)	51
Figura 13. Diagrama de modificaciones de PB12.SA31 (PB12.SA3/pJLBaroG ^{fbr} <i>tktA</i> , TOPO <i>aroBE</i>)	55

Abreviaturas

6PG	6-fosfogluconato
AA	aminoácidos aromáticos
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADP	adenosín difosfato
AG	ácido gálico
AQ	ácido quínico
ATP	adenosín trifosfato
CAT	compuestos aromáticos totales
CHO	corismato
DAHP	3-deoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato
DHS	3-dehidroshikimato
DHQ	3-dehidroquinato
DO	densidad óptica
EPSP	5-enolpiruvatoshikimato 3-fosfato
E4P	eritrosa 4-fosfato
fbr	feedback resistance
Fen	fenilalanina
g	gramos
G6P	glucosa 6-fosfato
IVM	ingeniería de vías metabólicas
L	litro
LB	medio de cultivo Luria-Bertani
OAA	oxalacetato
OSF	oseltamivir fosfato
PEP	fosfoenol piruvato
Pir	piruvato
PTS	sistema de fosfotransferasa dependiente de PEP:carbohidrato
R5P	ribulosa 5-fosfato
SHK	shikimato
S3P	SHK 3-fosfato
S-OIV	swine-origin influenza A (H1N1)

TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (de Krebs)
Trp	triptófano
Tyr	tirosina
VPP	vía de las pentosas fosfato

Gen	Codifica para la enzima
<i>aroA</i>	EPSP sintasa
<i>aroB</i>	3-Dehidroquinato sintasa
<i>aroC</i>	Corismato sintasa
<i>aroE</i>	Shikimato deshidrogenasa
<i>aroD</i>	3-Dehidroquinato deshidratasa
<i>aroF</i>	DAHP sintasa
<i>aroG</i>	DAHP sintasa
<i>aroH</i>	DAHP sintasa
<i>aroK</i>	Shikimato cinasa II
<i>aroL</i>	Shikimato cinasa I
<i>galP</i>	Galactosa permeasa
<i>glf</i>	Facilitador de glucosa
<i>glk</i>	Glucocinasa
<i>pck</i>	PEP carboxicinasa
<i>ppc</i>	PEP carboxilasa
<i>ppsA</i>	PEP sintasa
<i>pykA</i>	Piruvato cinasa II
<i>pykF</i>	Piruvato cinasa I
<i>talB</i>	Transaldolasa
<i>tktA</i>	Transcetolasa A
<i>tyrR</i>	Represor transcripcional (tirosina)
<i>trpR</i>	Represor transcripcional (triptófano)

1. RESUMEN

En la cepa de *Escherichia coli* PB12 (PTS⁻ Glu⁺) se analizó el efecto de la interrupción de los genes *aroL*, *aroK* y *pykF*, que codifican para las enzimas Shikimato cinasa I (AroK), Shikimato cinasa II (AroL) y Piruvato cinasa I (PykF), respectivamente, y de la sobre-expresión de los genes *aroG^{fbr}*, *tktA*, *aroB* y *aroE*, que codifican para las enzimas 3-*deoxi-D-arabino*heptulosonato-7-fosfato sintasa (DAHP, AroG^{fbr}), Transcetolasa I (TktA), 3-dehidroquinato sintasa (AroB) y Shikimato deshidrogenasa (AroE), respectivamente, sobre la producción de shikimato (SHK). Utilizando un volumen de trabajo de 0.5L en cultivos en fermentador en lote se obtuvo una concentración máxima de 7.05g/L, lo que equivale a un rendimiento de 0.291 molSHK/molGlu con la cepa PB12 Δ *aroL*, *aroK::cat* transformada con los plásmidos pJLBaroG^{fbr}*tktA* y TOPOaroEB, llamada PB12.SA22. El efecto de la interrupción del gen *pykF*, no benefició la producción de SHK ya que se obtuvo una concentración de 4.83g/L, con un rendimiento del 0.199molSHK/molGlu, tardando 12h más en llegar a estos niveles que la cepa PB12.SA22. El crecimiento y el consumo de glucosa de esta mutante también se vio afectada, lo que podría explicar la baja producción. A pesar de esto, el rendimiento total de compuestos aromáticos en la mutante *pykF* transformada con los plásmidos fue 0.092 molSHK/molGlu mayor que PB12.SA22, llegando a 55.8% del rendimiento máximo teórico (0.86mol/molGlu), indicando que la combinación de la inactivación de PTS y *pykF* resulta en una estrategia exitosa para el mejoramiento de la producción de compuestos aromáticos.

2. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la industria de manufactura de productos farmacéuticos se ha inclinado cada vez más hacia la utilización de la biotecnología como una estrategia de desarrollo sustentable. La idea en esta nueva era es que la materia prima para la producción esté constituida por fuentes renovables, como por ejemplo glucosa y otros azúcares. También, dirigido hacia éste esfuerzo, se ha motivado la sustitución de tecnologías contaminantes por tecnologías amables con el medio ambiente que no generen subproductos tóxicos, que a su vez permitan la recuperación de los productos de una manera eficiente y por lo tanto que se vea reflejado en el aspecto económico.

Existe un gran número de investigaciones en el mundo dedicadas al estudio de la fisiología microbiana, con el propósito de aplicar los conocimientos generados al desarrollo de microorganismos capaces de sintetizar compuestos de interés, que antes solo se podían obtener mediante la síntesis química o la extracción de los compuestos de las plantas que lo contienen. La mayor parte de estas nuevas cepas microbianas aún no alcanzan niveles de producción capaces de competir con los procesos tradicionales, por lo que es necesario seguir mejorándolas.

Actualmente, la posibilidad de producir un metabolito a gran escala puede solucionarse, en parte a través de la ingeniería de vías metabólicas (IVM). La IVM se define como la modificación directa del metabolismo celular y sus propiedades, mediante delección, introducción y/o modificación de vías metabólicas gracias al desarrollo de tecnologías de ADN recombinante y otras técnicas de biología molecular, cuyos objetivos son redirigir los flujos metabólicos para incrementar la producción de metabolitos que el organismo produce, lograr que el organismo produzca nuevos metabolitos, ampliar el

rango de los sustratos que utiliza y/o bloquear las vías de consumo de los compuestos precursores del metabolito (Lee y Papoutsakis, 1999).

La bacteria *Escherichia coli*, ha sido el principal modelo para el estudio del metabolismo de carbono, ya que la red metabólica central en esta bacteria incluye reacciones y rutas generales compartidas por muchos organismos (Flores N, 2005). Esta bacteria ha sido ampliamente utilizada para la producción de metabolitos de interés comercial, tales como, lactato, etanol, ácido acético (AAc), succinato, aminoácidos aromáticos (AA), etc. (Warnecke y Gill, 2005).

Los intermediarios y productos finales de la vía de los AA, son metabolitos por los cuales se tiene un gran interés comercial debido a sus propiedades y aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria. Estos intermediarios pueden ser utilizados como precursores para sintetizar otros compuestos de interés. Por ejemplo, la fenilalanina es materia prima para la elaboración del edulcorante dietético *aspartame*, a través de la tirosina puede formarse melanina y L-DOPA, este último, es un medicamento utilizado contra el mal de Parkinson, el dehidroshikimato (DHS) es un potente antioxidante, entre otros muchos ejemplos (Kedar *et al*, 2007).

El ácido shikímico (SHK) es uno de los intermediarios en la vía de los AA. Dicha vía se encuentra en la mayoría de los microorganismos, plantas, hongos y algunos parásitos como *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, y *Cryptosporidium parvum* (Herrmann y Weaver, 1999; Roberts *et al.*, 2002) y no está presente en mamíferos. El SHK y otros intermediarios de la ruta contienen varios grupos funcionales que son de importancia industrial para la producción de diferentes compuestos químicos como herbicidas, agentes antibacterianos o como el inhibidor de neuraminidasas Tamiflu®

(oseltamivir fosfato, OSF) usado como tratamiento para la influenza. Este virus ha sido identificado como el causante más probable de una futura pandemia de gripe humana (Johansson *et al.* 2005).

En la actualidad, la importancia de este antiviral ha ido en aumento debido al uso que se le ha dado para combatir al virus de influenza humana tipo A - H1N1, también llamado S-OIV, por sus siglas en inglés [Swine-Origin Influenza A(H1N1)]. Este virus ha mostrado sensibilidad hacia los inhibidores de neuraminidasas, no así contra los antivirales del tipo inhibidores de M2 (adamantanos). De los actuales inhibidores de neuraminidasas que han probado ser eficaces, el OSF posee varias ventajas sobre los otros inhibidores, como por ejemplo, es administrado al paciente vía oral (cápsulas) y la administración del zanamivir es vía intranasal (inhalación).

El compuesto antiviral Tamiflu® elaborado por los laboratorios Hoffman- La Roche ha demostrado ser la mejor opción para el tratamiento de la influenza, por lo que al existir el temor de una pandemia de influenza aviar y/o humana, este antiviral ha sido utilizado dentro de la primera línea de defensa, mientras se desarrolla una vacuna contra el virus. Sin embargo, la producción de Tamiflu® solamente cubre aproximadamente el 6.15% del total de la población mundial (http://www.roche.es/noticias/06/mar16_06.htm), por lo cual los investigadores y encargados del área de la salud se preguntan cómo esta compañía podrá producir la cantidad suficiente para ser almacenado y distribuido para ayudar en el control de una pandemia mientras una vacuna es fabricada.

La producción de Tamiflu® está basada en la extracción de SHK de los frutos del anís estrella chino (*Illicium verum* Hook f., Illiciaceae; *bajiao* en mandarín), también conocido comúnmente como badiana. Sin embargo, éste árbol de cerca de 6m de altura,

es notoriamente difícil de cultivar, madura a una velocidad muy lenta y su floración comienza después de 6 años. Otra desventaja es que este árbol solo se cultiva en algunas provincias asiáticas, solamente se cosecha en los meses de marzo y mayo, su cultivo requiere condiciones climáticas específicas (humedad, clima cálido y gran altitud) ambiente que existe en las áreas montañosas chinas donde crece (Factsheet Tamiflu, The Roche Group, 2006, www.roche.com/med_mbtamiflu05e.pdf).

Una alternativa para la obtención de compuestos aromáticos es a través de la IVM de los microorganismos para que estos produzcan los metabolitos deseados. Las principales estrategias de IVM para la producción de AA y sus intermediarios son: incrementar la disponibilidad de precursores del metabolismo central, incrementar el flujo de carbono hacia el producto de interés, eliminar la represión e incrementar la velocidad de transcripción de genes que codifiquen enzimas resistentes a inhibición (Chávez *et al.*, 2005).

En *E. coli* la síntesis del SHK comienza con la condensación de una molécula de fosfoenolpiruvato (PEP) y una de eritrosa 4-fosfato (E4P), que provienen de la glucólisis y la ruta de las pentosas fosfato respectivamente, convirtiéndose en 3-deoxi-D-arabinoheptulosonato 7-fosfato (DAHP), seguido de dos pasos intermediarios hasta llegar a SHK; por lo que una de las estrategias para aumentar la síntesis de AA ha sido la de mejorar la disponibilidad de estos precursores PEP y E4P.

En este trabajo nos enfocamos al estudio del efecto de la expresión e interrupción de algunos genes del metabolismo central y de la vía del SHK, en cepas de *E. coli* PTS⁻ para obtener una mayor concentración y rendimiento en la producción de SHK.

3. ANTECEDENTES

3.1. Importancia del shikimato

Debido a su alta funcionalidad, su anillo de seis carbonos y sus tres centros asimétricos, el SHK puede ser considerado como un precursor de construcción (building block) enantioméricamente puro para la síntesis de compuestos de importancia biológica (Johansson *et al.*, 2005). El SHK ha emergido como una molécula clave para el comienzo en la síntesis del inhibidor de neuraminidasas que fue descubierto por Gilead Sciences y desarrollado por Hoffman-La Roche Pharmaceuticals bajo el nombre de Tamiflu® (Anexo 1), para ser usado oralmente como un compuesto activo antiviral para la prevención y el tratamiento en infecciones de influenza, como la aviar causada por la cepa del virus H5N1 en 1997 (Krämer *et al.*, 2003) o la influenza humana AH1N1 (OMS, 2009).

La producción de Tamiflu® está basada en la extracción de SHK de los frutos del anís estrella chino (*Illicium verum* Hook f.). La extracción de SHK de los frutos del árbol *Illicium* es un proceso complicado de múltiples pasos con un bajo rendimiento (0.1gSHK/g de fruto seco) y costoso, que impide su uso en la síntesis a nivel comercial. Se han propuesto nuevas alternativas para incrementar la capacidad de producción y la disminución de costos de SHK, incluyendo la síntesis química orgánica y métodos basados en la modificación genética de cepas de *E. coli* (Chandran *et al.*, 2003; Draths *et al.*, 1999; Knop *et al.*, 2001).

Para el mejoramiento de la producción de SHK se han desarrollado procesos de producción fermentativa a partir de fuentes renovables y económicas como la glucosa, que presenta una alternativa sostenible para obtener volúmenes comerciales a precios

con un nivel competitivo (Krämer *et al.*, 2003). Además, existen algunos otros productos derivados del SHK que son de interés para la producción de agentes herbicidas y antibacterianos que bloquean la vía del SHK sin tener efectos negativos en mamíferos, el SHK también puede ser usado como un derivado no bencénico para la producción de fenol (Johansson *et al.*, 2005). Otra aplicación del SHK -a menor escala- es su uso como aditivo para alimentos y forrajes (Krämer *et al.*, 2003).

3.1.1 Biosíntesis de shikimato en *E. coli*

La vía del SHK en *E. coli*, inicia con la condensación del PEP proveniente de la glucólisis y la E4P proveniente de la vía de las pentosas fosfato, para generar DAHP, reacción catalizada por cada una de las tres isoformas de la enzima DAHP sintasa AroG, AroF y AroH, codificadas respectivamente por los genes *aroG*, *aroF* y *aroH*, las cuales están sujetas a regulación a nivel transcripcional por represión por los complejos represores *tyrR* y *trpR* (Pittard, 1996; Herrmann y Weaver, 1999; Sprenger, 2007) y por inhibición alostérica. Las DAHP sintasas AroG, AroF y AroH se inhiben por los productos finales de la vía; fenilalanina, tirosina y triptófano, respectivamente. En el siguiente paso de la vía el DAHP es convertido a 3-dehidroquinato (DHQ) por la enzima DHQ sintasa (producto del gen *aroB*), posteriormente el DHQ se convierte en DHS y después a SHK por medio de las enzimas DHQ deshidratasa y la SHK deshidrogenasa producto del gen *aroD* y *aroE*, respectivamente. El siguiente paso es la conversión de SHK en SHK 3-fosfato (S3P) por las enzimas SHK cinasas I y II, codificadas por los genes *aroK* y *aroL*, respectivamente. El S3P es enseguida convertido a 5-enolpiruvatoshikimato-3-fosfato (EPSP) por la acción de la enzima EPSP sintasa codificada por el gen *aroA*, incorporando una molécula de PEP. El último paso en la vía común de los AA es la formación de corismato (CHO) por la CHO sintasa (*aroC*). Este paso es el último de la vía común de los

compuestos aromáticos, en seguida la vía se bifurca hacia la formación de triptófano, fenilalanina y tirosina (figura 1; Herrmann y Weaver, 1999).

3.2. Estrategias para el aumento en la producción de compuestos aromáticos

La principal estrategia para aumentar la producción de compuestos aromáticos ha sido aumentar la disponibilidad de los precursores, PEP y E4P, evitando que estos sean consumidos por otras vías y/o aumentando el flujo de carbono hacia su formación.

3.2.1 Aumento de la disponibilidad de PEP

Una de las principales limitantes para la producción de compuestos aromáticos en microorganismos como *E. coli*, es el bajo flujo de PEP hacia la vía de los AA (Flores *et al.*, 1996). El PEP es un intermediario clave para diversos procesos celulares y es precursor en la síntesis de varios compuestos, no solo para AA, por lo que representa un nodo importante en el metabolismo central (Gosset, 2005). La mayor parte del PEP producido se dirige hacia la formación de piruvato, principalmente a través del sistema de fosfotransferasa (PTS) dependiente de PEP y en menor proporción por las isoenzimas Piruvato cinasas I y II (PykF y PykA). Otra enzima que utiliza el PEP es la PEP carboxilasa, la cual lo convierte en oxalacetato en una de las reacciones anapleróticas que sirven para suplir el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). En estudios anteriores donde se han calculado los flujos metabólicos en *E. coli*, se encontró que el principal consumidor de PEP es el sistema de PTS, donde 50% del PEP producido durante la glucólisis es utilizado por éste sistema para la internalización y fosforilación de la glucosa, seguido de un 16.2% por su conversión a oxalacetato a través de la PEP carboxilasa, 16% se dirige hacia la formación de ácido UDP-*N*-acetilmuránico, 14.5% por PykF y PykA, mientras que solo el 3.3% hacia compuestos aromáticos (Holms, 1996).

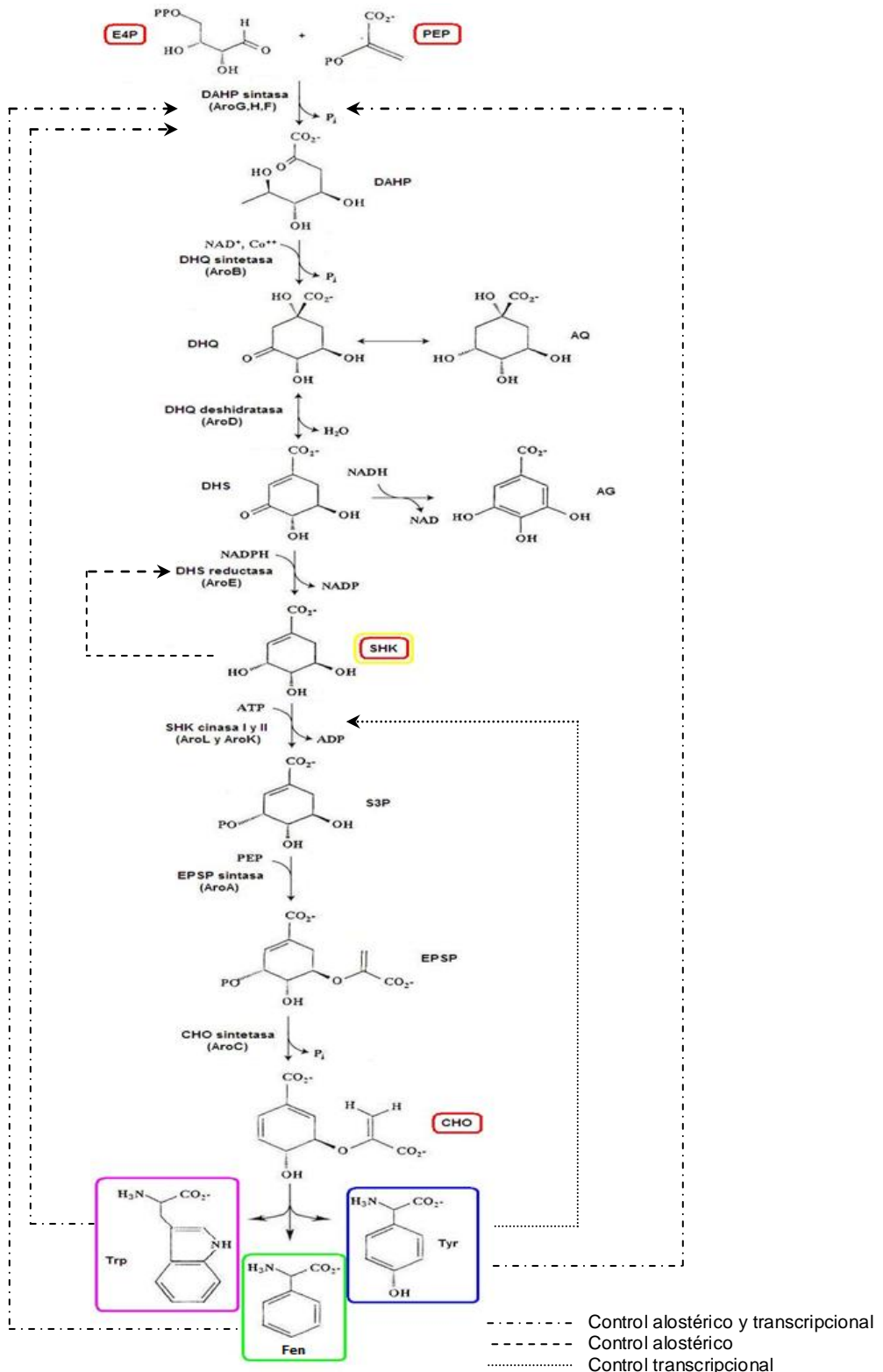


Figura 1. Vía del SHK en *E. coli*. PEP, fosfoenolpiruvato; E4P, eritrosa 4-fosfato; DAHP, 3-deoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato; DHQ, 3-dehidroquinato; AQ, ácido quínico; DHS, 3- dehidroshikimato; AG, ácido gálico; SHK, shikimato; S3P, SHK 3-fosfato; EPSP, 5-enolpiruvatoshikimate-3-fosfato; CHO, corismato; Trp, triptófano; Fen, fenilalanina; Tyr, tirosina (Herrmann, 1999; Krämer *et al.*, 2003).

Para el aumento de la disponibilidad de PEP se han estudiado varias alternativas:

- La sobre-expresión del gen *pps* que codifica la enzima PEP sintasa, la cual genera PEP a partir de piruvato (Patnaik y Liao, 1994; Yi *et al.*, 2002).
- La eliminación de las Piruvato cinasas (Gosset *et al.*, 1996) o la PEP carboxilasa (Miller *et al.*, 1987), enzimas que tienen como sustrato al PEP.
- La eliminación del principal sistema de transporte de azúcares en *E. coli*, PTS, el cual depende de la utilización de una molécula de PEP para fosforilar cada molécula del carbohidrato internalizado (Flores *et al.*, 1996; Gosset *et al.*, 1996, Yi *et al.*, 2003; Chandran *et al.*, 2003), utilizando mecanismos complementarios de transporte, tales como la Galactosa permeasa (*galP*) y el facilitador de glucosa de *Zymomonas mobilis* (*glf*). Estos mecanismos son capaces de transportar la glucosa al interior de la célula de forma pasiva, es decir, sin la necesidad de un gasto de energía; y también la fosforilación de azúcares mediante una glucocinasa (*glk*) para transformar la glucosa en glucosa-6 fosfato a través del gasto de una molécula de ATP (Chandran *et al.*, 2003).

3.2.1.1 Re-utilización de piruvato: sobre-expresión de PEP sintasa (*pps*)

Se ha estudiado una forma de obtener PEP a partir del piruvato formado principalmente por la acción del sistema PTS, esto es a través de su reutilización mediante la acción de la enzima PEP sintasa (Patnaik y Liao, 1994; Yi *et al.*, 2002). En condiciones normales, *E. coli* no lleva a cabo esta reacción debido al costo energético que tiene. Estudios anteriores, en donde se ha alterado la expresión de *pps*, se observaron rendimientos muy cercanos al rendimiento máximo teórico de la síntesis de DAH (DAH desfosforilado) en células suspendidas en medio mineral en matraces (Patnaik y Liao, 1994). En estudios posteriores, se midió el impacto de la sobre-expresión de *pps* en la producción de DHS en cultivos alimentados en fermentadores de 2L, en medio mínimo

con glucosa como única fuente de carbono, manteniendo una temperatura de 36°C y pH 7.0. En este estudio, realizado por Yi *et al.* (2002), se logró un rendimiento de compuestos aromáticos totales (CAT) en cultivos alimentados de 0.51 mol/mol de DHS+AG+DHQ+DAH (en dicho estudio incluyeron DAH, que aunque no es un compuesto aromático, es el primer producto de la vía) y se vio una baja producción de acetato (0.30g/L).

3.2.1.2 Eliminación de enzimas consumidoras de PEP

a) Inactivación de PEP carboxilasa (*ppc*)

La enzima PEP carboxilasa, codificada por el gen *ppc*, cataliza la conversión de PEP a oxalacetato. La inactivación de este gen dio como resultado una cepa que al ser cultivada en fermentadores de 2L, en medio mineral suplementado con succinato, a una temperatura de 34°C y un pH entre 6.8-7.1, produjo 6 veces más fenilalanina que su control *ppc*⁺, pero con el inconveniente de la formación de subproductos indeseados como acetato y piruvato. La producción de fenilalanina fue 10 veces menor a la producción de acetato, aunado a esto la cepa genera menos biomasa (Miller *et al.*, 1987).

b) Sistema de transporte de azúcares en *E. coli*

La disponibilidad de fuente de carbono, así como la ausencia o presencia de nitrógeno, oxígeno y otros nutrientes, son las principales señales ambientales que determinan los ajustes metabólicos necesarios para la adaptación de las redes metabólicas a una condición fisiológica en bacterias (Flores, 2005). Las bacterias tienen sistemas sensores que monitorean a su alrededor y gracias a ello pueden inducir o reprimir sistemas genéticos para la utilización de un gran número de fuentes de carbono, detectar gradientes de concentración de nutrientes, adaptarse a cambios osmóticos, a condiciones de estrés, a cambios de ambiente aeróbico o anaeróbico, a limitación de

nutrientes, etc. (Flores, 2005). Varios de estos sistemas sensores tienen en común la fosforilación de proteínas en un residuo de histidina, serina o ácido aspártico. A este tipo de sistemas sensores se les denomina sistemas de dos componentes, en el que uno de los componentes es el sensor y el otro es el regulador de la respuesta celular. Uno de estos sistemas sensores de dos componentes y el principal regulador de la represión catabólica es el de PTS de carbohidratos dependientes de PEP (Nam *et al.*, 2001).

En *E. coli*, el transporte de azúcares y en particular de glucosa, se lleva a cabo por PTS dependiente de PEP:carbohidrato (figura 2). Además de esta función, PTS forma parte de un sistema global de regulación metabólica; regula los procesos de represión catabólica y participa como elemento transductor de señales en la quimiotaxis (Postma *et al.*, 1996). No obstante la importancia PTS dentro de la fisiología normal de *E. coli*, la dependencia sobre la utilización de PEP para el transporte de azúcares, constituye una desventaja para fines biotecnológicos para la producción de metabolitos de interés, ya que el PEP junto con la E4P son precursores directos de compuestos aromáticos. En cepas silvestres de *E. coli* el PEP es utilizado principalmente para el transporte de glucosa (50%), mientras que las reacciones catalizadas por la PEP carboxilasa, Piruvato cinasas, UDP-N-acetilglucosamina enolpiruvil transferasa y DAHP sintasa consumen aproximadamente 16%, 15%, 16% y 3% de este compuesto, respectivamente (Gosset, 2005).

Partiendo de la necesidad de disponer de más PEP para la ruta de biosíntesis de compuestos aromáticos, a partir de la cepa silvestre de *E. coli* JM101 se obtuvo la cepa PB11 (PTS⁻) al eliminar los genes *ptsH*, *ptsI* y *crr*, la cual crece lentamente en comparación con JM101 bajo las mismas condiciones de cultivo ($\mu = 0.71$ vs 0.10). A partir de esta mutante y por medio de cultivos en quimiostato en medio mínimo con glucosa

como única fuente de carbono, se aislaron las cepas PB12 y PB13, capaces de crecer en glucosa (PTS⁻Glu⁺) a velocidades mayores que la cepa progenitora PB11 (0.42 y 0.49, respectivamente). Estas cepas utilizan la Permeasa de galactosa (GalP) y la Glucocinasa (GlcK) para transportar y fosforilar la glucosa, respectivamente (Flores *et al.*, 1996; Flores, 2005).

Como parte de la caracterización fisiológica de estas cepas, se ha demostrado que la cepa PB12 posee el potencial para la síntesis de compuestos aromáticos con un alto rendimiento a partir de glucosa, asimismo, se ha visto que esta cepa posee una baja tasa de formación de ácido acético (Gosset *et al.*, 1996), compuesto el cual es tóxico en altas concentraciones para *E. coli* (40g/L, Miller *et al.*, 1987).

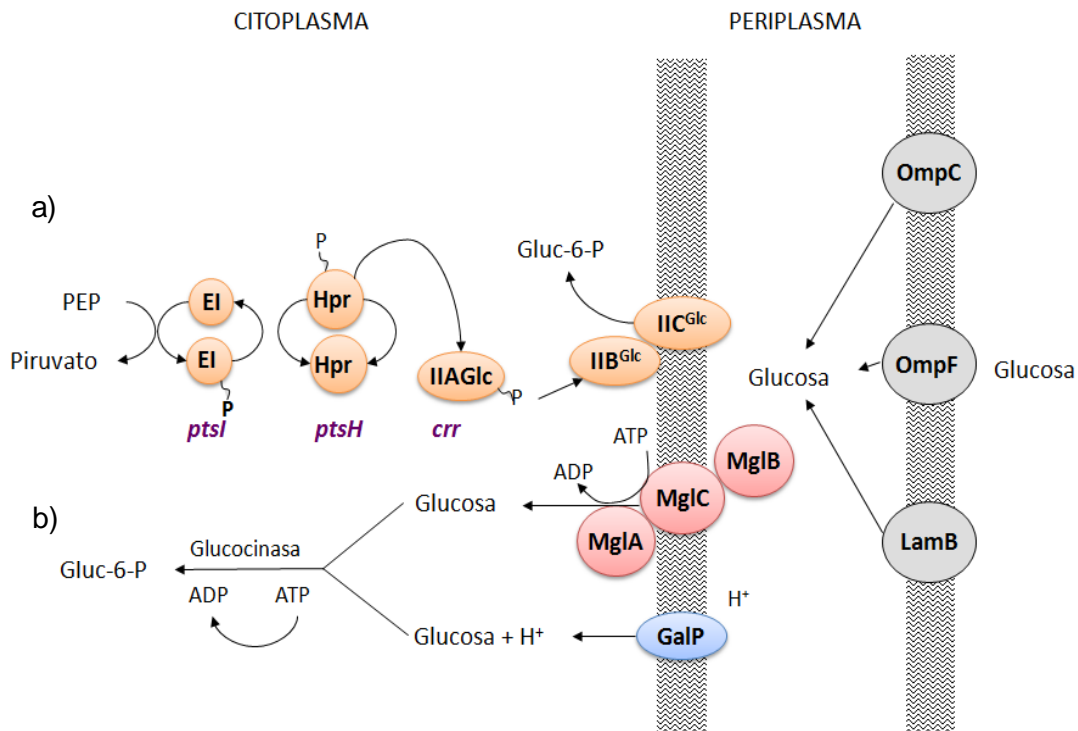
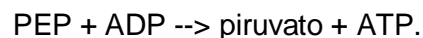


Figura 2. Transporte de glucosa en *E. coli* mediante el sistema de fosfotransferasa
a) transporte de glucosa en la cepa silvestre, b) transporte de glucosa en la cepa PB12 (PTS⁻Glu⁺)
MgIA, MgIB, MgIC: transportador tipo ABC de galactosa; OmpC, OmpF, LamB: porinas; GalP: galactosa permeasa; EI, EIIA, EIIB, EIIC, Hpr: sistema de transporte de azúcares dependiente de PEP. Modificado de Gosset (2005).

c) Mutantes en Piruvato cinasas I y II (*pykF* y *pykA*), evitando el flujo de carbono hacia TCA

En la obtención de energía e intermediarios importantes para la célula, se utiliza el PEP proveniente de la glucólisis convirtiéndolo a piruvato mediante las Piruvato cinasas I y II (PykF y PykA) para entrar al TCA o ser canalizado a la síntesis de otros aminoácidos no aromáticos. Las Piruvato cinasas I y II difieren en sus propiedades físicas y químicas así como en su comportamiento cinético. La reacción que cataliza esta enzima es:



Si bien las dos enzimas están bajo un control genético independiente, ellas coexisten en un amplio rango de estados nutricionales y metabólicos. Ambas muestran efectos positivos cooperativos con respecto al sustrato PEP. La Piruvato cinasa I de *E. coli*, a diferencia de la Piruvato cinasa II, es extraordinariamente estable. La Piruvato cinasa I es fuertemente activada por fructosa- 1,6-bisfosfato y muestra una cinética sigmoideal con respecto a su sustrato, PEP (www.ecocyc.org).

Evitar la utilización del PEP, que en su mayoría es consumido por el sistema de PTS, puede llevarse a cabo mediante la interrupción de una o ambas de las Piruvato cinasas (codificadas *pykA* y *pykF*) (Ponce *et al.*, 1995; Berry, 1996; Gosset *et al.*, 1996). La obtención de mutantes simples o una doble mutante en estos genes cuando las células carecen de PTS afecta considerablemente al crecimiento de la célula, siendo éste nulo cuando se cultiva en un medio mínimo mineral. Éste problema puede compensarse mediante la utilización de otras fuentes de carbono para obtener el piruvato por otras vías, como por ejemplo el gluconato que puede ser transportado dentro de la célula y convertirse a gluconato-6-fosfato para después convertirse a 2-ceto-3-deoxigluconato 6-fosfato y luego a piruvato, esto último aunado al uso de arabinosa, que puede entrar a la

vía de las pentosas fosfato para la obtención de E4P, pueden mejorar la producción de compuestos aromáticos (figura 3, Ponce *et al.*, 1995).

La eliminación de estas enzimas se ha evaluado midiendo la capacidad de producción de DAHP en medio Luria-Bertani (LB) (Gosset *et al.*, 1996). Las mutantes simples de *pykF* o *pykA* mostraron un aumento de 5.8 y 2.8 veces, respectivamente, en el flujo de carbono hacia aromáticos, mientras que la mutante doble incrementó la producción de DAHP casi 20 veces con respecto a la cepa parental.

3.2.2 Aumento de la disponibilidad de E4P

Otra molécula limitante para la síntesis de compuestos aromáticos es la E4P. Se han desarrollado estrategias para aumentar la disponibilidad de E4P mediante la sobre-expresión de los genes *tktA* y *talB*, que codifican para la Transcetolasa A y una transaldolasa, respectivamente, enzimas de la ruta no oxidativa de las pentosas fosfato (VPP). Estas enzimas catalizan las reacciones que conducen a la fructosa-6-fosfato y al gliceraldehído-3-fosfato ligando la vía glucolítica hacia E4P de la VPP (Bongaerts *et al.*, 2001). Se ha demostrado que la sobre-expresión de la Transcetolasa A incrementa el flujo de carbono hacia la vía de los AA, aunque la transaldolasa incrementa el flujo hacia aromáticos se ha visto que es menos efectiva que la transcetolasa (Gosset *et al.*, 1996; Draths *et al.*, 1992; Knop *et al.*, 2001).

3.2.3 Enzimas limitantes de la vía

Estudios anteriores han demostrado que para que el PEP con la E4P se conviertan en DAHP de forma eficiente, se tienen que sobre-expresar alguno de los genes que codifican para las isoenzimas DAHP sintasas resistentes a inhibición (*fbr*, por sus siglas en inglés, y codificadas por los genes *aroG^{fbr}*, *aroF^{fbr}* y *aroH^{fbr}*, respectivamente), ya que,

como se mencionó anteriormente, estas enzimas se inhiben con los productos finales de la vía; fenilalanina, tirosina y triptófano, respectivamente, siendo entonces la DAHP sintasa la primera enzima limitante de la vía.

El incremento en el número de copias o en el nivel de transcripción de las DAHP sintasas aumentan el flujo de carbono hacia la biosíntesis de compuestos aromáticos, pero también se requiere que la DAHP sintasa sea resistente a inhibición por retro-alimentación (*feedback resistant*, *fbr*) de sus efectores alostéricos. Muchas mutantes de DAHP sintasas resistentes a inhibición por retro-alimentación han sido descritas y secuenciadas (Ray *et al.*, 1988, Weaver y Herrmann, 1990). Estas DAHP sintasas resistentes a inhibición fueron inicialmente identificadas por la resistencia que ellas conferían a los análogos tóxicos de los AA. Una vez conocidas las mutaciones específicas que le conferían insensibilidad alostérica, más mutaciones fueron introducidas por mutagénesis sitio-dirigidas para mejorar esta característica (LaDuca *et al.*, 1999).

Se ha observado en mutantes de *E. coli* PTS⁻Glu⁺, que expresan simultáneamente los genes *aroG^{fbr}* y *tktA*, que son capaces de canalizar el flujo de carbono hacia la ruta del SHK, mostrando incrementos de 3.7 veces la producción de DAHP sintetizados a partir de glucosa (Gosset *et al.*, 1996; Báez-Viveros *et al.*, 2004).

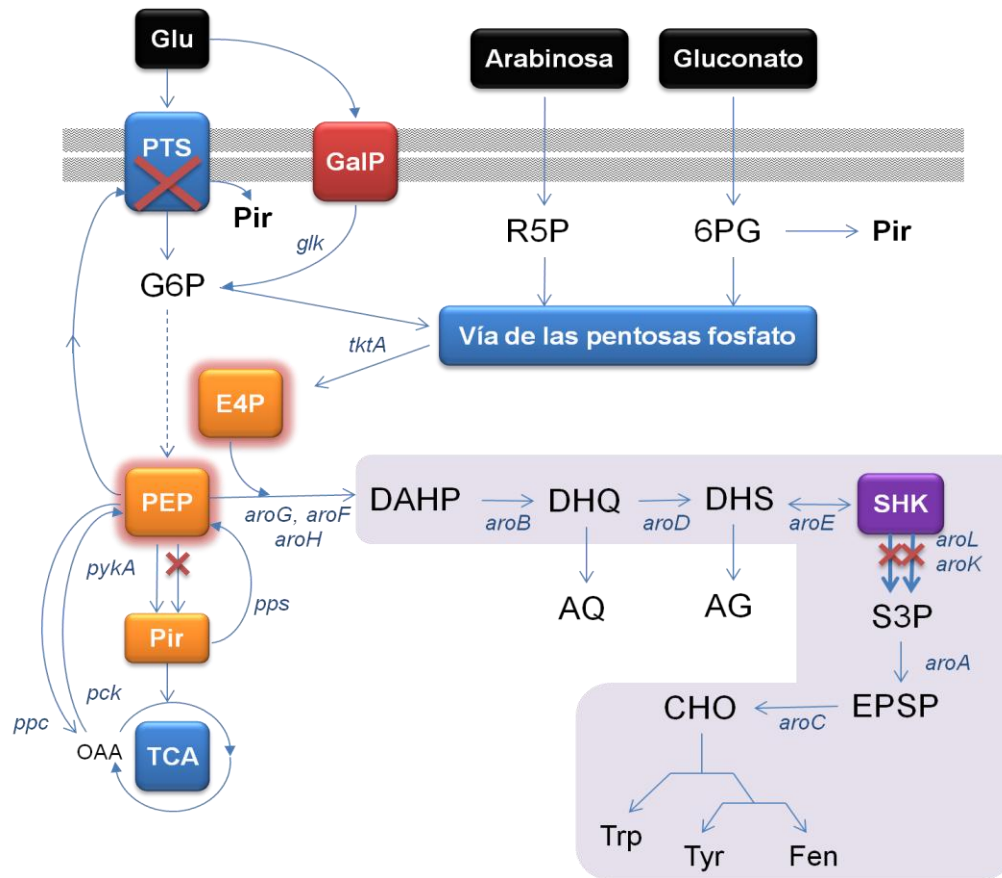


Figura 3. Modificaciones del metabolismo central de carbono y vía de síntesis de compuestos aromáticos aplicadas para la obtención de una cepa sobre-productora de SHK. PTS, sistema de fosfotransferasa; GalP, galactosa permeasa; PEP, fosfoenolpiruvato; G6P, glucosa-6-fosfato; E4P, eritrosa-4-fosfato; R5P, ribulosa-5-fosfato; 6PG, 6-fosfogluconato; Pir, piruvato; S3P, SHK 3-fosfato; EPSP, 5-enolpiruvatoshikimato-3-fosfato; TCA, ciclo de los ácidos tricarboxílicos; OAA, oxalacetato; DAHP, 3-deoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato; DHQ, 3-dehidroquinato; DHS, 3-dehidroshikimato; AQ, ácido quínico; SHK, shikimato; AG, ácido gálico; CHO, corismato; Trp, triptófano; Fen, fenilalanina; Tyr, tirosina y los genes: *glk*, glucocinasa; *tktA*, transcetolasa A; *pykF*, *pykA*, Piruvato cinasa I y II; *pps*, PEP sintasa; *ppc*, PEP carboxilasa; *pck*, PEP carboxinasa; *aroG*, *aroF*, *aroH*, DAHPs sintasas; *aroB*, DHQ sintasa; *aroD*, DHQ deshidratasa; *aroE*, SHK deshidrogenasa; *aroK*, *aroL*, SHK cinasas I, II; *aroA*, EPSP sintasa; *aroC*, CHO sintasa.

La siguiente enzima que limita la producción de SHK es la DHQ sintasa codificada por el gen *aroB*, la cual convierte el DAHP formado en la reacción anterior en DHQ. Cuando hay un exceso en la formación de DAHP en las células, estas lo desfosforilan convirtiéndolo en DAH y lo excretan al medio, perdiendo así una gran cantidad del DAHP ya ganado con la sobre-expresión de otras enzimas (Dell y Frost, 1993). Lo que se ha hecho en este caso es insertar directamente al cromosoma una copia extra de *aroB*, lo

cual ha probado ser más que suficiente para contender con esta limitante (Li *et al.*, 1999; Draths *et al.*, 1999; Knop *et al.*, 2001; Chandran *et al.*, 2003).

La sobre-expresión de las enzimas DAHP sintetas resistentes a inhibición y la transcetolasa con el fin de producir SHK, ha permitido observar una gran acumulación de DHS, esto se explica con el hecho de que la enzima SHK deshidrogenasa (AroE) es inhibida por SHK y puede revertir la reacción convirtiendo el SHK producido nuevamente en DHS o simplemente ya no convierte al DHS en SHK, la solución ha sido la sobre-expresión de *aroE* para evitar la acumulación de DHS y mejorar la producción de SHK (Li *et al.*, 1999; Draths *et al.*, 1999; Knop *et al.*, 2001; Chandran *et al.*, 2003).

3.2.4 Acumulación de shikimato

Para lograr la acumulación de SHK se han evaluado dos alternativas. La mejor ha sido bloquear la vía de los AA después de la biosíntesis del SHK mediante la eliminación del paso metabólico hacia el S3P catalizado por las isoenzimas SHK cinasas I y II, codificados por los genes *aroK* y *aroL*, respectivamente. Esto ha sido realizado en cepas de *E. coli* en las que se han interrumpido ambos genes (Draths *et al.*, 1999; Bongaerts *et al.* 2001). Consecuentemente, para el crecimiento de estas bacterias se requiere satisfacer la auxotrofía generada mediante la adición de vitaminas y AA (figura 3). Para evitar dicha auxotrofía se ha estudiado la posibilidad de solo eliminar la SHK cinasa que presenta mayor afinidad por el sustrato (AroL, SHK cinasa II) con la hipótesis de que la eliminación de *aroL* y mantener *aroK* permitiría un pequeño flujo a través de la vía después del SHK y la adición de vitaminas y AA sería innecesaria (Johansson *et al.*, 2005).

La otra alternativa para la acumulación de SHK es realizada por cepas deficientes de la EPSP sintasa, codificada por el gen *aroA* (ver figura 3), las cuales bloquean la ruta de los AA después de la producción de S3P, presumiblemente, la actividad fosfatasa de la bacteria convierte el S3P en SHK (Iomantas *et al.*, 2002).

3.3. Cepas productoras de SHK

Existen varios ejemplos de esfuerzos realizados por IVM en *E. coli* para producir SHK, los más destacados se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Cepas de *E. coli* productoras de SHK.

Modificaciones genéticas / condición de cultivo	SHK	Rendimiento total	Referencia
	(g/L)	(%) (molSHK/molGlu)	
SP1.1 (RB791 <i>serA::aroB aroL478::Tn 10, aroK17::Cm^R</i>) / pKD12.112 (Ap ^R , <i>aroF^{FBR}</i> , P _{tac} <i>aroE serA</i>)*	27	14	Draths <i>et al.</i> , 1999
SP1.1 / pKD12.138 (pKD12.112 <i>tktA⁺</i>)*	28	14	Knop <i>et al.</i> , 2001
SP1.1 <i>shiA</i> (SP1.1 <i>shiA::Kan^R</i>)*	23	NR	
SP1.1 / pKD12.138* adición de 1 mM metil- α -glucopiranosido	35	19	
SP1.1 / pKD12.138* cultivos ricos en glucosa (140mM)	52	18	
JB4 (KL3 <i>aroE353 serA::aroB aroL⁻ aroK17::Cm^R aroD25::Tn 10</i>) / pJB5.291 (Cm ^R <i>aroF^{FBR} tktA serA N. tabaccum aroD.E</i>)*	34	18	
SP1.1 / pKD15.071B (<i>aroF^{FBR} tktA serA P_{tac}aroE pps</i>)*	66	23	Chandran <i>et al.</i> , 2003
SP1.1 / pSC5.112B (<i>aroF^{FBR} tktA serA P_{tac}aroE glf</i>)*	70	24	
SP1.1 / pSC6.090B (<i>aroF^{FBR} tktA serA P_{tac}aroE glf glk</i>)*	46	21	
SP1.1 <i>pts</i> (SP1.1 Δ <i>ptsH ptsI crr</i>) / pSC6.090B*	71	27	
SP1.1 <i>pts</i> / pSC6.090B suplementado con 15g/L de extracto de levadura en fermentadores de 10L	84	33	

* se cultivaron en fermentadores de 1L, en cultivos alimentados, medio mineral suplementado con vitaminas y AA, pH 7.0, a 33°C, 300rpm y 0.5vvm
 NR: no reportado

4. HIPÓTESIS

En la cepa de *Escherichia coli* PB12 (PTS⁻Glu⁺), se producirá una mayor concentración de SHK como resultado del aumento de la disponibilidad de los precursores PEP-E4P y la interrupción en el flujo de SHK hacia corismato. Además, la interrupción de *pykF* permitirá una mayor producción de SHK al evitar parcialmente el flujo de carbono hacia TCA.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la sobre-expresión e interrupción de genes del metabolismo central de carbono y de la vía común de síntesis de aromáticos en la cepa *E. coli* PB12 (PTS⁻Glu⁺) para obtener una cepa sobre-productora de SHK.

5.2 Objetivos particulares

- Obtener una cepa de *E. coli* PB12 que acumule shikimato por interrupción de los genes *aroL* y *aroK* que codifican para las enzimas Shikimato cinasa I y II, respectivamente (PB12 Δ *aroL* y Δ *aroK*).
- Introducción de una copia adicional de los genes *aroG^{frb} tktA*, que codifican para una DAHP sintasa resistente a inhibición y la Trancetolasa A, respectivamente, por transformación de la cepa PB12 Δ *aroL* y Δ *aroK* con el plásmido pJLBaroG^{frb}*tktA*.
- Introducción de una copia adicional de los genes *aroB* y *aroE*, que codifican para la DHQ sintasa y la Shikimato deshidrogenasa, respectivamente, por transformación de la cepa PB12 Δ *aroL* y Δ *aroK* pJLBaroG^{frb}*tktA* con el plásmido TOPO*aroEB*.
- Evaluar las cepas generadas bajo las mismas condiciones de cultivo para compararlas en cuanto a su crecimiento y al rendimiento en la biosíntesis de SHK y otros compuestos aromáticos en sistemas de fermentación en lote, para seleccionar la mejor cepa productora de SHK.
- Generar mutante sencilla de la Piruvato cinasa I (*pykF*) a partir de la mejor cepa sobreproductora de SHK transformada con pJLBaroG^{frb}*tktA* y TOPO*aroEB* y evaluar su producción de SHK bajo condiciones de fermentación en lote.

6. METODOLOGÍA

6.1 Cepas bacterianas

La descripción de las características de las cepas de *E. coli* y los plásmidos utilizados en este trabajo se enlistan en la tabla 2.

6.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Todos los cultivos se realizaron de la siguiente forma. Se preparó un precultivo inoculando con una asada del glicerol (conservado a -70°C), en matraces Erlenmeyer bafleados (Eb) de 125mL con 10mL de medio LB con el antibiótico correspondiente a cada cepa en la concentración adecuada (tabla 2), e incubando a una temperatura de 37°C , 300rpm, durante 12 horas (h). De este cultivo se tomaron 150 μL para inocular un matraz Eb de 250mL con 50mL de medio de fermentación (tabla 2). A este cultivo se le midió la densidad óptica a 600nm ($\text{DO}_{600\text{nm}}$, Beckman DU[®]-70 Spectrophotometer, Palo Alto, CA) y se realizaron los cálculos para obtener una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ inicial de 0.35 para inocular los cultivos en fermentador.

Tabla 2. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este estudio

Cepas	Características relevantes	Referencias
<i>E. coli</i> JM101	F ⁺ <i>traD36 proA⁺ proB⁺ laq^f lacZΔM15/supE, thi, Δ(lac-proAB)</i>	Bolívar <i>et al.</i> , 1977
JM101 <i>aroK</i> ⁻	<i>E. coli</i> JM101 Δ <i>aroK::cat</i> Cm ^R (10 μg/ml)	Este trabajo
PB103B	PB103 <i>aroB::cat</i> Cm ^R (10 μg/ml)	Báez-Viveros <i>et al.</i> , 2001
<i>E. coli aroE</i> ⁻	<i>E. coli</i> K12 BW25113 Δ <i>aroE::kan</i> Km ^R (30 μg/ml)	Baba <i>et al.</i> , 2006
<i>E. coli</i> PB12	JM101 Δ(<i>ptsH, ptsI, crr</i>):: <i>kan</i> Glu ⁺ Km ^R (30 μg/ml)	Flores <i>et al.</i> , 1996
<i>E. coli</i> PB28	PB12 Δ <i>pykA::cat, ΔpykF::gen</i> Cm ^R (10 μg/ml) Gm ^R (10 μg/ml)	Ponce <i>et al.</i> , 1995
PB12.SA1	PB12 Δ <i>aroL</i> Km ^R (30 μg/ml)	Este trabajo
PB12.SA11	PB12.SA1/ pJLBaroG ^{trb} <i>tktA</i> Tc ^R TOPO <i>aroB</i> Zn ^R Km ^R (30 μg/ml) Tc ^R (30 μg/ml) Zn ^R (25 μg/ml)	Este trabajo
PB12.SA2	PB12.SA1 Δ <i>aroK::cat</i> Km ^R (30 μg/ml) Cm ^R (10 μg/ml)	Este trabajo
PB12.SA21	PB12.SA2/ pJLBaroG ^{trb} <i>tktA</i> Tc ^R TOPO <i>aroB</i> Zn ^R Km ^R (30 μg/ml) Cm ^R (10 μg/ml) Tc ^R (30 μg/ml) Zn ^R (25 μg/ml)	Este trabajo
PB12.SA22	PB12.SA2/ pJLBaroG ^{trb} <i>tktA</i> Tc ^R TOPO <i>aroEB</i> Zn ^R Km ^R (30 μg/ml) Cm ^R (10 μg/ml) Tc ^R (30 μg/ml) Zn ^R (25 μg/ml)	Este trabajo
PB12.SA3	PB12.SA2 <i>pykF::gen</i> Km ^R (30 μg/ml) Cm ^R (10 μg/ml) Tc ^R (30 μg/ml) Zn ^R (25 μg/ml) Gm ^R (10 μg/ml)	Este trabajo
PB12.SA31	PB12.SA3/ pJLBaroG ^{trb} <i>tktA</i> Tc ^R , TOPO <i>aroEB</i> Zn ^R Km ^R (30 μg/ml) Cm ^R (10 μg/ml) Tc ^R (30 μg/ml) Zn ^R (25 μg/ml) Gm ^R (10 μg/ml)	Este trabajo
<i>E. coli</i> TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG</i>	Invitrogen
Plásmidos		
pJLBaroG ^{trb} <i>tktA</i>	pJLBaroG ^{trb} (<i>aroG</i> ^{trb} bajo el control del promotor <i>lacUV5</i> , los genes <i>lac^f</i> y <i>tet</i> . Origen de replicación de pACYC184) conteniendo el gen <i>tktA</i>	Báez-Viveros <i>et al.</i> , 2004; Balderas-Hernández <i>et al.</i> , 2009
TOPO <i>aroB</i>	pCR [®] -Blunt II-TOPO [®] [Invitrogen™, 3.5Kb, gen letal <i>ccdB</i> , región operadora/promotora <i>lac</i> , Km ^R , Zn ^R , origen pUC] <i>aroB</i>	Este trabajo
TOPO <i>aroEB</i>	TOPO <i>aroB</i> + <i>aroE</i>	Este trabajo
pKD46	Contiene los genes <i>exo</i> , <i>bet</i> y <i>gam</i> de la recombinasa del fago λ. Promotor inducible por arabinosa (pBAD).	Datsenko y Wanner., 2000
pKD3	Porta el gen de resistencia a cloramfenicol flanqueado por regiones FRT.	Datsenko y Wanner., 2000

Para el desarrollo de los cultivos en fermentador en sistema lote, se utilizaron bioreactores de un litro marca Applikon (Schiedam, The Netherlands) equipado con las consolas: ADI 1010 BioControler y ADI 1025. Los cultivos de cada cepa se hicieron por duplicado y cada fermentador fue inoculado con la cantidad calculada para una DO_{600nm} inicial de 0.35. La fermentación se mantuvo durante 50h, excepto para el caso de la mutante *pykF* que se mantuvo durante 72h, a una temperatura de 37°C y un pH de 7.0 controlado mediante la adición de NH_4OH al 2.8-3.0%, la agitación osciló entre 500-700rpm para mantener los niveles de oxígeno disuelto a no menos de 20%, la aireación fue de 1vvm (volumen de aire por volumen de medio por minuto).

La composición del medio de cultivo utilizado para los experimentos en fermentador se enlistan en la tabla 3. Los primeros cuatro compuestos de la tabla se mezclan, se ajusta el pH y se esterilizan en autoclave. Los siguientes cuatro compuestos se esterilizan por separado por filtración. Los elementos traza se mezclan y se esterilizan. Una vez estériles todos los componentes del medio se mezclan en las cantidades adecuadas dependiendo de la cantidad requerida. Este medio es el reportado por Li *et al.* (1999) para la producción de DHS y es el que se ha seguido utilizando para la producción de otros metabolitos aromáticos por el grupo de trabajo del Ph.D. J.W. Frost de la Universidad de Michigan (Li *et al.*, 1999; Draths *et al.*, 1999; Knop *et al.*, 2001; Chandran *et al.*, 2003).

Durante la fermentación se midió la DO_{600nm} cada hora durante las primeras 8 horas y a partir de este punto, cada 6 horas hasta 50 horas de cultivo. Para la determinación de SHK y otros intermediarios de la vía, se tomó 1.5mL de muestra y se centrifugó a 12000rpm durante 5 minutos (Centrifuga Eppendorff 5410, Brinkman Instruments Inc., Westbury, USA), el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se

congeló a -20°C para su análisis posterior. Se realizaron fermentaciones con y sin la adición de IPTG para inducir la transcripción de los genes de los plásmidos.

Tabla 3. Medio de fermentación (Li *et al.*, 1999).

Composición	g/L
K ₂ HPO ₄	7.5
Cit. Amonio Fe III	0.3
Ácido Cítrico	2.1
H ₂ SO ₄	1.2(mL)
Extracto de levadura (YE)	15.0
Glucosa	25.0
MgSO ₄	0.2465
CaCl ₂	0.0147
Vitamina B ₁	0.0001
Elementos traza	mg/L
(NH ₄) ₆ (Mo ₇ O ₂₄).4H ₂ O	3.7
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2.9
H ₃ BO ₃	24.7
CuSO ₄ .5H ₂ O	2.5
MnCl ₂ .4H ₂ O	15.8
Inductor	
IPTG (isopropil-β-D-tio-galactósido)	0.1mM

6.3 Interrupción de las Shikimato cinasas I y II y la Piruvato cinasa I

E. coli PB12 fue usada como la cepa parental para la interrupción de los genes *aroL* y *aroK*, que codifican para las SHK cinasas I y II, respectivamente, y la interrupción de *pykF*, que codifica para la Piruvato cinasa I. La amplificación de estos genes fueron llevados a cabo con la DNA polimerasa *Pfu* (Fermentas, Glen Burnie, MD) de acuerdo a las recomendaciones del proveedor (tabla 5) en un termociclador Perkin-Elmer (Roche, Indianapolis, IN). Los juegos de oligonucleótidos empleados para la amplificación de los genes antes mencionados están enlistados en la tabla 4. Los productos de PCR fueron analizados por tamaño mediante electroforesis en gel (agarosa al 1%). Cuando fue requerido, los productos amplificados fueron purificados cortando la banda

correspondiente al tamaño deseado directamente de los geles de agarosa usando el kit de purificación “AxyPrep™ DNA Gel Extraction Kit” (Axygen Biosciences, Union City, CA).

- a) *aroL*:** Fue inactivado por el método de “inactivación de genes cromosomales en un solo paso por productos de PCR” desarrollado por Datsenko y Wanner (2000). El juego de oligonucleótidos *aroLcmFw* y *aroLcmRv* (tabla 4) fue usado para la amplificación del cassette de resistencia a cloramfenicol (*cm*) codificado por el gen *cat*, flanqueado por los sitios FRT requeridos para la recombinación mediada por la recombinasa λ Red con regiones homologas (H) de la región 5'-(H1) y 3'-(H2) de *aroL*, incluyendo los codones de inicio y paro, respectivamente (H1 *aroL*-FRT-*cm*-FRT-H2 *aroL*). La preparación de células electrocompetentes, transformación y selección de colonias positivas fueron llevadas a cabo como lo describen previamente (Datsenko y Wanner 2000). El genotipo Δ *aroL*::*cat* fue verificado por el crecimiento de colonias en cajas de medio LB (agar) suplementados con *cm*, *cat* fue removido de dicha construcción para facilitar la subsecuente inactivación de *aroK*. El genotipo *aroL*⁻ fue confirmado por PCR, el tamaño del producto esperado fue verificado por electroforesis en gel de agarosa al 1%. A la mutante que resultó se le designó como PB12.SA1.
- b) *aroK*:** este gen fue inactivado como se describió anteriormente para PB12.SA1, con la diferencia que primero se inactivó *aroK* en la cepa silvestre JM101 usando el juego de oligonucleótidos *aroKcmFw* y *aroKcmRv* (tabla 4). El genotipo Δ *aroK*::*cat* fue confirmado por PCR y electroforesis en gel de agarosa. Esta mutación fue entonces transducida por el fago P1 en PB12.SA1 para obtener a la PB12.SA2. La verificación de Δ *aroK*::*cat* se hizo de manera similar como se verificó PB12.SA1.

c) *pykF*: fue interrumpido con la construcción $\Delta pykF::gen$ (cassette de resistencia a gentamicina) transducida por el fago P1 a la PB12.SA2 utilizando el ADN cromosomal de la cepa de *E. coli* PB28 que tiene dicha mutación (Ponce *et al.*, 1995). Las mutantes fueron seleccionadas para el fenotipo *gen*⁺ por su crecimiento en cajas de LB suplementadas con gentamicina (gm). El genotipo fue verificado de la misma forma por PCR y electroforesis en gel de agarosa. La mutante resultante se le designó como PB12.SA3.

6.4 Amplificación y clonación del gen *aroB* y *aroE*

6.4.1 Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de los oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar el gen *aroB* y *aroE*, se procedió a buscar la secuencia de dicho gen en la base de datos de *E. coli* de la página <http://www.ecocyc.org/> (figura 4). A estos oligonucleótidos se agregaron sitios de restricción para poder introducirlos al plásmido deseado (tabla 4). A los oligonucleótidos obtenidos para la amplificación de *aroB* se les agregaron los sitios *XbaI* y *KpnI*, para la amplificación de *aroE* a los oligonucleótidos obtenidos se les agregó el sitio de restricción *BamHI* en ambas direcciones, todos estos sitios únicos para los vectores utilizados TOPO y pTrc99a.

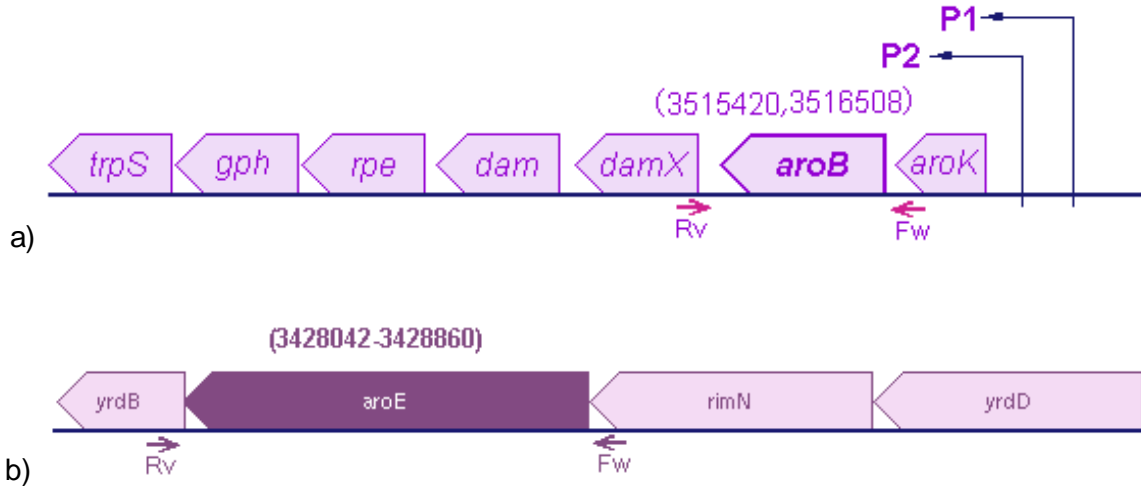


Figura 4. Ubicación de los genes *aroB* y *aroE* a) Operón *aroK-aroB-damX-dam-rpe-gph-trpS*, P1 y P2 indican los dos primeros promotores de este operón. b) Operón *yrdD-rimN-aroE-yrdB*. (<http://www.ecocyc.org/>). Las flechas Fw y Rv indican la región de unión de los primers para amplificar cada gen.

El par de oligonucleótidos *Fw_{aroB}* y *Rv_{aroB}* (tabla 4) amplifican *aroB* con aproximadamente 200nt río arriba y 200nt río abajo, con un tamaño total de 1484pb y el segundo par de oligonucleótidos amplifica *aroE* a tan solo 14nt antes del codón de inicio del gen, amplificando un fragmento de 835pb.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9600 (Pomona, CA). Las condiciones de amplificación de *aroB* y *aroE* se muestran en la tabla 5.

Para verificar la amplificación, los productos del PCR se analizaron en geles de agarosa (Sigma, St. Louis, MO) al 1% y se visualizaron en un analizador de imágenes (EagleEye™ II, Stratagene, La Jolla, CA).

Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados en este estudio para la interrupción de *aroK*, *aroL* y para la amplificación y clonación de *aroB* y *aroE*.

Nombre	Oligonucleótidos	Características
Inactivación de genes		
<i>aroLcmFw</i>	5'- <u>GCG ACC TAT TGG GGA AAA CCC ACG ATG ACA</u> <u>CAA CCT CTT TTT CTG TGT GTA GGC TGG AGC</u> <u>TGC TTC</u> -3'	Las secuencias subrayadas corresponden a regiones de homología con los genes a interrumpir, las secuencias sombreadas corresponden a los sitios <i>frt</i> y a una región del casete de resistencia a antibiótico
<i>aroLcmRv</i>	5'- <u>ACG TTA AGT ATA GGC GCT CGA AAA TCA ACA</u> <u>ATT GAT CGT CTG TGC CAT ATG AAT ATC CTC CTT</u> <u>AG</u> -3'	
<i>aroKcmFw</i>	5'- <u>AAT AGT CTT AGT AGT ACC GAA AAA ATG GCA</u> <u>GAG AAA CGC AAT ATC TGT GTA GGC TGG AGC</u> <u>TGC TTC G</u> -3'	
<i>aroKcmRv</i>	5'- <u>AGA CGA GTG TAT ATA AAG CCA GAA TTA GTT</u> <u>GCT TTC CAG CAT GTG CAT ATG AAT ATC CTC CTT</u> <u>AG</u> -3'	
Verificación del tamaño de la inactivación de genes		
<i>FwaroL</i>	5'-GTG GTG GCT GGA AGT GCA ACG TAG-3'	Verifica la interrupción de <i>aroL</i>
<i>RvaroL</i>	5'-CCT GAG CGG TCG GAT GTT CAC TG-3'	
<i>FwaroK</i>	5'-CTT CGC TGC CTG CGT TCC ATG ATG-3'	Verifica la interrupción de <i>aroK</i>
<i>RvaroK</i>	5'-CCG CGG ACC TTA TCG AGA TAC AG-3'	
<i>FwpykF</i>	5'-ACA AGC ACA CAT TCC TCT GCA- 3'	Verifica la interrupción de <i>pykF</i>
<i>RvpykF</i>	5' -AAA ACA GGA TGC TTC CAT CG- 3'	
Clonación de genes		
<i>FwaroB</i>	5' --- GCTCTAGATTTCAGTACGCTCAGAACGTTCA --- 3'	La secuencia subrayada corresponde al sitio de restricción de <i>XbaI</i>
<i>RvaroB</i>	5' --- GGGGTACCTGAAGTTCTGGAAGCGTTGG --- 3'	La secuencia subrayada corresponde al sitio de restricción de <i>KpnI</i>
<i>FwaroE</i>	5' --- CGGGATCCACAGGGGTAACATAATGGAAACC --- 3'	La secuencia subrayada corresponde al sitio de restricción de <i>BamHI</i>
<i>RvaroE</i>	5' --- CGGGATCCATTCACGCGGACAATTCCTC --- 3'	La secuencia subrayada corresponde al sitio de restricción de <i>BamHI</i>

Tabla 5. Componentes de las reacciones de amplificación de ADN.

Mezcla de PCR (50 μ L)	<i>Taq</i> DNA Polimerasa	<i>Pfu</i> polimerasa
ADN cromosomal (JM101)	1 μ L	1 μ L
Buffer 10x	5 μ L	5 μ L
MgCl ₂ 50mM	1.5 μ L	-
dNTP's 10mM	1 μ L	1 μ L
Primer Fw (0.5 μ M)	0.5ul	0.5ul
Primer Rv (0.5 μ M)	0.5ul	0.5ul
Enzima	0.5 μ L	0.5 μ L
H ₂ O	Hasta 50 μ L	Hasta 50 μ L
Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	95	10
	95	1
30	55	1
	72	1.5
1	72	5

6.4.2. Clonación del gen *aroB* y *aroE*

El gen *aroB* amplificado fue clonado directamente en el sistema de clonación Zero Blunt® TOPO® PCR cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para este caso, se amplificó el gen con la polimerasa *Pfu* (Fermentas, Glen Burnie, MD) que tiene actividad de exonucleasa 3'→5', ya que es necesario que el fragmento tenga los extremos rasos (*blunt*), siguiendo las indicaciones del proveedor (Invitrogen). Se verificó la orientación del gen mediante la digestión del plásmido con la enzima *Aat*II. Para la clonación del gen *aroE* se digirió el plásmido TOPO*aroB* y el gen amplificado (*aroE*) por PCR con la enzima de restricción *Bam*HI. Enseguida el plásmido fue tratado con la enzima fosfatasa alcalina CIP (calf intestinal phosphatase, Biolabs) para evitar su autoligación (Dale y Schantz, 2002), para posteriormente ligar el gen *aroE* en el plásmido con la enzima T4 DNA Ligasa (Fermentas, Glen Burnie, MD). Las ligaciones se transformaron en la cepa DH5 α y se sembraron en cajas de LB con Amp¹⁰⁰. Se eligieron algunas de las colonias resultantes para hacer minipreps para luego digerir con *Bam*HI y ver cual plásmido tenía el inserto (*aroE*).

El plásmido TOPO $aroB$ con inserto ($aroE$) se transformó a la cepa *E. coli* BW25113 $\Delta aroE::kan$ (Baba *et al.*, 2006) y se sembró en cajas de LB con Km³⁰, Amp¹⁰⁰. Se resembró en medio ARO (anexo 2) con glucosa 2g/L, Km³⁰, Amp¹⁰⁰ sin AA para ver la complementación. Para verificar la dirección del gen dentro del plásmido se secuenció un fragmento que abarca los dos genes $aroB$ y $aroE$.

6.5 Métodos analíticos

6.5.1. Cuantificación de SHK y otros metabolitos.

Las concentraciones de SHK, DHS, ácido gálico (AG) y ácido acético (AAc) fueron determinadas en un sistema de HPLC 600E bomba cuaternaria, 717 inyector automático, 2410 índice de refracción, y 996 arreglo de fotodiodos (Waters, Milford, MA). Para la determinación de SHK, DHS, AG y AAc se usó una columna Aminex HPX-87H (300x7.8mm; 9 μ m) (Bio-Rad, Hércules, CA). Las condiciones de corrida fueron: fase móvil de 5mM H₂SO₄; flujo de 0.5mL/min. y una temperatura de 50°C. Estos metabolitos se identificaron por arreglo de fotodiodo. Este método permite la cuantificación de SHK en concentraciones por debajo de 0.3g/L, por lo que se tuvieron que hacer las diluciones correspondientes. Para la cuantificación de DAHP se utilizó el método del ácido tiobarbitúrico (Weissbach y Hurwitz, 1958).

6.5.2. Cuantificación de glucosa

El consumo de glucosa para cada cepa se midió utilizando un sistema de cuantificación de glucosa (Biochemistry Analyser YSI 2700 Select, Yellow Springs, Ohio) que utiliza un estándar de glucosa de 2.5g/L, con el cual se midió cada muestra tomada para tener las curvas de consumo del sustrato.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Construcción de los plásmidos TOPOaroB y TOPOaroEB

Se construyó el plásmido TOPOaroB y posteriormente se le clonó el gen *aroE* para obtener el plásmido TOPOaroEB (figura 5). En ambos casos se comprobó la funcionalidad del gen *aroB* y los genes *aroB* y *aroE* por complementación en cepas de *E. coli* *aroB*⁻ y *aroE*⁻ en medio de cultivo mínimo ARO (Anexo 2).

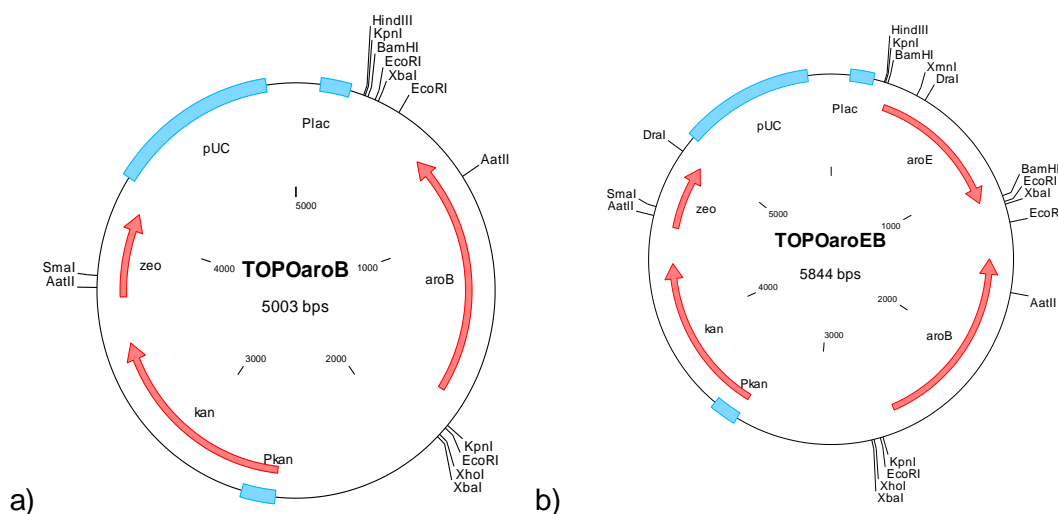


Figura 5. Construcción de plásmidos. a) Plásmido TOPOaroB (5003pb); b) Plásmido TOPOaroEB (5844pb); ambos plásmidos contienen una resistencia a kanamicina y zeocina.

7.2 Crecimiento y producción de shikimato de la cepa PB12 y cepas sobreproductoras en cultivos en fermentador

7.2.1 Cepa parental PB12

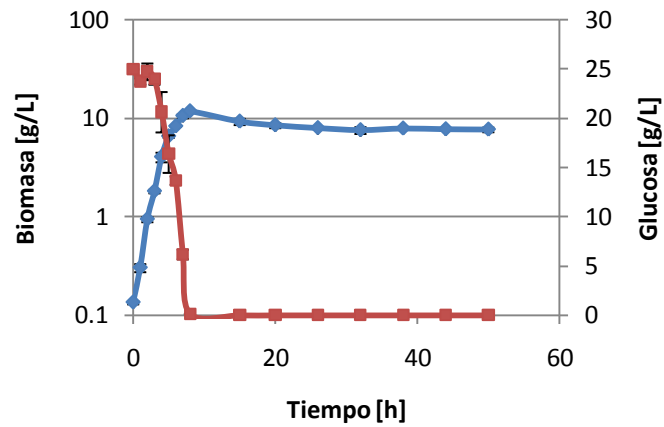
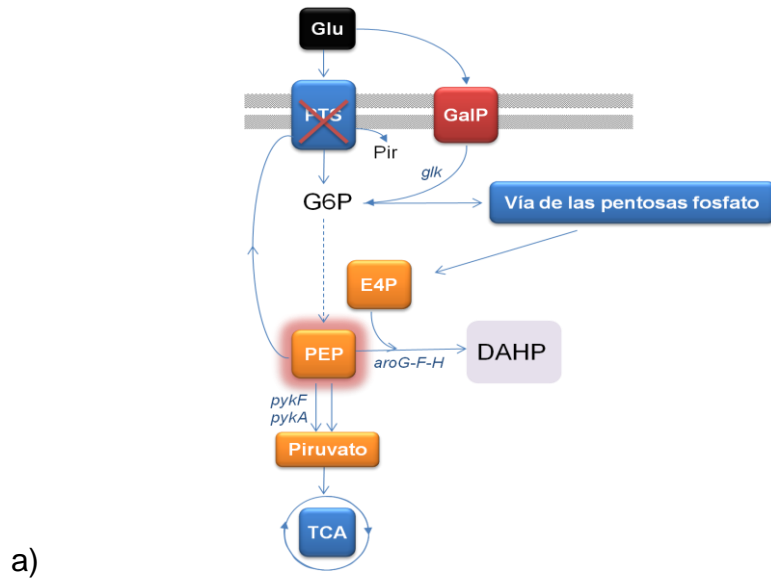
La cepa PB12 alcanzó una DO_{600nm} de 32, después de 8h de fermentación con el consumo del 98.7% de la glucosa agregada, con una velocidad específica de crecimiento (μ) de $0.48h^{-1}$ y una velocidad específica de consumo de glucosa (qs) de 5.17×10^{-6} mmolGlu/g DCW.h (tabla 6). Al término de la fase exponencial (8h) y hasta el final de la fermentación (50h), se observó un decremento de 35% de la concentración de la

biomasa. El análisis del sobrenadante del cultivo mostró, una mínima acumulación de DAHP (0.03g/L). No se detectó acumulación de ningún otro compuesto aromático, DHS, AG ni SHK durante todo el cultivo (figura 6). Aunque la cepa PB12 se cree que posee un exceso de PEP al no ser consumido por el sistema PTS, éste exceso no es canalizado hacia la vía de síntesis de aromáticos, ya que para que esto ocurra se requiere también de un incremento en la concentración de E4P (LaDuca *et al.*, 1999; Pantaik *et al.*, 1995), por lo que es posible que el PEP se dirija hacia el TCA, que es una de las vías que más consume PEP después de PTS y otra parte hacia la formación de biomasa, ya que como se verá más adelante y como resultado de las subsecuentes modificaciones realizadas a la cepa PB12, se afectó en el crecimiento. En los cultivos mencionados no se acumuló ácido acético.

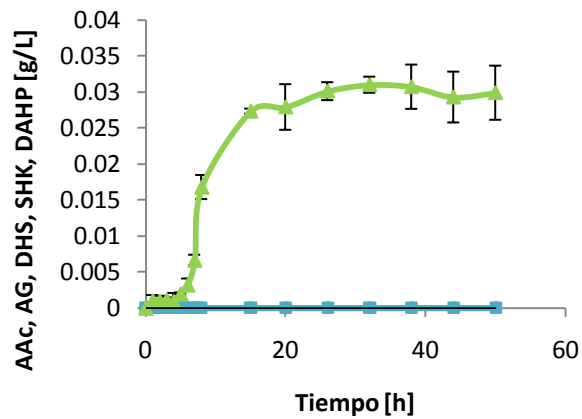
Tabla 6. Velocidad específica de crecimiento y consumo de sustrato en cepas PB12 y las productoras de SHK, PB12.SAn.

Cepa	μ (h^{-1})	$Y_{P/S}$ (molSHK/molGlu)	q_s (mmolGlu/g DCW ^a h)
PB12	0.483	N/P	5.17
PB12.SA1	0.437	0.003	3.64
PB12.SA11	0.415	0.11	2.03
PB12.SA2	0.466	0.01	2.28
PB12.SA21	0.420	0.21	2.5
PB12.SA22	0.423	0.29	1.93
PB12.SA3	0.380	N/P	1.72
PB12.SA31	0.324	0.22	0.77

^a por sus siglas en ingles: dry cell weight, gramos de células en peso seco



b)



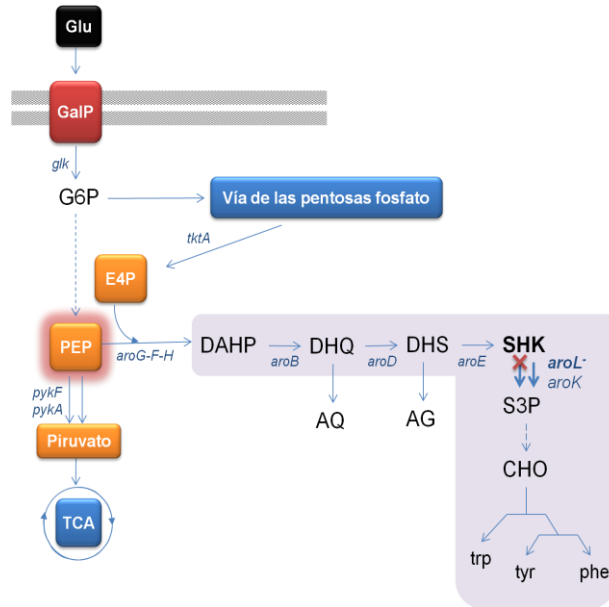
c)

Figura 6. a) Diagrama de modificaciones de PB12 (JM101/PTS⁻, Glu⁺); b) crecimiento celular y consumo de glucosa; c) producción de compuestos aromáticos. ◆ Biomasa; ■ Glucosa; ◆ SHK; ▲ DAHP; ■ DHS; ● AG; ▼ ácido acético (AAC)

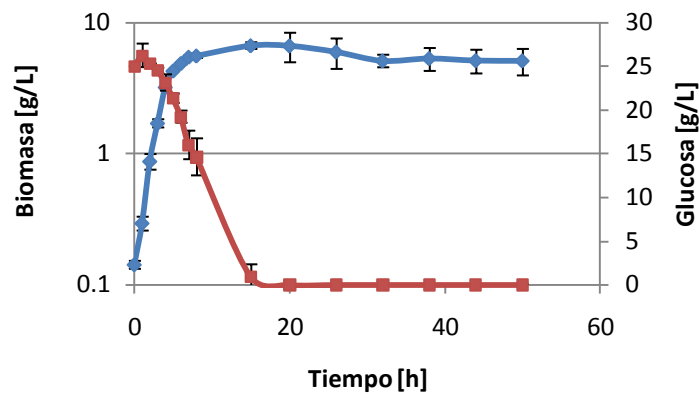
7.2.2 Inactivación de las SHK cinasas I y II

La primera modificación realizada en la cepa PB12 para lograr la acumulación de compuestos aromáticos fue la delección del gen *aroL* que codifica para la enzima SHK cinasa II, obteniendo la PB12.SA1 (figura 7). Otros autores han reportado que la sola delección de *aroL* permite la acumulación de SHK y evita la total auxotrofia de la bacteria hacia los aminoácidos y vitaminas aromáticas, esto con el fin de evitar el uso de complementos en los medios de cultivos (Krämer *et al.*, 2003; Johansson *et al.*, 2005).

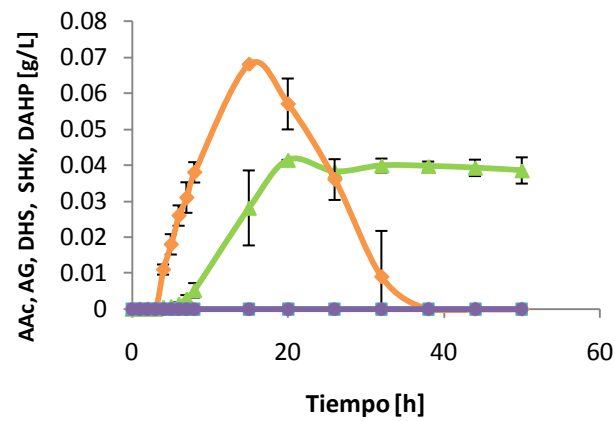
En el cultivo de la PB12.SA1 el crecimiento disminuyó en un 45% en comparación con la PB12. Se detectó una ligera acumulación de SHK, 0.068g/L, lo que equivale a un 0.30% (mol/mol) de rendimiento con respecto a la glucosa consumida (25g). Después de 15h de cultivo, se pudo observar que el SHK acumulado comenzó a disminuir hasta consumirse totalmente después de 32h de cultivo (figura 7). Hay que recordar que en esta cepa el gen *aroK* aún está activo y posiblemente la disminución de SHK indica que la SHK cinasa I aun es capaz de fosforilar y dirigir el SHK para producir S3P. En los cultivos de la mutante *aroL*⁻ se detectó una acumulación de DAHP, 0.041g/L, y produciendo una concentración máxima de CAT de 0.11g/L.



a)



b)



c)

Figura 7. a) Diagrama de modificaciones de PB12.SA1 (PB12/ Δ aroL); b) crecimiento celular y consumo de glucosa; c) producción de compuestos aromáticos. \blacklozenge Biomasa; \blacksquare Glucosa; \blacklozenge SHK; \blacktriangle DAHP; \blacksquare DHS; \bullet AG; \blacktriangledown ácido acético (AAC)

A partir de la PB12.SA1 se obtuvo la cepa PB12.SA2, *aroL*⁻*aroK*⁻ (tabla 2), la cual es auxotrofa a todos los aminoácidos y vitaminas aromáticas. El cultivo en fermentador de esta cepa mostró un incremento del 20% de biomasa máxima respecto a la PB12.SA1, también la velocidad de crecimiento aumentó ligeramente, alrededor de un 6%, aunque el consumo de glucosa fue más lento, tardó 26h en consumir los 25g de glucosa agregada (figura 8) mientras la PB12.SA1 fue de 20h.

Durante el cultivo de PB12.SA2 se observó una ligera disminución en la velocidad de crecimiento con respecto a PB12 de un 3%, en cuanto a las concentraciones de SHK con respecto a la PB12.SA1, la cantidad de SHK detectada en esta cepa carente de ambas SHK cinasas, fue de 267% más con respecto a la mutante simple *aroL*⁻, teniendo una concentración de 0.25g/L contra los 0.068g/L que se obtuvo con PB12.SA1, lo que indica que el SHK ya no se está “escapando” hacia la síntesis de S3P durante la fase estacionaria del cultivo como sucedió con PB12.SA1. Comparando las concentraciones de DAHP entre estas cepas, la PB12.SA2 tuvo 0.167g/L, que equivale a 307% más de lo obtenido con PB12.SA1. Con esta cepa también se vio una pequeña acumulación de DHS. El total de compuestos aromáticos en este cultivo fue de aproximadamente 0.445g/L, 310% más que PB12.SA1.

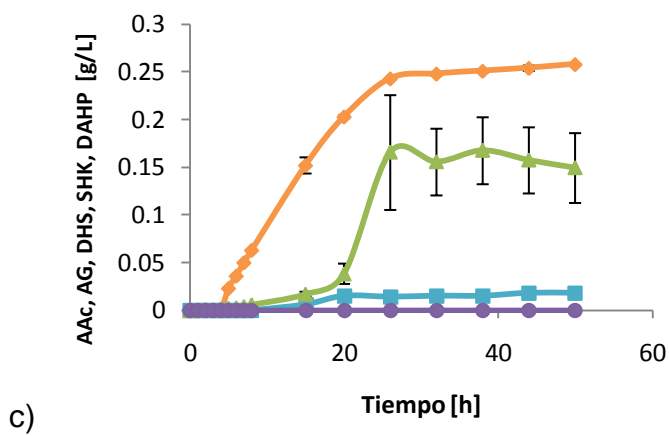
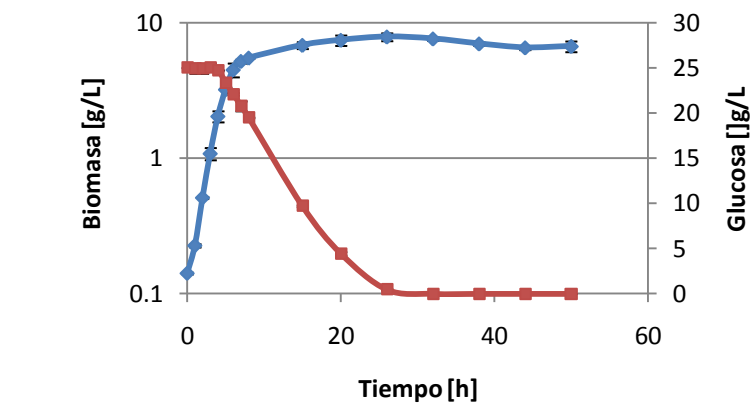
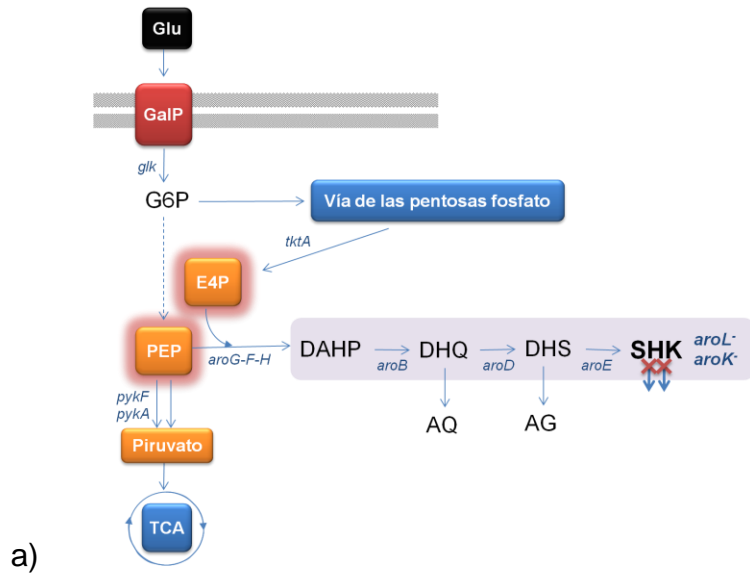
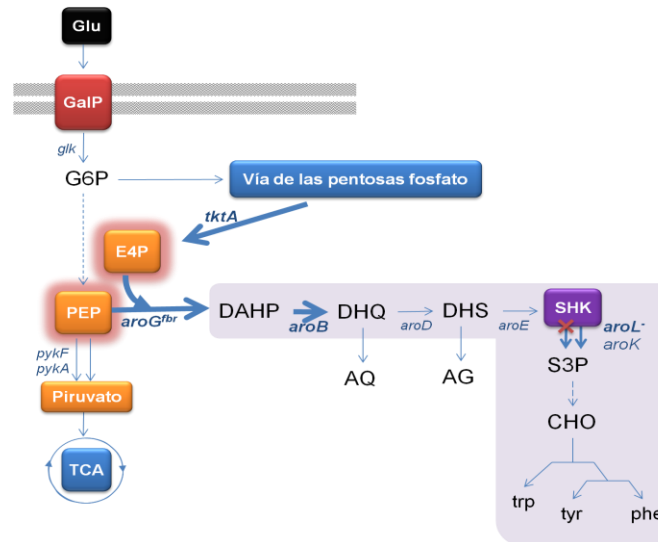


Figura 8. a) Diagrama de modificaciones de PB12.SA2 (PB12.SA1/*aroK::cat*); b) crecimiento celular y consumo de glucosa; c) producción de compuestos aromáticos. ◆ Biomasa; ■ Glucosa; ◆ SHK; ▲ DAHP; ■ DHS; ● AG; ▼ ácido acético (AAC)

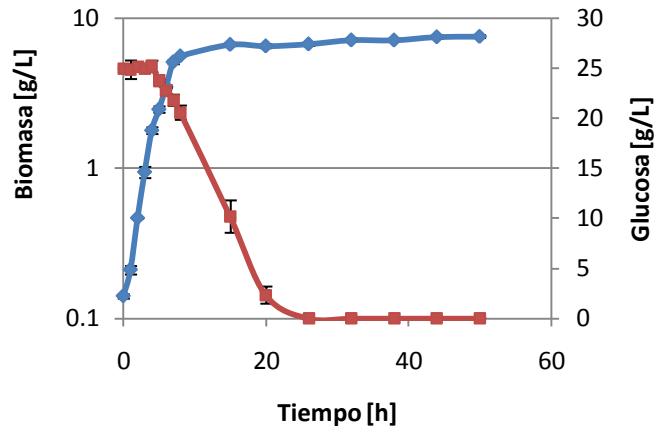
7.2.3 Sobre-expresión de *aroG^{fbr}*, *tktA*, *aroB* y *aroE* en plásmidos

La cepa PB12.SA11 (PB12.SA1 ρ JLBaroG^{fbr}tktA TOPOaroB, tabla 2), sobre-expresa una DAHP sintasa^{fbr}, dirige el PEP hacia la vía de los aromáticos, y la expresión de la Transcetolasa A incrementa el flujo de carbono a través de la ruta de las pentosas fosfato hacia la formación de E4P, logrando así, tener una mayor disponibilidad de los precursores de la vía y el direccionamiento del flujo de estos compuestos hacia la vía de interés (figura 9a).

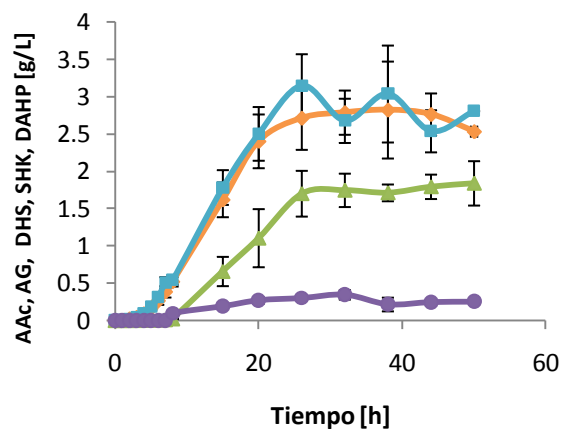
La sobre-expresión de *aroB* previene la acumulación de DAHP, la cual resulta inconveniente ya que este compuesto se puede desfosforilar para formar DAH y salir hacia el medio externo, lo que provoca una pérdida de carbono.



a)



b)



c)

Figura 9. a) Diagrama de modificaciones de PB12.SA11 (PB12.SA1/pJLBaroG^{fbr}tktA, TOPOaroB); b) crecimiento celular y consumo de glucosa; c) producción de compuestos aromáticos.
 ◆ Biomasa; ■ Glucosa; ◆ SHK; ▲ DAHP; ■ DHS; ● AG; ▼ ácido acético (AAc)

Esta cepa presentó una disminución en los valores de μ y q_s , 14% y 61% menos, respectivamente (tabla 6), cuando se comparan con los valores determinados para PB12, en comparación con la PB12.SA1 también disminuyó 6%. A partir de este momento (8h) y hasta el final de la fermentación, esta cepa se mantuvo en fase estacionaria. La producción de DAHP, DHS, SHK y AG fue detectada durante la fase de crecimiento exponencial. Durante las primeras 26h de cultivo se acumuló DAHP, DHS y SHK, a partir de este momento y hasta el final de la fermentación las concentraciones se mantuvieron constantes, alrededor de 1.71, 2.8 y 2.8 g/L, respectivamente. El rendimiento de SHK fue de 0.11molSHK/molGlu. La concentración de AG fue la más baja de los intermediarios; sin embargo, esta cepa produce la mayor concentración de AG (aproximadamente 0.3g/L), con respecto a las otras cepas de PB12 productoras de SHK. Alternativamente a esto, el AG puede resultar de la deshidratación de DHS seguido de una hidroxilación del intermediario diceto ácido protocatehuico (PCA) (Kambourakis *et al.*, 2000). La acumulación de AG durante la producción de SHK en cultivos en lote o alimentados (Chandran *et al.*, 2003), no ha sido antes reportada, pero si ha sido detectada en cultivos en lote (este trabajo) y quimiostatos bajo condiciones de carbón limitado, debido a que hay una gran acumulación de DHS (Johansson *et al.*, 2005).

La relación SHK/DHS para esta cepa fue de 1, esto concuerda a lo ya reportado por Knop y colaboradores (2001) acerca del equilibrio hidro-aromático, que es similar a lo que sucede cuando no se sobre-expresa *aroE* (SHK deshidrogenasa), que como se había mencionado, *aroE* es un “cuello de botella” en la vía. La enzima SHK deshidrogenasa es una de las enzimas limitantes dentro de la vía de los AA, debido a la reversibilidad de la reacción de DHS a SHK y también a que ésta enzima es inhibida por el producto final, SHK.

La presencia de la DAHP sintasa AroG^{fbr} en la cepa PB12.SA11 evita la inhibición por la fenilalanina de la primera reacción de la vía del SHK presente en el extracto de levadura del medio de cultivo. Se ha reportado que la actividad de las DAHP sintasas *in vivo* está limitada por la disponibilidad de PEP y E4P y que la máxima actividad específica de la DAHP sintasa es alcanzada cuando la concentración de ambos intermediarios es incrementada (LaDucca *et al.*, 1999; Patnaik *et al.*, 1995). También, ha sido reportado que la presencia de un plásmido que codifique para una copia de *tktA* (Transcetolasa I) provoca un incremento en la disponibilidad de E4P en PB12 (Flores *et al.*, 1996; Gosset *et al.*, 1996; Flores *et al.*, 2004; Flores, 2005). Además, la presencia *aroB* en un plásmido multicopia reduce la posible acumulación de DAHP (Krämer *et al.*, 2003; Chandran *et al.*, 2003). PB12.SA11 contiene las características anteriores, así como la inactivación de una de las isoenzimas SHK cinasas (AroL), para el mejoramiento de producción de SHK.

La inactivación del gen *aroL* como parte de la estrategia para la producción de SHK ha sido previamente descrita en la cepa de *E. coli* W3110 *aroL*⁻ (W3110 *shik1*) en cultivos en quimiostato donde se han obtenido como máximo rendimiento de SHK de 0.02 y 0.05mol/mol bajo condiciones limitadas de carbono y fosfato, respectivamente (Johansson *et al.*, 2005; Johansson y Lidén, 2006). En este trabajo, el rendimiento de SHK de PB12.SA11 fue de 0.11 molSHK/molGlu, un orden de magnitud mayor que el reportado por Johansson y colaboradores (2005); sin embargo han sido reportados, en otra cepa de *E. coli* SP1.1*pts* / pSC6.090B (tabla 1) carente de ambas SHK cinasas, en cultivos alimentados de 1 y 10L, los máximos rendimientos de producción de SHK por mol de glucosa fueron de 0.27 y 0.33mol/mol, respectivamente (Chandran *et al.*, 2003), sugiriendo que el fenotipo *aroL*⁻ es por sí mismo insuficiente para obtener altos rendimientos de SHK.

La cepa PB12.SA21 que fue diseñada para que sobre-expresara *aroG^{fabr}*, *tktA* y *aroB*, mostró un crecimiento exponencial durante las primeras 8h de cultivo y una fase estacionaria similar a la observada en PB12 y PB12.SA11. No se observaron diferencias significativas en los valores de μ y q_s entre las cepas PB12.SA21 y PB12.SA11 como consecuencia de la inactivación de los genes *aroL* y *aroK*. La producción de DAHP, DHS, SHK y AG fue detectada durante la fase estacionaria de crecimiento. Comparando con la PB12.SA11, las máximas concentraciones observadas de DAHP y AG en PB12.SA21 fueron menores, mientras que no se observó una diferencia en la concentración máxima de DHS. Después de 50h de cultivo, se detectaron alrededor de 5.1g/L de SHK con un rendimiento de 0.21molSHK/molGlu. Este resultado representa un incremento, de aproximadamente un 80% más del rendimiento que con PB12.SA11, como una consecuencia de la doble inactivación de *aroK* y *aroL*.

Las concentraciones de DAHP, DHS y SHK obtenidas con la cepa PB12.SA11, comparadas con las producidas por la PB12.SA21, indican un flujo eficiente de DAHP a SHK. Sin embargo, basados en la concentración relativamente alta de DHS observada, sugirió que esta cepa puede promover la conversión de este DHS acumulado a SHK y con esto mejorar la concentración y rendimiento de este compuesto. Al final del cultivo de PB12.SA21 se obtuvieron 8.25g/L de CAT, aunque esta cantidad es similar a la obtenida con PB12.SA11, la relación entre SHK/DHS se duplicó: 5.07g/L de SHK por 2.49g/L de DHS.

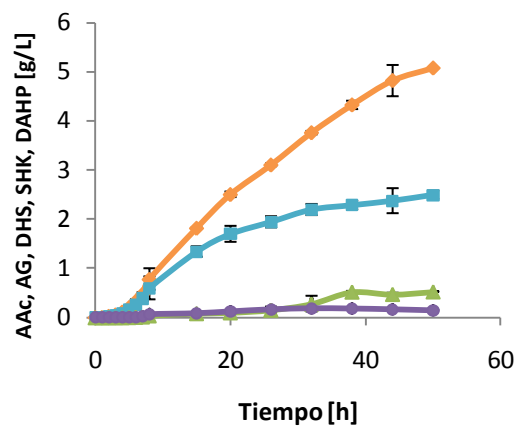
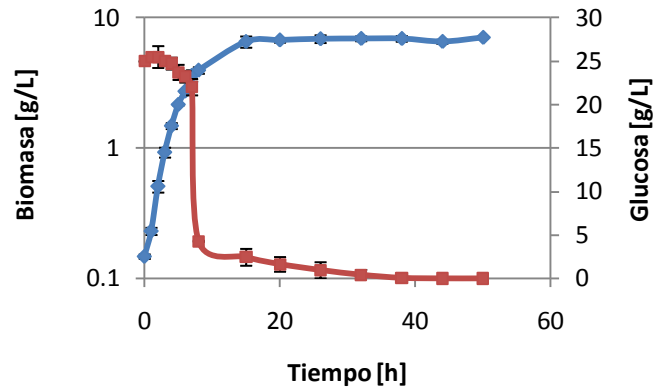
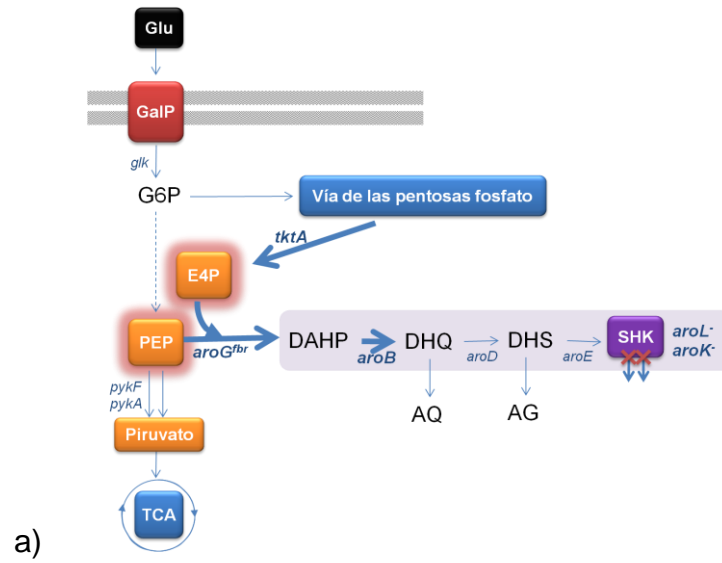


Figura 10. a) Diagrama de modificaciones de PB12.SA21 (PB12.SA2/pJLBaroG^{fbr} tktA, TOPOaroB); b) crecimiento celular y consumo de glucosa; c) producción de compuestos aromáticos. ◆ Biomasa; ■ Glucosa; ◆ SHK; ▲ DAHP; ■ DHS; ● AG; ▼ ác.acético (AAC)

La clonación del gen *aroE* en el vector TOPO*aroB* y su transformación en la cepa PB12.SA21, permitió obtener la cepa PB12.SA22. Los cultivos de esta cepa no mostraron una variación significativa en los valores de μ y q_s con respecto a los mostrados por su progenitora (PB12.SA2). Ambas cepas consumieron totalmente la glucosa después de 38h de cultivo. La concentración de DHS fue significativamente más baja que la detectada en PB12.SA21, la concentración de DHS bajó de 2.5 a 1.5g/L, lo que aumenta la relación de SHK/DHS a 4.86. Al final de la fermentación se encontraron 7.1g/L de SHK con un rendimiento de 0.29mol/mol de glucosa, equivalente a un incremento del 39% en el rendimiento con respecto a la PB12.SA21. La cantidad de DAHP producida por PB12.SA22 no fue muy diferente a PB12.SA21, en cambio el AG disminuyó en un 50%. La menor acumulación de AG pudo deberse a la disminución de las concentraciones de DHS. Las concentraciones de CAT cuantificadas durante esta fermentación aumentaron de 8.25 a 9.40g/L, con un rendimiento de 0.38molCAT/molGlu. La introducción de una copia del gen *aroE* en el plásmido multicopia pTOPO*aroB* dio como resultado una conversión más eficiente de DHS a SHK, probablemente como una consecuencia de la reducción del “equilibrio hidroaromático” responsable de la síntesis de DHS a partir de SHK (Krämer *et al.*, 2003; Chandran *et al.*, 2003; Johansson *et al.*, 2005; Johansson y Lindén, 2006; Knop *et al.*, 2001). En concordancia con esto, se detectó una baja concentración AG (figura 11).

Si se compara esta cepa (PB12.SA22) con la cepa reportada con el mayor rendimiento (*E. coli* SP1.*lpts*/pSC6.090B) se puede observar que se ha llegado a niveles de rendimiento similares; 0.29 vs 0.33molSHK/molGlu (tabla 7). El fondo genético de la cepa SP1.*lpts*/pSC6.090B reportada por Chandran y colaboradores (2003), es parecido al de la cepa PB12.SA22, una diferencia importante que podría influir en la producción es que la otra cepa fue cultivada en fermentadores alimentados.

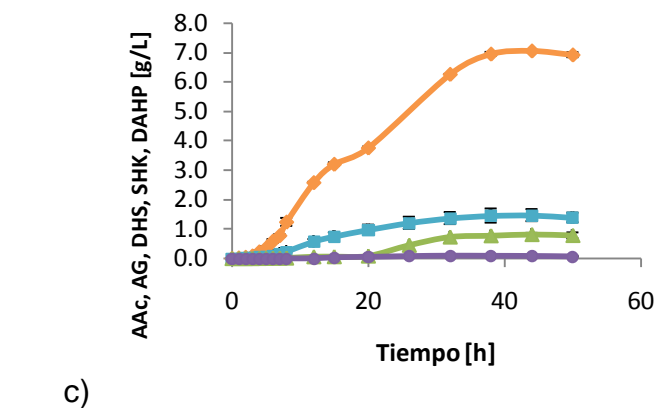
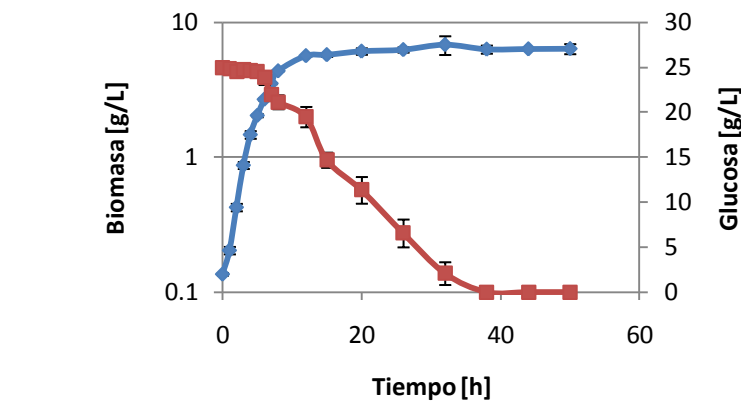
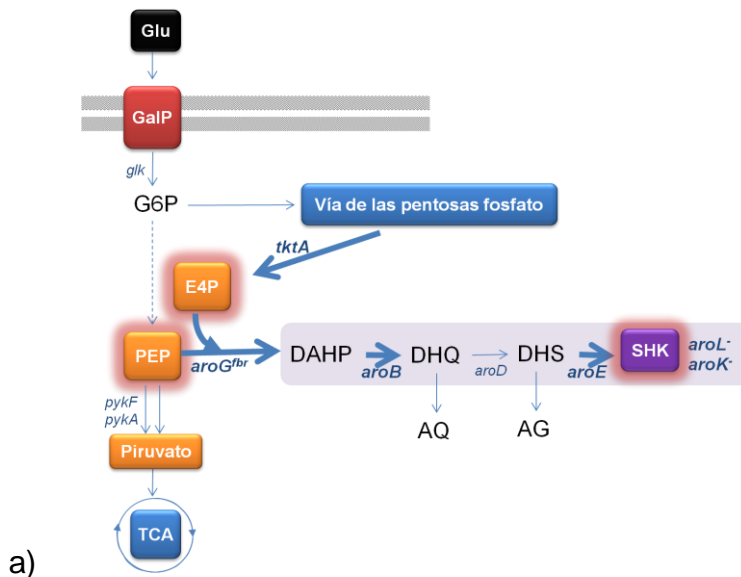


Figura 11. a) Diagrama de modificaciones de PB12.SA22 (PB12.SA2/pJLBaroG^{ibr} tktA, TOPOaroEB); b) crecimiento celular y consumo de glucosa; c) producción de compuestos aromáticos. ◆ Biomasa; ■ Glucosa; ◆ SHK; ▲ DAHP; ■ DHS; ● AG; ▼ ác.acético (AAc)

7.2.4 Inactivación de la Piruvato cinasa I

Las Piruvato cinasas (PykF y PykA) son enzimas muy importantes en el metabolismo central de carbono, junto con la Fosfofructocinasas. Es una de las 2 principales enzimas que controlan el flujo de carbono a través de la glucólisis. En estudios anteriores (Ponce *et al.*, 1995) se ha reportado que cuando se inactiva *pykF* en PB12, resulta en un incremento de la actividad de *pykA*, lo que hace pensar que la inactivación de *pykF* no afectaría el crecimiento de PB12.

La interrupción de *pykF* mediante la inserción de un casete de resistencia a gentamicina a la cepa PB12.SA2, dio como resultado la cepa PB12.SA3. Esta interrupción disminuyó la velocidad de crecimiento de la bacteria, un 18% con respecto a PB12.SA2, de 0.466 a 0.38h⁻¹. Hacia el final de la fermentación se observó una lisis celular (figura 12). El consumo de glucosa en esta cepa no fue tan lento como se vio en las cepas que tienen los plásmidos, incluso fue más rápido que el de la cepa PB12.SA2, esto podría deberse a que cuando se inactiva *pykF* se disminuye el flujo de carbono hacia TCA, lo que ocasiona que la bacteria produzca menos energía. La disminución del flujo de carbono hacia TCA estaría provocando que la célula, en un intento por recuperar la energía faltante, aumente el transporte de glucosa hacia el interior de la célula. Considerando el fondo genético de PB12.SA3, en donde se han cortado las principales vías de consumo de PEP, la producción de biomasa sería la vía disponible que la célula tendría para dirigir el flujo de carbono, ya que las actividades de las DAHPs sintetasas nativas de PB12 no son suficientes para dirigir el flujo de PEP hacia la vía del SHK.

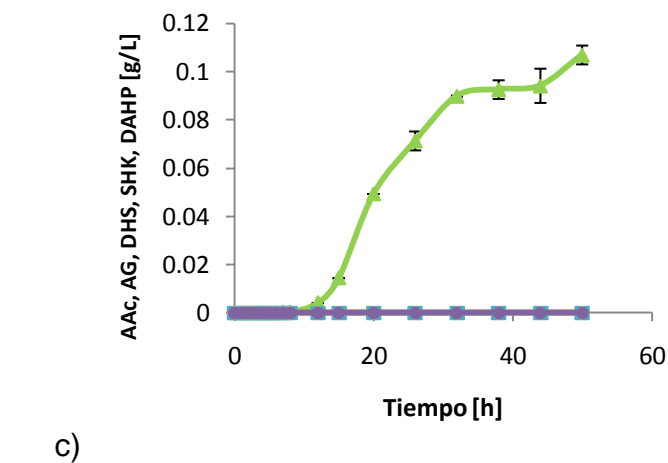
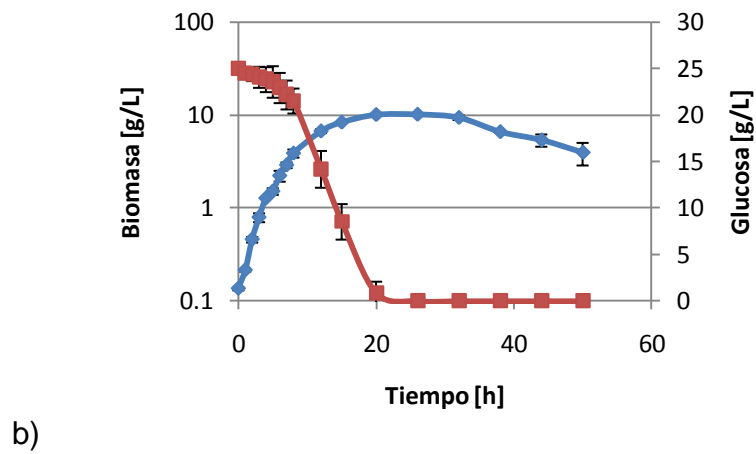
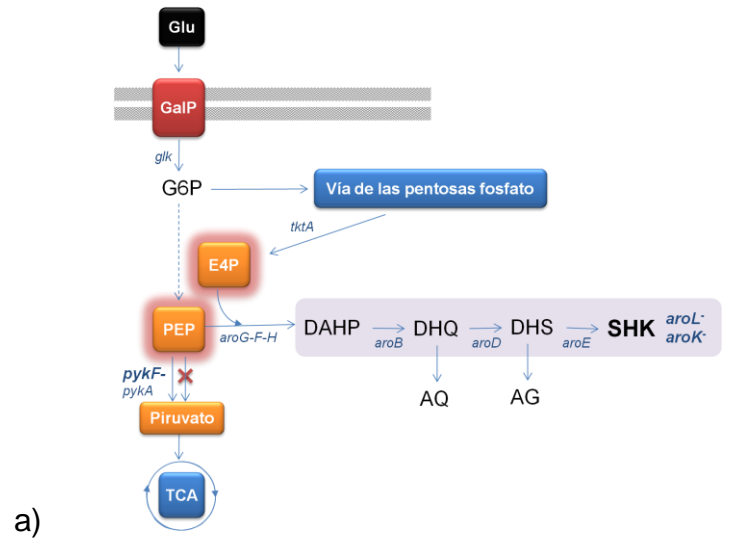


Figura 12. a) Diagrama de modificaciones de PB12.SA3 (PB12.SA2/ Δ pykF::gen); b) crecimiento celular y consumo de glucosa; c) producción de compuestos aromáticos. \blacklozenge Biomasa; \blacksquare Glucosa; \blacklozenge SHK; \blacktriangle DAHP; \blacksquare DHS; \bullet AG; \blacktriangledown ácido acético (AAc)

Lo anterior también explicaría por qué no se detectó ningún compuesto aromático durante las fermentaciones, a excepción de los 0.107g/L de DAHP, que en este caso fueron producidos por las DAHPs sintetas nativas en PB12.

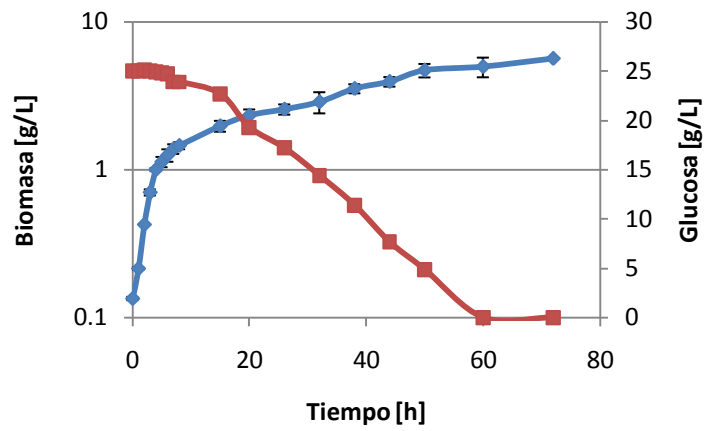
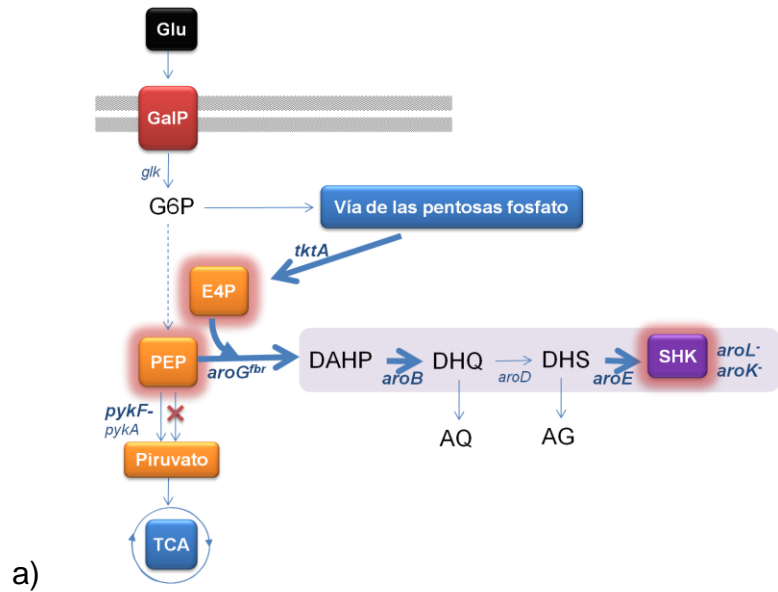
Cuando se transformó a la cepa PB12.SA3 con los plásmidos pJLBaroG^{br}tktA y TOPOaroEB, se obtuvo la cepa PB12.SA31 (figura 13). La velocidad de crecimiento de esta cepa disminuye drásticamente en comparación con PB12.SA3 y al resto de las cepas, esto muy probablemente debido a la carga metabólica producida por los plásmidos al no tener la energía suficiente, por ser PTS⁻ y *pykF*, hace más difícil su crecimiento. Este resultado sugiere que, al parecer, la sola actividad de *pykA* no es suficiente para tener un flujo suficiente de carbono hacia TCA.

Los cultivos de esta cepa mostraron el crecimiento característico en dos fases que se observó en todas las cepas anteriormente mencionadas, aunque disminuyen los valores de μ y q_s , 25 y 60% menos respectivamente, comparada con su progenitora PB12.SA22 (*pykF*⁺). Así mismo, la concentración de biomasa máxima después de 8h de cultivo fue de solo el 33% con respecto a la alcanzada por PB12.SA22 y, contrario a todas las demás cepas analizadas, la glucosa adicionada al medio de cultivo no fue completamente consumida después de 50h. Las concentraciones de DHS, AG y especialmente de DAHP fueron mayores que las obtenidas con la PB12.SA22, mientras que la producción y rendimiento de SHK fue 35% menor. Es importante señalar que el rendimiento de CAT fue de 55% mol/mol de glucosa, lo que equivale a un incremento del 33% con respecto a la PB12.SA22, lo que representa un mayor rendimiento de CAT comparada con todas las PB12.SA analizadas.

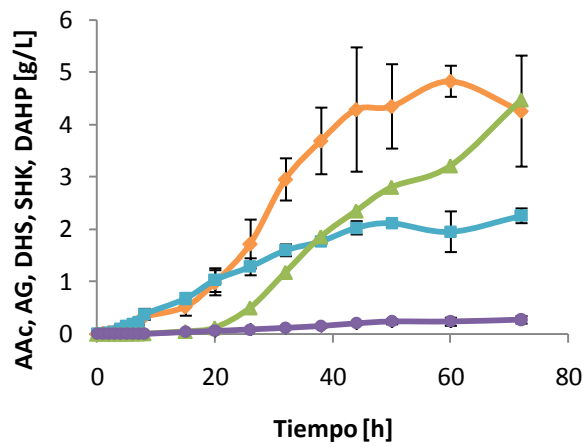
Las concentraciones de producción de SHK se redujeron en poco más de 2g/L con respecto a la PB12.SA22, al igual que lo producido de DHS (2.1g/L), DAHP (4.48g/L) y AG (0.23g/L), aun así, los niveles de producción de CAT aumentó de 9.4g/L producidos por PB12.SA22 a 11.61g/L por PB12.SA31, lo que equivale a un aumento del 23% con respecto a la cepa que había producido más CAT.

Las isoenzimas Piruvato cinasas, Pyk I y Pyk II, juegan un papel muy importante en la glucolisis, especialmente en lo que se refiere al metabolismo del carbono en cepas carentes del sistema PTS (Muñoz y Ponce, 2003; Ponce *et al.*, 1995). La actividad de Pyk, junto con la Fosfofructocinasa, controlan el flujo de carbono a través de la glucolisis, cataliza la reacción irreversible de trans-fosforilación de PEP y ADP en piruvato y ATP (Muñoz y Ponce, 2003). Previamente se ha reportado que la inactivación de *pykF* en PB12 (PTS⁻, Glu⁺) resulta en un ligero incremento en la actividad específica de PykA (13.5%; Ponce *et al.*, 1995). Asimismo, un análisis de flujo de carbono de esta cepa (PB12) ha mostrado un incremento en el flujo a través de las enzimas PykAF en ausencia de PTS comparada con su cepa silvestre parental (JM101 PTS⁺; Gosset *et al.*, 1996). Además, el análisis del transcriptoma de PB12 y de una cepa de PB12 sobre-productora de fenilalanina mostró una ligera sobre-regulación de *pykA* con respecto a la cepa silvestre JM101, sugiriendo que el total de la actividad de las isoenzimas Pyk presente en PB12 es suficiente para convertir el PEP en piruvato, o al menos a una velocidad similar a JM101 (Flores *et al.*, 2005; Baéz-Viveros *et al.*, 2007). Estos resultados, sumados a los resultados obtenidos en este trabajo, sugieren que una inactivación simple de *pykF* o *pykA* podrían ser una atractiva estrategia, si se utilizan otras estrategias de cultivo, para el incremento de la cantidad de PEP disponible para la síntesis de DAHP, sin comprometer la síntesis de piruvato y su flujo hacia acetil-CoA.

La interrupción de *pykF* en PB12.SA31 afecta de forma negativa el crecimiento, el consumo de glucosa y la acumulación de SHK comparada con la cepa parental PB12.SA22 (*pykF*⁺). De forma importante, el valor de CAT se incrementó a 0.55mol/mol de glucosa en la cepa *pykF*⁻, al sumar el producto acumulado entre DAHP, DHS, SHK y AG, el cual es 33% mayor que el rendimiento total observado en la cepa parental PB12.SA22. Estos resultados sugieren que la inactivación de *pykF* aparentemente incrementa la disponibilidad de PEP, el cual es canalizado hacia la vía de los aromáticos, resultando en una mayor cantidad de CAT. Mayores concentraciones de DAHP acumuladas en cultivos de PB12.SA31 también indican que, en éste fondo genético, la DHS sintasa podría ser una limitante para la producción de SHK. Un reporte previo sobre la respuesta proteómica de la inactivación de *pykF* en *E. coli* BW25113 demostró la sobreexpresión de todos los genes de la vía común del SHK, con excepción de *aroB*, durante la producción de aromáticos (Kedar *et al.*, 2007). Incrementar la expresión del gen *aroB*, por substitución de su promotor natural por uno más fuerte, podría ser una estrategia viable para mejorar la concentración de SHK en PB12.SA31.



b)



c)

Figura 13. a) Diagrama de modificaciones de PB12.SA31 (PB12.SA3/pJLBaroG^{fbr}tktA, TOPOaroEB); b) crecimiento celular y consumo de glucosa; c) producción de compuestos aromáticos. —♦— Biomasa; —■— Glucosa; —◇— SHK; —▲— DAHP; —■— DHS; —●— AG; —▼— AAC

La actividad de Pyk juega un papel clave en el metabolismo celular conectando la glucólisis con la vía de los AA y la biosíntesis de lípidos (Ponce *et al.*, 1995; Kedar *et al.*, 2007). Una característica notable de las isoenzimas Pyk es su respuesta alostérica sobre varios efectores involucrados no solo en el metabolismo central del carbono sino también en el metabolismo celular global, entre ellos, el intermediario glucolítico PEP (Ponce *et al.*, 1995; Jurica *et al.*, 1998; Fraenkel, 1987). Se ha propuesto que las isoenzimas Pyk están involucradas en la represión catabólica en *E. coli* en fermentaciones con glucosa (Cunningham *et al.*, 2009); sin embargo, no hay información disponible para correlacionar el papel específico de cada isoenzima Pyk en el metabolismo global bacteriano, particularmente en cepas ocupadas para la producción de compuestos aromáticos.

7.3 Comparación de la concentración y rendimiento de SHK de las cepas PB12.SA con cepas reportadas

De acuerdo a la información disponible en la literatura, la mejor cepa productora de SHK, el rendimiento con respecto al sustrato consumido es muy similar a la cepa obtenida en este trabajo, es una cepa reportada por Chandran y colaboradores (2003; tabla 7). Aunque las condiciones de trabajo no son las mismas, ellos utilizan un cultivo lote alimentado y en este trabajo se realizó un cultivo en lote, los rendimientos obtenidos son similares.

Tabla 7. Características de la mejor cepa reportada para la producción de SHK por Chandran *et al.* (2003) comparada con las mejores cepas PB12.SAn obtenidas durante este trabajo.

Características de la cepa	Concentración g/L Shk	Y _{P/S} molShk/molGlu	Y _{P/S} molCAT/molGlu	Condiciones de cultivo	Autores
SP1.1 pts [RB791 <i>serA::aroB</i> <i>aroL478::Tn 10</i> <i>aroK17::Cm^R</i> Δ (<i>ptsH ptsI crl</i>)/ pSC6.090B (P _{tac} <i>glf</i> <i>glk</i> , <i>aroF^{FBR}</i> , <i>tktA</i> , P _{tac} <i>aroE</i> , <i>serA</i>)]	71	0.27 (31.4)*	0.33 (39.5)	Fed-Batch, 1L, 33°C, Glu 20 a 30g/L	Chandran <i>et al.</i> , 2003
PB12.SA21 [JM101 Δ (<i>ptsH</i> , <i>ptsI</i> , <i>crl</i>)::Km ^R , Glu ⁺ , Δ <i>aroL</i> <i>aroK::Cm^R</i> / pJLBaroG ^{FBR} <i>tktA</i> , TOPO <i>aroB</i>]	5.07	0.210 (24.4)	0.341 (39.7)	Lote, 0.5L, 37°C, Glu 25g/L	Este trabajo
PB12.SA22 [PB12.SA2/ pJLBaroG ^{FBR} <i>tktA</i> , TOPO <i>aroEB</i>]	7.05	0.291 (33.9)	0.389 (45.2)	Lote, 0.5L, 37°C, Glu 25g/L	Este trabajo
PB12.SA31 [PB12.SA2 <i>pykF::Gm^R</i> / pJLBaroG ^{FBR} <i>tktA</i> , TOPO <i>aroEB</i>]	4.83	0.199 (23.1)	0.480 (55.8)	Lote, 0.5L, 37°C, Glu 25g/L	Este trabajo

* entre paréntesis se muestra el porcentaje del rendimiento máximo teórico que representa cada uno.

Chandran y colaboradores (2003), reportan un rendimiento de 0.27 molSHK/molGlu, mientras que durante el desarrollo de este trabajo, con PB12.SA22 se obtuvo un rendimiento de 0.291molSHK/molGlu, al comparar los máximos rendimientos tomando en cuenta todos los aromáticos producidos que cuantificaron, reportan un rendimiento de 0.33molSHK/molGlu, mientras que el rendimiento obtenido por la cepa PB12.SA22 fue mayor (0.389molSHK/molGlu). La cepa PB12.SA31 alcanzó con un rendimiento aun mejor que las cepas anteriormente reportadas con un CAT, 0.480mol/molGlu.

8. CONCLUSIONES

E. coli PB12 (PTS⁻, Glu⁺) fue usada como fondo genético para la obtención de la cepa sobreproductora de SHK PB12.SA22 (*aroL*- *aroK*- *aroG*^{br}, *tktA*, *aroB*, *aroE*).

Cultivos controlados de esta cepa, en fermentadores de 1L en medio mineral suplementado con glucosa y extracto de levadura, resultó en la producción de 7g/L de SHK, con un rendimiento con respecto al sustrato del 29% mol/mol y a su vez un rendimiento de los intermediarios aromáticos aproximadamente del 38% mol/mol, mejorando con esto los rendimientos de 27% y 33% mol/mol de SHK y CAT, respectivamente, reportado anteriormente (Chandran *et al.*, 2003).

La inactivación de *pykF* en el fondo genético PTS⁻ *aroL*- *aroK*- afectó negativamente las concentraciones de biomasa, glucosa y producción de SHK (4.8g/L), sin embargo, la producción total de aromáticos se incrementó en un 10% del rendimiento máximo teórico, respecto a la cepa PB12.SA22. Esto último indica un importante potencial de la cepa *pykF*- para la producción de mayores concentraciones de SHK.

9. PERSPECTIVAS

- A partir de la cepa PB12.SA2 interrumpir el gen de la Piruvato cinasa II (*pykA*) para tener ambas mutantes simples de las Pyr cinasas y comparar su comportamiento con respecto a la producción de SHK.
- Caracterización transcriptómica de PB12.SA31 para ver el efecto de la mutación de *pykF*; esto permitiría identificar puntualmente como se vieron afectados otros genes por dicha mutación y si estos benefician o perjudican para la producción de SHK.
- Optimizar condiciones de cultivo para incrementar la producción de SHK utilizando diferentes estrategias de cultivo como por ejemplo el uso de células en reposo, o bien, cultivos alimentados donde se controle el flujo del sustrato (cultivos en lote alimentado o cultivos continuos).
- Reducir la carga metabólica integrando directamente al cromosoma de PB12.SA2 los genes sobre-expresados para la producción de SHK.

10. REFERENCIAS

- Baba T, T Ara, M Hasegawa, Y Takai, Y Okumura, M Baba, KA Datsenko, M Tomita, BL Wanner, H Mori (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection, *Molecular Systems Biology*, **2**:1-11
- Báez JL, F Bolívar, G Gosset (2001). Determination of 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate productivity and yield from glucose in *Escherichia coli* devoid of the glucose phosphotransferase transport system, *Biotechnology and Bioengineering*, **73**(6):530-535
- Báez-Viveros JL, J Osuna, G Hernández-Chávez, X Soberón, F Bolívar, G Gosset (2004). Metabolic engineering and protein directed evolution increase the yield of L-phenylalanine synthesized from glucose in *Escherichia coli*, *Biotechnology and Bioengineering*, **87**(4):516-24
- Báez-Viveros JL, N Flores, K Juárez, P Castillo-España, F Bolivar, G Gosset (2007). Metabolic transcription analysis of engineered *Escherichia coli* strains that overproduce L-phenylalanine, *Microbial Cell Factories*, **6**(30):1-20
- Balderas-Hernández VE, A Sabido-Ramos, P Silva, N Cabrera-Valladares, G Hernández-Chávez, JL Báez-Viveros, A Martínez, F Bolivar, G Gosset (2009). Metabolic engineering for improving anthranilate synthesis from glucose in *Escherichia coli*, *Microbial Cell Factories*, **8**:19-30
- Berry A (1996). Improving production of aromatic compounds in *Escherichia coli* by metabolic engineering, *Trends in Biotechnology*, **14**:250-56
- Bolívar F, RL Rodríguez, PJ Greene, MC Betlach, HL Heynecker, HW Boyer, JH Crosa, S Falkow (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*, **2**:95-113
- Bongaerts J, M Krämer, U Müller, L Raeven, M Wubbolts (2001). Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds, *Metabolic Engineering*, **3**:289-300
- Chandran SS, J Yi, KM Draths, R von Daeniken, W Weber, JW Frost (2003). Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid, *Biotechnology Progress*, **19**:808-814
- Chávez MI, A Martínez, F Bolívar, G Gosset (2005). Metabolic pathway engineering for microbial production of aromatic amino acids, *Recent Advances in Food Science*, **5**:11-20

- Cunningham DS, Z Liu, N Domagalski, RR Koepsel, MM Ataa, MM Domach (2009). Pyruvate kinase-deficient *Escherichia coli* exhibits increased plasmid copy number and cyclic AMP levels, *Journal of Bacteriology*, **191**:3041-49 Dale JW, M von Schantz (2002). From Genes to Genomes: Concepts and Applications of DNA Technology, Chapt. 5, John Wiley & Sons, Ltd. West Sussex, England, 41-64
- 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**(12):6640-45
- Dell KA, JW Frost (1993). Identification and removal of impediments to biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: Rate-limiting enzymes in the common pathway of aromatic amino acid biosynthesis, *Journal of the American Chemical Society*, **115**:11581-89
- Draths KM, DL Pompliano, DL Conley, JW Frost, A Berry, GL Disbrow, RJ Staversky, JC Lievens (1992). Biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: the Role of transketolase, *Journal of the American Chemical Society*, **114**(10):3956-62
- Draths KM, DR Knop, JW 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
- Flores N, J Xiao, A Berry, F Bolivar, F Valle (1996). Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*, *Nature. Biotechnology*, **14**:620-23
- Flores N, S Flores, A Escalante, R de Anda, L Leal, R Malpica, D Georgellis, G Gosset, F Bolivar (2004). Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and *gal* regulon genes in an *Escherichia coli* lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system, *Metabolic Engineering*, **7**:70-87
- Flores N (2005). Análisis del transcriptoma en cepas de *Escherichia coli* que carecen del sistema de fosfotransferasa (PTS) y su comparación con la progenitora silvestre. Tesis de Doctorado, UNAM, México
- Fraenkel DG (1987). **Glycolysis, pentose phosphate pathway, and Entner-Duodoroff pathway**, In: *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology 2nd Edition, Edited by: Neidhardt C, Washington, D.C. ASM Press, **1**:142-50

- 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, J Yong-Xiao, A Berry (1996). A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **17**(1):47-52
- Herrmann KM, LM Weaver (1999). The shikimate pathway, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**:473–503
- Holms H (1996). Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*, *FEMS Microbiology Reviews*, **19**:85-116
- Iomantas Y, EG Abalakina, B Polanuer, TA Yampolskaya, TA Bachina, JI Kozlov (2002). Method for producing shikimic acid. US Patent 6,436,664
- Johansson L, A Lindskog, G Silfversparre, C Cimander, KF Nielsen, G Lidén (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):541-552
- Johansson L, G Lidén (2006). Transcriptome analysis of a shikimic acid producing strain of *Escherichia coli* W3110 grown under carbon- and phosphate-limited conditions, *Journal of Biotechnology*, **126**(4):528-45
- Jurica MS, A Mesecar, PJ Heath, W Shi, T Nowak, BL Stoddard (1998). The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate, *Structure*, **6**(2):195-210
- Kambourakis S, KM Draths, JW Frost (2000). Synthesis of gallic acid and pyrogallol from glucose: replacing natural product isolation with microbial catalysis, *Journal of the American Chemical Society*, **122**:9042-9043
- Kambourakis S, JW Frost (2000). Synthesis of gallic acid: Cu²⁺-mediated oxidation of 3-dehydroshikimic acid, *The Journal of Organic Chemistry*, **65**:6904-6909
- Kedar P, R Colah, K Shimizu (2007). Proteomic investigation on the *pyk-F* gene knockout *Escherichia coli* for aromatic acid production, *Enzyme and Microbial Technology* **41**:455-65
- Knop DR, KM Draths, SS Chandran, JL Barker, R von Daeniken, W Weber, JW Frost (2001). Hydroaromatic equilibration during biosynthesis of shikimic acid, *Journal of the American Chemical Society*, **123**:10173-10182

- 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
- LaDuca RJ, A Berry, G Chotani, TC Dodge, G Gosset, F Valle, JC Liao, J Yong-Xiao, SD Power (1999). **Metabolic pathway engineering of aromatic compounds**. In: *Manual of industrial microbiology and biotechnology 2nd Edition*. Edited by Demain AJ, Davies JE. Washington, D.C. ASM Press, 605-615
- Lee SY, ET Papoutsakis (1999). Metabolic engineering. Mercel Dekker, Inc. *1st Edition*. New York, EUA, 1-7
- Li K, MR Mikola, KM Draths, RM Worden, JW Frost (1999). Fed-batch fermentor synthesis of 3-dehydroshikimic acid using recombinant *Escherichia coli*, *Biotechnology and Bioengineering*, **64**(1):61-73
- Miller JE, KC Backman, MJ O'Connor, RT Hatch (1987). Production of phenylalanine and organic acids by phosphoenolpyruvate carboxylase-deficient mutants of *Escherichia coli*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **2**(3):143-149
- Muñoz ME, E Ponce (2003). Pyruvate kinase: current status of regulatory and functional properties, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, **135**:197-218
- Nam T, S Cho, D Shin, J Kim, J Jeong, J Lee, J Roe, A Peterkofsky, S Kang, S Ryu, Y Seok (2001). The *Escherichia coli* glucose transporter enzyme IICBGlc recruits the global repressor, Mlc. *EMBO J.*, **20**:491-498
- Patnaik R, JC Liao (1994). Engineering of *Escherichia coli* central metabolism for aromatic metabolite production with near theoretical yield, *Applied and Environmental Microbiology*, **60**(11):3903-8
- Patnaik R, R Spitzer, JC Liao (1995). Pathway engineering for production of aromatics in *Escherichia coli*: Confirmation of stoichiometric analysis by independent modulation of AroG, TktA, and Pps activities, *Biotechnology and Bioengineering*, **46**:361-370
- Pittard AJ (1996). **Biosynthesis of aromatic amino acids**. In: *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology 2nd Edition*, Edited by: Neidhardt C, Washington, D.C. ASM Press, 1:458–484
- Ponce E, N Flores, A Martinez, F Valle, F Bolivar (1995). Cloning of the two pyruvate kinase isoenzyme structural genes from *Escherichia coli*: the relative roles of these enzymes in pyruvate biosynthesis, *Journal of Bacteriology*, **177**(19):5719-22
- Postma PW, JW Lengeler, GR Jacobson (1996). **Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems**. In: *Escherichia*

coli and *Salmonella*: cellular and molecular biology 2nd Edition, Edited by: Neidhardt C, Washington, D.C. ASM Press, 2:1149-74

- Ray JM, C Yanofsky, R Bauerle (1988). Mutational analysis of the catalytic and feedback sites of the tryptophan-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase of *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, **170**: 5500-5506
- Roberts CW, Roberts F, Lyons RE, Kirisits MJ, Mui EJ, Finnerty J, Johnson JJ, Ferguson DJ, Coggins JR, Krell T, Coombs GH, Milhous WK, Kyle DE, Tzipori S, Barnwell J, Dame JB, Carlton J, McLeod R (2002). The shikimate pathway and its branches in apicomplexan parasites, *Journal of Infectious Diseases* **185**(1):25-36
- Sabido-Ramos A (2006). Generación y caracterización de cepas de *Escherichia coli* productoras de antranilato y catecol, Tesis de Licenciatura, UNAM, México
- Sprenger GA (2007). From scratch to value: engineering *Escherichia coli* wild type cells to the production of L-phenylalanine and other fine chemicals derived from chorismate, *Applied Microbiology and biotechnology*, **75**:739-49
- Yi J, K Li, KM Draths, JW Frost (2002). Modulation of phosphoenolpyruvate synthase expression increases shikimate pathway product yields in *Escherichia coli*, *Biotechnology Progress*, **18**:1141-48
- Yi J, KM Draths, K Li, JW Frost (2003). Altered glucose transport and shikimate pathway product yields in *Escherichia coli*, *Biotechnology Progress*, **19**:1450-59
- Warnecke T, RT Gill (2005). Organic acid toxicity, tolerance, and production in *Escherichia coli* biorefining applications, *Microbial Cell Factories*, **4**(25):1-8
- Weaver LM, KM Herrmann (1990). Cloning of an *aroF* allele encoding a tyrosine-insensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase, *Journal of Bacteriology*, **172**:6581-84
- Weissbach A, J Hurwitz (1958). The formation of 2-keto-3-deoxyheptonic acid in extracts of *Escherichia coli* B, *The Journal of Biological Chemistry*, **234**(4):705-709

11. APENDICE

A. Preparación de células competentes.

1. Crecer en medio YENB un cultivo fresco de toda la noche (ON). Esto es muy importante ya que elimina todos los pasos requeridos para remover las sales. Se sabe que las sales reducen la eficiencia de la electrotransformación y causan arcos en la cubeta de electroporación.

YENB (Yeast Extract – Nutrient Broth):

Extracto de levadura 0.75% + Caldo nutritivo 0.8%

2. Inocular 100mL de medio YENB fresco con 0.5-1mL de un precultivo ON y crecer las células a 37° con agitación. Las células deben de ser cosechadas a una absorbancia entre 0.5-0.9 (DO_{600nm}) Si las células están sobrecrecidas, diluir a una ABS de 0.2 (DO_{600nm}) y recrecer a la DO deseada.
3. Para cosechar las células, enfriar el matraz en hielo por \approx 5min y centrifugar a 4000xg por 10min a 4°. Es importante no centrifugar a un valor de g mayor: la aplicación de una fuerza mayor aplicada por un periodo más largo reduce la viabilidad del cultivo, esto reduce la eficiencia de electroporación.
4. Remover y descartar el medio. Ya que el medio no contiene sales agregadas, no es importante remover las trazas del medio, tal y como lo requieren los protocolos originales. Lavar el pellet dos veces con 100mL de agua fría y centrifugar con en el paso 3. Remover y descartar el sobrenadante.
5. Resuspender en 20mL de glicerol frío al 10%. Centrifugar como en el paso 3, remover y desechar el sobrenadante.
6. Resuspender las células (de 100mL de cultivo) en un volumen final de 200-300 μ L de glicerol frío al 10%. El número de células debe ser de $2-4 \times 10^{10}$ UFC/mL. Estas células competentes pueden ser utilizadas frescas o congeladas para su futuro uso.
7. Para congelar las células competentes, alicuotar en tubos de centrifuga (40 μ L) y colocar los tubos en hielo seco hasta que se congelen. Almacenar a -70°. Calentar en hielo antes de usar. Estas células competentes son buenas por 1-2 años.

B. Electrotransformación

1. A una alícuota de 40 μ L de células competentes, agregar 1-5 μ L de ADN en buffer TE o agua (mejor). Mezclar bien y mantener en hielo aprox. por 1min.

2. Transferir la mezcla de células y ADN a una cubeta de electroporación y electroporar en un BioRad Gene Pulser (de acuerdo con las instrucciones de manejo).
3. Remover la cubeta de la cámara y agregar inmediatamente 1mL de medio YENB en la cubeta, se puede usar medio SOC (triptona 2%, YE 0.5%, NaCl 10mM, KCl 2.5mM, MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 10mM y glucosa 20mM). Resuspender las células. Transferir a un tubo de 17x100mm e incubar con o sin agitación a 37° por 1-3h (mínimo 1h).
4. Plaquear las células en medio selectivo (YENB con antibiotico) e incubar ON a 37°.

C. Preparación de ADN plasmídico por lisis alcalina (minipreps)

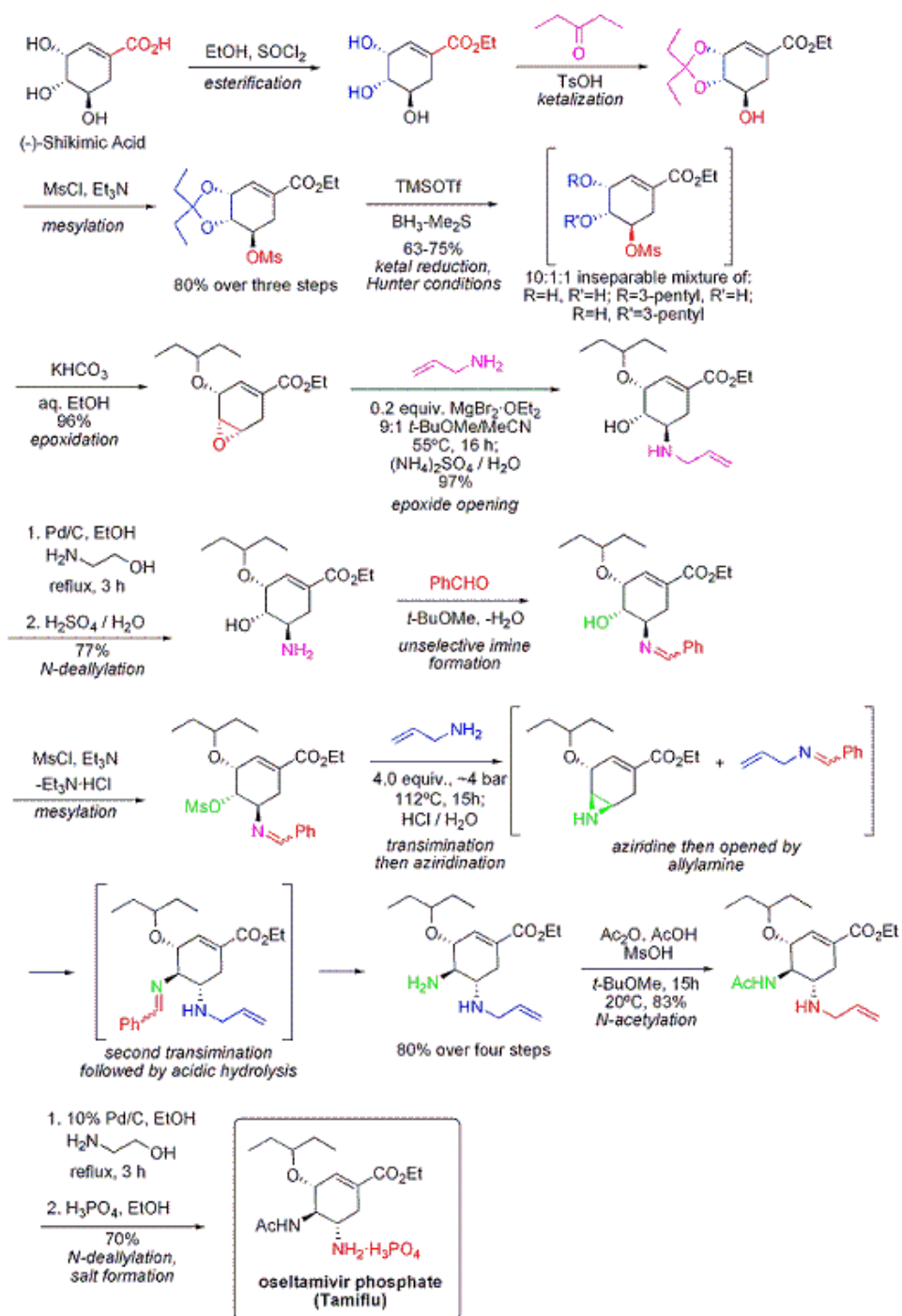
1. Crecer cultivo hasta saturación. Centrifugar 1.5mL de cultivo por 1 min. Eliminar sobrenadante
2. Resuspender el pellet en 150µL de sol I fría y 5µL de RNAasa
3. Adicionar 350µL de sol. II. Mezclar por inversión. Incubar 10 min. en hielo
4. Adicionar 250µL de Sol. III fría. Mezclar por inversión
5. Incubar 30 min. en hielo. Centrifugar 15 min. a 12,000 rpm (microcentrifuga)
6. Transferir sobrenadante a un tubo nuevo. Desechar el pellet
7. Llenar el tubo con 900µL de isopropanol a temp. ambiente. Mezclar por inversión
8. Centrifugar 15 min. a 12,000 rpm. Decantar el sobrenadante
9. Lavar con 1mL de EtOH 70%. Mezclar por inversión
10. Centrifugar 10 min. a 12,000 rpm. Decantar el sobrenadante
11. Secar en el Savant 15 min. a 30°C. Resuspender en 50mL de TE o agua milliQ estéril
12. Guardar a -20°C

Reactivos:

- Buffer TE : Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0
- Sol. I : Tris-HCl 0.05M, EDTA 0.05M, pH 8.0, Sacarosa 8%
- Sol. II : SDS 1%, NaOH 0.2M (se prepara al momento con un volumen de SDS 2% + un volumen de NaOH 0.4M)
- Sol. III : Acetato de sodio 3M, pH 5.2
- RNAasa 5mg/mL
- Isopropanol
- EtOH 70%

Anexo 1

Producción de fosfato de oseltamivir (Tamiflu®) a partir de SHK:



<http://www.moleculeoftheday.com/2006/05/03/oseltamivirtamiflu-part-1-neuraminidase-viral-glue-remover/>

El proceso desde SHK hasta el fosfato de oseltamivir tarda aproximadamente un año. Por cada 1.3g de SHK se produce 1g de Tamiflu® (10 cápsulas) el equivalente a un tratamiento para una persona.

Anexo 2

Composición del medio de cultivo mínimo ARO

Compuesto	g/L
Glucosa	1.0
KH_2PO_4	2.0
K_2HPO_4	7.0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5
Citrato de amonio férrico	0.32
Casaminoácidos	5.0
NaCl	0.5
Ácido <i>p</i> -aminobenzoico	0.0062
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	0.0048
Ácido 2,3-dihidroxibenzoico	0.0035
Tiamina - HCl	0.0001
MgSO_4	0.2465

Anexo 3.

Escalante et al. *Microbial Cell Factories* 2010, 9:21
<http://www.microbialcellfactories.com/content/9/1/21>



RESEARCH

Open Access

Metabolic engineering for the production of shikimic acid in an evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system

Adelfo Escalante*¹, Rocío Calderón¹, Araceli Valdivia¹, Ramón de Anda¹, Georgina Hernández¹, Octavio T Ramírez², Guillermo Gosset¹ and Francisco Bolívar¹

Abstract

Background: Shikimic acid (SA) is utilized in the synthesis of oseltamivir-phosphate, an anti-influenza drug. In this work, metabolic engineering approaches were employed to produce SA in *Escherichia coli* strains derived from an evolved strain (PB12) lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system (PTS⁻) but with capacity to grow on glucose. Derivatives of PB12 strain were constructed to determine the effects of inactivating *aroK*, *aroL*, *pykF* or *pykA* and the expression of plasmid-coded genes *aroG*^{fbt}, *tktA*, *aroB* and *aroE*, on SA synthesis.

Results: Batch cultures were performed to evaluate the effects of genetic modifications on growth, glucose consumption, and aromatic intermediate production. All derivatives showed a two-phase growth behavior with initial high specific growth rate (μ) and specific glucose consumption rate (q_s), but low level production of aromatic intermediates. During the second growth phase the μ decreased, whereas aromatic intermediate production reached its maximum. The double *aroK*-*aroL*⁻ mutant expressing plasmid-coded genes (strain PB12.SA22) accumulated SA up to 7 g/L with a yield of SA on glucose of 0.29 mol/mol and a total aromatic compound yield (TACY) of 0.38 mol/mol. Single inactivation of *pykF* or *pykA* was performed in PB12.SA22 strain. Inactivation of *pykF* caused a decrease in μ , q_s , SA production, and yield; whereas TACY increased by 33% (0.5 mol/mol).

Conclusions: The effect of increased availability of carbon metabolites, their channeling into the synthesis of aromatic intermediates, and disruption of the SA pathway on SA production was studied. Inactivation of both *aroK* and *aroL*, and transformation with plasmid-coded genes resulted in the accumulation of SA up to 7 g/L with a yield on glucose of 0.29 mol/mol PB12.SA22, which represents the highest reported yield. The *pykF* and *pykA* genes were inactivated in strain PB12.SA22 to increase the production of aromatic compounds in the PTS⁻ background. Results indicate differential roles of Pyk isoenzymes on growth and aromatic compound production. This study demonstrated for the first time the simultaneous inactivation of PTS and *pykF* as part of a strategy to improve SA production and its aromatic precursors in *E. coli*, with a resulting high yield of aromatic compounds on glucose of 0.5 mol/mol.

Background

The shikimic acid (SA) pathway is the common route leading to the biosynthesis of aromatic compounds in

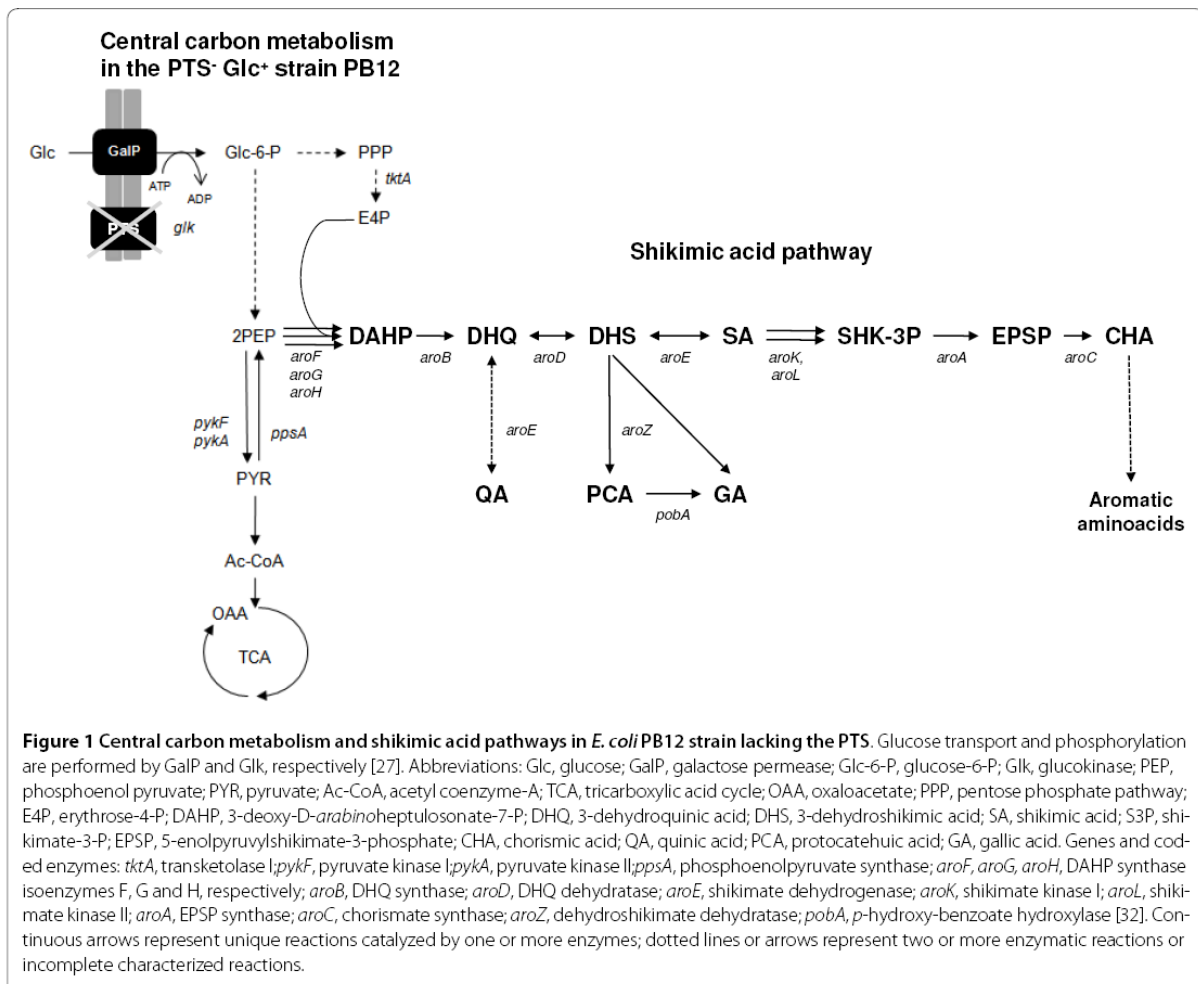
bacteria and in several eukaryotic organisms such as ascomycetes fungi, apicomplexans, and plants [1,2]. In *Escherichia coli*, the first step in this pathway is the condensation of the central carbon metabolism (CCM) intermediates phosphoenol pyruvate (PEP) and erythrose 4-phosphate (E4P) into 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate (DAHP) by the DAHP synthase (DAHPS)

* Correspondence: adelfo@ibt.unam.mx

¹ Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, 62210, México

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





isoenzymes AroF, AroG, and AroH, coded respectively by the *aroF*, *aroG* and *aroH* genes (Figure 1).

DAHP is converted to 3-dehydroquinic acid (DHQ) by dehydroquinic acid synthase, coded by *aroB*. DHQ dehydratase, coded by *aroD*, catalyzes the transformation of DHQ into 3-dehydroshikimic acid (DHS). This compound is reduced to SA by the shikimate dehydrogenase, coded by *aroE*. In turn, SA is transformed to shikimate-3-P (SHK-3P) by the shikimate kinase isoenzymes I and II, coded by the *aroK* and *aroL* genes, respectively; SHK-3P is then transformed to chorismic acid (CHA) (Figure 1).

SA is used as the precursor for the synthesis of a large number of chemicals [3-5] and nowadays has gained importance as the starting compound for the chemical synthesis of the neuraminidase inhibitor oseltamivir phosphate ((3R,4R,5S)-4-acetylamino-5-amino-3-(1-ethylpropoxy)-1-cyclohexene-1-carboxylic acid, ethyl ester phosphate (1:1)) known as Tamiflu[®] and produced by Roche Pharmaceuticals. This compound is currently employed as an antiviral drug for the treatment of both

common seasonal influenza A and B virus infections [6,7] and for the treatment of both the avian virus type H5N1 and A/H1N1 influenza infections. The latter has been considered a new pandemic [8,9]. It has been estimated that in the case of a global pandemic of influenza, the present capacity of Tamiflu[®] production could be insufficient to protect large populations, particularly in developing countries [7,8]. Thus, alternative biotechnological strategies with engineered strains to produce SA have gained relevance.

Several metabolic engineering approaches have been developed to obtain SA from *E. coli* by biotechnological processes as an alternative to its limited and costly extraction procedures from plants such as *Illicium anisatum* or *I. verum* [3,5,9-11]. Previously developed approaches involve *E. coli* derivatives with several genetic modifications in the CCM and SA pathways. CCM modifications comprise inactivation of the PTS operon (*ptsHlccr*), expression of non-PTS glucose transporters like glucose facilitators and transformation with plasmids carrying

the *tktA* and *ppsA* genes, coding for transketolase I and PEP synthase, respectively, to increase the availability of intermediates E4P and PEP, respectively [3,4,12-18]. The main modifications in the SA pathway include the partial or total blockage of the SA flux into CHA. This has been achieved by decreasing or completely eliminating the synthesis of SHK-3P -by inactivating *aroK* and *aroL* genes- with the subsequent SA accumulation (Figure 1). These modifications are commonly complemented with the transformation of plasmid-coded feedback resistant (*fbr*) AroF or AroG proteins (AroF^{fbr} and AroG^{fbr}, respectively), required to avoid possible feedback inhibition in the first step of the aromatic pathway catalyzed by DAHPS isoenzymes. The rate-limiting enzyme DHQ synthase, and shikimate dehydrogenase, which is feedback inhibited by SA [3,15], catalyze two reactions that can be improved with the goal of increasing the synthesis of SA. It has been proposed that high extracellular SA concentration drives the transport of this compound into the cells by the SA transporter ShiA (*shiA*). Higher intracellular SA accumulation reverts the reaction catalyzed by *aroE* to synthesize DHS, resulting in "hydroaromatic equilibration" and by-productby formation, such as quinic (QA) and gallic acids (GA) (Figure 1). Inactivation of the ShiA transporter has been used as a strategy to reduce the intracellular accumulation of DHS, QA, and GA [3,4,15,19,20]. Engineered *E. coli* strains with several of the genetic modifications described above have been successfully applied to produce 71 g/L of SA with a yield of 0.27 mol SA/mol glc and total aromatic compound yield (TACY) (including SA, DHS and QA) of 0.34 mol aromatic compounds/mol glc in 1-L fed-batch cultures using mineral broth with 15 g/L yeast extract and glucose addition to maintain a 55-170 mM concentration [4]. The effects of carbon and phosphate limitations in chemostat cultures on SA production have been studied elsewhere [15,19].

Our group has been involved in the characterization of *E. coli* strains lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system (PTS⁻), such as strain PB12 (PTS⁻ glc⁺), which has been selected as an evolved strain for growth rate recovery in a chemostat with glucose fed at progressively faster rates [21,22]. This strain utilizes galactose permease (GalP) and glucokinase (Glk) to transport and phosphorylate glucose into glucose-6-P, respectively (Figure 1). In addition, most of the glycolytic and other CCM genes are upregulated in this derivative as compared to its parental strains [21-25]. Further characterization of this evolved strain has shown increased PEP availability that can be redirected into the aromatic pathway, as compared to isogenic PTS⁺ strains. PB12 strain has been modified for the high yield production of aromatic compounds such as L-phenylalanine [26,27] and L-tyrosine [28].

In this work, we report the construction of a SA over-producing derivatives from the *E. coli* PB12 strain by inactivation of the *aroL* and *aroK* genes and expressing in plasmids different combinations of *aroG^{fbr}*, *tktA*, *aroE*, and *aroB* genes. The effects of single inactivation of either pyruvate kinase (Pyk) I or II, coded respectively by *pykF* and *pykA*, were also evaluated. This strategy was used to achieve additional availability of PEP for the synthesis of aromatic compounds and SA in the *E. coli* PB12 PTS⁻ glc⁺ background.

Results and discussion

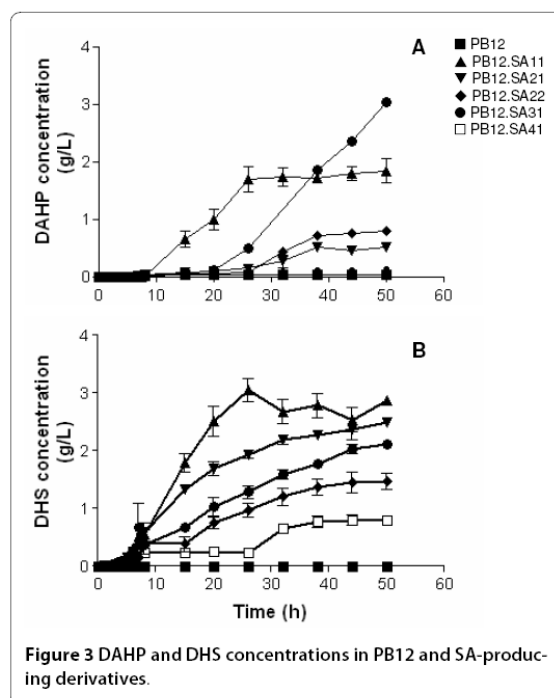
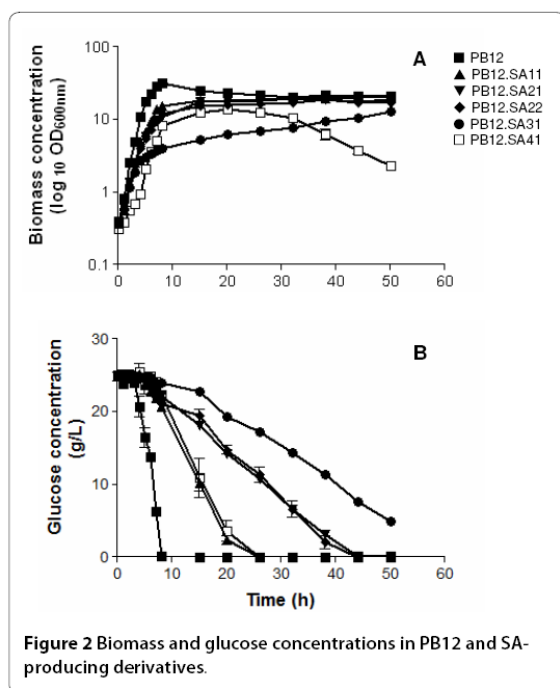
Inactivation of the genes coding for shikimate kinases I and II, and expression of the *aroG^{fbr}*, *tktA*, *aroB* and *aroE* genes in plasmids in the PB12 strain background

The capacity of the *E. coli* PB12 (PTS⁻ glc⁺) strain to produce SA was evaluated in 500 mL batch cultures in 1 L fermentors grown in mineral broth supplemented with 25 g/L of glucose and 15 g/L of yeast extract. Specific growth rate (μ), glucose consumption (*qs*), SA production and

Table 1: Growth kinetic parameters for strain PB12 and SA-producing derivatives.

Strain/derivative	μ (h ⁻¹)	<i>qs</i> (millimol glc g DW ⁻¹ h ⁻¹) ^c
PB12	0.48 ± 0.02	5.17 × 10 ⁻⁶ ± 4.07 × 10 ⁻⁷
PB12.SA11	0.41 ± 0.00	2.03 × 10 ⁻⁶ ± 4.79 × 10 ⁻⁷
PB12.SA21	0.42 ± 0.02*	2.5 × 10 ⁻⁶ ± 8.55 × 10 ⁻⁷ *
PB12.SA22	0.42 ± 0.01*	1.93 × 10 ⁻⁶ ± 5.9 × 10 ⁻⁷ *
PB12.SA31	0.32 ± 0.02	7.76 × 10 ⁻⁶ ± 9.67 × 10 ⁻⁸
PB12.SA41	0.45 ± 0.03	2.58 × 10 ⁻⁶ ± 5.39 × 10 ⁻⁷

Values are the average of two independent experiments. ^a μ , specific growth rate; ^b*qs*, specific glucose consumption rate; ^cDW, dry cell weight. Mean values within each column with the same superscript (*) (*P* < 0.05) do not differ significantly with respect to the immediate parental strain (see Methods).



yield, as well as DAHP, DHS and GA concentrations were evaluated during 50-h cultures (Table 1, Figure 2). Strain PB12 reached an $OD_{600\text{ nm}}$ of 32, after 8 h of fermentation with the consumption of 98.7% of added glucose. From this time (8 h) to the end of the fermentation (50 h), a decrease in biomass concentration was observed (Figure 2). Analysis of culture supernatants showed that as expected, strain PB12 did not accumulate DAHP (Table 2, Figure 3).

Similarly to strain PB12, cultures of strain PB12.SA11 (aroL- strain expressing aroGfbr, tktA and aroB from two different plasmids) (see Methods, Figure 1 and Table 3)

also showed an exponential growth phase during the first 8-h cultivation interval as detected for strain PB12 (Figure 2). However, a significant decrease ($P < 0.05$), determined by the Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) test, was observed (see Methods) in both μ and q_s values (86% and 39%, respectively), when compared to those recorded for strain PB12 (Table 1). From this moment (8 h) the strain remained stationary. DAHP, DHS, SA, and GA production was detected during the exponential growth phase (Figures 3 and 4). Interestingly, relatively constant concentration levels of all aromatic intermediates were observed after glucose was com-

Table 2: Aromatic metabolites production and yields determined for strain PB12 and SA-producing derivatives.

Strain	SA (g/L)	SA yield (mol SA/mol glc)	DAHP (g/L)	DHS (g/L)	GA (g/L)	TACY1 (mol aromatic compounds/mol glc)
PB12	ND	---	0.044 ± 0.07	ND	ND	0.00
PB12.SA11	2.82 ± 0.01	0.11 ± 0.00	1.71 ± 0.07	2.79 ± 0.21	0.21 ± 0.06	0.28
PB12.SA21	5.07 ± 0.00	0.21 ± 0.00	0.52 ± 0.00	2.49 ± 0.06*	0.14 ± 0.00	0.33*
PB12.SA22	7.05 ± 0.06	0.29 ± 0.00	0.81 ± 0.04	1.46 ± 0.14	0.08 ± 0.01	0.37*
PB12.SA31	4.35 ± 0.57	0.22 ± 0.04	3.03 ± 0.00	2.12 ± 0.02	0.23 ± 0.04	0.50
PB12.SA41	1.00 ± 0.36	0.03 ± 0.02	0.14 ± 0.00	0.79 ± 0.01	ND	0.07

Values are the average of two independent experiments. [†]TACY, Total aromatic compound yield (combined DAHP, DHS, SA and GA molar yields); ND, Non-detected. Mean values within each column with the same superscript (*) ($P < 0.05$) do not differ significantly with respect to the immediate parental strain (see Methods).

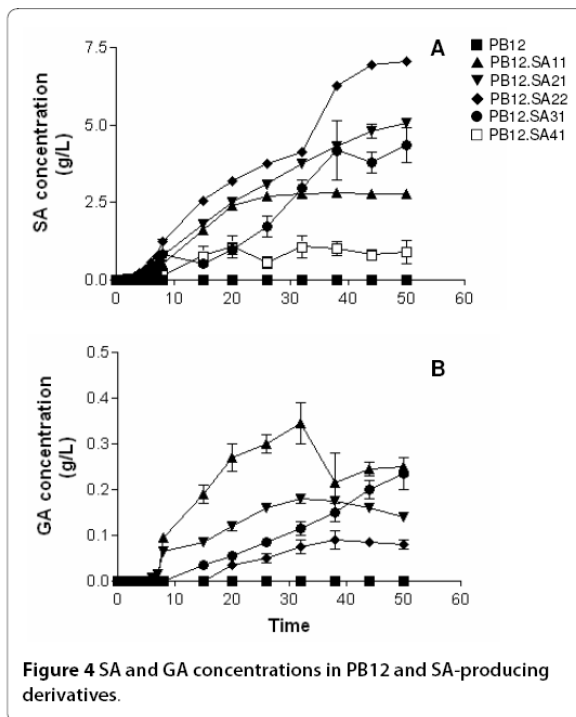
Table 3: Strains and plasmids used and developed in this work.

Strain/derivative	Relevant characteristics	Reference
<i>E. coli</i> JM101	<i>supE, thi, Δ(lac-proAB)</i> , F'	[45]
<i>E. coli</i> JM101 <i>aroK</i> ⁻	<i>E. coli</i> JM101 <i>aroKΔ::cm</i>	This work
<i>E. coli</i> <i>aroB</i> ⁻	<i>E. coli</i> K12 strain BW25113 <i>ΔaroB::kan</i> (JW3352)	[48]
<i>E. coli</i> <i>aroE</i> ⁻	<i>E. coli</i> K12 strain BW25113 <i>ΔaroE::kan</i> (JW3242)	[48]
<i>E. coli</i> PB28	PB12 <i>ΔpykA::cat ΔpykF::gen</i>	[31]
<i>E. coli</i> PB12	JM101 <i>Δ(ptsH-l-crr)::kan glc</i> ⁺	[18]
PB12.SA1	PB12 <i>ΔaroL</i>	This work
PB12.SA11	PB12.SA1 pJLBaroG ^{fbr} <i>tktA</i> pTOPOaroB	This work
PB12.SA2	PB12 <i>ΔaroL ΔaroK::cm</i>	This work
PB12.SA21	PB12.SA2 pJLBaroG ^{fbr} <i>tktA</i> pTOPOaroB	This work
PB12.SA22	PB12.SA2 JLBaroG ^{fbr} <i>tktA</i> pTOPOaroB <i>aroE</i>	This work
PB12.SA3	PB12.SA2 <i>ΔpykF::gen</i>	This work
PB12.SA31	PB12.SA3 pJLBaroG ^{fbr} <i>tktA</i> pTOPOaroB <i>aroE</i>	This work
PB12.SA4	PB12.SA2 <i>ΔpykA::gen</i>	This work
PB12.SA41	PB12.SA4 pJLBaroG ^{fbr} <i>tktA</i> pTOPOaroB <i>aroE</i>	This work
<i>E. coli</i> TOP10	F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80/lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG</i>	Invitrogen
Plasmids		
pJLBaroG ^{fbr} <i>tktA</i>	pJLBaroG ^{fbr} (<i>aroG</i> ^{fbr} expressed from the <i>lacUV5</i> promoter, <i>lacIq</i> and <i>tet</i> genes (Tc ^r), pACYC184 replication origin) derivative, containing the <i>tktA</i> gene with its native promoter.	[21,47]
pCR ⁺ -Blunt II-TOPO ⁺	P _{lac} <i>lacZ-α</i> ORF T7 promoter <i>ccdB kan</i> (Km ^r) Zeocin pUC origin.	Invitrogen
pTOPO <i>aroB</i>	pCR ⁺ -Blunt II-TOPO ⁺ containing the <i>aroB</i> gene	This work
pTOPO <i>aroB aroE</i>	pTOPOaroB derivative containing the <i>aroB</i> and <i>aroE</i> genes	This work

pletely consumed. DAHP, DHS, and SA accumulated during the first 26 h of cultivation; thereafter their concentration remained constant at around 1.71, 2.8, and 2.8 g/L, respectively (Table 2). SA yield on glucose was 0.11 mol SA/mol. GA concentration was lower than the other aromatic intermediates; however, as in the case of DHS, this strain produced higher GA concentrations (approximately 0.3 g/L, Table 2, Figure 4), than the other PB12 derivatives. It has been proposed that GA is formed by the oxidation of DHS into a diketo intermediate protocatechuic acid (PCA) followed by its spontaneous aromatization. Alternatively, this compound may result from the dehydration of DHS followed by hydroxylation of the intermediate PCA [29] (Figure 1). GA accumulation during SA production has not been reported in either batch

or fed-batch cultures [4], but it has been detected in batch and chemostat cultures under carbon-limited conditions [15].

Plasmid-coded AroG^{fbr} DAHPS avoided feedback inhibition of the first reaction of the SA pathway by the phenylalanine present in the yeast extract included in the medium or produced by the cell. It has been reported that DAHPS activity in vivo is limited by PEP and E4P availability and that maximum specific activity of DAHPS is reached when the concentration of both intermediates is increased [13,17]. It has also been reported that the presence of a plasmid-coded copy of *tktA* (coding for transketolase I) causes an increase in E4P availability in strain PB12 [21,22,25,30-32]. In addition, it is expected that the



presence of *aroB* in a multicopy plasmid (Figure 1) will reduce the possible accumulation of DAHP [3,4].

Inactivation of *aroL* gene as part of a SA production strategy has been previously described in the *E. coli* W3110 *aroL*-strain (W3110 shik1) in chemostat cultures that resulted in maximum SA yields on glucose of 0.02 and 0.05 mol/mol under carbon and phosphate limited conditions that resulted in a maximum SA yield on glucose of 0.2 mol/mol and 0.05 mol/mol, respectively [15,19]. In the present study, strain PB12.SA11 yielded 0.11 mol SA/mol glc; however, maximum yields of SA on glucose of 0.27 and 0.33 mol/mol have been reported for another *E. coli* strain (PTS- *glf*, *glk*, *aroF*^{fbr}, *tktA*, *aroE*, *aroK*-*aroL*⁻) in 1-L and 10-L fed-batch cultures, respectively [4], suggesting that the Δ *aroL* phenotype is in itself insufficient to achieve high SA yields.

Strain PB12.SA21 (*aroL*-*aroK*-strain expressing plasmid coded *aroG*^{fbr} *tktA* and *aroB* genes) (Figure 1 and Table 3) showed an exponential growth phase during the first 8 h fermentation interval and a stationary stage similar to what was observed for PB12 and PB12.SA11 strains (Figure 2). No significant differences ($P < 0.05$) were observed in μ and *qs* values between PB12.SA21 and PB12.SA11 strains as a consequence of the inactivation of the *aroL* and *aroK* genes (Table 1). DAHP, DHS, SA, and GA production was also detected during the exponential growth phase, but important differences were observed (Figures 3 and 4). Compared to the PB12.SA11 derivative,

maximum concentrations of DAHP and GA in the PB12.SA21 strain were significantly lower ($P < 0.05$), whereas no significant difference ($P < 0.05$) was observed in the maximum concentration of DHS (Table 2, Figure 3). Furthermore, SA production was observed throughout all the process (Figure 4). After 50 h of cultivation, about 5.1 g/L of SA were detected with a yield on glucose of 0.21 mol/mol. This result represents a significant increase ($P < 0.05$) (80%) in both SA concentration and yield, as a consequence of the double *aroK*-*aroL*-mutations (Table 2, Figure 4). The concentrations of DAHP, DHS (Figure 3) and SA obtained in strain PB12.SA11, as compared to the ones recorded for the PB12.SA21 derivative, indicate an efficient flow of aromatic intermediates from DAHP to SA. However, based on the still relatively high DHS concentration observed, it appears that this strain can further convert part of the remaining DHS to improve SA concentration and yield.

Cultures of strain PB12.SA22 (*aroK*-*aroL*-strain expressing *aroG*^{fbr}, *tktA*, *aroB* and *aroE* from two different plasmids) (Table 3, Figure 1) showed no significant differences ($P < 0.05$) in μ and *qs* values with respect to those for strain PB12.SA21 (Table 1). Glucose was totally consumed in both strains only after 38 h of cultivation (Figure 2). DHS was detected in a significantly ($P < 0.05$) lower concentration than the previous derivative and SA reached the highest concentration compared to all other derivatives (Table 2, Figure 4). At the end of the fermentation, 7.1 g/L of SA were detected with a yield on glucose of 0.29 mol SA/mol (39% increase in yield with respect to the previous derivative) and a TACY value of 0.378 mol aromatic compounds/mol glc (Table 2, Figure 4). Introduction of a copy of the *aroE* gene in the multicopy plasmid pTOPO resulted in a more efficient conversion of DHS into SA, probably as a consequence of a responsible for the synthesis of DHS from SA [3,4,15,19,20]. Accordingly, very small amounts of GA were produced during the cultivation of this strain (Table 2, Figure 4).

Inactivation of the genes coding for pyruvate kinases I and II in the PB12SA.22 strain

Disruption of the *pykF* gene in strain PB12.SA22 generated the PB12.SA31 derivative (*aroL*⁻, *aroK*⁻, *pykF*-strain expressing *aroG*^{fbr}, *tktA*, *aroB* and *aroE* genes from two different plasmids) (Figure 1 and Table 3). Cultures of this strain showed the characteristic two-phase growth behavior observed for the previous derivatives (Figure 2), although significant ($P < 0.05$) differences were observed in μ and *qs* values as compared to the PB12.SA22 *pykF*⁺ parental strain (Table 1). In addition, maximum biomass concentration after 8 h of fermentation was only 33% with respect to the one recorded for PB12.SA22 and, contrary to all other analyzed strains, glucose was not com-

pletely consumed after 50 h (Figure 2). DHS, GA, and specially DAHP final concentrations were higher than those obtained with the *pykF*⁺ parental strain, whereas the final SA production and yield were lower (Table 2). Importantly, the TACY value in this strain was 0.50 mol aromatic compounds/mol glc (i.e., a 33% increment with respect to PB12.SA22), the highest yield obtained when compared to all previous PB12.SA derivatives (Table 2).

Inactivation of the *pykA* gene in strain PB12.SA22 generated the derivative PB12.SA41 (*aroL*⁻, *aroK*⁻, *pykA*⁻ strain expressing *aroG*^{fbr}, *tktA*, *aroB* and *aroE* genes from two different plasmids) (Table 3, Figure 1). Cultures of this strain showed no-significant differences ($P < 0.05$) in μ and *qs* values with respect to those recorded for the parental strain PB12.SA22 *pykA*⁺ (Table 1). This strain reached an OD_{600 nm} of 14 after 20 h of fermentation; however, an important decrease in growth was observed from this moment to the end of the fermentation (Figure 2). This strain also showed the lowest production of DAHP, DHS, and SA as compared to all other variants, and no GA was detected (Table 2, Figures 3 and 4).

Pyruvate kinase isoenzymes Pyk I and Pyk II play a key role in the glycolytic pathway, especially in overall carbon metabolism in strains lacking PTS [33,34]. Pyk activity, together with phospho-fructokinase I and glucokinase, control the carbon flux through the glycolytic pathway and catalyze the essentially irreversible trans-phosphorylation of PEP and ADP into PYR and ATP [33]. It has been previously reported that inactivation of *pykF* in strain PB12 (PTS⁻glc⁺) results in an apparently slight increase in the specific activity of Pyk A enzyme (13.5%) [34]. Likewise, carbon flux analysis in this strain has shown a flux increase through the Pyk AF enzymes in the absence of PTS as compared to the wild-type strain (JM101 PTS⁺) [23]. Furthermore, transcriptome analyses in strain PB12 and in a phenylalanine overproducing PB12 derivative have shown a slight upregulation of *pykA* with respect to the wild type strain JM101, suggesting that the overall activity of Pyk isoenzymes present in the PB12 strain is sufficient to convert PEP into PYR, at least at similar rates as in JM101 [31,35]. These results suggest that single inactivation of the *pykF* or *pykA* gene could be an attractive strategy to increase the amount of PEP available for DAHP synthesis, without compromising the synthesis of PYR and its flux to acetyl-CoA.

Interruption of either the *pykF* or *pykA* gene in the *E. coli* strain PB12.SA22 demonstrated a differential role of Pyk isoenzymes in overall cellular metabolism in this strain which produces aromatic compounds. Disruption of *pykF* in strain PB12.SA31 negatively affected growth, glucose consumption, and SA accumulation with respect to the PB12.SA22 *pykF*⁺ parental strain. Importantly, the TACY value increased to 0.50 mol aromatic compounds/

mol glc in the *pykF*⁻ strain, which is 33% higher than the total yield observed for the parental strain PB12.SA22. These results suggest that *pykF* inactivation apparently increases PEP availability, which in turn is channeled into the aromatic pathway, resulting in a higher TACY value. Higher DAHP concentrations produced by the PB12.SA31 derivative also indicate that in this genetic background, DHQ synthase could be one of the limiting steps for SA production. This explanation contravenes the fact that this strain was transformed with a plasmid-carrying *aroB*; however, a previous report on the proteomic response to *pykF* inactivation in *E. coli* BW25113 strain demonstrated the upregulation of all the genes of the SA pathway, with the exception of *aroB*, during the production of aromatic amino acids [33]. Therefore, increasing the expression of the *aroB* gene, by substitution of its natural promoter for a stronger one, could be a viable strategy to improve SA concentrations in strain PB12.SA31.

Pyk activity plays a key role in cellular metabolism by connecting glycolysis with amino acid and lipid biosynthetic pathways [34,36,37]. Consequently, one remarkable characteristic of Pyk isoenzymes is their allosteric response to several effectors involved not only in central carbon metabolism but also in global cellular metabolism, among them, the glycolytic intermediate PEP [34,38,39]. It has been proposed that Pyk isoenzymes are involved in catabolite repression in *E. coli* glucose fermentations [40]; however, no information is available to correlate the specific role of individual Pyk isoenzymes in global bacterial metabolism, particularly in strains devoted to the production of aromatic compounds. Our results demonstrate that inactivation of the *pykA* gene in strain PB12.SA41 caused a negative effect on the production of aromatic compounds, probably due to an increased growth rate (Table 1). In addition, SA accumulation and TACY were substantially reduced in this strain as compared to the PB12.SA31 (*pykF*⁻) and PB12.SA22 (*pykA*⁺ *pykF*⁺) strains. The lack of *pykF* clearly reduced μ and *qs* values in relation to the parental PB12.SA22 strain. In addition, glucose was not completely consumed in strain PB12.SA31 after 50 h, as compared to strain lacking *pykA*, where it was completely consumed after 25 h (Figure 2). Furthermore, the accumulation of aromatic compounds was the highest in the strain lacking *pykF*, while in the strain PB12.SA22, 37% of glucose was converted into aromatic compounds; this amount increased to 50% in strain PB12.SA31. Altogether, the result of differentially inactivating the kinases I and II suggest that the PykF isoenzyme may have a more relevant role in global cellular processes than PykA in the derivatives constructed under the growth conditions tested here, since it seems that the absence of *pykF* apparently allows

higher accumulation of PEP than the absence of *pykA*. Importantly, *pykF* is apparently transcribed when growing on glucose from at least three different promoters in strains JM101 and PB12, while *pykA* is apparently only transcribed from two [41]. These results are in agreement with previous observations which suggest that PykF plays a more important role than PykA in strain JM101 (PTS⁺) and other derivative strains lacking PTS, when growing on glucose as the only carbon source [34].

Conclusions

E. coli PB12 (PTS⁻ glc⁺) strain was used as the host for the synthesis of SA. The derivative PB12.SA22 was obtained by inactivation of both *aroL* and *aroK* genes, and transformed with plasmids carrying *aroG^{fb}*, *tktA*, *aroB*, and *aroE* genes. This strain was capable of efficiently channeling carbon from metabolites participating in the CCM into the aromatic pathway for the synthesis of SA. Fermentor cultures of PB12.SA22 strain in mineral broth complemented with 25 g/L glucose and 15 g/L yeast extract resulted in the production of 7 g/L of SA with a yield of SA on glucose of 0.29 mol/mol and a TACY of 0.38 mol aromatic compounds/mol glc. Importantly, glucose was totally consumed in strain PB12.SA22 after 48 h of fermentation. It is known that PTS⁻ strains are capable of utilizing higher concentrations of glucose (100 g/L) [42,43] and different carbon sources simultaneously with glucose [29,31]. Therefore, experiments with higher glucose concentrations, including fed-batch fermentations should be performed to increase SA concentrations. In fact, preliminary results, in which glucose concentration in the medium was increased to 100 g/L, in a 500 mL batch fermentor cultures with strain PB12.SA22, allowed the production of 14 g/L of SA (unpublished results).

Single inactivation of either the *pykF* or *pykA* gene was performed to further increase PEP availability for SA production in strain PB12.SA22. Inactivation of these genes demonstrated differential roles of Pyk isoenzymes in final growth, glucose consumption, and production of aromatic intermediates and SA. The *pykF* mutation present in strain PB12.SA31 substantially affected biomass concentration, glucose consumption, and SA production, suggesting a more important role of the PykF isoenzyme in comparison to PykA, in these growing conditions. The production of SA was reduced in this strain as compared to strain PB12.SA22; however, it is notable that TACY reached a value of 0.5 mol aromatic compounds/mol glc, which was 33% higher than the one obtained in the parental *pykF⁺* strain. As far as we know, there are no reports in which the utilization of a double PTS⁻, *pykF* derivative has been used to improve the production of SA and its aromatic precursors [3,4,16-18,44]. Further genetic modifications will be undertaken in this *pykF* derivative, such as the substitution of the *aroB* natural

promoter for another that allows its upregulation to avoid the accumulation of the aromatic intermediate DAHP in order to increase the production of SA. In addition, carbon flux could still be further modulated by reducing the expression of *pykA* in the strain lacking *pykF*, to obtain a higher accumulation of PEP to be channeled into the SA pathway. The *pykA* gene in these *E. coli* derivatives, as mentioned, is expressed from two different promoters when glucose is utilized as the only carbon source [41]. Therefore, it could be possible to construct derivatives lacking one of these two promoters to reduce the transcription of *pykA* with the goal of increasing PEP concentration.

This study demonstrated for the first time the simultaneous inactivation of PTS and *pykF* as part of a strategy to improve SA production and its aromatic precursors in *E. coli*, with the resulting high yield of 0.5 mol aromatic compounds/mol glc.

Methods

Bacterial strains and plasmids

Bacterial strains and plasmids used in this work are listed in Table 3. *E. coli* PB12, a derivative of strain JM101 [45], was used as the parental strain to originate the interruptions in *aroL* and *aroK* as well as the single interruption of *pykF* or *pykA*. Amplification of target genes was performed with *Pfu* DNA polymerase (Fermentas, Glen Burnie, USA), according to recommendations by the supplier, in a GeneAmp PCR System thermocycler (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA). Primer sets employed for amplification of target genes are listed in Table s1 (see Additional file 1). The size of the PCR products was determined by agarose gel electrophoresis. When required, amplicons were purified by cutting the desired band from the agarose gels and processed with a gel PCR purification kit (Marligen Biosciences, Urbana-Pike-ljamsville, USA). The obtained derivative strains were transformed with plasmids carrying the *aroG^{fb}*, *tktA*, *aroB*, and *aroE* genes (see below) for the construction of SA producing strains.

Inactivation of the *aroL* gene

PB12.SA1 strain (*aroL*- derivative) (Table 3) was obtained by the one-step inactivation procedure of chromosomal genes by PCR products [46]. Primer sets used are listed in Table s1 (see Additional file 1). The *aroL* gene was replaced by the Δ *aroL::cat* cassette. Selection was performed in chloramphenicol (Cm) containing Luria Bertani (LB) plates. Inactivation of the *aroL* gene in chloramphenicol resistant (Cm^r) colonies was confirmed by PCR and the size of the PCR product was determined by agarose gel electrophoresis. The Cm cassette was deleted from the Δ *aroL::cat* construction, as previously described [46], to facilitate subsequent gene inactivation; the *aroL*- genotype was confirmed by PCR.

Inactivation of the *aroK* gene

Strain PB12.SA2 (*aroL*⁻, *aroK*⁻ derivative) (Table 3) was constructed in a two-step procedure. First, the *aroK* gene of *E. coli* JM101 strain was replaced by the Δ *aroK::cat* cassette [46]. Selection was performed in Cm containing plates and the inactivation of *aroK* in Cm^r colonies was confirmed by PCR. Second, strain PB12.SA1 was the recipient of P1 phage lysate grown on the JM101 *aroK* strain; the *aroK*⁻ genotype was confirmed by PCR.

Inactivation of the *pykF* gene

PB12.SA22 strain was the recipient of P1 phage lysate of *E. coli* PB28 (Δ *pykF::gen*) strain (Table 3). Transductants were selected on gentamicin (Gm) plates and the inactivation of *pykF* in Gm^r colonies was confirmed by PCR; the size of the PCR product was determined by agarose gel electrophoresis. The resultant strain (*aroL*⁻, *aroK*⁻, *pykF*⁻ derivative) was named PB12.SA31.

Inactivation of the *pykA* gene

PB12.SA4 strain (*aroL*⁻, *aroK*⁻, *pykA* derivative) (Table 3) was constructed by a modification of the one-step inactivation procedure of chromosomal genes by PCR products [46]. Briefly, template plasmids pKD3, pKD4, or pKD13, used to amplify FRT-resistance gene-FRT cassette, only allowed the use of Cm or kanamycin (Km) as selection markers [46]; however, PB12.SA2 carried both resistance genes as a consequence of previous genetic modifications [31]. For this reason, a primer set was designed (Table s1, see Additional file 1), for priming the Gm^r cassette flanked by the entire FRT sequence and homology regions for the *pykA* gene. The Gm^r cassette was amplified using chromosomal DNA from PB12.SA3 as template and the expected product was confirmed by PCR. Purified PCR products were used to inactivate *pykA* in strain JM101. Selection of the resultant Δ *pykA::gen* mutant was achieved on Gm containing plates and the inactivation of *pykA* in Gm^r colonies was confirmed by PCR; the size of the PCR products was determined by agarose gel electrophoresis. The Δ *pykA::gen* construction was then P1 phage transduced to PB12.SA3; Gm^r colonies were selected and screened.

Transformation of derivative strains with plasmid pJLBaroG^{fb}tktA

The construction of plasmid pJLBaroG^{fb}tktA (Table 3) has been previously reported [21,47]; this vector was used to transform all SA producing derivative strains. Positive clones were selected by growing colonies on LB plates supplemented with tetracycline (Tet).

Cloning the *aroB* gene and transformation with plasmid pTOPOaroB

The *aroB* gene (1484 bp) was obtained by PCR using chromosomal DNA from *E. coli* JM101 strain as template and the primers F*varoB* and R*varoB* (Table s1, see Additional file 1). PCR reaction was performed with *Pfu* polymerase; the size of the PCR product was determined by

agarose gel electrophoresis and cloned directly into the pCR⁺-Blunt II-TOPO⁺ vector (Invitrogen, Carlsbad, USA) leading to the construction of the pTOPO*aroB* plasmid (Table 3). This vector was used to transform competent TOP10 cells (Invitrogen) and selection was performed on 25 μ g/mL of zeocin-containing LB plates. Functionality of the cloned *aroB* gene was tested by restoring growth of an *aroB*⁻ *E. coli* mutant [48] in M9 minimal medium plates supplemented with zeocin, as a consequence of the complementation of the SA pathway in this mutant strain.

Cloning the *aroE* gene and transformation with plasmid pTOPOaroE

The *aroE* gene (835 bp) was obtained by PCR using chromosomal DNA from *E. coli* JM101 strain as template and primers F*varoE* and R*varoE* (Table s1, see Additional file 1). PCR amplification was performed as described for the *aroB* gene; the size of the PCR product was determined by agarose gel electrophoresis. Amplified *aroE* gene and plasmid pTOPO*aroB* were both digested with *Bam* HI endonuclease. This vector was treated with calf intestine phosphatase (Fermentas) and ligated with the digested *aroB* product using T4 DNA ligase (Fermentas), transformed into TOP10 competent cells and selection was performed on zeocin-containing LB plates. Functionality of the cloned *aroE* gene was tested by restoring growth of an *aroE*⁻ *E. coli* mutant [48] in M9 minimal medium plates supplemented with zeocin.

Cultivation media and growth conditions

Shake flask cultures inoculated with frozen stocks of each strain were performed in 125 mL baffled flasks containing 10 mL of LB supplemented with the respective antibiotics as required: 30 μ g/mL Km, 15 μ g/mL Gm, 20 μ g/mL Cm or 30 μ g/mL Tet (Table 3 shows specific antibiotic resistances). Cultures were incubated overnight in a shaker (New Brunswick Scientific, Edison, USA) at 37°C, 300 rpm. An aliquot of 150 μ L from each culture was used to inoculate a 250 mL baffled flask with 50 mL of fermentation medium, whose composition has been previously reported for the production of SA, and grown as described above. This medium contained 25 g/L of glucose, 15 g/L of yeast extract [4] and the required antibiotics. Biomass concentrations were determined and calculations were performed to adjust inoculum size to an OD_{600 nm} of 0.35. Batch cultures were performed in duplicate in an Applikon autoclavable glass Bio Reactor (Schiedam, The Netherlands) 1 L fermentor (500 mL of working volumen of fermentation medium supplemented with the required antibiotics). This device was connected to an Applikon ADI 1010 BioController and ADI 1025 controllers to monitor temperature, pH, impeller speed and dissolved oxygen (DO). Batch fermentations were run for 50 h at 37°C, pH 7.0 (maintained by addition of 3.0% NH₄OH). An impeller speed of no less than 500 rpm

was used to maintain DO levels at 20% air saturation. Gene expression of cloned genes was induced by adding 0.1 mM IPTG at the onset of fermentation.

Analytical procedures

Biomass concentrations were monitored every hour during the first 8 h of culture; after this point they were monitored every 6 h until the end of the fermentation. Samples (1.5 mL) were withdrawn from each reactor and cell turbidity was determined spectrophotometrically at 600 nm (Beckman DU[®]-70 Spectrophotometer, Palo Alto, USA). Samples for the determination of SA, DHS, QA, and GA were prepared by centrifuging at 12,000 rpm for 1 min (Eppendorf Centrifuge 5410, Brinkman Instruments Inc., Westbury, USA) 1 mL of fermented broth to remove cells and filtered through 0.45 μ m nylon membranes (Millipore, Brazil). SA, DHS, QA, and GA concentrations were determined by HPLC using a Waters system (600E quaternary pump, 717 automatic injector, 2410 refraction index, and 996 photodiode array detectors, Waters, Milford, USA), equipped with an Aminex HPX-87H column (300 \times 7.8 mm; 9 μ m) (Bio-Rad, Hercules, USA) maintained at 50°C. The mobile phase was 5 mM H₂SO₄ with a flow rate of 0.5 mL/min, at 50°C. All metabolites were detected with a photodiode array detector at 210_{nm}. DAHP concentrations were determined by the thiobarbituric acid assay [49]. This method does not distinguish between DAHP and DAH, so in this work, DAHP levels corresponded the sum of both compounds [26]. Glucose concentration was assessed by a biochemical analyzer (YSI 2700 Select, Yellow Springs, USA).

Calculations

The specific glucose (S) consumption rate (*qs*) was calculated during the exponential growth phase as the differential change in S with time (t) normalized to the biomass concentration ($qs = \frac{\mu}{Yx/s}$). A predetermined correlation factor (1 OD₆₀₀ corresponded to 0.37 g/L of dry cellular weight) [50] was used to transform OD₆₀₀ values into cell concentrations for *qs* calculation. TACY determinations were based on the combined molar yields of DAHP, DHS, SA, and GA [4].

In order to determine whether the observed differences between growth, *qs*, and aromatic intermediate production (DAHP, DHS, SA and GA) in strain PB12 and in PB12.SA derivatives were significant (P < 0.05), an analysis of variance (ANOVA) and the multiple comparison test of Tukey's Honestly Significant Difference (HSD)

were performed using the XLSTAT program V2009.5.01 <http://www.xlstat.com>.

Additional material

Additional file 1 Table s1. Primers used in this work. Primers used for the amplification of inactivated and cloned genes.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

AE and FB participated in the design of this study. AE and RC participated in the construction of Δ aroK, Δ aroL, Δ pykF mutants and data analysis. RC was involved in the construction of pTOPO *aroB* *aroE* vector and fermentations. AV participated in the construction of the Δ pykA mutant and fermentations. RA was responsible for the fermentations. GH performed HPLC determinations and data analysis. AE, OR, GG, and FB 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

We thank Alfredo Martínez, Shirley Ainsworth and Marcela Sánchez for critical reading of the manuscript, Mercedes Enzaldo for technical support and Paul Gaytán, Jorge Yañez and Eugenio López for primer synthesis and DNA sequencing. This work was supported by FONSEC/SSA/IMSS/ISSSTE/CONACYT Grants 44126, 126793 and DGAPA-PAPIIT, UNAM Grants IN213508, IN224709.

Author Details

¹Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, 62210, México and ²Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, 62210, México

Received: 15 September 2009 Accepted: 12 April 2010

Published: 12 April 2010

References

1. Richards TA, Dacks JB, Campbell SA, Blanchard JL, Foster PG, McLeod R, Roberts CW: Evolutionary origins of the eukaryotic shikimate pathway: gene fusions, horizontal transfer, and endosymbiotic replacements. *Eukaryot Cell* 2006, **5**:1517-1531.
2. Herrmann KM, Weaver LM: The shikimate pathway. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1999, **50**:473-503.
3. Krämer M, Bongaerts J, Bovenberg R, Kremer S, Müller U, Orf S, Wubbolts M, Raeven L: Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid. *Metab Eng* 2003, **5**:277-283.
4. Chandran SS, Yi J, Draths KM, von Daeniken R, Weber W, Frost JW: Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. *Biotechnol Prog* 2003, **19**:808-804.
5. Adachi O, Ano Y, Toyama H, Matsushita K: High shikimate production from quinate with two enzymatic systems of acetic acid bacteria. *Biosci Biotech Biochem* 2006, **70**:2579-2582.
6. Sheu TG, Deyde VM, Okomo-Adhiambo M, Garten RJ, Xu X, Bright RA, Butler EN, Wallis TR, Klimov AI, Gubareva LB: Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrob Agents Chemother* 2008, **52**:3284-3292.
7. Dharan NJ, Gubareva LV, Meyer JJ, Okomo-Adhiambo M, McClinton RC, Marshall SA, St. George K, Epperson S, Brammer L, Klimov AI, Breesee JS, Fry AM: Infections with oseltamivir-resistant influenza A (H1N1) virus in the United States. *JAMA* 2009, **301**:1034-1041.
8. Russell RJ, Lesley F, Haire LF, Stevens DJ, Collins PJ, Yi Pu Lin YP, Blackburn GM, Hay AJ, Gamblin SJ, Skehel JJ: The structure of H5N1 avian influenza

- neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nature* 2006, **443**:45-49.
9. Centers for Disease Control and Prevention: Interim guidance on antiviral recommendations for patients with confirmed or suspected swine influenza A (H1N1) virus infection and close contacts. 2009 [<http://www.cdc.gov/swineflu/recommendations.htm>].
 10. Abbot A: What's in the medicine cabinet? *Nature* 2005, **435**:407-409.
 11. Luo M: Antiviral drugs fit for a purpose. *Nature* 2006, **443**:37-38.
 12. Draths KM, Knop DR, Frost JW: Shikimic acid and quinic acid: replacing isolation from plant sources with recombinant microbial biocatalysis. *J Am Chem Soc* 1999, **121**:1603-1604.
 13. LaDucca RJ, Berry A, Chotani G, Dodge TC, Gosset G, Valle F, Liao JC, Yong-Xiao J, Power SD: Metabolic pathway engineering of aromatic compounds. In *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2nd edition. Edited by: Demain AJ, Davies JE. Washington DC: ASM Press; 1999:605-615.
 14. Yi J, Draths KM, Li K, Frost W: Altered glucose transport and shikimate pathway product yields in *E. coli*. *Biotechnol Prog* 2003, **19**:1450-1459.
 15. Johansson L, Lindsok A, Silfversparre G, Cimander C, Nielsen KF, Lidén G: Shikimic acid production by a modified strain of *E. coli* (W3110.shik1) under phosphate-limited and carbon-limited conditions. *Biotechnol Bioeng* 2005, **92**:541-552.
 16. 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.
 17. Patnaik R, Spitzer R, Liao JC: Pathway engineering for production of aromatics in *Escherichia coli*: Confirmation of stoichiometric analysis by independent modulation of AroG, TktA, and Pps activities. *Biotechnol Bioeng* 1995, **46**:361-370.
 18. Lu JL, Liao JC: Metabolic engineering and control analysis for production of aromatics: Role of transaldolase. *Biotechnol Bioeng* 1997, **53**:132-138.
 19. Johansson L, Lidén G: Transcriptome analysis of a shikimic acid producing strain of *Escherichia coli* W3110 grown under carbon- and phosphate-limited conditions. *J Biotechnol* 2006, **126**:528-545.
 20. Knop DR, Draths KM, Chandran SS, Barker JL, von Daeniken R, Weber W, Frost JW: Hydroaromatic equilibration during biosynthesis of shikimic acid. *J Am Chem Soc* 2001, **123**:10173-10182.
 21. Flores N, Xiao J, Berry A, Bolívar F, Valle F: Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 1996, **14**:620-623.
 22. Flores N, Leal L, Sigala JC, de Anda R, Escalante A, Martínez A, Ramírez OT, Gosset G, Bolívar F: Growth recovery on glucose under aerobic conditions of an *Escherichia coli* strain carrying a phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system deletion by inactivating *arcA* and overexpressing the genes coding for glucokinase and galactose permease. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2007, **13**:105-116.
 23. 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.
 24. Flores S, Gosset G, Flores N, de Graaf AA, Bolívar F: Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by ¹³C labeling and NMR spectroscopy. *Metab Eng* 2002, **4**:124-137.
 25. Flores N, de Anda R, Flores S, Escalante A, Hernández G, Martínez A, Ramírez OT, Gosset G, Bolívar F: Role of pyruvate oxidase in *Escherichia coli* strains lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2004, **8**:209-221.
 26. Báez JL, Bolívar F, Gosset G: Determination of 3-deoxy-D- arabinose-7-phosphate productivity and yield from glucose in *Escherichia coli* devoid of the glucose phosphotransferase transport system. *Biotechnol Bioeng* 2001, **73**:530-535.
 27. Báez-Viveros JL, Osuna J, Hernández-Chávez G, Soberón X, Bolívar 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.
 28. Chávez-Béjar MI, Lara AR, López H, Hernández-Chávez G, Martínez A, Ramírez OT, Bolívar F, Gosset G: Metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-tyrosine production by expression of genes coding for the chorismate mutase domain of the native chorismate mutase-prephenate dehydratase and a cyclohexadienyl dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. *Appl Environ Microbiol* 2008, **74**:3284-3290.
 29. Kambourakis S, Draths KM, Frost JW: Synthesis of gallic acid and pyrogallol from glucose: Replacing natural product isolation with microbial catalysis. *J Am Chem Soc* 2000, **122**:9042-9043.
 30. Flores S, Flores N, de Anda R, González A, Escalante A, Sigala JC, Gosset G, Bolívar F: Nutrient-scavenging stress response in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system, as explored by gene expression profile analysis. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2005, **10**:51-63.
 31. Flores N, Flores S, Escalante A, de Anda R, Leal L, Malpica R, Georgellis D, Gosset G, Bolívar F: Adaptation for fast growth 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.
 32. Martínez K, de Anda R, Hernández G, Escalante A, Gosset G, Ramírez OT, Bolívar F: Coultivation of glucose and glycerol enhances the production of aromatic compounds in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Microb Cell Fact* 2008, **7**:1-12.
 33. Muñoz ME, Ponce E: Pyruvate kinase: current status of regulatory and functional properties. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2003, **135**:197-218.
 34. Ponce E, Flores N, Martínez A, Valle F, Bolívar 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.
 35. Báez-Viveros JL, Flores N, Juárez K, Castillo-España P, Bolívar F, Gosset G: Metabolic transcription analysis of engineered *Escherichia coli* strains that overproduce L-phenylalanine. *Microb Cell Fact* 2007, **6**:1-20.
 36. Li K, Mikola MR, Draths KM, Worden RM, Frost JW: Fed-batch fermentor synthesis of 3-Dehydroshikimic acid using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 1999, **64**:61-73.
 37. Kedar P, Colah R, Shimizu K: Proteomic investigation on the *pyk* - F gene knockout *Escherichia coli* for aromatic amino acid production. *Enzyme Microb Technol* 2007, **41**:455-465.
 38. Jurica MS, Mesecar A, Heath PJ, Shi W, Nowak T, Stoddard BL: The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6- biphosphate. *Structure* 1998, **6**:195-210.
 39. Fraenkel DG: Glycolysis, pentose phosphate pathway, and Entner-Duodoroff pathway. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and Molecular Biology Volume 1*. Edited by: Neidhardt C. Washington DC: American Society for Microbiology; 1987:142-150.
 40. Drew S, Cunningham DS, Liu Z, Domagalski N, Koepsel RR, Ataai MM, Domach MM: Pyruvate kinase-deficient *Escherichia coli* exhibits increased plasmid copy number and cyclic AMP levels. *J Bacteriol* 2009, **191**:3041-3049.
 41. Olvera L, Mendoza-Vargas A, Flores N, Olvera M, Sigala JC, Gosset G, Morett E, Bolívar F: Transcriptional analysis of central metabolism genes in *Escherichia coli*. Possible roles of σ^{38} in their expression, as response to carbon limitation. *PLoS ONE* 2009, **4**:1-23.
 42. de Anda R, Lara AR, Hernández V, Hernández-Montalvo V, Gosset G, Bolívar F, Ramírez 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.
 43. Lara AR, Vázquez-Limón C, Gosset G, Bolívar F, López-Munguía A, Ramírez OT: Engineering *Escherichia coli* to improve culture performance and reduce formation of by-products during recombinant protein production under transient intermittent anaerobic conditions. *Biotechnol Bioeng* 2006, **94**:1164-1175.
 44. Oh MK, Liao JC: Gene expression profiling by DNA microarrays and metabolic fluxes in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 2000, **16**:278-286.
 45. Bolívar F, Rodríguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heynecker HL, Boyer HW, Crosa JH, Falkow S: Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 1977, **2**:95-113.

46. Datsenko KA, Wanner BL: **One step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **27**:6640-6645.
47. Balderas-Hernández VE, Sabido-Ramos A, Silva P, Cabrera-Valladares N, Hernández-Chávez G, Báez-Viveros JL, Martínez A, Bolívar F, Gosset G: **Metabolic engineering for improving anthranilate synthesis from glucose in *Escherichia coli*.** *Microb Cell Fact* 2009, **8**:1-12.
48. Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H: **Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection.** *Mol Syst Biol* 2006, **2**:1-11.
49. Weissbach A, Hurwitz J: **The formation of 2-keto-3-deoxyheptonic acid in extracts of *Escherichia coli* B.** *J Biol Chem* 1958, **234**:705-709.
50. Hernández-Montalvo V, Martínez A, Hernández-Chávez G, Bolívar 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.

doi: 10.1186/1475-2859-9-21

Cite this article as: Escalante *et al.*, Metabolic engineering for the production of shikimic acid in an evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system *Microbial Cell Factories* 2010, **9**:21

**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

