

Efecto de la Clonación del Gen *zwf* sobre la Producción de Shikimato en la Cepa de *Escherichia coli* PB12.SA22

Susy Carmona*, Francisco Bolívar, Adelfo Escalante

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología,

Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001, Col.

Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, 62210, México.

adelfo@ibt.unam.mx

RESUMEN

El ácido shikímico (SA), uno de los intermediarios de la ruta común de biosíntesis de compuestos aromáticos o vía del ácido shikímico, presente en bacterias y plantas principalmente, es utilizado como precursor para la síntesis química del antiviral oseltamivir-fosfato. Dicho antiviral es utilizado para el tratamiento de la influenza común y en los casos de infección por los virus H5N1, H3N2 y A/H1N1. Ante el escenario de una pandemia de influenza, grupos de investigación han aplicado estrategias de ingeniería de vías metabólicas para la sobreproducción de SA en diferentes cepas de *Escherichia coli*. En este contexto, en el presente trabajo se evaluó el efecto de la clonación del gen *zwf* que codifica para la enzima glucosa-6-P-deshidrogenasa en un vector multicopia, con la finalidad de desviar el flujo de carbono de la vía glicolítica a la vía de las pentosas en cepas recombinantes de *E. coli* y aumentar así la concentración del precursor eritrosa-4-fosfato y del cofactor NADPH⁺ requeridos en la síntesis de SA. La cepa recombinante resultante PB12.SA23 presentó un aumento en la producción de SA del 14.1 %, respecto a la mejor cepa productora con que se contaba previamente. El análisis del efecto de la clonación del gene *zwf* sobre el nivel de expresión de genes del metabolismo central y de la vía del ácido shikímico en la cepa PB12.SA23 y cepas parentales, indican que el aumento en la producción de SA en la cepa PB12.SA23, es debido principalmente al aumento en la producción del cofactor NADPH.

Palabras clave: Ácido shikímico, Ingeniería de vías metabólicas, *zwf*, *E. coli*.

ABSTRACT

Shikimic acid (SA) is an intermediate of the shikimic acid pathway, which is the common route for the biosynthesis of aromatic compounds mainly in bacteria and plants. SA is used as a precursor for the chemical synthesis of the antiviral oseltamivir phosphate. This drug is used for treatment of seasonal flu and cases of H5N1, H3N2 and H1N1 virus infection. Given the potential scenario of a pandemic influenza, diverse research groups have implemented strategies of

engineering metabolic pathways for the overproduction of SA in different *Escherichia coli* strains. In these context, we evaluated the effect of *zwf* gene cloning in *E. coli* that codes for the enzyme glucose-6-P-dehydrogenase in a multicopy vector, in order to increase the carbon flux in the glycolytic pathway, pentose phosphate pathway and thereby increase the concentration of precursor erythrose 4-phosphate and cofactor NADPH required for the synthesis of SA. As result of this modification, the obtained strain designated as PB12.SA23 achieved an increment in the production of SA of 14.1% compared to the best producing strain that were available previously.

Key words: Shikimic acid, metabolic pathway engineering, *zwf*, *E. coli*.

INTRODUCCIÓN

El ácido shikímico (SA) ocupa un papel central en la vía común de biosíntesis de compuestos aromáticos, también llamada vía del ácido shikímico (VSA). Esta vía vincula el metabolismo central de carbono con la biosíntesis de los diversos compuestos aromáticos en organismos como plantas, bacterias y hongos ascomicetos principalmente. En el tronco principal de la vía, los precursores eritrosa 4-fosfato (E4P) y fosfoenolpiruvato (PEP) provenientes de la vía de las pentosas fosfato (PP) y glucólisis respectivamente, son convertidos a través de 7 reacciones enzimáticas en corismato (Fig. 1), el cual es el precursor para la biosíntesis de los aminoácidos y vitaminas aromáticas (Herrmann & Weaver, 1999).

El SA representa un compuesto de alto valor comercial ya que por la alta funcionalidad de su molécula: un anillo de 6 carbonos con tres centros asimétricos y un grupo funcional ácido carboxílico, es considerado como un atractivo bloque de construcción en la síntesis de varios compuestos tales como aditivos de

alimentos, alimento para animales, inyectables, entre otros (Rawat & Tripathi, 2013); en recientes años ha ganado importancia por ser el compuesto base para la síntesis del antiviral oseltamivir-fosfato (OSF), inhibidor de la neuraminidasa del virus de la influenza, el cual es producido por Roche Pharmaceuticals bajo el nombre comercial de Tamiflu® para el tratamiento de virus de la influenza estacional A y B, y de la influenza aviar H5N1 y A/H1N1 (Ghosh *et al.*, 2012).

Actualmente, se emplean en el tratamiento de la influenza dos tipos de antivirales, los inhibidores de la proteína M2 como la Amantadina (Lysovir®, symmetrel syrup; Alliance Pharmaceuticals) y la Rimantadina (Flumadine®; Forest Pharmaceuticals), que evitan la replicación del virión (Burch *et al.*, 2009) y los inhibidores de la neuraminidasa entre los que se encuentra el Zanamivir, medicamento nebulizado comercializado bajo el nombre de Relenza por Glaxo Wellcome y el OSF, [Jefferson *et al.*, 2009]. Los primeros sin embargo, no son efectivos contra la influenza tipo B y por otro lado el

Artículos

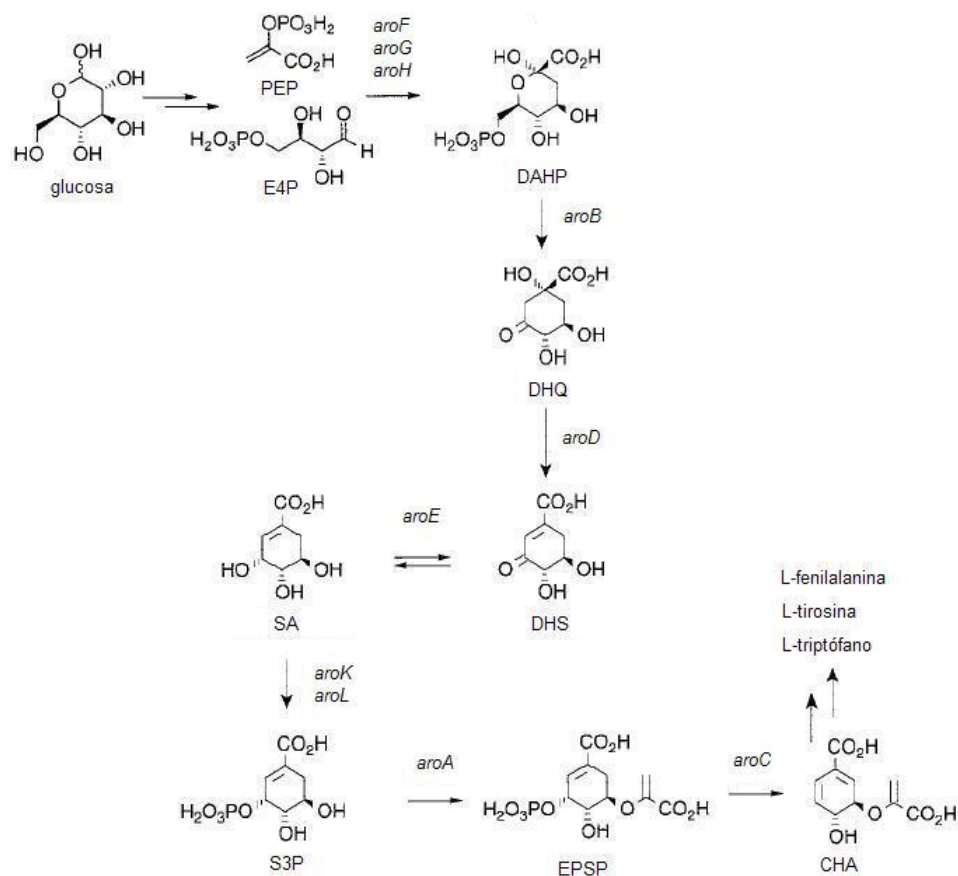


Fig. 1. Vía del ácido shikímico. Se indica cada uno de los intermediarios, así como los genes que codifican para las correspondientes enzimas de cada paso de la vía. *aroF*, *aroG*, *aroH*: isoenzimas DAHP sintasa; *aroB*: DHQ sintasa; *aroD*: DHQ deshidratasa, *aroE*: shikimato deshidrogenasa; *aroK*, *aroL*: shikimato cinasa I/II, *aroA*: EPSP sintasa; *aroC*: corismato sintasa; PEP:fosfoenolpiruvato; E4P: eritrosa-4-fosfato; DAHP: 3-deoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato; DHQ: 3-dehidroquinato; DHS: 3-dehidroshikimato; SA: shikimato; S3P: shikimato-3-fosfato; EPSP: 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato; CHA: corismato (modificado de Kai *et al.*, 1999 y Knop *et al.* 2001).

virus A/H1N1 resultó ser resistente a estos; los segundos, son efectivos tanto para la influenza A y B, y aunque se ha presentado resistencia, ésta es baja (Burch *et al.*, 2009).

El Tamiflu® ha sido aprobado como el único medicamento oral disponible tanto

para la profilaxis como para el tratamiento de la influenza humana A/H1N1 y la influenza H5N1 (Liang *et al.*, 2009), ya que tras pruebas de laboratorio ha demostrado ser efectivo, disminuyendo eficaz y tempranamente los síntomas ocasionados

por el virus, incluyéndose así también en el tratamiento preventivo (Osores *et al.*, 2006); la Organización Mundial de la Salud lo ha recomendado para planes de pandemia (Jefferson *et al.*, 2009).

El SA fue aislado por primera vez en 1885 del árbol japonés shikimi-no-ki (*Illicium anisatum*), actualmente se extrae de los frutos de la planta anís estrella chino *Illicium anisatum* e *Illicium verum* (Edmonds, 2005), obteniéndose 1.1 kg de SA por cada 30 kg de planta seca (Liang *et al.*, 2009). Debido a que la disponibilidad de AS a partir del anís estrella chino depende de la disponibilidad del fruto, con el fin de mejorar la disponibilidad del SA, una alternativa a su extracción a partir de plantas, es la producción por sistemas de fermentación empleando microorganismos sobreproductores modificados genéticamente.

La ingeniería de vías metabólicas (IVM) se ha definido como el mejoramiento de las actividades celulares por manipulación de funciones enzimáticas, de transporte y regulatorias de la célula por el uso de la tecnología del ADN recombinante y en una definición más general como la modificación de la bioquímica celular por la introducción de nuevas propiedades o por modificación de las ya existentes (Kern *et al.*, 2007).

En la obtención de cepas bacterianas sobreproductoras de SA, diversos grupos han empleado variadas técnicas que involucran ingeniería de los circuitos regulatorios, de los transportadores que

participan en la toma de carbono del medio, de las vías glicolítica, de la vía de las PP y de síntesis de aromáticos (Ghosh *et al.*, 2012).

En este contexto, en nuestro grupo de investigación se han aplicado diversas estrategias de ingeniería de vías metabólicas (IVM), tales como:

i) *Obtención de cepas PTS⁻Glc⁺*. La disponibilidad de PEP hacia la VSA aumentaría al doble si la célula empleara para internalizar la glucosa un sistema PEP-independiente; bajo este enfoque, en nuestro grupo de trabajo se han obtenido cepas PTS⁻ al inactivar el sistema fosfotransferasa de transporte de carbohidratos dependiente de PEP (PTS), mediante la delección del operón *ptsHlcr* (Flores *et al.*, 1996; Flores *et al.*, 2005); posteriormente, a través de un proceso de evolución adaptativa, la cepa de *E. coli* PB11 PTS⁻Glc⁻ (derivada de la cepa silvestre JM101), recuperó su capacidad de crecimiento en glucosa generando la cepa PB12 (PTS⁻ Glc⁺), cuyo fenotipo fue el resultado de la selección del transportador galactosa permeasa (GalP), sistema que no requiere de PEP, el cual fue seleccionado por la célula como alternativa para transportar la glucosa del medio, obteniendo así cepas con el fondo genético PTS⁻Glc⁺ (Flores *et al.*, 1996; Flores *et al.*, 2005; Flores *et al.* 2007; Aguilar *et al.*, 2012).

ii) la sobreexpresión del gen *tktA* codificante para la isoenzima transcetolasa I (TktA) de la vía de las PP resultando en el

incremento en la disponibilidad de E4P (Balderas *et al.*, 2009),

iii) la clonación del gen que codifica para una versión insensible a inhibición alostérica de la isoenzima 3-deoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintasa AroG (*aroG^{fbr}*, feedback resistant) (Balderas *et al.*, 2009), para evitar la inhibición de esta enzima por el aminoácido aromático fenilalanina,

iv) la sobreexpresión de los genes *aroB* y *aroE*, que codifican para las enzimas 3-dehidroquinato sintasa y shikimato deshidrogenasa respectivamente (Escalante *et al.*, 2010),

v) la inactivación de las isoenzimas shikimato cinasas I y II por interrupción de los genes *aroK* y *aroL*, respectivamente con el fin de lograr la acumulación de SA (Escalante *et al.*, 2010).

Se obtuvo de este modo la cepa derivada PB12.SA22 (Fig. 2) sobreproductora de SA (PB12 *aroG^{fbr} tktA aroB aroE ΔaroK ΔaroL*), la cual es capaz de producir 7.1 g /L de SA con un rendimiento de 0.29 mol SA/mol de glucosa, en sistemas de fermentación en lote en reactores de 1 L, con 500 mL de medio mineral suplementado con 25 g/L de glucosa y 15 g/L de extracto de levadura (Escalante *et al.*, 2010).

La vía de las pentosas fosfato (PP) es una de las tres vías esenciales del metabolismo central, junto con la glicólisis y la vía Entner-Doudoroff; además de su papel como ruta de asimilación de azúcares como glucosa y pentosas, suministra en *E. coli*

tres de los metabolitos precursores más importantes para las vías anabólicas de aminoácidos, vitaminas, nucleótidos y constituyentes celulares: D-ribosa-5-fosfato, sedoheptulosa-7-fosfato (S7P) y E4P, por lo que parte del carbono captado, debe fluir a través de esta vía para satisfacer las necesidades de la célula de estos metabolitos. La E4P como se ha mencionado, es uno de los sustratos clave para la formación de SA. La vía de las PP es además una fuente importante de NADPH, necesario también para las reacciones del anabolismo (Sprenger, 1995).

La enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH, *Zwf*, codificada por el gen *zwf*), cataliza la primera reacción de la vía de las PP, siendo clave en el nodo glucólisis-vía de las PP; rinde poder reductor como NADPH, el cual es consumido durante la síntesis de SA por acción de la enzima shikimato deshidrogenasa codificada por el gen *aroE*.

Con la finalidad de aumentar la capacidad de producción de SA de la cepa PB12.SA22, se clonó el gen *zwf* en un plásmido de mediano número de copias, buscando incrementar el flujo de carbono hacia esta vía y con ello el aumento de la disponibilidad del sustrato E4P como precursor para la síntesis de SA. El NADPH generado por la reacción catalizada por la enzima *Zwf* puede ser empleado a su vez, por la enzima shikimato deshidrogenasa de la VSA, lo que se espera contribuya al incremento de la producción de SA.

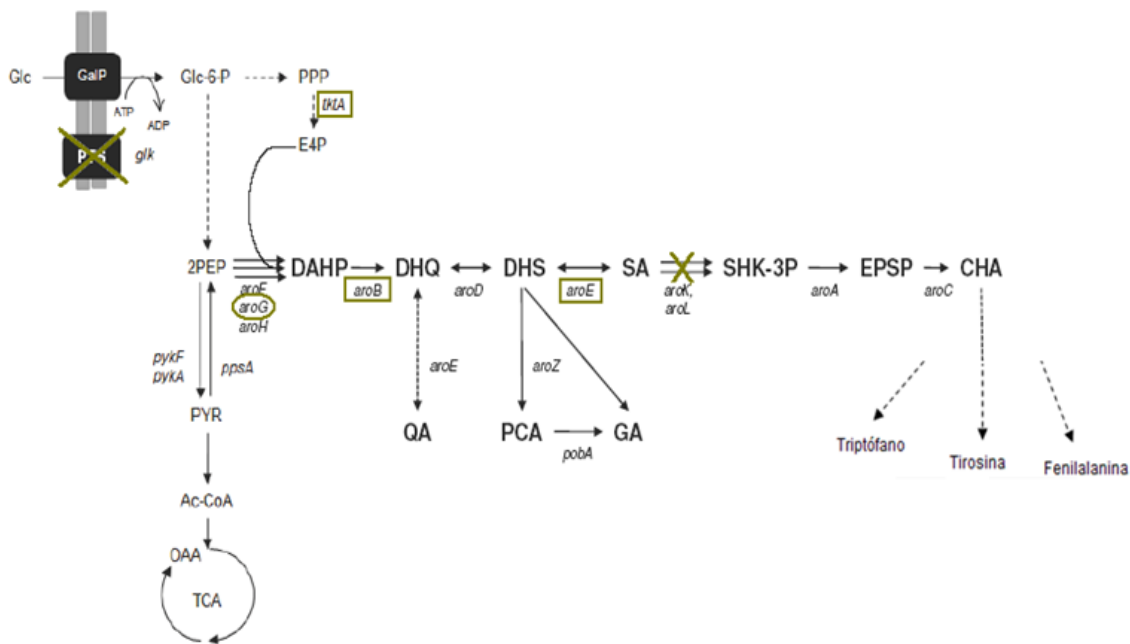


Fig. 2. IVM en el metabolismo central de carbono y VSA en cepas de *E. coli* PTS⁻ Glc⁺ para la sobreproducción de AS. Las X indican inactivación de reacciones por delección de genes; el rectángulo indica que genes que se sobre-expresas; el ovalo indica que se trata de genes insensibles a inhibición alostérica; Las flechas punteadas representan dos o más reacciones. *glk*:glucocinasa; *tktA*: transcetolasa; *aroF*, *aroG*, *aroH*: isoenzimas DAHP sintasa; *aroB*: DHQ sintasa; *aroD*: DHQ deshidratasa, *aroE*: shikimato deshidrogenasa; *aroK*, *aroL*: shikimato cinasa I/II, *aroA*: EPSP sintasa; *aroC*: corismato sintasa Glc: glucosa; GalP: permeasa de galactosa; PTS: sistema fofotransferasa de transporte de carbohidratos; Glc-6-P: glucosa-6-fosfato; PP: vía de las pentosas fosfato; PEP: fosfoenolpiruvato; PYR: piruvato; Ac-CoA: acetil-coenzima A; TCA: Ciclo de los ácidos tricarbóxicos; OAA: oxaloacetato; DAHP: 3-deoxi-D-*arabino*-heptuloseonato-7-P; DHQ: 3-dehidroquinato; DHS: 3-dehidroshikimato; SA: shikimato; SHK-3P: shikimato 3 fosfato; EPSP: 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato; CHA: corismato (modificado de Escalante *et al.*, 2010).

MATERIALES Y MÉTODOS

Construcción de la cepa PB12.SA23

Las cepas y los plásmidos utilizados en este trabajo se muestran en la tabla 1. Se amplificó el gen *zwf* a partir del DNA cromosomal de la cepa *E. coli* JM101. El

producto amplificado se clonó en el plásmido de mediano número de copias pTOPO*aroBaroE* generando el plásmido pTOPO*aroBaroEzwf*, con el que se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* TOP10. Se extrajo el DNA

Artículos

plasmídico por lisis alcalina de estas células. Se prepararon células electrocompetentes de la cepa PB12.SA2, las cuales fueron transformadas con los plásmidos pJLBaroG^{ibr}tkatA de alto número de copias (Balderas *et al.*, 2009) y pTOPOaroBaroEzwf, se seleccionaron

colonias en placas de agar LB con cloranfenicol (Cm) (20 µg/mL), kanamicina (Km) (30 µg/mL), tetraciclina (Tc) (30 µg/mL) y zeocina (Zn) (25 µg/mL). La cepa seleccionada fue llamada en este trabajo como PB12.SA23.

Tabla 1. Características de las cepas y plásmidos empleados.

Cepas	Características relevantes	Referencia
<i>E. coli</i> JM101	<i>supE</i> , <i>thi</i> , $\Delta(lac-proAB)$, F'	Bolívar <i>et al.</i> , 1977
<i>E. coli</i> PB12	JM101 $\Delta(ptsH-l-crr)::kan glc^+$	Flores <i>et al.</i> , 1996
PB12.SA2	PB12 $\Delta aroL\Delta aroK::cm$	Escalante <i>et al.</i> , 2010
PB12.SA22	PB12.SA2 pJLBaroG ^{ibr} tkatA pTOPOaroBaroE	Escalante <i>et al.</i> , 2010
PB12.SA23	PB12.SA2 pJLBaroG ^{ibr} tkatA pTOPOaroBaroEzwf	Este trabajo
Plásmidos		
pTOPOaroBaroE	pCR [®] -Blunt II-TOPO [®] [Invitrogen [™] , 3.5Kb, gen letal <i>ccdB</i> , región operadora/promotora <i>lac</i> , Km ^R , Zn ^R , origen pUC] conteniendo los genes <i>aroB</i> y <i>aroE</i>	Escalante <i>et al.</i> , 2010
pJLBaroG ^{ibr} tkatA	pJLBaroG ^{ibr} (<i>aroG^{ibr}</i> bajo el control del promotor lacUV5, los genes <i>lac^f</i> y <i>tet</i> , resistencia a Tc y origen de replicación pACYC184) conteniendo el gen <i>tkatA</i> con su promotor nativo.	Balderas <i>et al.</i> , 2009
pTOPOaroBaroEzwf	pCR [®] -Blunt II-TOPO [®] [Invitrogen [™] , 3.5Kb, gen letal <i>ccdB</i> , región operadora/promotora <i>lac</i> , Km ^R , Zn ^R , origen pUC] conteniendo los genes <i>aroB</i> , <i>aroE</i> y <i>zwf</i>	Este trabajo

Medio y condiciones de cultivo

Se realizaron fermentaciones por triplicado de la cepa PB12.SA23 en jarras de un litro Autoclavable Bio Reactor (Applikon)

equipado con las consolas: ADI 1010 Bio controller y ADI 1025 Bio console (Applikon) para controlar la temperatura, pH, agitación y aireación. Se utilizó un medio de

producción que consta de una base de medio mineral con la siguiente composición (g/L): K_2HPO_4 (7.5), ácido cítrico monohidratado (2.1), citrato amonio hierro (III) (0.3), H_2SO_4 concentrado 1.2 ml, $MgSO_4$ (0.64), $CaCl_2$ (0.06), $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ (0.0037), $ZnSO_4$ (0.0029), H_3BO_3 (0.0247), $CuSO_4$ (0.0025), $MnCl_2$ (0.0158), $CoCl_2$ (0.00129), tiamina (0.001) (Li *et al.*, 1999), suplementado con extracto de levadura (DIFCO) (15) y glucosa (J.T. Baker) (25), además de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) como inductor a una concentración de 0.1 mM, el pH del medio se ajustó a 7 con NaOH 1N. Se adicionaron los antibióticos Cm (20 μ g/mL), Km (30 μ g/mL) y Tc (30 μ g/mL).

Para iniciar la fermentación, se realizó un precultivo; a partir del stock de la cepa almacenado a -70 °C (glicerol) de la siguiente manera: se sembró una asada del glicerol en cajas de medio LB con antibióticos señalados y se incubó a $37^\circ C$, durante 12 h. A partir de las colonias desarrolladas, se inoculó un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL del medio de producción, más los antibióticos requeridos, incubando a $37^\circ C$ y 300 rpm. Cuando este cultivo alcanzó un D.O._{600nm} ~ 6 se tomó una alícuota para inocular cada fermentador con una D.O._{600nm} = 0.3. Cada fermentador se mantuvo en las condiciones siguientes; $37^\circ C$, pH 7.0 (controlado mediante la adición de NH_4OH 10%), agitación entre 500 y 700 rpm para mantener los niveles de oxígeno disuelto a

no menos de 20%, la aireación fue de 1 vvm (volumen de aire por volumen de medio por minuto). La duración de las fermentaciones fue de 50 h.

Cuantificación de metabolitos.

Se tomaron muestras cada hora durante las primeras 8 horas y posteriormente cada 6 horas hasta el final del cultivo, se midió en el sobrenadante la concentración de SA, DHQ, DHS, ácido gálico (GA), ácido acético, glucosa y DAHP.

La cuantificación de los primeros cinco compuestos se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en un sistema Waters, Miliford, MA, el cual cuenta con una bomba 600E, inyector automático 717, un índice de refracción de 2410 y un detector de arreglo de diodos (996). Las muestras se analizaron en una columna Aminex HPX-87H (300x 7.8 mm; 9 μ m) (Bio – Rad, Hércules, CA), utilizando una fase móvil de H_2SO_4 5 mM, un flujo de 0.5 mL/min y una temperatura de $50^\circ C$.

La glucosa contenida en cada una de las muestras se determinó en el sistema de cuantificación de glucosa (Biochemistry Analyser YSI 2700 Select), empleando como estándares una curva patrón de glucosa de 2, 4, 6, 8, 10 y 12.5 g/L.

El DAHP presente en las muestras se determinó por el ensayo colorimétrico del ácido tiobarbitúrico [Weissbach & Hurwitz, 1958].

Análisis del perfil de transcripción por qPCR tiempo real

De los cultivos de cada cepa (PB12.SA22, PB12.SA23, JM101 y PB12) a una $D.O_{600nm} = 1.0$, se colectaron muestras a las cuales se extrajo el RNA total por el método de fenol caliente equilibrado en agua (Flores *et al.*, 2005). Se comprobó su integridad por electroforesis en gel de agarosa para RNA, así mismo se cuantificó y comprobó su calidad por las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 (indican el grado de contaminación por proteínas y compuestos fenólicos, respectivamente). Para la síntesis del cDNA, se empleó el kit RevertAid™ H First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas Inc.), usando una mezcla de cebadores específicos para los genes de interés (Flores *et al.*, 2005). La reacción de síntesis de cDNA se realizó en un Termociclador GenAmp PCR System Perkin Elmer. La reacción de qPCR se llevó a cabo en el equipo ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Perkin-Elmer Applied Biosystems) utilizando el kit SYBR Green PCR Master Mix (Perkin-Elmer Applied Biosystems).

La técnica de cuantificación del nivel de expresión de los genes estudiados, fue el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ descrito por Livak & Schmittgen (2001). Los datos obtenidos se normalizaron utilizando como control interno el gen constitutivo *ihfB* que codifica para la subunidad beta de un regulador

transcripcional de unión a DNA, ya que se detecta el mismo nivel de expresión de este gen en todas las cepas bajo las condiciones de estudio. Para cada gen analizado, el nivel de transcripción del gen correspondiente en la cepa silvestre JM101 se consideró con un valor de 1.0 y se empleó como referencia para normalizar los datos de las cepas restantes, por lo que los datos de expresión de las cepas PB12, PB12.SA22 y PB12.SA23 se reportan como valores de expresión relativa comparados con el nivel de expresión de la cepa silvestre.

Los resultados presentados son el promedio de dos mediciones independientes de qPCR de valores obtenidos a partir de cDNA generados de muestras de fermentaciones independientes.

Cuantificación de la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD).

A partir de cultivos para la producción de SA con la cepa PB12.SA23, se cosecharon células a una $D.O_{600nm} = 1$. Se tomaron muestras de 5 mL que se centrifugaron a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en buffer TRIS-HCl 100 mM (pH 7.5), centrifugando nuevamente bajo las mismas condiciones y decantando finalmente el sobrenadante. La pastilla celular se resuspendió en 500 mL del mismo buffer. Manteniendo en hielo, las células resuspendidas se lisaron en un sonicador Ultrasonic Processor CV18, el extracto celular se centrifugó bajo las condiciones

antes mencionadas y se separó el sobrenadante, que fue utilizado como fuente de la enzima G6PD. La actividad se midió con el protocolo descrito por Shimizu & Peng (2003) por la cantidad de NADPH generado el cual absorbe a una longitud de onda de 340 nm. Las curvas de actividad y los valores de absorbancia se visualizaron en un espectrofotómetro Thermo Spectronic (BioMate 5). Para poder determinar la actividad específica, se midió la concentración total de proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Construcción de la cepa PB12.SA23

Tomando como secuencia de referencia la región correspondiente del gen *zwf*, en el genoma de *E. coli* K12, se amplificó por PCR a partir del DNA cromosomal de la cepa JM101, un producto de 1579 pb que incluyen 93 pb antes del codón de inicio que contienen la región promotora (*soxS*, *marA* y *rob*), la región estructural y 22 pb después del codón de término; el producto de PCR fue clonando en el plásmido pTOPO*aroBaroE* resultando en el plásmido pTOPO*aroBaroEzwf* (Fig. 3). Se verificó la correcta orientación del gen clonado y que la secuencia del mismo no tuviera ninguna modificación. Este plásmido se transformó junto con el pJLB *aroG^{fb} tktA* en la cepa PB12.SA2 dando como resultado la cepa PB12.SA23.

Evaluación del efecto de la clonación del gen zwf sobre la producción de SA, en sistemas de fermentación en lote.

La cepa PB12.SA23 muestra un crecimiento en dos etapas característico de las cepas PTS⁻ glc⁺ *aroK*⁻ *aroL*⁻ (Fig. 4) (Escalante *et al.*, 2010), la primera es de rápido crecimiento con bajo consumo de glucosa, mientras que la segunda es de lento crecimiento con elevado consumo de glucosa y un aumento en la producción de metabolitos. La cepa PB12.SA23 llega a su máxima D.O._{600nm} alrededor de las 10 horas de cultivo cuando entra a fase estacionaria; presenta una menor acumulación de biomasa en comparación con la cepa PB12.SA22 que era hasta ahora la mejor cepa productora obtenida en el grupo de investigación (Escalante *et al.*, 2010).

Reportes en la literatura indican que la sobreexpresión del gen *zwf* no tiene un efecto importante sobre la velocidad específica de crecimiento (μ) manteniéndose constante (Nicolas *et al.*, 2007); en nuestro caso podemos observar este efecto en la cepa PB12.SA23, cuyo valor de μ no es estadísticamente significativo al compararse con la μ de la cepa PB12.SA22 (Tabla 2). Los valores de μ fueron determinados con los valores de biomasa de la fase exponencial de la curva de crecimiento; los valores utilizados en cada caso tuvieron un coeficiente de correlación mayor a 0.98.

Como se ha mencionado, se observa una relación entre el crecimiento y el consumo de glucosa; durante la fase de

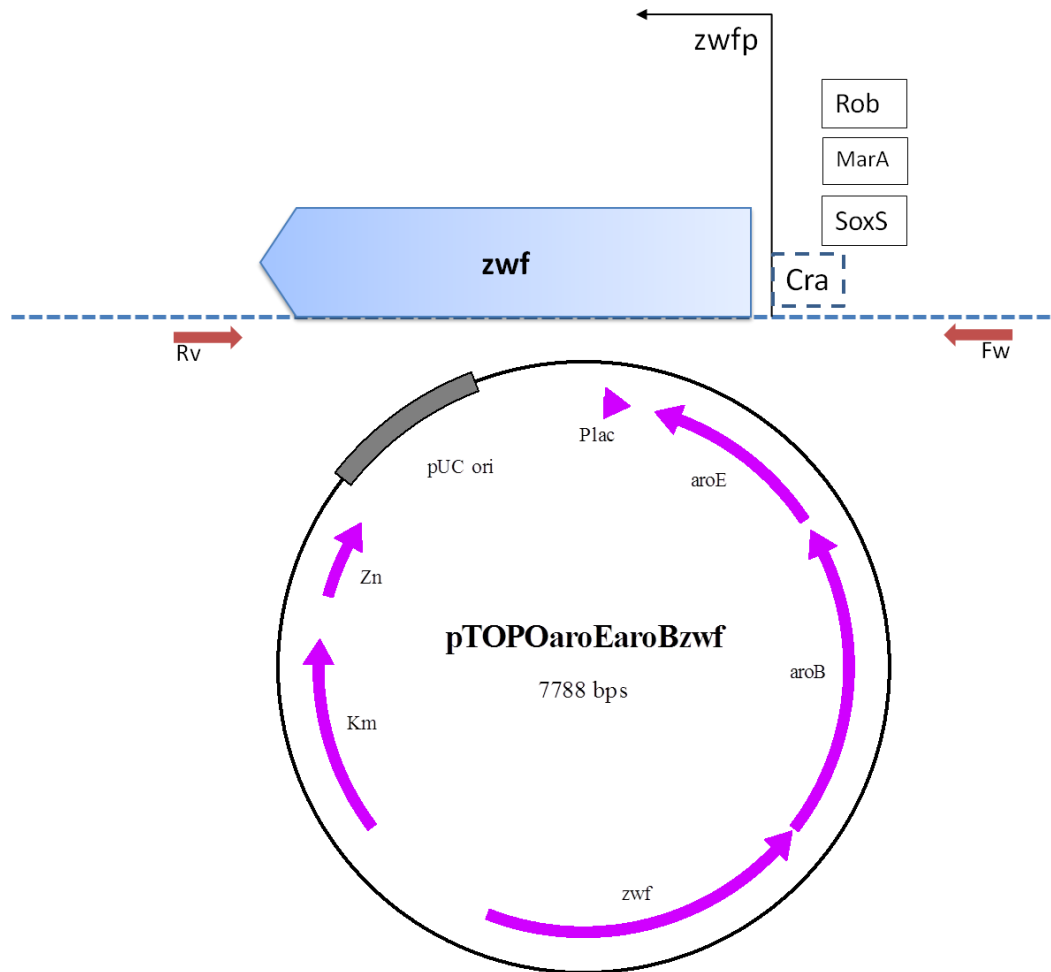


Fig. 3. Unidad transcripcional del gen *zwf* y clonación el plásmido *pTOPOaroEaroBzwf*. En la parte superior se muestra la unidad transcripcional del gen *zwf* en el genoma de *E. coli* (Keseler *et al.*, 2013); la región amplificada incluye tanto las regiones promotora y estructural del gen; el producto de PCR obtenido se clonó en el plásmido *pTOPOaroEaroB* que contiene una copia de los genes *aroB* y *aroE*, así como genes de resistencia a Kny Zn. En la parte inferior se muestra el plásmido resultante: *pTOPOaroEaroBzwf*.

crecimiento exponencial el consumo de glucosa es mínimo y aumenta el consumo a medida que el cultivo entra y avanza en la

fase estacionaria hasta llegar a agotarla alrededor de las 45 horas de la fermentación

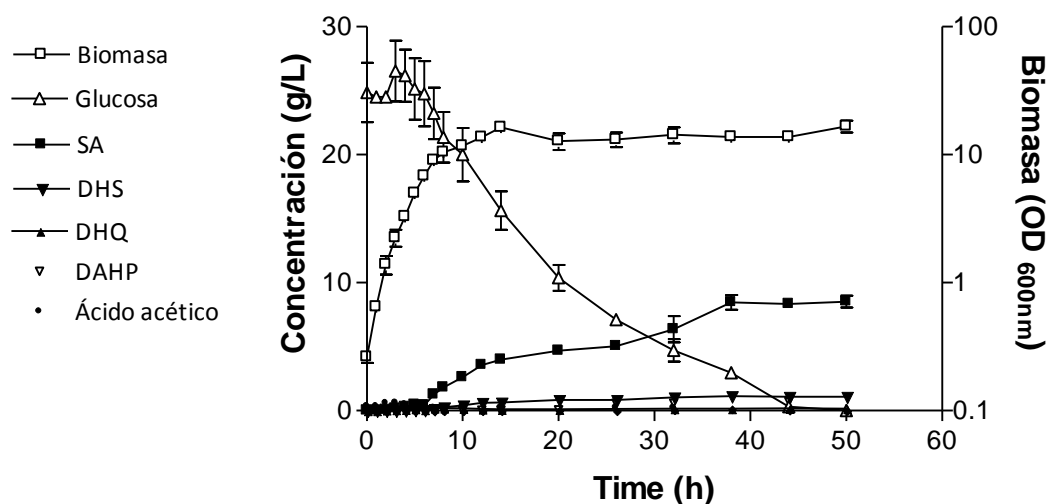


Fig. 4. Perfil de crecimiento, consumo de glucosa y producción de compuestos aromáticos de la cepa PB12.SA23. Se muestra el resultado del promedio de los datos obtenidos de tres fermentaciones independientes (para DAHP, solo es el resultado de dos) con sus correspondientes barras de error que indican la desviación estándar.

Tabla 2. Velocidad específica de crecimiento (μ) y velocidad de consumo de sustrato (q_s)

Cepa	μ (h^{-1})	q_s (milimol glc gDWC h^{-1})
PB12.SA22	0.42 ± 0.01	1.93 ± 0.59
PB12.SA23	0.37 ± 0.02	2.02 ± 0.29

(Fig. 5), a diferencia de la cepa PB12.SA22 que la termina en un menor tiempo (36 h). Como se observa en la Tabla 3, a excepción del SA, hay una disminución en las cantidades de intermediarios de la vía de aromáticos; esto le confiere a la cepa una ventaja en la producción de SA, ya que el carbono se dirige más eficientemente hasta la síntesis de SA y se presentarían menores dificultades en su extracción y purificación a

partir de los caldos de cultivo, al tener menor cantidad de otros intermediarios de la VSA. En trabajos de otros grupos de investigación se reporta una acumulación aproximada de 1 g/L de DHS por cada 5 g/L de SA producido en cepas con diferentes fondos genéticos (Draths *et al.*, 1999; Knop *et al.*, 2001; Chandran *et al.*, 2003). La proporción de DHS respecto a SA disminuyó en cultivos de la cepa PB12.SA23,

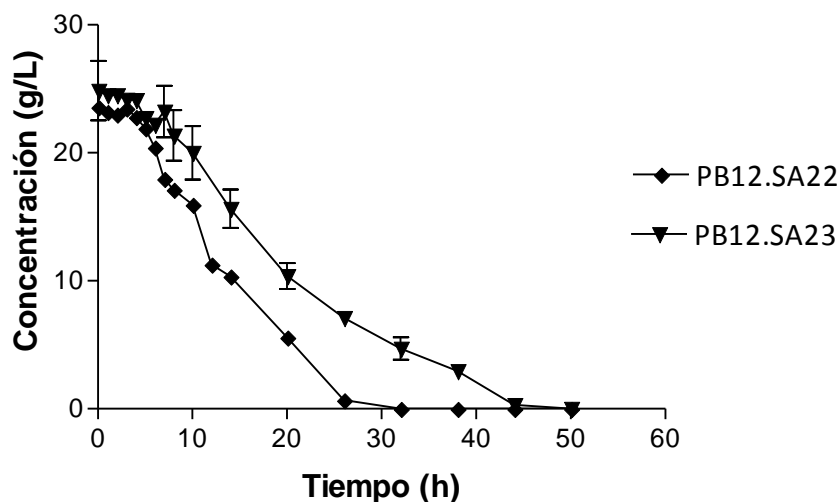


Fig. 5. Comparación del consumo de glucosa entre las cepas PB12.SA22 y PB12.SA23. Se muestra el resultado del promedio de los datos obtenidos de tres fermentaciones independientes para la cepa PB12.SA23 con sus correspondientes barras de error que indican la desviación estándar.

Tabla 3. Producción de SA y otros intermediarios de la VSA al final del cultivo.

Cepa	DAHP (g/L)	DHS (g/L)	SA (g/L)	GA (g/L)
PB12.SA22	0.81±0.04	1.46±0.14	7.05±0.06	0.08±0.01
PB12.SA23	0.70±0.001	1.09±0.09	8.52±0.79	0.03±0.0

obteniendo 1 g/L de DHS por cada 8 g/L de SA aproximadamente. Se ha propuesto la generación de un equilibrio hidroaromático (Knop *et al.*, 2001) cuando se acumula SA en cepas sobreproductoras, lo que tiene como consecuencia una reversión en el flujo de carbono de SA hacia DHS, con la conformación de GA y QA (Li *et al.*, 1999; Draths *et al.*, 1999; Knop *et al.*, 2001), en

este trabajo se detectó GA en concentraciones muy bajas (0.03 g/L) y no se detectó QA.

El título de SA alcanzado con la cepa PB12.SA23, es menor a la reportada en otros trabajos (Draths *et al.*, 1999; Knop *et al.*, 2001), con diferentes sistemas de fermentación (sistemas con alimentación de fuente de carbono); sin embargo, el

rendimiento con respecto a la fuente de carbono (glucosa), es mayor para la cepa construida en este trabajo, lo que resulta de mayor interés en el aspecto industrial, al reflejar un mejor aprovechamiento del sustrato empleado en el cultivo. La cepa PB12.SA22 brinda un rendimiento de 0.29 mol SA/ mol Glc que sobrepasaba el mejor

valor reportado en la literatura por Chandran (2003). Con la cepa PB12.SA23, se logró aumentar el rendimiento a 0.37 mol SA/ mol Glc (Tabla 4). También se logró una mejora en el rendimiento de metabolitos aromáticos totales lo cual indica un mayor flujo de carbono hacia la VSA, con un mayor aprovechamiento del carbono.

Tabla 4. Comparación de la producción de metabolitos y rendimiento para cada cepa generada.

Cepa	Rendimiento SA (mol SA / mol glucosa)	Rendimiento de compuestos aromáticos totales* (mol compuestos aromáticos / mol glucosa)
PB12.SA22	0.29	0.37
PB12.SA23	0.35	0.42

*El rendimiento de aromáticos totales incluye todos los compuestos detectados en el medio de cultivo como resultado de la actividad de la VSA (DAHP, DHQ, DHS, SA, GA)

sedoAnálisis del perfil de transcripción por qPCR tiempo real

Para la mayoría de los genes analizados (Tabla 5), se observó un nivel de expresión mayor en la cepa PB12. En las cepas productoras de SA (PB12.SA) la expresión fue menor posiblemente debido al efecto de la carga metabólica que le confiere a estas cepas la presencia de dos plásmidos. Comparando las cepas productoras, se observa que los niveles de expresión de la mayoría de los genes analizados son más altos en la cepa PB12.SA23. Se ha observado que la sobreexpresión de *zwf* ayuda a contrarrestar

efectos negativos de la carga metabólica (Flores *et al.*, 2004) y quizá este fenómeno se esté dando en esta cepa, teniendo así un metabolismo central más activo. La variación en el nivel de expresión de la mayoría de los genes analizados en las cepas PB12.SA respecto a la cepa PB12 se puede explicar además como una respuesta a las modificaciones genéticas realizadas en esta cepa: inactivación de los genes *aroK* y *aroL* y la sobreexpresión de genes de la vía de las PP y de la VSA.

i) Transporte de glucosa

En la cepa PB12 (PTS⁻ glc⁺) la glucosa

Artículos

Tabla 5. Niveles de transcripción de las cepas PB12, PB12.SA22 y PB12.SA23 a 1 DO_{600nm}, creciendo en medio mineral suplementado con 25 g/L glucosa y 15 g/L de extracto de levadura.

Genes	Niveles de expresión como $2^{-\Delta\Delta CT}$ con JM101 como valor de normalización = 1.					
	PB12		PB12.SA22		PB12.SA23	
Glicólisis y vía de las PP						
<i>glk</i>	3.17	(±0.08)	1.06	(±0.15)	1.84	(±0.33)
<i>pgi</i>	3.62	(±0.12)	2.24	(±0.01)	1.02	(±0.17)
<i>eda</i>	0.88	(±0.18)	1.13	(±0.15)	0.87	(±0.06)
<i>edd</i>	1.08	(±0.19)	0.18	(±0.06)	0.22	(±0.00)
<i>gnd</i>	1.24	(±0.47)	1.36	(±0.09)	1.38	(±0.04)
<i>pgl</i>	2.97	(±0.75)	1.70	(±0.01)	1.84	(±0.52)
<i>rpe</i>	1.09	(±0.20)	0.58	(±0.04)	0.66	(±0.05)
<i>rpiA</i>	2.60	(±0.69)	1.94	(±0.64)	1.44	(±0.22)
<i>rpiB</i>	1.24	(±0.18)	0.60	(±0.23)	1.04	(±0.18)
<i>talA</i>	7.43	(±1.45)	12.12	(±3.11)	32.27	(±4.57)
<i>talB</i>	3.01	(±0.77)	0.89	(±0.01)	1.19	(±0.11)
<i>tktA</i>	1.27	(±0.07)	16.24	(±2.85)	14.90	(±4.74)
<i>tktB</i>	8.37	(±1.61)	16.06	(±2.74)	34.00	(±2.83)
<i>zwf</i>	1.94	(±0.30)	1.57	(±0.11)	19.92	(±1.27)
Genes que codifican para transportadores						
<i>aroP</i>	2.06	(±0.35)	1.12	(±0.13)	1.87	(±0.15)
<i>shiA</i>	1.45	(±0.07)	1.78	(±0.30)	1.45	(±0.33)
<i>galP</i>	21.76	(±4.98)	2.56	(±0.79)	4.08	(±0.98)
<i>lamB</i>	n.d.		0.05	(±0.00)	0.06	(±0.01)
<i>malE</i>	0.01	(±0.00)	0.12	(±0.11)	0.10	(±0.04)
<i>mgIB</i>	242.04	(±9.16)	29.73	(±2.64)	43.04	(±8.52)
<i>ompC</i>	2.34	(±0.50)	1.01	(±0.24)	1.10	(±0.35)
<i>ompF</i>	n.d.		0.15	(±0.04)	0.96	(±0.16)

VSA

Artículos

<i>aroB</i>	0.81	(±0.16)	3.58	(±0.59)	9.88	(±0.42)
<i>aroD</i>	1.40	(±0.12)	0.84	(±0.26)	0.89	(±0.19)
<i>aroE</i>	0.95	(±0.02)	41.88	(±0.49)	47.12	(±4.38)
<i>aroF</i>	0.86	(±0.16)	1.74	(±0.18)	1.29	(±0.04)
<i>aroG</i>	1.66	(±0.42)	20.95	(±0.43)	20.89	(±5.28)
<i>aroH</i>	2.26	(±0.51)	5.00	(±0.39)	3.25	(±0.37)
<i>aroK</i>	0.34	(±0.00)	0.00	(±0.00)	0.00	(±0.00)
<i>aroL</i>	0.60	(±0.05)	0.01	(±0.00)	0.00	(±0.00)
<i>ydiB</i>	2.92	(±0.32)	3.32	(±0.13)	2.28	(±0.47)

Se muestra como resultado, el promedio de dos mediciones independientes de RT-qPCR de valores obtenidos a partir de cDNA generados de muestras de fermentaciones independientes.

ingresa del periplasma al citoplasma principalmente vía las proteínas transportadoras codificadas por los genes *galP* y *mgIB*, siendo la segunda proteína la principal responsable del transporte de glucosa en esta cepa bajo las condiciones de cultivo utilizadas en este trabajo, a diferencia de lo observado previamente para esta cepa en cultivos en medio mineral mínimo, en donde ambos transportadores tienen un nivel similar de transcripción [Flores *et al.*, 2005]. En las cepas PB12.SA se observa una disminución importante en el nivel de transcripción de estos dos genes respecto a la PB12, aunque en la cepa PB12.SA23 *mgIB* presenta un nivel de expresión mayor (~10X) respecto a la cepa PB12.SA22. Debido a que la única diferencia entre las cepas PB12.SA22 y PB12.SA23 es la presencia de gen *zwf* en el plásmido, es probable que el incremento en

el nivel de transcripción de *mgIB* y su papel principal sobre el transporte de glucosa sea resultado de esta modificación genética. Es importante considerar también que es probable que durante la fase exponencial de cultivo, las cepas productoras PB12.SA estén utilizando algún componente del extracto de levadura como fuente de carbono, por lo que no se requiere un nivel de transcripción elevado de los transportadores de glucosa en las cepas productoras de SA bajo esta condición de cultivo, aunque esta situación parece presentarse únicamente en estas cepas y no en la PB12. De los genes que codifican para las porinas OmpC, OmpF y LamB, se observa un menor nivel de transcripción para el gen *lamB*.

ii) *Glucólisis y vía de las pentosas fosfato*

Artículos

La cepa pB12.SA23 presenta un incremento en el nivel de expresión del gen *zwf*, ~12X respecto al nivel observado para las cepas PB12 y PB12.SA22, como resultado de su clonación en el plásmido pTOPOaroBaroE. Este aumento en el nivel de expresión está asociado con un aumento en la actividad de la enzima, lo que indica que el transcrito está siendo traducido y esto se refleja en la proteína funcional, al menos en los ensayos *in vitro*. Esto es indicativo de la importancia de la enzima Zwf en la canalización del carbono proveniente de la glicólisis hacia la vía de las PP en la cepa PB12.SA23 y hace sentido con los niveles de transcripción de los genes *glk* y *pgi*. Para ambos genes, hay un mayor nivel de transcrito en la cepa PB12 ya que esta consume más glucosa debido a que tiene una mayor tasa de crecimiento; en cuanto a las cepas productoras, *glk* tiene un nivel mayor de expresión en la cepa PB12.SA23, indicando que esta cepa está consumiendo más carbono que la PB12.SA22; el nivel de transcrito de *pgi* es menor en la cepa PB12.SA23 haciendo sentido con la sobreexpresión de *zwf* y la canalización de una parte del carbono hacia la vía de las PP.

A diferencia del alto nivel de expresión de *zwf* en la cepa PB12.SA23, el resto de los genes de la parte oxidativa de la vía de las PP *pgl* y *gnd* no presentaron cambios en su nivel de expresión con respecto a la cepa PB12.SA22. Los genes de la parte no oxidativa de la vía *rpe* y *rpiA* no presentan

cambios en su nivel de expresión entre las cepas productoras PB12.SA; el gen *talA* presenta un nivel de expresión mayor en las cepas PB12.SA respecto a la PB12, y presenta también un nivel de expresión diferencial entre las cepas sobreproductoras: en la cepa PB12.SA23 está sobreexpresado 3X respecto a la cepa PB12.SA22, mientras que *talB* no presenta cambios entre las cepas PB12.SA. Las enzimas TalA y TalB catalizan, respectivamente la reacción reversible de S7P a fructosa-6-P y de gliceraldehído-3-fosfato a E4P. El gen *talA* es regulado negativamente por ArcA y es importante destacar que en la cepa PB12, el sistema regulador de dos componentes ArcAB está inactivo por una mutación en *arcB*, lo que puede explicar el alto nivel en su expresión (Flores *et al.*, 2005; Salmon *et al.*, 2005). El nivel de expresión de los genes *tktA* y *tktB* es mayor en las cepas PB12.SA respecto a la PB12, sin embargo, también presentan una expresión diferencial entre las cepas productoras. Ambas cepas PB12.SA fueron transformadas con el plásmido pJLBaroG^{fb}*tktA*, lo que explica el elevado nivel de expresión de *tktA*, sin embargo, en la cepa PB12.SA23 *tktB* presenta un nivel de expresión mayor (2X), respecto a la PB12.SA22. El gen *tktB* se encuentra en el mismo operón que *talA* y aunque no está reportado si ambos genes están regulados negativamente por ArcA, es probable que sea así y esto explique su elevado nivel de expresión en las cepas PB12.SA. Es importante mencionar que *tktB* presenta la

menor actividad de transcetolasa para la síntesis de E4P (Iida *et al.*, 1993).

iii) Vía del shikimato

Se observó en las cepas productoras un alto nivel de expresión de los genes clonados en los plásmidos pJLBaroG^{fb}r *tktA* y pTOPOaroBaroEzwf, mientras que los genes que codifican para el resto de las enzimas de la vía presentan el mismo nivel de expresión en la cepa PB12 y en las cepas productoras. Es importante destacar que en la cepa PB12.SA23 el nivel de expresión de los genes *aroB* y *aroE* (clonados en el plásmido pTOPO), son mayores que los observados para la cepa PB12.SA22, mientras que *aroG* (clonado en el plásmido pJLB), presenta un nivel similar de transcripción que en ambas cepas productoras. Estos resultados indican que más que exista un aumento en el flujo de carbono a través de la vía, hay un mejor aprovechamiento del carbono en la producción de SA.

CONCLUSIONES

La cepa PB12.SA23 que sobreexpresa el gen *zwf*, alcanza una producción de 8.52 g/L de SA, que corresponde a un aumento del 14.1% con respecto a la cepa productora PB12.SA22, lo que es resultado del incremento en el nivel de expresión del gen *zwf* y de la actividad de la proteína codificada por este gen.

El rendimiento logrado con la cepa PB12.SA23 de 0.37 mol SA/mol Glc es el

mayor hasta ahora reportado para sistemas de fermentación similares al empleado en este trabajo (cultivos en lote).

La disminución en la cantidad de intermediarios, sobre todo de DHS en la cepa PB12.SA23, sugiere una mayor eficiencia de conversión de los distintos metabolitos hasta SA, probablemente asociada a una mayor disponibilidad del cofactor NADPH requerido en la conversión de DHS a SA. La disminución en la proporción de DHS respecto a la cantidad de SA producido, puede tener un impacto importante en el proceso de extracción y purificación del AS a partir de los sobrenadantes de los cultivos.

El presente trabajo constituye un avance significativo en la búsqueda de estrategias para incrementar los títulos y rendimientos en la producción de SA, sin embargo, para llegar a un proceso industrial, se necesitan evaluar diferentes enfoques tanto de IVM como de ingeniería de fermentaciones, sobre los que actualmente nos encontramos trabajando en nuestro grupo de investigación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por DGAPA-UNAM PAPIIT IN224709 e IN206812, FONSEC Salud-CONACYT 126793, CONACYT Ciencia Básica 105782.

REFERENCIAS

- Balderas VE, Sabido A, Silva P, Cabrera N, Hernandez G, Baez JL, Martinez A, Bolivar F & Gosset G (2009) Metabolic engineering for improving anthranilate synthesis from glucose in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*. 8:1-19.
- Bolívar F, Rodríguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heynecker HL, Boyer HW, Crosa JH & Falkow S (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*. 2:95-113.
- Bradford M (1976) A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.
- Burch J, Paulden M, Conti S, Stock C, Corbett M, Welton N, Ades A, Sutton A, Cooper N, Elliot A, Nicholson K, Duffy S, McKenna C, Stewart L, Westwood M & Palmer S (2009) Antiviral drugs for the treatment of influenza: a systematic review and economic evaluation. *Health Technology Assessment*. 13:1-9.
- Chandran S, Yi J, Draths K, Daeniken R, Weber W & Frost J (2003) Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. *Biotechnology Progress*. 19:808-814.
- Draths K, Knop D & Frost J (1999) Shikimic acid and quinic acid: replacing isolation from plant sources with recombinant microbial biocatalysis. *Journal of the American Chemical Society*. 121:1603-1604.
- Edmonds M (2005) Isolation of shikimic acid from star aniseed. *Journal of Chemical Education*. 82:599-600.
- Escalante A, Calderón R, Valdivia A, De anda R, Hernández G, Ramírez O, Gosset G & Bolívar F (2010) Metabolic engineering for the production of shikimic acid in a evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotranferase system. *Microbial Cell Factories*. 9:1-12.
- Flores N, Xiao J, Berry A, Bolivar F & Valle F (1996) Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*. 14:620-623.
- Flores N, Flores S, Escalante A, de Anda R, Leal L, Malpica R, Georgellis D, Gosset G & Bolivar F (2005) Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in a *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Metabolic Engineering*. 7:70-87.
- Flores S, de Anda R, Gosset G & Bolivar F (2004) Growth-rate recovery of *Escherichia coli* cultures carrying a multicopy plasmid, by engineering of the pentose-phosphate pathway. *Biotechnology and Bioengineering*. 8:485-494.

Artículos

- Ghosh S, Chisti Y & Banerjee U (2012) Production of shikimic acid. *Biotechnology Advances*. 30:1425-1431.
- Herrmann KM & Weaver LM (1999) The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology*. 50:473-503.
- Iida A, Teshiba S & Mizobuchi K (1993) Identification and characterization of the *tktB* gene encoding a second transketolase in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*. 175:5375-5383.
- Jefferson T, Jones M, Doshi P & Del Mar C (2009) Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in healthy adults: systematic review and meta-analysis. *The British Medical Journal*. 339:b5106.
- Kai L, Mikola M, Draths K, Worden R & Frost J (1999) Fed-batch fermentor synthesis of 3-dehydroshikimic acid using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 64:61-73.
- Kern A, Tilley E, Hunter I, Legiša M & Glieder A (2007) Engineering primary metabolic pathways of industrial microorganisms. *Journal of Biotechnology*. 129:6-29.
- Keseler I, Collado J, Santos A, Peralta M, Gama S, Muñoz L, Bonavides C, Paley S, Krummenacker M, Altman T, Kaipa P, Spaulding A, Pacheco J, Latendresse M, Fulcher C, Sarker M, Shearer A, Mackie A, Paulsen I, Gunsalus R & Karp P (2011) EcoCyc: a comprehensive database of *Escherichia coli* biology. *Nucleic Acids Research*. 39:1-8.
- Knop D, Draths K, Chandran S, Barker J, Daeniken R, Weber W & Frost J (2001) Hydroaromatic equilibration during biosynthesis of shikimic acid. *Journal of the American Chemical Society*. 123:10173-10182.
- Li K, Mikola M, Draths K, Worden R & Frost J (1999) Fed-batch fermentor synthesis of 3-dehydroshikimic acid using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 64:61-73.
- Liang N, Xiao S, Kwang H & Wei L (2009) A short and practical synthesis of oseltamivir phosphate (Tamiflu) from (-)-shikimic acid. *The Journal of Organic Chemistry*. 74:3970-3973.
- Livak K & Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 25:402-408.
- Nicolas C, Kiefer P, Letisse F, Krömer J, Massou S, Soucaille P, Wittmann C, Lindley N & Portais JC (2007) Response of the central metabolism of *Escherichia coli* to modified expression of the gene encoding the glucose-6-phosphate dehydrogenase. *FEBS Letters*. 581:3771-3776.
- Osores F, Cabezas C & Gómez J (2006) Influenza humana y aviar: amenaza de una pandemia humana. *Acta Médica Peruana*. 23: 35-47.

Artículos

- Rawat G & Tripathi P (2013) Expanding horizons of shikimic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97:4277-4287.
- Salmon K, Hung S, Steffen N, Krupp R, Baldi P, Hatfield G & Gunsalus R (2005) Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12: effects of oxygen availability and ArcA. *Journal of Biology and Chemistry*. 280:15084-96.
- Shimizu K & Peng L (2003) Global metabolic regulation analysis for *Escherichia coli* K12 based on protein expression by 2-dimensional electrophoresis and enzyme activity measurement. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 61:163-178.
- Sprenger G (1995) Genetics of pentose-phosphate pathway enzymes of *Escherichia coli* K-12. *Archives of Microbiology*. 164:324-330.
- Weissbach, A & Hurwitz J (1958) The formation of 2-keto-3-deoxyheptonic acid in extracts of *Escherichia coli* B. *Journal of Biological Chemistry*. 234, 705-709.