



PRODUCCIÓN DE SHIKIMATO EN CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* PTS⁻ GLC⁺, COMO UNA ESTRATEGIA PARA LA PRODUCCIÓN DE PRECURSORES DE ANTIVIRALES CONTRA GRIPE AVIAR.

Araceli Valdivia¹, Rocío Calderón¹, Ramón de Anda¹, Georgina Hernández¹, Guillermo Gosset¹, Francisco Bolívar¹ y Adelfo Escalante^{1*}.

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001. Col. Chamilpa. Cuernavaca, Morelos. 62210.

[*adelfo@ibt.unam.mx](mailto:adelfo@ibt.unam.mx)

Palabras clave: shikimato, ingeniería de vías metabólicas, *Escherichia coli*.

Introducción. La vía del Shikimato (VSHK), es la vía común para la biosíntesis de compuestos aromáticos en bacterias y plantas principalmente (1). El SHK es un intermediario clave de esta vía, ya que recientemente ha sido utilizado como el precursor para la síntesis química del Tamiflu®, un antiviral de aplicación oral utilizado para el tratamiento de la gripe aviar que infecta a humanos y que es causada por el virus de gripe aviar H5N1 (1, 2). *Escherichia coli* ha sido utilizada como sistema modelo para la sobreproducción de diversos metabolitos y proteínas recombinantes de interés comercial. Ante la posible necesidad a una escala regional - global del antiviral Tamiflu® en caso de una pandemia de gripe aviar, diferentes grupos de investigación ha aplicado diversas estrategias de ingeniería de vías metabólicas para la sobreproducción de este compuesto en cepas de *E. coli*.

En este trabajo se describen la aplicación de diversas estrategias de ingeniería de vías metabólicas sobre el metabolismo central de carbono (MCC) y la VSHK en cepas de *E. coli* PB12 (PTS⁻ glc⁺), para la obtención de una mutante sobreproductora de shikimato.

Metodología. Las cepas de *E. coli* PTS⁻ glc⁺ PB12 y VH33 fueron utilizadas como fondos genéticos para las siguientes modificaciones de los genes del MCC y VSHK: inclusión de una copia adicional en plásmido de los genes *tktA* y *aroG^{fb}* (que codifican respectivamente para las enzimas Transcetolasa I y AroG^{fb}); inactivación secuencial de los genes *aroK*, *aroL* (Shikimato cinasa I y II, respectivamente), *pykF* y *pykA* (Piruvato cinasa I y II, respectivamente); e inclusión de una copia adicional en plásmido de los genes *aroB* y *aroD* (DHQ sintasa y DHQ deshidratasa, respectivamente). Para determinar el efecto de cada modificación genética sobre la producción de SHK se realizaron cultivos en fermentador instrumentado de 1 L a 37° C durante 50 horas, utilizando un medio mineral suplementado con glucosa 25 g/L y extracto de levadura 15 g/L (1). Para cada fermentación se determinó crecimiento, consumo de sustrato, la concentración de DAHP, DHS y SHK.

Resultados y discusión. Las cepas de *E. coli* PTS⁻ Glc⁺ PB12 y VH33 presentan una mayor disponibilidad de

fosfoenolpiruvato (PEP) como resultado de la inactivación del sistema de PTS:glucosa, mientras que la presencia de una copia adicional del gen *tktA* asegura un incremento en los niveles de E4P, ambos, precursores del MCC son canalizados hacia la VSKH por acción de las isoenzimas AroFGH. La presencia de una copia adicional de *aroG^{fb}* contribuye a incrementar el flujo carbono en esta reacción y evita la inhibición de la actividad de esta enzima por acumulación o presencia de fenilalanina en el medio. En este fondo genético (PTS⁻ Glc⁺), la inactivación secuencial de los genes *aroK* y *aroL* y en presencia de una copia adicional de los genes *aroG* y *aroB* tuvieron un efecto aditivo sobre la producción de SHK en ambas cepas, aunque la mejor producción se observó en la cepa PB12 (*aroG^{fb} tktA aroB aroE ΔaroK ΔaroL*), la cual fue capaz de producir 7 g/L con un rendimiento de 0.28 g SHK / g glucosa. Este rendimiento es ligeramente superior al mejor valor reportado en la literatura (1). Por su parte, la cepa VH33 solo es capaz de producir 6.4 g/L, con un rendimiento de 0.25 g SHK / g glc. Contrariamente a lo esperado, las inactivaciones sencillas de los genes *pykF* y *pykA*, no tuvieron el efecto positivo que se esperaba sobre la producción de SHK en ambas cepas, al no incrementar la disponibilidad de PEP a partir de piruvato.

Conclusiones. La aplicación de la ingeniería de vías metabólicas en cepas de *E. coli* PTS⁻ glc⁺ permitió obtener una cepa derivada de *E. coli* PB12 (*aroG^{fb} tktA aroB aroE ΔaroK ΔaroL*), capaz de sobreproducir 7 g/L SHK, con un rendimiento de 0.28 g SHK / g glucosa en un sistema de fermentación de 1 L.

Agradecimiento. Este proyecto contó con los siguientes apoyos económicos: CONACYT Fondo Salud 44126, PAPIIT-UNAM proyectos IN-213508 e IN-224709.

Bibliografía.

- Chandran, S. S., Yi, J., Draths, K. M., von Daeniken, R., Weber, W., Frost, J. W. (2003). Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. *Biotechnol. Prog.* 19:808-804.
- Krämer, M., Bongaerts, J., Bovenberg, R., Kremer, S., Müller, U., Orf, S., Wubbolts, M., Raeven, L. (2003). Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid. *Metab. Eng.* 5: 277-283.