

INCREMENTO EN LA SÍNTESIS DE ANTRANILATO A PARTIR DE GLUCOSA EN *Escherichia coli* MEDIANTE INGENIERÍA METABÓLICA

Victor E. Balderas-Hernández, Andrea Sabido, Patricia Silva, Natividad Cabrera-Valladares, Georgina Hernández-Chávez, José Luis Báez-Viveros, Alfredo Martínez, Francisco Bolívar and Guillermo Gosset. Instituto de Biotecnología, UNAM. Apdo. Postal 510-3. Cuernavaca, Mor. Fax (777)3172388. email: gosset@ibt.unam.mx

Palabras clave: antranilato, compuestos aromáticos, sistema fosfotransferasa de carbohidratos.

Introducción. El antranilato (ANT) es una amida aromática de amplio uso en la industria farmacéutica y del perfume. En *Escherichia coli* el ANT se sintetiza a partir de corismato por la ANT sintasa (TrpED) y posteriormente es convertido a fosforribosil-ANT por la fosforribosil ANT sintasa (TrpD) para continuar en la vía de síntesis del triptófano.

Con el propósito de generar un proceso alternativo a la síntesis química para la producción de ANT, la cepa *E. coli* W3110 *trpD9923* (1); una mutante en el gen *trpD* que acumula bajos niveles de ANT, se caracterizó y se modificó utilizando diversas estrategias de Ingeniería Metabólica.

Metodología. Se determinó la secuencia nucleotídica de los genes *trpEGD* de *E. coli trpD9923*. Se generó la cepa *E. coli trpD9923* con el sistema fosfotransferasa de carbohidratos (PTS) inactivo mediante transducción con el fago P1 *vir* (2). Las cepas *E. coli trpD9923* y *trpD9923* PTS⁻ se transformaron con el plásmido pJLBaroG^{fbr}tktA, que co-expresa una 3-deoxy-D-arabino heptulosonato-7-fosfato sintasa insensible a inhibición alostérica (*aroG^{fbr}*) y la transcetolasa (*tktA*). Se evaluó la producción de ANT por las cuatro cepas derivadas de *E. coli trpD9923* en matraz a 37°C utilizando medio M9 adicionado con 10 g/L de glucosa y 20 µg/mL de triptófano, así como a nivel de biorreactor en medio M9, 90 g/L de glucosa y 10 g/L de extracto de levadura, a 37°C y pH 7.0. El ANT se cuantificó por cromatografía líquida de alta resolución.

Resultados y discusión. La secuenciación de los genes *trpEGD* de la cepa *E. coli trpD9923* reveló una mutación sin sentido en el gen *trpD*, que ocasiona la pérdida de la actividad fosforribosil ANT sintasa, sin modificarse la actividad ANT sintasa, causando así la acumulación del ANT. De las cuatro cepas derivadas de *E. coli trpD9923*, las cepas *trpD9923* PTS⁻ y *trpD9923*/pJLBaroG^{fbr}tktA mostraron los mejores parámetros de producción de ANT en matraz (Cuadro 1); acumulando 0.70-0.75 g/L de ANT (Fig. 1c) con rendimientos que corresponden al 28-46% del máximo teórico. Sin embargo, la cepa *trpD9923* PTS⁻ mostró bajos perfiles de crecimiento y consumo de glucosa (Fig. 1-a y b) debido a la inactivación del PTS. Utilizando un proceso de cultivo *fed batch* en biorreactor la cepa *trpD9923*/pJLBaroG^{fbr}tktA produjo 14 g/L de ANT en 34 h (Fig. 1f).

Cuadro 1. Parámetros cinéticos y fermentativos de cultivos en matraz de cepas derivadas de *E. coli trpD9923*.

Cepas de <i>E. coli</i>	μ (h ⁻¹)	q_{Glc} (g _{Glc} /g _{DCW} ·h)	$Y_{Ant/Glc}$ (g _{Ant} /g _{Glc})
<i>trpD9923</i>	0.26	0.34	0.06
<i>trpD9923</i> PTS ⁻	0.09	0.13	0.12
<i>trpD9923</i> /pJLBaroG ^{fbr} tktA	0.15	0.37	0.20
<i>trpD9923</i> PTS ⁻ /pJLBaroG ^{fbr} tktA	0.24	0.43	0.10

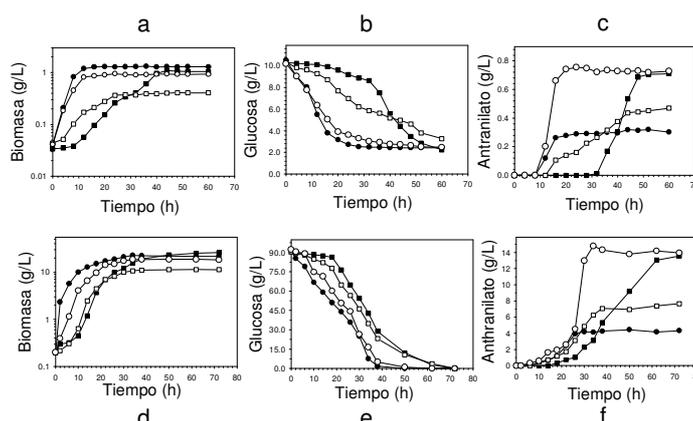


Figura 1. Producción de antranilato en matraz (a-c) y biorreactor (d-f) por las cepas *E. coli trpD9923* (○), *trpD9923* PTS⁻ (■), *trpD9923*/pJLBaroG^{fbr}tktA (□) y *trpD9923* PTS⁻/pJLBaroG^{fbr}tktA (●). Biomasa (a y d), Glucosa (b y e) y Antranilato (c y f).

Conclusiones. Empleando estrategias de Ingeniería Metabólica en la cepa *E. coli trpD9923*, la producción de ANT se incrementó 3.3 veces. Este trabajo constituye el primer sistema microbiano para la síntesis de ANT compatible con el medio ambiente.

Agradecimiento. Al financiamiento CONACyT D43243-Z. VB agradece beca posdoctoral DGAPA-UNAM.

Bibliografía. 1. Yanofsky, C, Horn, V, Bonner, M, Stasiowski, S. (1971) Polarity and enzyme functions in mutants of the first three genes of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. *Genetics*. 69:409-433.

2. Flores, N, Xiao, J, Berry, A, Bolivar, F, Valle, F. (1996) Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnol.* 14:620-623.