

EVALUACIÓN DE LAS CEPAS DE *E. coli* PB12 Y VH33 PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO SHIKÍMICO.

Zuluaga-Rave D.F., Bolívar F., Escalante A., Ramírez O.T., Valdez-Cruz N.A.
 Instituto de Biotecnología/U.N.A.M., Av. Universidad #2001, Col. Chamilpa, C.P. 62210
 Cuernavaca, Morelos. Tel. (55) 56227617, Fax (777) 3138811, adri@ibt.unam.mx

Palabras clave: Shikimato, Oseltamivir, Influenza.

Introducción. El ácido shikimico (AS) es un compuesto de interés industrial ya que es clave para la síntesis del inhibidor de neuraminidasas llamado oseltamivir, el cual tiene actividad antiviral específica contra la influenza. El método actual de producción del AS no es escalable, debido a que es obtenido a partir de su fuente natural (hoja de estrella de anis chino). Mediante ingeniería genética se han diseñado racionalmente cepas con mutaciones en la vía del corismato en la que un subproducto es el AS (1).

En este trabajo se evaluó la producción de AS en las cepas de *E. coli* PB12 y VH33 mutantes en los genes *PTS*, *galp*⁺, *aroEB*, *aroG*^{trb}, *aroL* y *aroK*, de los cuales los dos primeros codifican para proteínas del sistema de internalización de glucosa y los demás para enzimas de la vía del corismato, bajo diferentes condiciones de inducción con IPTG.

Metodología. Las condiciones de inducción (tiempo de inducción y concentración del inductor), se analizaron según un modelo factorial 3X4 (Tabla 1). Las cinéticas se realizaron en matraces bafleados de 250 ml, con 25g/L de glucosa, con un volumen de trabajo de 100ml, a 200rpm y 37°C. La mejor condición hallada en el modelo factorial se evaluó en un bioreactor de 1L, con 25g/L y 100g/L de glucosa. La concentración de AS y algunos de sus derivados se evaluaron mediante HPLC usando una columna aminex(1).

		Tiempo de inducción [h]			
		0	4	7	11
[IPTG] mM	0,1	a	b	c	d
	0,5	e	f	g	h
	1	i	j	k	m

Tabla 1. Diseño experimental factorial.

Resultados y discusión. Los tratamientos realizados mostraron que la producción AS, depende de la concentración y el tiempo de inducción, ya que en cada tratamiento se observaron cambios en la producción de AS. Los valores obtenidos de AS de la cepa VH33 van desde 0.1g/L para el tratamiento "m" con el menor rendimiento producto/sustrato ($Y_{P/S}$), hasta 3.5g/L para el tratamiento "a". El $Y_{P/S}$ que se obtuvo con el mejor tratamiento para VH33 fue de 0.14mol/mol que es 57% menor al reportado (2) para cultivos en lotes alimentados. La cepa PB12 bajo el tratamiento "i" produjo 2g/L. Sin embargo, bajo los tratamientos "a" y "g" se obtuvieron entre 10 y 11.5 g/L, se obtuvo un $Y_{P/S}$ de 0.5 mejorando un 50% comparado con lo reportado (2).

Además, se observó una baja producción de DHS y ácido gálico. Comparando el tratamiento "a" y "g", se escogió el tratamiento "a" pues requiere menor concentración de inductor y se adiciona al inicio de la fermentación, por lo que fue evaluado en el fermentador de 1 L. En el reactor se produjo el 25% de AS de lo obtenido en matraces (figura 1).

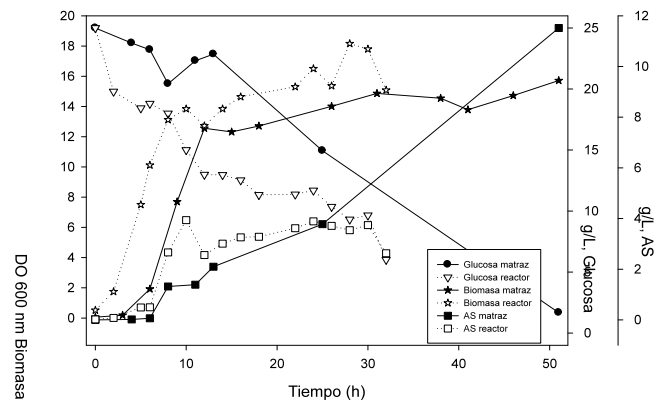


Fig. 1. Cinética de crecimiento, consumo de glucosa y producción AS.

Los cultivos en matraz aun en la fase estacionaria producen AS, mientras los cultivos en reactor presentan una producción de AS asociada al crecimiento. La máxima concentración de AS obtenida fue de 14.5g/L en el reactor con 100g/L de glucosa bajo las condiciones de inducción del tratamiento "a".

Conclusiones. Las modificaciones en la vía del corismato y en el sistema de transporte de glucosa de la cepa PB12, permitieron la acumulación de 11.5 g/L de AS en matraces y de 14.5 g/L en reactor bajo el tratamiento "a". En matraces con el tratamiento "a", la transformación del sustrato hacia AS mejoró en un 50% comparado con lo reportado. La mejor condición de inducción evaluada para la cepa PB12 mejoró en un 40% la producción de AS obtenida previamente.

Agradecimiento. CONACyT Fondo de Salud 44126. Beca CONACyT, DGAPA IN223308.

Bibliografía.

- Flores N, Xiao J, Berry A, Bolivar F, Valle F. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in Escherichia coli, (1996), *Nat. Biotechnol.*, Vol 14, 620-23
- Chandran S, Yi J, Draths K, Daeniken R, Weber W, Frost J. Phosphoenolpyruvate Availability and the Biosynthesis of Shikimic Acid, (2003) *Biotechnol Prog*, Vol 19, 808-814.