



ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO METABÓLICO Y TRANSCRITÓMICO DE UNA CEPA SOBREPDUCTORA DE SHIKIMATO MEDIANTE EL ANÁLISIS DE SUPERFICIES DE RESPUESTA

Juan Andres Martínez*, Alberto Rodríguez*, Noemí Flores*, Álvaro R. Lara*, Octavio T. Ramírez*, Guillermo Gosset*, Francisco Bolívar*. *Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa *Departamento de Ingeniería celular y biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001, Chamilpa, Cuernavaca Morelos, 62210, correo: jandres@ibt.unam.mx

Palabras clave: Acido shikímico, altas concentraciones de sustrato, metabolismo central de carbono.

Introducción. Los compuestos derivados de la vía de los aminoácidos aromáticos (AA) tienen importantes aplicaciones en la industria farmacéutica y alimentaria [1]. El ácido shikímico (SA) es un intermediario utilizado como precursor para la síntesis de Oseltamivir fosfato, utilizado en el tratamiento de la influenza A y B [2]. El SA es obtenido mediante procesos de extracción en plantas o la producción biotecnológica en bacterias [3]. La ingeniería de vías metabólicas (IVM) en *Escherichia coli* ha logrado desarrollar cepas con rendimientos cercanos al máximo teórico y con altas productividades [4]. En específico la cepa de *E. coli* PB12.AR36 con varias modificaciones el metabolismo central de carbono ha logrado rendimientos superiores al 45 % utilizando altas concentraciones de glucosa (Glu) y extracto de Levadura (YE) en reactores de 1L [5]. Sin embargo, para que esta cepa pueda ser utilizada a escala industrial es necesario estudiar a detalle el comportamiento en estas condiciones de alta cantidad de sustrato a fin de encontrar los parámetros óptimos para la distribución de carbono hacia SA.

Metodología. Se utilizó un método multivariado para la concentración inicial de Glu y de YE en las fermentaciones con rangos de 75 a 125 g/L y de 15 a 45 g/L respectivamente. Se utilizó una matriz experimental de 3x3 para el estudio del comportamiento de los diferentes parámetros de fermentación, así como para el comportamiento metabólico y transcriptómico de la cepa. Se construyeron superficies de respuesta con forma polinomial de segundo orden. El análisis del comportamiento se realizó estudiando la morfología de las superficies así como por el método de LaGrange para la obtención de puntos críticos en las superficies [6]. Los datos del análisis fueron utilizados para optimizar la producción de SA en modo lote y lote alimentado.

Resultados. Las superficies de respuesta mostraron dependencias importantes con respecto a la concentración inicial de las dos fuentes de carbono presentes en el medio. Entre ellos identificaron dos zonas de maximización a altas y bajas concentraciones de YE. Estos puntos críticos se correlacionaron con la diferencia en transcripción de los genes de *zwf* y *pgi* los cuales controlan el radio de flujo entre la glicólisis la vía de las pentosas fosfato, mostrando el mismo comportamiento, sugiriendo la aparición de dos regímenes de flujo distintos

que llevan a la producción de SA. Adicionalmente se analizaron las superficies de respuesta para los parámetros de rendimiento, productividades, crecimiento y concentraciones finales de metabolitos, así como la transcripción de 43 genes del metabolismo central y reguladores globales. El análisis nos permitió establecer las condiciones óptimas de operación en modo lote y lote alimentado favoreciendo condiciones metabólicas específicas que llevaron a concentraciones de SA cercanas a los 60 g/L.

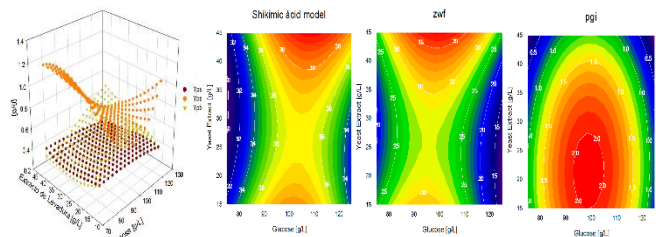


Fig. 1. Superficies de respuesta para los rendimientos SA/Glu, Biomasa/Glu y SA/biomasa y diagramas de contorno para el título final de SA y la expresión relativa de *zwf* y de *pgi*.

Conclusiones Se encontraron relaciones importantes entre la expresión de los genes y el comportamiento fisiológico de la cepa en diferentes condiciones iniciales de sustrato. Estas relaciones nos permitieron generar información importante para el diseño de estrategias de IVM. Se logró optimizar la producción en modo lote así como realizar fermentaciones en modo lote alimentado que permitieran una mayor redirección del flujo de carbono hacia la producción de SA.

Agradecimientos. La investigación fue realizada con las becas 105782 y 177568 del CONACyT y PAPIIT IN205811 DGAPA-UNAM

Bibliografía.

- 1 Gosset G. (2009). CURR OPIN BIOTECH. vol.(20.): 651-658.
2. Escalante A, Calderón R, Valdivia A. de Anda R, Hernández G, Ramírez O, Gosset G, Bolívar F. (2010). MICROB CELL FACT. vol(9):21-33.
3. Draths K.M, Knop D, Frost J.W. (1999). J. Am. Chem. Soc. vol(121):1603
4. Frost J.W, Frost K.M, Knop D. (2002). Biocatalytic synthesis of shikimic acid. United States. Patent US 6,472,168 B1.
5. Rodríguez A, Martínez JA. Báez-Viveros J, Flores N, Hernández-Chavez G, Ramírez OT, Gosset G. Bolívar F. (2013). MCF. 12(86) 1-15
6. Ferreira S, dos Santos W, Quintella C, Neto B, Bosque-Sendra J. (2004). TALANTA. vol(63):1061-1067.