



EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA SOBRE-EXPRESIÓN E INTERRUPCIÓN DE GENES RELACIONADOS A LA PRODUCCIÓN DE SHIKIMATO EN CEPAS DE *Escherichia coli* QUE CARECEN DE SISTEMA DE FOSFOTRANSFERASA (PTS⁻)

Rocío V. Calderón Pascacio*, Adelfo Escalante Lozada, Guillermo Gosset Lagarda y Francisco Bolívar Zapata. Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Mor. 62250, México, fax. 56227601, rcalderon@ibt.unam.mx*

Palabras clave: shikimato, Ingeniería de vías metabólicas, *Escherichia coli*

Introducción. El shikimato (SHK) es uno de los principales intermediarios en la ruta de los aminoácidos aromáticos. Este compuesto contiene varios grupos funcionales que son de importancia industrial para la producción de diferentes compuestos químicos entre ellos, el inhibidor de neuraminidasas Tamiflu[®], compuesto usado como para el tratamiento de la influenza aviar tipo A causada por el virus H5N1. Ante la posibilidad de una pandemia de esta enfermedad se han desarrollado diferentes estrategias a nivel global encaminadas a la producción de Tamiflu[®] (1). La posibilidad de producir este metabolito a gran escala puede solucionarse en parte a través de la ingeniería de vías metabólicas utilizando como principales estrategias el incrementar la disponibilidad de precursores y el flujo de carbono hacia el producto de interés.

En este trabajo se presenta la obtención de una cepa sobreproductora de SHK por medio de la modificación de algunos genes del metabolismo central y de la vía del SHK en cepas de *Escherichia coli* carentes de PTS para obtener una mayor producción de SHK.

Metodología. Para la acumulación de shikimato en *E. coli* es necesario inactivar una o las dos enzimas shikimato cinasa, codificadas por los genes *aroL* y *aroK* (1,2), y evitar de esta manera el flujo de SHK a CHO, producto final de la vía. En este trabajo se inactivó el gen *aroL* de la cepa PB12 de *E. coli* (PTS⁻Glc⁺, derivada de la JM101) (3), esta cepa se transformó con los plásmidos pJLBaroG^{br}tkTA y TOPOaroB, los cuales permitieron tener una mayor disponibilidad de los intermediarios DAHP, E4P y DHQ, respectivamente. Se realizaron fermentaciones de 500mL con 100mL de medio mínimo M9 suplementado con 5g/L de extracto de levadura, 10g/L de glucosa, los antibióticos correspondientes y 100μM IPTG. Se determinó el crecimiento de la cepa y los metabolitos producidos: DHS, SHK, ácido acético (HAc) mediante HPLC, consumo de glucosa y DAHP por el método del ácido tiobarbitúrico (4).

Resultados y discusión. En la figura 1a se presenta la curva de crecimiento, consumo de glucosa y producción de intermediarios y productos analizados, con y sin la adición de IPTG. La Figura 1b muestra los rendimientos máximos con respecto a la biomasa, de DHS, SHK, DAHP y HAc, sin IPTG se encuentran en una relación de 0.19:1.0:0.42:7.18 (DHS:SHK:DAHP:HAc) y con IPTG la relación es de 2.28:1.0:0.16:0.0, lo que indica que el flujo de carbono se dirige hacia la vía del SHK.

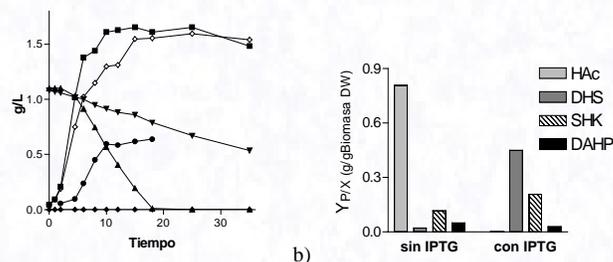


Figura 1 a) sin IPTG: ■Biomasa, ▲Glucosa ($\times 10^{-1}$ g/L), ●HAc; con IPTG: ◇Biomasa, ▼Glucosa ($\times 10^{-1}$ g/L), ◆HAc; b) Rendimientos.

Este comportamiento también se puede ver al comparar las velocidades de producción de dichos metabolitos (Cuadro 1). Aunque la velocidad de producción de SHK se reduce, la cantidad total de compuestos aromáticos aumenta, lo cual indicaría que existe otra enzima limitante en la vía, la cual podría ser la SHK deshidrogenasa que convierte el DHS en SHK, y que se inhibe por su producto final.

Cuadro 1. Velocidades de consumo de glucosa y de producción de metabolitos en la cepa PB12.shik1/pJLBaroG^{br}tkTA/TOPOaroB

	q _{Glu} ^a	q _{HAc} ^b	q _{DHS} ^b	q _{SHK} ^b	q _{DAHP} ^b
Sin IPTG	0.4624	23.8	1.26	8.06	4.15
Con IPTG ^c	0.1166	-	17.78	5.97	7.46

^a(gGlu/gX⁻¹hr); ^b(mgP/gX⁻¹hr); ^c100μM

Conclusiones. La obtención de una cepa de *E. coli* PTS⁻ Glc⁺ inactivada en el gen *aroL* permitió obtener SHK en fermentaciones a nivel de matraz, aunque el rendimiento obtenido se considera bajo respecto a lo reportado en la literatura se pretende analizar el efecto de la inactivación de *aroK* y evaluar la producción en nivel en fermentador bajo mejores condiciones de control.

Bibliografía.

- 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, *Met Eng*, 5:277-83.
- Johansson, L, Lindskog, A, Silfversparre, G, Cimander, C, Nielsen, KF, Lidén, G (2005), Shikimic Acid Production by a Modified Strain of *E. coli* (W3110.shik1) Under Phosphate-Limited and Carbon-Limited Conditions, *Biotechnol Bioeng*, 92(5):541-552.
- Flores N (1995) Construcción y caracterización de cepas de *Escherichia coli* mutantes en el sistema de transporte de carbohidratos PTS; Tesis de maestría, IBT-UNAM, México.
- Srinivasan, PR, Sprinson DB. (1958) 2-keto-3-deoxy-D-arabonoheptonic acid 7 phosphate synthase. *J Biol Chem* 234:716-722.