



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



EFFECTO DE LA CLONACIÓN DEL GEN *ZWF* SOBRE LA PRODUCCIÓN DE SHIKIMATO EN LA CEPA DE *Escherichia Coli* PB12.SA22.

Beatriz Carmona, Adelfo Escalante, Noemí Flores, Georgina Hernández, Francisco Bolívar. Instituto de Biotecnología. UNAM. Departamento de Ingeniería Celular y Biotatálisis. Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa Cuernavaca, Mor., susybcc@ibt.unam.mx .

Palabras clave: *Escherichia coli*, ácido shikímico, *zwf*

Introducción. El ácido shikímico (SA) intermediario de la vía de biosíntesis de compuestos aromáticos, es empleado como precursor en la síntesis de el inhibidor de la neuraminidasa del virus de la influenza: oseltamivir fosfato (OSF); el cuál es comercializado bajo el nombre de Tamiflu® por Roche Pharmaceuticals. Ante la necesidad a escala regional o global del antiviral OSF, en el escenario de una pandemia de influenza, se han aplicado estrategias de ingeniería de vías metabólicas para la sobreproducción de SA en diferentes cepas de *Escherichia coli* (1). Con la clonación del gen *zwf* de *E. coli* que codifica para la enzima glucosa-6-P-deshidrogenasa, se busca incrementar el flujo de carbono de la vía glicolítica a la vía de las pentosas y aumentar así la concentración del precursor eritrosa-4-fosfato y el cofactor NADPH+H⁺ para aumentar la producción de SA.

Objetivo. Estudiar el efecto de la clonación en plásmido del gen *zwf* (codifica para la enzima glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa) y su transformación en la cepa de *E. coli* PB12 *aroK aroL*, como una estrategia para incrementar la producción de SA.

Metodología. Se clonó el gen *zwf* en el plásmido pTOPO*aroBaroE*, obteniendo así el plásmido pTOPO*aroBaroEzwf*, el cual junto con el plásmido pJL*BaroGfbrtktA* se transformaron en la cepa PB12.SA2 (PB12Δ*aroL*Δ*aroK::cm*) generando la cepa PB12.SA23. Se evaluó la producción de shikimato y otros compuestos aromáticos, a través de sistemas de fermentación en lote en reactores de 1 L, con 500 mL de medio mineral (1) suplementado con 25 g/L de glucosa y 15 g/L de extracto de levadura. A partir de estos cultivos se realizó además un perfil transcriptómico por RT-qPCR.

Resultados.

Tabla 1. Velocidad específica de crecimiento y producción de SA y otros intermediarios de la vía de aromáticos.

| Cepa | μ (h ⁻¹) | DAHP (g/L) | DHS (g/L) | SA (g/L) | GA (g/L) |
|---------------|----------------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| PB12.SA22 (2) | 0.42±0.01 | 0.81±0.04 | 1.46±0.14 | 7.05±0.06 | 0.08±0.01 |
| PB12.SA23 | 0.37±0.02 | 0.70±0.001 | 1.09±0.09 | 8.52±0.79 | 0.03±0.0 |

Tabla 2. Comparación de rendimiento de SA y aromáticos totales.

| Cepa | Rendimiento de compuestos aromáticos totales* | |
|---------------|---|---|
| | Rendimiento SA (mol SA/mol glc) | Rendimiento de compuestos aromáticos totales* (mol compuestos aromáticos/mol glc) |
| PB12.SA22 (2) | 0.29 | 0.37 |
| PB12.SA23 | 0.35 | 0.42 |

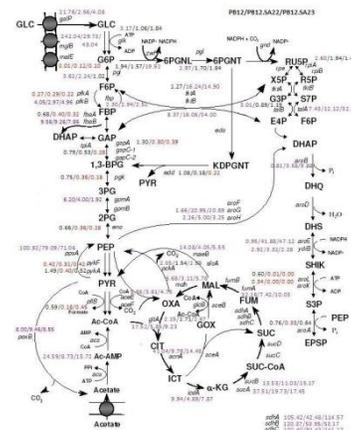


Fig. 1. Perfil transcriptómico de las cepas PB12, PB12.SA22, PB12.SA23. En morado los valores de expresión por arriba del nivel de la cepa silvestre y en rojo los valores que se encuentran por debajo del mismo, en negro están los valores que se mantienen al nivel de la cepa silvestre.

Conclusiones. La clonación del gen *zwf* generó un incremento en el nivel de expresión del mismo, lo que tuvo como consecuencia un aumento en la producción del 14% con respecto a la cepa productora PB12.SA22 y un rendimiento de 0.35 molSA/molglc, siendo este valor el mayor reportado para sistemas de fermentación similares. La producción de DHS respecto a la cantidad de SA producida con la cepa PB12.SA23 mejoró respecto a lo reportado previamente (1), obteniendo aproximadamente 1 g/L de DHS por cada 8 g/L de SA, lo que representa una ventaja en el aspecto industrial. El análisis transcriptómico muestra un incremento general del nivel de transcripción en la mayoría de los genes del metabolismo central de carbono analizados respecto a la cepa PB12.SA22; lo que sugiere que la mayoría del PEP generado por la cepa PB12.SA23 se dirige hacia la vía de compuestos aromáticos.

Agradecimiento. Este trabajo fue financiado por los donativos PAPIIT IN224709, CONACYT 105782 y CONACYT Sector Salud 126793.

Bibliografía.

- Chandran S, Yi J, Draths K, Daeniken R, Weber W, Frost J. (2003) *Biotechnol. Prog.* 19(1):808-814
- Escalante A, Calderón R, Valdivia A, De anda R, Hernández G, Ramírez O, Gosset G, Bolívar F. (2010). *Microb. Cell Fact.* 9(1):1-12