



# XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



## MEJORAMIENTO DE LA CAPACIDAD DE TRANSPORTE DE GLUCOSA EN UNA CEPA DE *Escherichia coli* (PTS<sup>-</sup>) SOBREPDUCTORA DE SHIKIMATO

Ania Cervantes Salinas, Adelfo Escalante Lozada, Francisco Bolívar Zapata,

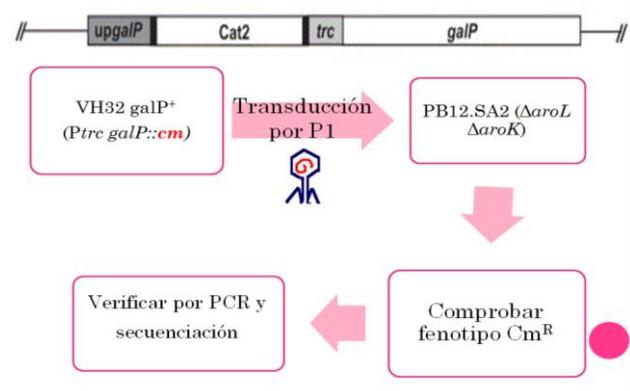
Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos C.P. 62210  
ania@ibt.unam.mx

Palabras clave: *Escherichia coli*, shikimato, galactosa permeasa

**Introducción.** El shikimato (SHK) es empleado como un precursor para la síntesis química del inhibidor de la enzima neuraminidasa, oseltamivir fosfato (OSF) producido por Roche bajo el nombre comercial Tamiflu®, que se emplea para el tratamiento de infecciones virales tales como influenza estacional tipos A y B, influenza aviar H5N1 e influenza A/H1N1. Se ha estimado que en caso de presentarse una pandemia de gripe aviar, la producción de Tamiflu® sería insuficiente para atender la población de países en vías de desarrollo. Ante esta situación, es importante contar con capacidades locales y regionales para producir este compuesto antiviral por medio de aproximaciones biotecnológicas. La síntesis microbiana de dicho compuesto empleando glucosa como fuente de carbono constituye una buena alternativa al proceso tradicional de extracción a partir de las plantas del género *Illicium* (1). En *Escherichia coli* la glucosa es introducida preferencialmente por el sistema de fosfotransferasa:glucosa (PTS) dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP) pero también puede ser transportada activamente hacia el citoplasma por sistemas como el MFS GalP (Permeasa de galactosa). La inactivación del sistema PTS incrementa la disponibilidad de moléculas de PEP que pueden ser empleadas en la vía de síntesis del shikimato sin embargo el inconveniente de esta inactivación es que la velocidad de crecimiento específica ( $\mu$ ) en glucosa disminuye sustancialmente comparada con la cepa silvestre.

El objetivo del presente trabajo consiste en incrementar la capacidad de transporte de glucosa en *E. coli* PB12.SA22 (PTS<sup>-</sup> glc<sup>+</sup> aroK<sup>-</sup> aroL<sup>-</sup> aroG<sup>fb</sup> tktA aroB aroE) y evaluar su efecto sobre la producción de SHK.

**Metodología.** A partir de la cepa de *E. coli* VH32GalP<sup>+</sup> (2) que contiene al gen *galP* bajo control del promotor P<sub>trc</sub> y el gen *cat2* de resistencia a cloramfenicol (Figura 1) se llevó a cabo una transducción mediada por el fago P1 con la cepa PB12.SA22 como receptora con el fin de reemplazar el promotor nativo de dicho gen. Se evaluó el efecto de esta modificación sobre el crecimiento de la cepa en cultivos de 50 mL en matraces bafleados de 250 mL con medio mineral suplementado con extracto de levadura y glucosa. Se seleccionó a las células receptoras de la construcción por su fenotipo de resistencia a cloramfenicol, verificando por PCR y secuenciación.



**Fig. 1.** Gen *galP* bajo control del promotor P<sub>trc</sub> presente en el cromosoma de la cepa VH32GalP<sup>+</sup>. Tomado de (2). Esquema de la estrategia de reemplazo del promotor por transducción.

### Resultados.

La velocidad específica de crecimiento evaluada tomando como cepa control a la PB12.SA22 permitió determinar la eficiencia de la modificación genética realizada.

**Tabla 1.** Velocidad específica de crecimiento para la cepa construida y la cepa control.

Cepa	$\mu$
PB12.SA22	0.73±0.02
PB12.SA22 GalP <sup>+</sup>	0.79±0.01

**Conclusiones.** La modificación genética realizada repercute en aumento de 8.2% en la velocidad específica de crecimiento de la cepa al ser evaluada en medio rico en matraz. Se espera que el desempeño de la cepa sea mejor en sistemas de fermentadores. Por otro lado también es necesario evaluar la producción de shikimato y otros intermediarios de la vía para apreciar el efecto directo que ejerce la modificación realizada.

**Agradecimiento.** Este trabajo fue financiado por los donativos PAPIIT IN224709, CONACyT 105782, 106428 y CONACyT Sector Salud 126793.

### Bibliografía.

- Escalante, A., Calderón, R., Valdivia, A., De Anda, R., Hernández, G., Ramírez, O., Gosset, G., Bolívar, F. (2010). *Microb. Cell Fac.*, 9: 21.
- de Anda, R., Lara, A., Hernandez, V., Hernandez-Montalvo, V., Gosset, G., Bolívar, F., Ramirez, O. (2006). *Metab. Eng.*, 8:281-290.