

## PREMIO SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL CATEGORÍA MAESTRÍA

### Ingeniería de vías metabólicas en bacterias para la producción de intermediarios de interés industrial de la vía del aminoshikimato

Rubén Mendoza-Flores<sup>1</sup>, Dulce Díaz-Quiroz<sup>1</sup>, Andrea Sabido-Ramos<sup>2</sup>, Francisco Bolívar<sup>1</sup>, Adelfo Escalante<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México.*

<sup>2</sup>*Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa, Cuajimalpa de Morelos, Ciudad de México, México.*

\*Contacto: [adelfo@ibt.unam.mx](mailto:adelfo@ibt.unam.mx)

#### Resumen

La vía del aminoshikimato (ASHK) descrita en *Amycolatopsis mediterranei* es una variante de la ruta del shikimato (SHK). Los principales intermediarios de esta ruta son la kanosamina, el 3-amino-5-hidroxibenzoato (aminoHBA) y el ASHK, compuestos precursores de una amplia variedad de moléculas de valor comercial entre los que se incluyen antivirales, anticancerígenos y antibióticos. Estos precursores tienen también el potencial de aplicación para el desarrollo de nuevas moléculas bioactivas. Para mejorar la capacidad de producción de estos compuestos, se han aplicado diferentes estrategias de ingeniería de vías metabólicas para el desarrollo de cepas sobreproductoras, sin embargo, en todos los casos se han alcanzado rendimientos y títulos bajos. En el caso de la kanosamina y el aminoHBA, las estrategias aplicadas se han limitado principalmente a sobreexpresar los clústeres de producción. Los experimentos de producción de ASHK ponen en evidencia que es fundamental aumentar la disponibilidad de fosfoenolpiruvato (PEP) e 1-imino-1-desoxi-D-eritrosa-4-fosfato (iminoE4P), y por tanto la capacidad de producción de kanosamina o kanosamina-6-fosfato. La limitación de PEP podría ser minimizada aplicando estrategias previamente reportadas para producción de SHK y otros compuestos aromáticos. Mientras que la vía del shikimato es una fuente importante de pérdida de sustrato. En esta contribución se describe la relevancia de la vía del ASHK, las principales aplicaciones de los intermediarios de importancia de esta vía y las principales estrategias reportadas para su producción mediante ingeniería de vías metabólicas con el fin de explorar su potencial biotecnológico.

**Palabras clave:** Vía del aminoshikimato, aminoshikimato, ácido 3-amino-5-hidroxibenzoico, kanosamina, ingeniería de vías metabólicas.

## Abstract

The aminoshikimic acid (ASHK) pathway is a variant of the shikimic acid pathway described in the bacteria *Amycolatopsis mediterranei*. In this pathway, the metabolic intermediates kanosamine, 3-amino-5-hydroxybenzoic acid (aminoHBA), and ASHK are precursors for the synthesis of high-value molecules such as antivirals, anticancer compounds, and antibiotics. These intermediates also have the potential for the development of new bioactive molecules. Metabolic engineering strategies for overproduction of kanosamine and aminoHBA have upregulated their codifying biosynthetic clusters. Meanwhile, strategies for the overproduction of ASHK shown the relevance to increasing the availability of phosphoenolpyruvate and imino-erythrose-4-phosphate, resulting in the increased production of the intermediates kanosamine or kanosamine-6-phosphate. Nevertheless, metabolic engineering pathway strategies for the overproduction of these compounds in several microbial cells resulted in the production of lower titers and yields. In this contribution, we describe the relevance of the ASHK pathway, the main applications of relevant intermediates and an overview of the central metabolic engineering strategies for the overproduction of these high-value aromatic compounds.

**Key words:** aminoshikimate pathway, 3-amino-5-hidroxibenzoic acid, kanosamine, aminoshikimic acid, metabolic engineering.

## Introducción

La vía del aminoshikimato (ASHK) fue descrita inicialmente en la actinobacteria *Amycolatopsis mediterranei* cuyo producto es el ácido 3-amino-5-hidroxibenzoico (aminoHBA), un componente estructural común en los antibióticos de las familias de ansamicinas, ansamitocinas y salinicetales. La vía del ASHK es de gran relevancia desde el punto de vista biotecnológico ya que, a partir de tres de sus intermediarios, la kanosamina, el aminoHBA y el ASHK es posible obtener diferentes compuestos de importancia farmacéutica (Figura 1). La kanosamina es un antibiótico aminoglucósido

monomérico y es también un componente estructural de otros antibióticos como la kanamicina y la 3,3'-neotrehalosdiamina (Vetter et al., 2013). El aminoHBA es un componente común en una amplia variedad de metabolitos secundarios de las familias de las ansamicinas, ansamitocinas y salinicetales que incluyen antibióticos, anticancerígenos y antioxidantes (Kang et al., 2002). Mientras que el ASHK es un compuesto aromático que posee varios centros estereogénicos y grupos funcionales ordenados alrededor de un anillo carbocíclico de seis carbonos. Por estas características, el ASHK (al igual que el shikimato o SHK), es un compuesto muy

atractivo como andamio estructural para la síntesis de bibliotecas combinatorias y es también una alternativa relevante para ser utilizado como material de partida para la síntesis química del antiviral tamiflu, inhibidor de la enzima neuraminidasa de virus de influenza (Guo & Frost, 2004; Díaz et al., 2014).

La vía del aminoshikimato está presente en microorganismos como *A. mediterranei*, *Actinosynnema pretiosum* y *Streptomyces collinus* y requiere de la formación de 1-imino-1-deoxi-D-eritrosa-4-fosfato (iminoE4P) a partir de 3-amino-3-deoxi-D-glucosa o kanosamina. La iminoE4P es condensada con fosfoenolpiruvato (PEP) para generar ácido 3,4,dideoxi-4-amino-D-arabino-heptulónico-7-fosfato (aminoDAHP); la siguiente reacción de la vía es catalizada por la enzima ácido 5-deoxi-5-amino-3-

dehidroquinico (aminoDHQ) sintasa que cicla el aminoDAHP a aminoDHQ, el cual es deshidratado para generar ácido 5-amino-5-desoxi-3-dehidroshikímico (aminoDHS). La última reacción de la vía es la biosíntesis de aminoHBA por la enzima aminoHBA sintasa la cual aromatiza al aminoDHS. Como estas reacciones de formación de aminoDAHP hasta aminoDHS son similares a las de la ruta del shikimato, ambas rutas se consideran paralelas (Guo & Frost, 2004; Díaz et al., 2014). En esta revisión se describe la vía de síntesis del ASHK y de sus intermediarios kanosamina, el aminoHBA y el ASHK como precursores para la síntesis de diferentes compuestos de relevancia farmacéutica, así como la aplicación de diversas estrategias de ingeniería de vías metabólicas para la sobreproducción de estos intermediarios en sistemas de fermentación.

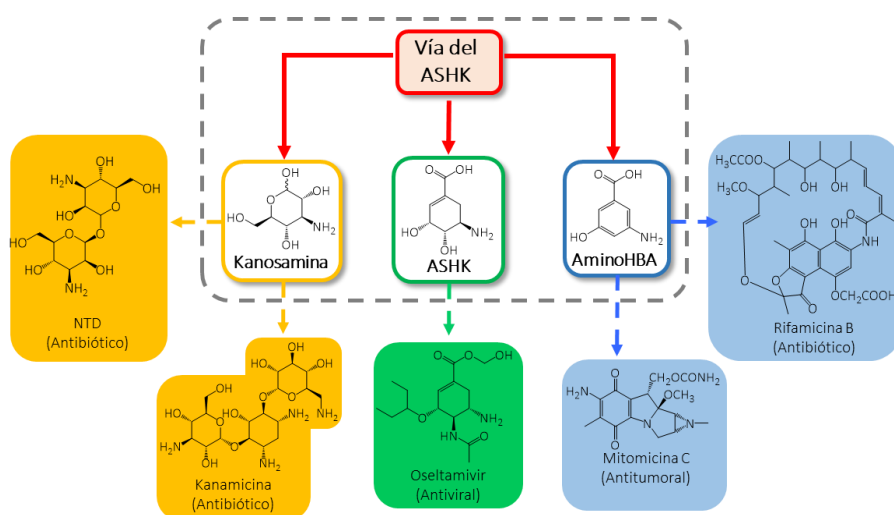


Figura 1. Algunos productos derivados de los intermediarios de la vía del aminoshikimato. ASHK (ácido aminoshikimato); aminoHBA (ácido 3-amino-5-hidroxibenzoico); NTD (3,3'-neotrehalosadiamina); (Modificado de Vetter et al., 2013; Floss et al., 2011; Guo & Frost, 2002a, b).

Vía del aminoshikimato.

Reacciones de la vía del aminoshikimato en *Amycolaptosis mediterranei*.

De acuerdo con la propuesta de Guo & Frost (2002a, b), la vía del ASHK puede ser dividida en dos etapas (Figuras 2 y 3):

**Etapas de síntesis de iminoE4P.** La UDP-glucosa es reducida a UDP-3-ceto-D-glucosa (UDPCG) por acción de la enzima UDP-D-glucosa deshidrogenasa (*rifL*) en una reacción dependiente de NAD<sup>+</sup>. La UDPCG es transformada a UDP-kanosamina en una reacción catalizada por la UDP-ceto-D-glucosa aminotransferasa (*rifK*) generando UDP-kanosamina; esta molécula es transformada a kanosamina por la UDP-kanosamina fosfatasa (*rifM*); la kanosamina es fosforilada por la kanosamina cinasa (*rifN*) generando kanosamina-6-fosfato (K6P) que se isomeriza a 3-amino-3-desoxi-D-fructosa-6-fosfato (aminoF6P) por acción una

fosfokanosamina isomerasa; la aminoF6P junto con ribosa-5-fosfato son convertidas a 1-imino-1-desoxi-eritrosa-4-fosfato (iminoE4P) y sedoheptulosa-7-fosfato (S7P) por acción de una transcetolasa (*orf15*).

**Etapas de síntesis de aminoHBA.** La iminoE4P es condensada junto con el PEP para formar aminoDAHP en una reacción catalizada por la enzima aminoDAHP sintasa (*rifH*), posteriormente el aminoDAHP es transformado a 5-amino-5-desoxi-3-deshidroquinato (aminoDHQ) por la aminoDHQ sintasa (*rifG*), el aminoDHQ es deshidratado a 5-amino-5-desoxi-3-deshidroshikimato (aminoDHS) por la enzima aminoDHQ deshidratasa (*rifJ*), finalmente, el aminoDHS es transformado a aminoHBA por la aminoHBA sintasa (*rifK*). En *A. mediterranei* el aminoHBA se incorpora a la ruta de síntesis de la rifamicina B (una ansamicina).

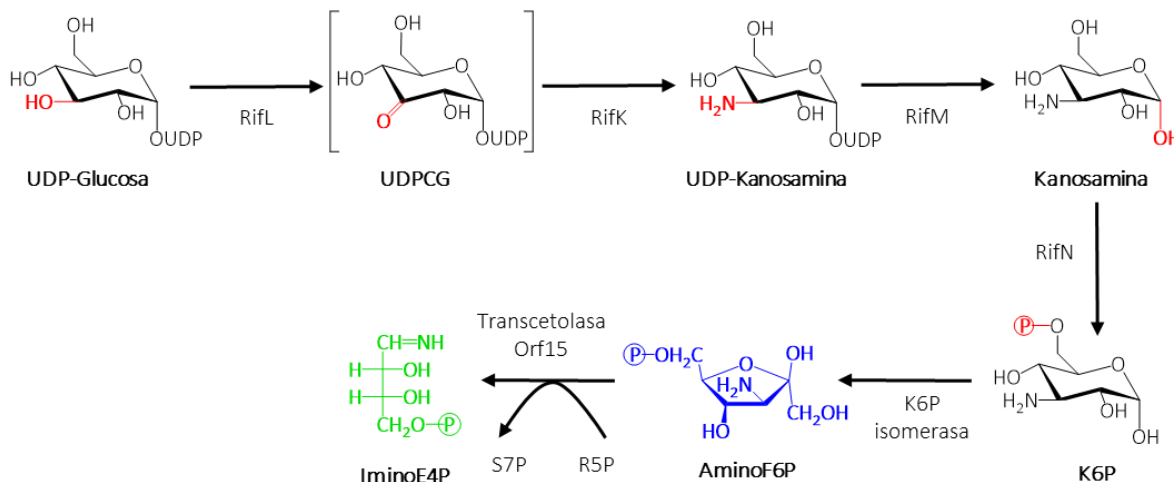


Figura 2. Etapas de síntesis de iminoE4P en *A. mediterranei*. Los grupos en rojo están involucrados en la reacción enzimática. UDPCG, UDP-3-ceto-D-glucosa; K6P, kanosamina-6-fosfato; aminoF6P, 3-amino-3-desoxi-D-fructosa-6-fosfato; iminoE4P, imino-eritrosa-4-fosfato; S7P sedoheptulosa-7-fosfato; R5P, ribosa-5-fosfato (Modificado de Gou & Frost, 2002a,b).

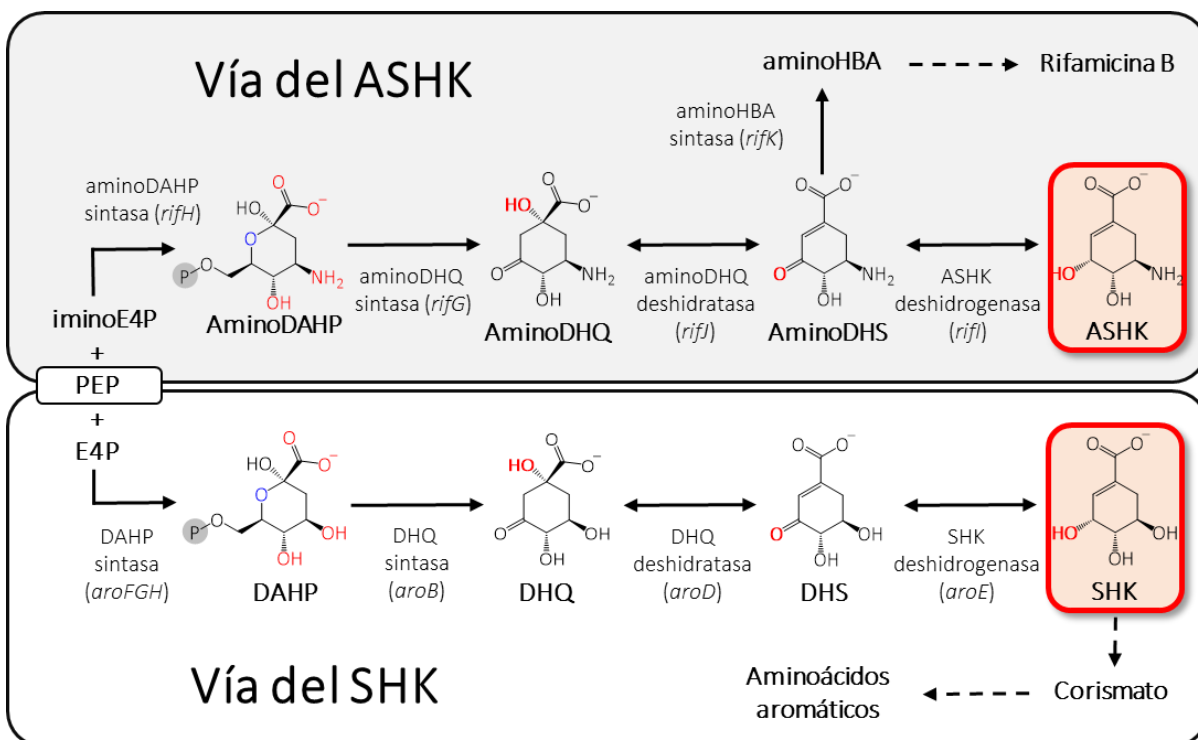


Figura 3. Segunda etapa de la vía del aminoshikimato (ASHK) en *A. mediterranei* (abajo) y vía del shikimato (SHK) en *E. coli* (arriba). Los grupos en rojo participan en la reacción respectiva. aminoDAHP, ácido 3,4,dideoxi-4-amino-D-arabino-heptulonico-7-fosfato; aminoDHQ, ácido 3-amino-3-desoxi-deshidroquinico; aminoDHS ácido-3-amino-3-desoxi-deshidroshikímico, ASHK (3-amino-3-desoxishikimato); aminoHBA, ácido 3-amino-5-hidroxibenzoico; DAHP, 3-deoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato; DHQ, ácido 3-deshidroquinico; DHS, ácido 3-deshidroshikímico; (*rifH*) y *aroFGH*, (amino)DAHP sintasa; (*rifG*) y *aroB*, (amino)DHQ sintasa; (*rifJ*) y *aroD*, (amino)DHQ deshidratasa; *rifK*, aminoHBA sintasa; (*rifI*) y *aroE*, (amino) shikimato deshidrogenasa (modificado de Gou & Frost, 2002a, b; Díaz et al., 2014).

Los genes codificantes para las enzimas de síntesis de rifamicina se encuentran en un clúster denominado *rif* en el genoma de *A. mediterranei*. En el clúster *rif* de *A. mediterranei* también se encuentran otros genes involucrados en la síntesis y transporte de la rifamicina B. Clústeres similares han sido encontrados en microorganismos del género *Streptomyces flaveolus*, *S. hygroscopicus*, *S. achromogenes*, *S. collinus*, *S. lavendulae* y en otros microorganismos como *A. pretiosum* y

*S. arenicola*. En el clúster *rif* también se encuentra el gen *rifI* que codifica para una enzima con actividad *in vivo* de aminoshikimato deshidrogenasa que puede reducir aminoDHS a ASHK (Guo y Frost, 2002a, b).

*Ingeniería de vías metabólicas para la producción de intermediarios de la vía del ASHK.*

La ingeniería de vías metabólicas (IVM) busca manipular el metabolismo de los microorganismos con el fin de generar cepas capaces de sobreproducir metabolitos de relevancia industrial por medio de la aplicación de ingeniería genética (Lee et al., 2019). En la IVM se suelen usar herramientas de otras áreas de conocimiento como la biología de sistemas, biología sintética, evolución adaptativa en laboratorio, ciencias ómicas y bioinformática; por lo que es denominada en ocasiones ingeniería metabólica de sistemas (*systems metabolic engineering*) (Choi et al., 2019).

Dado la relevancia de la kanosamina, el aminoHBA y el aminoshikimato se han explorado estrategias para aumentar su producción, incluida la IVM en hospederos heterólogos (Tabla 1). Una primera estrategia consiste en aumentar la disponibilidad de kanosamina o kanosamina-6-fosfato por lo que se deben buscar formas eficientes de canalizar glucosa hacia su vía de síntesis (Fan et al., 2016), sin afectar el flujo de glucosa a la glucólisis y la vía de las pentosas fosfato pues se pondría en riesgo la capacidad de crecimiento del fondo genético. Dado que la kanosamina presenta actividad antibiótica es necesario evitar también su acumulación mediante su rápida conversión a iminoE4P; el fondo genético debería tolerar la presencia de este antibiótico (Guo y Frost, 2007).

De forma relevante, dado que las reacciones de formación de aminoDAHP y

posteriores son similares a las de la ruta del SHK, la aplicación de diversas estrategias previamente usadas para la sobreproducción de SHK y otros compuestos aromáticos podrían ser aplicadas a la síntesis de ASHK y aminoHBA (Díaz et al., 2014; Rodríguez et al., 2014). Mientras que algunos genes de la vía del ASHK podrían sustituirse por los de la vía del SHK reduciendo la cantidad de genes heterólogos necesarios, sin embargo, también se debe considerar evitar la competencia entre las rutas de SHK y ASHK (Díaz et al., 2014; Guo y Frost, 2002a, b).

### *Estrategias de IVM para la síntesis de kanosamina.*

La kanosamina o 3-amino-3-desoxi-D-glucosa consta de un grupo amino sustituyendo al grupo hidroxilo de la glucosa en el carbono 3 y es considerada el único antibiótico aminoglucósido monomérico. Fue identificada originalmente como componente de la kanamicina producida por *Streptomyces kanamyceticus* (Umezawa et al., 1967). Posteriormente la kanosamina fue aislada de caldos de fermentación de *Bacillus* de la kanamicina producida por *Streptomyces kanamyceticus* (Umezawa et al., 1967). Posteriormente la kanosamina fue aislada de caldos de fermentación de *Bacillus pumilus* (originalmente denominado *Bacillus aminoglucosidicus*), *Bacillus cereus* y



# Artículos

Tabla 1. Reportes de Ingeniería de vías metabólicas para la producción de intermediarios de la vía del aminoshikimato.

Cepa	Compuesto	Genotipo	Condiciones de cultivo	Título (g/L)	Referencia
<i>E. coli</i> SP1.1/pSN1.292	Kanosamina	RB791 <i>serA::aroB aroL::Tn10 aroK::Cm<sup>R</sup> trc/ ndcA ntdB ntdC</i>	Cultivo en lote alimentado en medio rico	8	Nisthala, 2018
<i>Bacillus pumillus</i> ATCC 21143	Kanosamina	Cepa silvestre	Lote alimentado adicionado con harina de soya, soytona y NaCl	20	Gou & Frost, 2001
<i>Streptomyces coelicolor</i> YU105/pHGF7612	aminoHBA	YU105 <i>pact/ rifG rifH rifK rifL rifM rifN rifJ</i>	Medio R5 modificado sin sacarosa	0.45-0.50	Yu et al., 2001
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) / pKW255	aminoHBA	BL21 T7/ <i>rifH rifK rifL rifM rifN asm47 asm23</i>	Medio M9 en matraz agitado	0.0031	Watanabe et al., 2013
<i>E. coli</i> BAP1 pKW255/ pKW256	P8/1-OG	BAP1 T7/ <i>rifH rifK rifL rifM rifN asm47 asm23 pccB accA1 rifLM+rifM1 rifM2+rifM3</i>	Cultivo lote alimentado en fermentador en medio F1	trazas	Watanabe et al., 2013
<i>E. coli</i> BAP1/pKW255	aminoHBA	BAP1 T7/ <i>rifH rifK rifL rifM rifN asm47 asm23</i>	Medio LB en matraz agitado	0.055	Rude et al., 2006
<i>A. mediterranei</i> ATCC 21789/pJG8.219 <sup>a</sup>	ASHK	ATCC 21789 <i>amy/ rifI</i>	Cultivo en fermentador en medio adicionado con 32 g/L de harina de soya y 7.5 g/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.2	Gou & Frost, 2004
<i>E. coli</i> SP1.1/pJG6.181B	ASHK	RB791 <i>serA::aroB aroL::Tn10 aroK::Cm<sup>R</sup> tac/ rifH aroE serA tktA glK</i>	Cultivo lote alimentado en medio minimo con glucosa y kanosamina	1.1	Gou & Frost, 2004
<i>E. coli</i> SP1.1/pJG11.265	ASHK	RB791 <i>serA::aroB aroL::Tn10 aroK::Cm<sup>R</sup> tac/ yhjY yhjL rifH aroE serA tktA</i>	Medio mínimo en fermentador con 10 g/L de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.06	Gou & Frost, 2007

ASHK = aminoshikimato; aminoHBA = ácido 3-amino-5-hidroxibenzoico.

de la kanamicina producida por *Streptomyces kanamyceticus* (Umezawa et al., 1967). Posteriormente la kanosamina fue aislada de caldos de fermentación de *Bacillus pumilus* (originalmente denominado *Bacillus aminoglucosidicus*), *Bacillus cereus* y *Streptomyces lansus* (Umezawa, 1968; Milner, 1996; Dolak, 1980).

La kanosamina presenta actividad antibiótica contra algunas bacterias y hongos entre los que se incluyen fitopatógenos como *Phytophthora medicaginis*, *Venturia inaequalis* y *Ustilago maydis* así como cepas patógenas de humanos como *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Candida albicans* (Janiak & Milewki., 2001). Las concentraciones mínimas inhibitorias de la kanosamina son altas y no puede ser usada como antibiótico comercial, sin embargo, su actividad se ve beneficiada de forma sinérgica en presencia de otros antibióticos como la swittermicina A, por lo que cepas productoras de estos compuestos podrían ser usadas en control biológico de fitopatógenos (Milner et al., 1996). Ejemplo de esto es la cepa de *B. cereus* UW85 que ha mostrado ser efectiva para el control del mal del talluelo de la alfalfa causada por *Phytophthora medicaginis*. Se ha reportado que esta cepa de *B. cereus* logra acumular 2.2 µg/ml de kanosamina en cultivos en fermentador, aunque el título final varía de acuerdo con la composición del medio de cultivo (Milner et al., 1996). Experimentos realizados en *C. albicans* demuestran que la kanosamina es fosforilada fácilmente por la

hexocinasa, la K6P actúa como inhibidor competitivo de la enzima glucosamina-6-fosfato sintasa deteniendo la síntesis de pared celular (Janiak & Milewki, 2001). La adición de N-acetil-glucosamina en una concentración de 10 mM recupera la capacidad de crecimiento en presencia de kanosamina (Iwai et al., 1977; Janiak & Milewki., 2001).

En microorganismos como *A. mediterranei* y *B. pumilus* la kanosamina es sintetizada a partir de UDP-glucosa en tres reacciones enzimáticas. La primera es una oxidación de la glucosa dependiente de NAD<sup>+</sup> en el carbono 3, seguida de una transaminación dependiente de glutamina, posteriormente el UDP es hidrolizado (Figura 2). En 2013, Vetter y colaboradores reportaron en *B. subtilis* una ruta de biosíntesis de kanosamina alternativa a la reportada previamente en *A. mediterranei*, en la que la kanosamina participa como un intermediario en la ruta de biosíntesis del antibiótico 3,3'-neotrehalosdiamina (NTD), un antibiótico descrito originalmente en *B. pumilus* y *B. circulans*, el cual presenta actividad inhibitoria contra *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y curiosamente al mismo *B. pumilus* (Tsuno, 1986). En *B. subtilis* (Figura 4) la glucosa-6-fosfato es oxidada a 3-ceto-3-desoxi-D-glucosa-6-fosfato (3OG6P) por acción de la enzima 3OG6P deshidrogenasa (*ntdC*) en una reacción dependiente de NAD<sup>+</sup>. La 3OG6P es posteriormente transformada a K6P por acción de la 3OG6P aminotransferasa (*ntdA*);



en esta reacción el grupo amino es cedido por el L-glutamato que es transformado a oxoglutarato. La K6P es transformada a kanosamina por la kanosamina fosfatasa (*ntdB*), para continuar la ruta de producción de NTD. Para la producción mediante IVM de kanosamina, aminoHBA o ASHK, la vía en *B. subtilis* tiene la ventaja de que permite generar

kanosamina a partir de glucosa-6-fosfato en menos reacciones enzimáticas y no requiere de UDP-glucosa.

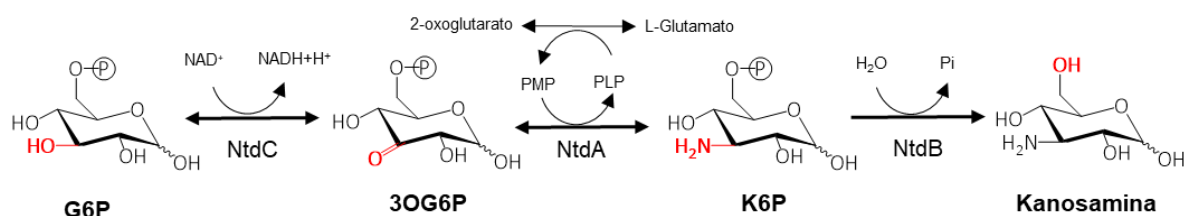


Figura 4. Síntesis de kanosamina en *B. subtilis*, los grupos en rojo están invocados en la reacción respectiva. G6P, glucosa-6-fosfato; 3OG6P, 3-oxoglucosa-6-fosfato; K6P, kanosamina-6-fosfato; PLP, coenzima piroxidal fosfato; PMP, piridoxamina fosfato; NtdC, glucosa-6-fosfato-3-deshidrogenasa; NtdA, 3-oxoglucosa-6-fosfato-glutamato aminotransferasa; NtdB, K6P fosfatasa (Tomado de van Straaten et al., 2013).

*B. pumilus* es el microorganismo que más acumula kanosamina por lo que es comúnmente utilizado para la producción de este metabolito. Guo & Frost (2004), han logrado la producción de hasta 20 g/L de kanosamina en cultivos en lote alimentado con la cepa *B. pumilus* ATCC 21143 en un medio de cultivo que contiene glucosa, harina de soya, soytona (hidrolizado comercial de soya) y cloruro de calcio. Estos cultivos se realizaron con la finalidad de aprovechar la kanosamina para su posterior conversión en ASHK. Por otro lado, *B. pumilus* K-169-B61 en un medio de cultivo rico optimizado se reportó la producción de hasta 700 µg/ml de NTD (Tsuno, 1986).

Más recientemente Nisthala (2018), clonó los genes *ntdC*, *ntdB* y *ntdA* en un operón regulado por el promotor *trc* en el plásmido pSN1.292 que fue utilizado para transformar a la cepa de *E. coli* SP1.1. Esta cepa ha sido previamente usada para la producción de SHK cuya principal característica es que tiene las dos isoenzimas de shikimato cinasa inactivadas (*aroK*, *aroL*) (Chandran et al., 2003). En cultivos en lote alimentado en un medio rico la cepa transformante fue capaz de acumular 8 g/L de kanosamina y 10.8 g/L de SHK, mientras que en un medio mínimo se obtuvieron 6 g/L de kanosamina y 1.3 g/L de SHK. En fermentaciones similares en medio rico usando a la misma cepa transformada con un

plásmido que solo incluye los genes *ntdB* y *ntdC* se obtuvieron 1.7 g/L de kanosamina y 7.6 g/L de SHK, lo que indica que *E. coli* es ligeramente capaz de desforilar al la K6P, La acumulación de SHK se debe a la inactivación de las dos isoenzimas de shikimato cinasa. Curiosamente en estos cultivos no se encontró ASHK debido posiblemente a que la fracción de kanosamina convertida a iminoE4P tiende a hidrolizarse rápidamente a E4P, el cual finalmente se convierte en SHK, mientras que las isoenzimas de DAHP sintasa (*aroFGH*) no serían capaces de catalizar la reacción de formación de aminoDAHP (Guo y Frost, 2002a, b).

## *Estrategias de IVM para la síntesis de aminoHBA*

El aminoHBA es el precursor universal de las familias de metabolitos secundarios conocidos como ansamicinas, ansamitocinas y saliniciteles, entre estos compuestos se incluye al antibiótico rifamicina B, producidos de manera natural por las actinobacterias y que es utilizada para el tratamiento de la tuberculosis y compuestos antitumorales como la geldanamicina y la ansamitocina (Floss et al., 2011). La estructura del aminoHBA presente en estos antibióticos consta de un anillo aromático con un carbono adicional y un nitrógeno en arreglo meta. Esta estructura es conocida como mC<sub>7</sub>N y funciona como la unidad de inicio de síntesis de estos policétidos (Floss et al., 2011). Se han descrito varios clústeres

biosintéticos relacionados con la síntesis de antibióticos derivados del aminoHBA que están presentes en actinobacterias tales como *Streptomyces coelicolor*, *S. collinus*, *S. hygroscopicus* y *A. pretiosum* (Floss et al., 2011). El primer cluster descrito es el del antibiótico rifamicina B de *A. mediterranei*, el cual consta de 5 genes que codifican para policétido sintasas y una amida sintasa (*rifA-F*), los genes para la síntesis de aminoHBA (*rifG-J, K-N*), además de genes involucrados en la regulación, procesamiento y exporte de dicho antibiótico. Existen clústeres adicionales para la producción de metabolitos derivados del aminoHBA tales como el de producción de ansatrianina de *S. collinus*, que posee dos clústeres, uno con genes de ansatrianina y los genes del clúster *rif* y el segundo clúster asociado con genes putativos de la biosíntesis de naftomicina y genes homólogos del clúster *rif*. De igual manera, *S. hygroscopicus* posee los clústeres AHBA-N y AHBA-B, el primero de ellos asociado con genes putativos de la biosíntesis de naftomicina y el segundo con genes de geldanamicina, en este último están presentes dos copias homólogas de *rifG*, pero carece de *rifH*. Por su parte, el clúster de ansamitocina de *A. pretiosum* posee dos copias de los genes *rifK*, una de ellas asociada al clúster principal de ansamitocina donde se encuentran homólogos de *rifJ* y *rifN*, y el segundo dentro de un grupo de genes que contienen homólogos de *rifL*, *rifM* y *rifG*. Mientras que *Actinosynnema mirum* posee otro arreglo en donde dos genes homólogos a

*rifK* se encuentran separados 112 Kb uno de otro y asociados con genes de las poliketido sintasas de ansamitocina. De manera general, estos hallazgos permiten identificar que los genes *rifK*, *rifL*, *rifM* y *rifN*, involucrados en los primeros pasos de la síntesis de aminoDAHP son imprescindibles, mientras que los involucrados en los pasos posteriores de la vía del ASHK pueden estar ausentes y ser sustituidos por los genes de la vía paralela del SHK (Floss, 2011). Como se ha señalado, la síntesis de metabolitos derivados del aminoHBA es compleja pues involucra múltiples genes, además de que, dependiendo del microorganismo, se encuentran organizados en diferentes arreglos. Para el caso de la biosíntesis de ansamicinas, una vez que el aminoHBA es sintetizado, éste tiene que pasar por una serie de modificaciones que involucran su activación, elongación y ensamblado por una poliketido sintasa (RifA), enzima de 530 kDa que requiere de metilmalonil-CoA y malonil-CoA para la elongación. Para el caso de la geldamicina y las ansamitocinas, también se requiere de metoximalonil-ACP (proteína acarreadora de acilos) (Rude y Khosla, 2006).

A la fecha se han obtenido cepas de actinobacterias sobreproductoras de metabolitos secundarios a partir de distintos enfoques entre los que incluyen mutagénesis tradicional e ingeniería genética (Baltz, 2011). Sin embargo, también resulta atractivo buscar su sobreproducción usando fondos genéticos heterólogos cuyo metabolismo sea más

conocido, que puedan ser fácilmente manipulados genéticamente y que puedan crecer en medios cultivo simples (Weber et al., 2014). Como el aminoHBA funciona como unidad de inicio, su sobreproducción es un primer paso hacia la producción mediante IVM de compuestos derivados (Rude & Khosla, 2006). Con este fin se han generado cepas de *E. coli* con varias modificaciones genéticas, tales como el ensamblado de operones multigénicos con 5 genes de *A. mediterranei* (*rifH*, *-K*, *-L*, *-M* y *-N*), 2 genes homólogos de *A. pretiosum* (*asm47* y *asm23*) que suplen la función de las proteínas RifG y RifJ respectivamente y 2 genes de *S. coelicolor* (*pccB* y *accA1*) involucrados en la síntesis de metilmalonil-CoA (Watanabe et al., 2003). En dicho trabajo se logró producir 3.1 mg/L de aminoHBA a partir de glucosa en medio mínimo utilizando un fermentador de 10 L. Una vez obtenida esta unidad primaria, el siguiente paso fue sintetizar el intermediario de la rifamicina, el compuesto P8/1-OG. Este compuesto es el producto de la poliketido sintasa RifA, la cual está conformada por 4 módulos cada uno con dominios y actividades enzimáticas involucradas en la activación y elongación del aminoHBA. Debido a que no fue posible sobreexpresar el polipéptido completo, los 4 módulos de RifA se dividieron en 2 construcciones genéticas por separado. Las dos proteínas trunca se lograron expresar en *E. coli*, obteniéndose trazas de P8/1-OG y 2.5 mg/L del compuesto *N*-acetil P8/1-OG en un cultivo en lote alimentado

(Watanabe et al., 2003). Otra aproximación para la síntesis de las ansamicinas en *E. coli* consiste en sobreexpresar los genes responsables de la producción de las unidades de elongación del aminoHBA, como es el caso de los genes *fkfG*, *-H*, *-I*, *-J* y *-K* de *S. hygroscopicus* involucrados en la síntesis del metoximalonil-ACP utilizado por la poliketido sintasa de la vía de síntesis de las geldamicinas (Rude y Khosla, 2006).

Otra aproximación para la producción de aminoHBA fue la sobreexpresión del clúster *rifG-N* en *S. coelicolor* que resultó ser suficiente, al menos en este hospedero, para producir de 350 a 400 mg/L de aminoHBA (Yu et al., 2001). Por su parte, la delección de *rifG* (aminoDHQ sintasa) y *rifJ* (aminoDHQ deshidratasa) en *S. coelicolor* reduce la producción de aminoHBA en un 90%, mientras que la ausencia de *rifH* (aminoDAHPSintasa) elimina la síntesis de dicho precursor. Por su parte, la inactivación de estos mismos genes en la cepa silvestre de *A. mediterranei* disminuye del 1 al 10% la producción de rifamicina (Yu et al., 2001). Estos resultados sugieren que las enzimas correspondientes a la vía de síntesis del SHK como la DHQ sintasa (*aroB*) y la DHQ deshidratasa (*aroD*) pueden suplir la función de aquellas de la ruta del aminoHBA y utilizar los compuestos aminados análogos (Yu et al., 2001).

Con el objetivo de determinar el papel de los genes involucrados en la primera parte de la vía, la síntesis de iminoE4P, se han

realizado trabajos preliminares en los que se expresan los genes *rifL* y *rifK*, el producto del primero esta involucrado en la reducción de UDP-glucosa a UDP-3-ceto-D-glucosa, mientras que en el segundo caso además de su papel como aminoHBA sintasa, tiene una segunda función como aminotransferasa, responsable de transformar la UDP-3-ceto-D-glucosa en UDP-kanosamina. La expresión individual de *rifL* en *E. coli* generó cuerpos de inclusión, mientras que al ser co-expresada con *rifK*, se logró observar en geles SDS las bandas correspondientes a cada una de las proteínas. Estos resultados sugieren un posible complejo entre ambas proteínas que provee de estabilidad estructural o funcional a cada una de ellas (Floss et al., 2011). Existe un panorama amplio de posibilidades para seguir caracterizando las diferentes vías de síntesis de policétidos naturales derivados del aminoHBA.

## *Estrategias de IVM para la síntesis de aminoshikimato*

El ASHK (ácido 5-amino-5-deoxishikímico) recibe su nombre por ser un análogo del SHK con la diferencia de que en el carbono 5 se sustituye al grupo hidroxilo por un grupo amino, el ASHK fue inicialmente propuesto como un posible precursor en la ruta de biosíntesis de aminoHBA. El ASHK no ha sido encontrado en cepas silvestres y su papel en el metabolismo no está claro, pues no participa en la ruta de biosíntesis del aminoHBA (Peek & Christendat, 2015). Se ha

demostrado que el ASHK puede ser sintetizado por vía enzimática *in vivo* e *in vitro* a partir de aminoDHS (Guo & Frost, 2002a), y puede ser obtenido mediante síntesis química a partir de shikimato (Kim et al., 1992). Como la vía del SHK está presente solo en plantas, bacterias, algas, hongos y parásitos del género *apicomplexa* y su función de síntesis de aminoácidos aromáticos es esencial (figura 2), las enzimas de esta ruta son un excelente blanco para el desarrollo de antibióticos, antimicóticos, antiparasitarios, herbicidas y herramientas de control biológico de plaga. Estos compuestos deberían ser inocuos para aves, mamíferos, reptiles y anfibios dada la ausencia de la ruta en estos organismos (Díaz-Quiroz et al., 2018; Amer et al., 2008). Como los intermediarios de la vía del ASHK son similares a los de la vía del shikimato, los primeros podrían ser un excelente andamio para la generación de bibliotecas químicas para el desarrollo de inhibidores de esta vía (Pansegrau et al., 1991).

Bajo este enfoque Pansegrau y colaboradores (1991), obtuvieron ASHK a partir de SHK por síntesis química y posteriormente ASHK-3-fosfato por vía enzimática, este compuesto demostró ser un inhibidor competitivo ante la enzima ESPS sintasa, que cataliza la formación de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSPS) a partir de la reacción de PEP en el carbono 5 del shikimato-3-fosfato (S3P); la sustitución del grupo hidroxilo en el carbono 5 por el grupo amino evita que la formación de ESPS

se lleve a cabo. Un estudio más reciente demuestra que uno o dos sustituyentes voluminosos pueden ser agregados al grupo amino del ASHK, lo que les da capacidad de inhibir a la enzima shikimato deshidrogenasa de los patógenos humanos *Mycobacterium tuberculosis* y *Helicobacter pylori* (Prado et al., 2016). Estos experimentos demuestran que compuestos derivados del ASHK tienen potencial para el desarrollo de inhibidores de enzimas de la vía del SHK.

Por otro lado, el ASHK ha ganado interés por ser un atractivo precursor del oseltamivir fosfato (OSP) o Tamiflu® que presenta actividad contra distintos subtipos de virus de influenza, incluidos H1N1 y la influenza aviar (A5N1) (Díaz et al., 2014). El OSP actúa deteniendo el ciclo lítico del virus mediante la inhibición de la neuraminidasa, una enzima presente en la cápside de los viriones sintetizados en el interior de la célula infectada, que escinde la unión entre la hemaglutinina de la cápside de los viriones y el ácido siálico de los receptores de membrana en la célula infectada, lo que permite a los viriones continuar su ciclo lítico (Ward et al., 2005). Actualmente el OSP es sintetizado químicamente a partir de SHK que originalmente era obtenido únicamente, con bajo rendimiento, por extracción del anís estrella, un fruto del árbol *Illicium verum* (Díaz et al., 2014). En las últimas décadas la constante aparición de pandemias de influenza generó alta demanda de OSP y por lo tanto de SHK cuya cantidad ofertada llegó

a ser insuficiente, dejando a gran parte de la población mundial desprotegida ante esta amenaza, principalmente en países en desarrollo, por lo que fue necesario explorar nuevas alternativas de producción de SHK (Martínez et al., 2015).

Actualmente, mediante la aplicación de IVM se han desarrollado varias de cepas de *E. coli* productoras de SHK con las que se han obtenido títulos de hasta 84 g/L y rendimientos de hasta 43 % mol/mol usando medios ricos con glucosa como sustrato. Sin embargo, el título más alto reportado de SHK es de 151 g/L con rendimientos de hasta 56 % en una cepa de *Corynebacterium glutamicum* aplicando diversas estrategias de IVM y un sistema de cultivos de células en reposo (Kogure et al., 2016; Bibal et al., 2018). En general las estrategias se han enfocado en aumentar la disponibilidad de E4P y PEP, así como de evitar pasos limitantes en la ruta y evitar la conversión de SHK a otros subproductos (Martínez et al., 2015; Rodríguez et al., 2014). En algunos de los procesos actuales de síntesis de OSP se requieren cuatro etapas para incorporar el grupo amino en la posición 5 del SHK, por lo que sustituir al SHK por ASHK eliminaría operaciones de reacción y separación en los procesos industriales, lo que se podría traducir en menor costo de producción, a la vez que aumentaría la productividad y el rendimiento global del proceso (Díaz et al., 2014; Guo y Frost, 2007, 2004; Karpf, 2005).

En el clúster *rif* de *A. mediterranei* se encuentra el gen *rifI* que fue propuesto como una quinato o SHK deshidrogenasa putativa (Peek & Christendat, 2015). Guo & Frost (2004), lograron la primera síntesis microbiana de ASHK a partir de glucosa mediante la sobreexpresión de *rifI* en el plásmido pJG8.219A en la cepa *A. mediterranei* ATCC 21789 en cultivos en lote alimentado, obteniendo 0.2 g/L de ASA, con un rendimiento molar de 0.4% y 1.4 g/L de rifamicina B; dado que no se encontró aminoquinato en el medio de cultivo, se da por hecho que esta enzima tiene actividad *in vivo* de aminoshikimato deshidrogenasa. Sin embargo, el papel de *rifI* y del ASHK en la síntesis del aminoHBA permanece incierto, se piensa que su papel sea posiblemente regular el flujo de carbono hacia la ruta de biosíntesis de ansamicinas (Peek & Christendat, 2015).

Alternativamente Guo & Frost (2004), han propuesto un cultivo en dos etapas para la producción de ASHK, en la primera etapa se utiliza a *B. pumilus* como productor de kanosamina que es posteriormente transformado a ASHK por cepas recombinantes derivadas de *E. coli* SP1.1. Una de estas cepas sobreexpresa los genes que codifican para shikimato cinasa (*aroE*), trancetolasa (*tktA*) y aminoDAHP sintasa (*rifH*) y el gen de glucosa cinasa (*glk*) en el plásmido pJG6.181B (usado para fosforilar a la kanosamina). Con esta estrategia se obtuvo un título de 1.1 g/L de ASHK, con un rendimiento global de 5 % y contaminación



con SHK de 3.4 g/L. Esta estrategia valida el concepto de que no todas las enzimas heterólogas de la vía de ASHK son necesarias para la síntesis de este compuesto, pudiendo ser sustituidas por las de la vía del SHK del hospedero (*E. coli*), y que específicamente catalizan las siguientes reacciones: conversión de K6P a iminoE4P por acción de la transcetolasa (*tktA*), conversión de aminoDAHP a aminoDHQ por la enzima DHQ sintasa (*aroB*), conversión de la aminoDHQ a aminoDHS por la enzima DHQ deshidratasa (*aroD*) y conversión de aminoDHS a ASHK por la shikimato deshidrogenasa (*aroE*). La aplicación industrial de este proceso de síntesis de ASHK se ve limitada pues se requieren dos fermentaciones y varias etapas de purificación de la kanosamina.

Una tercera propuesta de Guo & Frost (2007), utiliza la cepa recombinante *E. coli* SP1.1/ pJG11.233 que es capaz de producir ASHK en un cultivo en una sola etapa, esta cepa derivada de SP1.1 sobreexpresa el plásmido pJG11.233 con los genes *yhjL* y *yhjJ*, (*ndtC* y *ntdA*) para síntesis de K6P (Inakota et al., 2003), además de *rifH*, *aroE*, *serA*, *tktA*. La K6P que se transforma en aminoF6F por la enzima glucosa-6-fosfato isomerasa (*pgi*) nativa de *E. coli* y posteriormente es transformada a iminoE4P por la transcetolasa (*tktA*) nativa de *E. coli*; la aminoDAHP (*rifH*) de *A. mediterranei* condensa la iminoE4P con PEP para generar aminoDAHP que es transformado a ASHK aprovechando los genes nativos de *E. coli* de

la ruta del SHK. Con esta estrategia se logró una producción de ASHK de 0.06 g/L, trazas de kanosamina y 3.10 g/L de SHK.

Si bien estas estrategias son prueba de concepto de que el ASHK puede ser producido mediante la aplicación de IVM en *A. mediterranei* y *E. coli*, los bajos títulos y rendimientos y la contaminación con SHK son una limitante para su implementación a escala industrial, lo que representa una oportunidad para el desarrollo de mejores cepas productoras.

## Conclusiones

La kanosamina, el aminoHBA y el aminoSHK son compuestos derivados de la vía del ASHK con potencial industrial. Se han aplicado diferentes estrategias de IVM para el desarrollo de cepas sobreproductoras de estos compuestos, sin embargo, solo se han alcanzado rendimientos y títulos bajos. En el caso de la kanosamina y el aminoHBA, las estrategias se han limitado principalmente a sobreexpresar los clústeres de producción. Los experimentos de producción de ASHK ponen en evidencia que es fundamental aumentar la disponibilidad de PEP e iminoE4P, y por tanto la capacidad de producción de kanosamina o K6P. La limitación de PEP podría ser minimizada aplicando estrategias previamente reportadas para producción de SHK y otros compuestos aromáticos. Por otro lado, la mayor parte del carbono es canalizado a la vía del SHK por lo que se deben buscar estrategias que permitan

reducir la competencia de sustrato (SHK y ASHK) entre ambas vías.

## Agradecimientos

Se agradece el financiamiento de este trabajo al proyecto PAPIIT-UNAM IN209618 y el apoyo de CONACYT por la beca para los estudios de maestría de Rubén Mendoza Flores. Se agradece a los Dres. Juan Carlos Sigala Alanís y José Utrilla Carreri y a la M. en C. Georgina Teresa Hernández Chávez por su apoyo técnico.

## Referencias

- Amer FA, El-behedy EM & Mohtady HA (2008) New targets for antibacterial agents. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 3: 46–57.
- Chandran SS, Yi J, Draths KM, von Daeniken R, Weber W & Frost JW (2003) Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. *Biotechnol. Prog.* 19(3): 808-14
- Baltz RH (2011) Strain improvement in actinomycetes in the postgenomic era. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38: 657–666.
- Bilal M, Wang S, Iqbal HMN, Zhao Y, Hu H, Wang W & Zhang X (2018) Metabolic engineering strategies for enhanced shikimate biosynthesis: current scenario and future developments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102: 7759–7773.
- Kogure T, Kubota T, Suda M, Hiraga K & Inui M (2016) Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for shikimate overproduction by growth-arrested cell reaction. *Metab. Eng.* 38: 204-216.
- Choi KR, Jang WD, Yang D et al. (2019) Systems metabolic engineering strategies: integrating systems and synthetic biology with metabolic engineering. *Trends Biotechnol.* 1744: 1–21.
- Díaz-Quiroz DC, Cardona-Félix CS, José Viveros-Ceballos JL, Reyes-González MA, Bolívar F, Ordoñez M & Escalante A (2018) Synthesis, biological activity and molecular modelling studies of shikimic acid derivatives as inhibitors of the shikimate dehydrogenase enzyme of *Escherichia coli*. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2018. 33: 397-404.
- Diaz Quiroz DC, Carmona SB, Bolivar F & Escalante (2014). Current perspectives on applications of shikimic and aminoshikimic acids in pharmaceutical chemistry. *Res. Rep. Med. Chem.* 35.
- Dolak LA, Castle TM, Dietz A & Laborde AL (1980) 3-amino-3-deoxyglucose produced by a *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.* 33: 900-901.
- Fan Y, Zhao M, Wei L, Hu F, Imanaka T, Bai L & Hua Q (2016) Enhancement of UDPG synthetic pathway improves ansamitocin production in *Actinosynnem pretiosum*. *Appl.*

- Microbiol. Biotechnol.* 100: 2651-2662.
- Floss-Heinz G, Yu TW & Arakawa K (2011) The biosynthesis of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid (AHBA), the precursor of mC7N units in ansamycin and mitomycin antibiotics: A review. *J. Antibiot.* 64: 35-44.
- Guo J & Frost JW (2002a) Biosynthesis of 1-deoxy-1-imino-D-erythrose 4-phosphate: A defining metabolite in the aminoshikimate pathway. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 528-529.
- Guo J & Frost JW (2002b) Kanosamine biosynthesis: A likely source of the aminoshikimate pathway's nitrogen atom. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 10642-10643.
- Guo J & Frost JW (2004) Synthesis of aminoshikimic acid. *Org Lett.* 6: 1585-1588.
- Guo J & Frost JW (2007) Synthesis of oseltamivir carboxylates. US Patent, 0190621 A1.
- Inaoka T, Takahashi K, Yada H, Yoshida M & Ochi K (2004) RNA polymerase mutation activates the production of a dormant antibiotic 3,3'-neotrehalosdiamine via an autoinduction mechanism in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 279: 3885-3892.
- Iwai Y, Tanaka H, Oiwa R, Shimizu S & Omura S (1977) Studies on bacterial cell wall inhibitors. III. 3-amino-3-deoxy-D-glucose, an inhibitor of bacterial cell wall synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 498: 223-228.
- Janiak AM & Milewski S (2001) Mechanism of antifungal action of kanosamine. *Med. Mycol.* 39: 401-408.
- Kang Q, Shenb Y & Bai Q (2002) Biosynthesis of 3,5-AHBA-derived natural products. *Nat. Prod. Rep.* 29: 243-263.
- Karpf M & Trussardi R. 2005. Process for the preparation of 4,5-diamino shikimic acid derivatives. US Patent 7.514,580 B2.
- Kim CG, Kirschning, Bergon P, Ahn Y, Wang JJ, Shibuya CG & Floss HG (1992) Formation of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid, the precursor of mC7N units in ansamycin antibiotics, by a new variant of the shikimate pathway? *J. Am. Chem. Soc.* 114: 4941-4943.
- Lee SY, Kim HU, Chae TU, Cho JS, Kim JW, Shin JH, Kim DI, Ko YS, Jang WD & Jang YS (2019) A comprehensive metabolic map for production of bio-based chemicals. *Nat. Catal.* 2: 18-33
- Martinez,JA, Bolivar F & Escalante A (2015) Shikimic acid production in *Escherichia coli*: from classical metabolic engineering strategies to omics applied to improve its production. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3, 145.
- Milner JL, Silo-Suh J, Lee JC & Handelsman J (1996) Production of kanosamine by

[Escriba aquí]

- Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3061–3065.
- Nisthala S (2018) Microbial synthesis of antibiotic precursor kanosamine and value-added chemical shikimic acid. Microbial synthesis of antibiotic precursor kanosamine. Degree of Chemistry - Master of Science. Michigan State University.
- Pansegrau PD, Anderson KS, Widlanskilhs T, Ream JE, Sammons RD, Sikorski JA & Knowles JR (1991) Synthesis and evaluation of two new inhibitors of EPSP synthase. *Tetrahedron Lett.* 32: 2589-2592.
- Peek J & Christendat D (2015) The shikimate dehydrogenase family: Functional diversity within a conserved structural and mechanistic framework. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* *Arch. Biochem. Biophys.* 566: 85–99.
- Prado V, Lence E, Thompson P, Hawkins AR & Gonzales-Bello (2016) Freezing the dynamic gap for selectivity: Motion-based design of inhibitors of the shikimate kinase enzyme. *Chem. Eur. J.* 22: 17988-18000.
- Rodriguez A, Martínez JA, Flores N, Escalante A, Gosset G & Bolivar F (2014) Engineering *Escherichia coli* to overproduce aromatic amino acids and derived compounds. *Microb. Cell. Fact.* 13. 126.
- Rude MA & Khosla C (2006) Production of ansamycin polyketide precursors in *Escherichia coli*. *J. Antibiot.* 59: 464-470.
- Tsuno T, Ikeda C, Numata K, Tomita K, Konishi M & Kawaguchi H (1986) 3, 3'-Neotrehalosadiamine (BMY-28251), a new aminosugar antibiotic. *J. Antibiot.* 39: 1001-1003.
- Umezawa S, Shibahara S, Omoto S, Takeuchi T & Umezawa H (1968) Studies on biosynthesis of 3-amino-3-deoxy-D-glucose. *J. Antibiot.* 21: 485-491.
- Umezawa S, Umino K, Shibahara S, Hamada M & Omoto S. (1967) Fermentation of 3-amino-3-deoxy-D-glucose. *J. Antibiot.* 20(6): 355-360.
- van Straaten KE, Ko JB, Jagdhane R, Anjum S, Palmer DR & Sanders DA (2013) The structure of NtdA, a sugar aminotransferase involved in the kanosamine biosynthetic pathway in *Bacillus subtilis*, reveals a new subclass of aminotransferases. *J. Biol. Chem.* 288: 34121-30.
- Vetter ND, Langill DM, Anjum S, Boisvert-Martel J, Jagdhane RC, Omene E, Zheng H, van Straaten KE, Asiamah I, Krol ES, Sanders DA, Palmer DR (2013) A previously unrecognized kanosamine biosynthesis pathway in *Bacillus subtilis*. *J. Am. Chem. Soc.* 135: 5970–5973
- Ward, P, Small I, Smith J, Suter P & Dutkowski R (2005) Oseltamivir (Tamiflu®) and its potential for use in the event of an

# Artículos

- influenza pandemic. *J. Antimicrob. Chemother.* 55. Suppl. S1: i5–i21.
- Watanabe K, Rude MA, Walsh CT & Khosla C (2003) Engineered biosynthesis of an ansamycin polyketide precursor in *Escherichia coli*. *PNAS.* 100: 9774-9778.
- Weber T, Charusanti P, Musiol-Kroll EM, Jiang X, Tong Y, Kim HU & Lee SY (2014) Metabolic engineering of antibiotic factories: new tools for antibiotic production in actinomycetes. *Trends Biotechnol.* 33(1): 15-26
- Yu TW, Muller R, Muller M, Zhang X, Draeger G, Kim CG, Leistner E & Floss HG (2001) Mutational analysis and reconstituted expression of the biosynthetic genes involved in the formation of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid, the starter unit of rifamycin biosynthesis in *Amycolatopsis mediterranei* S699. *J. Biol. Chem.* 276: 12546-12555.