

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

“DESARROLLO DE UN SISTEMA DE CELULAS
EN REPOSO DE ESCHERICHIA COLI
PB12.SA22 PARA LA PRODUCCION
DE ÁCIDO SHIKIMICO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

MARCO ANTONIO GARCÍA EUROZA



MÉXICO D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Ingeniería celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología, UNAM y contó con el apoyo de los proyectos CONACYT-Sector Salud 106428 y CONACYT Ciencia Básica 105782

Durante el desarrollo de éste proyecto se contó con una beca de PAPIIT (DGAPA-UNAM) proyecto PAPIIT IN224709.

Índice

| | |
|--|----|
| 1. Resumen..... | 4 |
| 2. Introducción..... | 6 |
| 2.1 Situación actual | 7 |
| 2.2 Fármacos antivirales..... | 9 |
| 2.3 Ácido shikímico y oseltamivir fosfato | 10 |
| 2.4 Ingeniería de vías metabólicas | 11 |
| 3. Generalidades..... | 12 |
| 3.1 Estructura de virus de la influenza | 12 |
| 3.2 Ciclo de replicación..... | 13 |
| 3.3 Riesgo de una pandemia | 15 |
| 3.4 Mecanismo de acción de antivirales actuales..... | 16 |
| 3.5 Vía del ácido shikimico | 17 |
| 3.6 Ingeniería de vías metabólicas aplicado a la producción de AS | 22 |
| 4. Justificación..... | 26 |
| 5. Objetivo | 29 |
| 5.1 Objetivos particulares | 29 |
| 6. Métodos | 29 |
| 6.1 Preparación de un stock de la célula PB12.SA22..... | 29 |
| 6.2 Preparación de inóculo y desarrollo de fermentaciones. | 30 |
| 6.3 Desarrollo de un cultivo de células en reposo a partir de la biomasa cosechada en fase estacionaria en MM, MK y MP. | 31 |
| 6.4 Desarrollo de un cultivo de células en reposo a partir de la biomasa cosechada en fase exponencial en MM y MP. | 32 |
| 6.5 Determinación de crecimiento, consumo de glucosa y concentración de AS. | 33 |
| 6.5.1. Crecimiento..... | 33 |
| 6.5.2 Cuantificación de glucosa | 34 |
| 6.5.3 Cuantificación de AS y DHS..... | 34 |
| 7. Resultados | 34 |
| 7.1 Fermentaciones en MP..... | 34 |
| 7.2 Fermentaciones en MM con la cosecha en la fase estacionaria..... | 38 |

| | |
|----------------------------------|----|
| 7.3 Fermentaciones en el MK..... | 42 |
| 8. Discusión..... | 44 |
| 9. Conclusiones..... | 49 |
| 10. Apéndice..... | 51 |
| 11. Referencias..... | 51 |

Índice de Figuras y Tablas

| | |
|--|----|
| Figura 1 Estructura del virus de la influenza..... | 12 |
| Figura 2 Mecanismo de replicación del virus de la influenza..... | 15 |
| Figura 3. Sitios de acción de los antivirales. | 17 |
| Figura 4. Vía del ácido shikímico en <i>E. coli</i> | 21 |
| Figura 5. Ingeniería de vías metabólicas en cepas de <i>E. coli</i> PTS ⁻ para la sobreproducción de AS en sistemas de fermentación..... | 25 |
| Figuras 6. Crecimiento, consumo de sustrato y producción de AS de cepas productoras de AS en sistemas de fermentación en lote en medio de producción. 28 | |
| Figura 7. Sistema de Fermentación | 31 |
| Figura 8. Fermentación en dos etapas de <i>E. coli</i> PB12.SA22 en MP con la cosecha en la fase estacionaria.. | 36 |
| Figura 9. Fermentación en dos etapas de <i>E. coli</i> PB12.SA22 en MP con la cosecha en la fase exponencial.. | 37 |
| Figura 10. Fermentación en dos etapas de <i>E. coli</i> PB12.SA22 en MM con la cosecha en la fase estacionaria. | 40 |
| Figura 11. Fermentación en dos etapas de <i>E. coli</i> PB12.SA22 en MM con la cosecha en la fase exponencial.. | 41 |

| | |
|--|----|
| Figura 12. Fermentación de <i>E. coli</i> PB12.SA22 en MK..... | 42 |
| Tabla 1. Pandemias de influenza en el último siglo. | 8 |
| Tabla 2. IVM en <i>E. coli</i> para la producción de shikimato. | 26 |
| Tabla 3. Composición de los diferentes medios utilizados. | 32 |
| Tabla 4. Parámetros cinéticos de las cultivos en dos etapas | 43 |

1. Resumen

La influenza estacional es una enfermedad aguda causada por el virus de la influenza. Existen 3 diferentes tipos de virus de la influenza A, B y C, siendo los A y B responsables de las epidemias anuales recurrentes. Los virus del tipo A infectan a varias especies y son divididos en diferentes subtipos de acuerdo a las diferentes combinaciones de proteínas en su membrana mientras que el virus tipo B posee menor diversidad génica con solo una cepa y solo infecta a humanos. Contrario al tipo B, la gran diversidad génica y el alto número de especies hospedadoras del tipo A hace de este, un virus recurrente en las pandemias. Ejemplos de esto son aquellos brotes producidos por el virus AH1N1 en 1918 y 2009, AH2N2 en 1957 y AH3N2 en 1968. Actualmente existe la posibilidad de una nueva pandemia por parte del subtipo H5N1.

El virus AH5N1 es endémico en aves, sin embargo, recientemente se han encontrado casos de infecciones en humanos con una mortalidad cercana al 60%. En caso de que éste llegara mutar para tener una transmisión humano-humano efectiva, sería la causa de una nueva pandemia. Si bien la mejor defensa para la influenza es la vacunación, la producción por los métodos actuales no sería suficiente para abastecer a la población, es por esto que la primera línea de defensa en caso de una pandemia de influenza son los antivirales. Existen 2 tipos de antivirales disponibles para el tratamiento de la influenza, las adamantanos y los inhibidores de la neuraminidasa. Ambos actúan inhibiendo diferentes enzimas durante en el ciclo de replicación del virus. La OMS recomienda el uso de

inhibidores de la neuraminidasa para el tratamiento de una infección adquirida por este virus. Dentro de este tipo de compuestos el fosfato de oseltamivir, conocido comercialmente con el nombre de Tamiflu, ha probado disminuir la severidad de la infección e incrementar la probabilidad de supervivencia. La principal restricción de este compuesto, involucra su limitada capacidad de producción y la venta a un precio considerablemente alto para varios países. Debido al complejo y largo proceso de manufactura, los productores no pueden satisfacer la demanda y se ven obligados a usar sus reservas.

La semisíntesis de tamiflu requiere como molécula base ácido shikímico el cual es extraído a partir del fruto del anís estrella chino *Illicium verum*. El proceso es extremadamente laborioso y toma alrededor de un año para completarse, más aun las cantidades que se llegan a obtener a partir del fruto son extremadamente bajas. Por esto, en orden para producir las cantidades necesarias para combatir una pandemia se debe buscar otra fuente para obtener ácido shikímico u otro proceso de síntesis.

Buscando suplir la demanda de ácido shikimico (AS) se ha considerado su producción a partir de microorganismos recombinantes, principalmente en *E. coli* a partir de procesos fermentativos, recurriendo a la ingeniería de vías metabólicas. Esto consta del conjunto de técnicas de biología molecular y la selección racional de diversos genes blancos para la modificación genética, su objetivo es encontrar genes específicos o la manipulación ambiental para inducir un aumento en la producción y rendimiento de un compuesto de interés.

En este contexto, el grupo del trabajo del Dr. Francisco Bolívar del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM, se ha desarrollado una cepa de *E.coli* sobreproductora de AS denominada PB12SA22. En el presente trabajo se describe la utilización de un sistema de células en reposo con la finalidad de incrementar la producción de este compuesto.

1. Introducción

La influenza es una enfermedad viral, una de las enfermedades infecciosas más comunes causante de estados febriles agudos y cuyos síntomas varían desde una fatiga moderada hasta la falla respiratoria y muerte. Cada año en todo el mundo brotes o epidemias de influenza ocurren durante finales de otoño o principios de invierno. En cada epidemia usualmente solo una cepa del virus es responsable de la enfermedad. La influenza es diferente al resfriado común, es causado por un virus diferente y produce síntomas que son más severos y ataca a células que se encuentran en vías respiratorias bajas (WHO, 2009).

El virus de la influenza humana es un retrovirus que pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, consiste en los géneros: influenza A, B y C, y *Thogovirus*. En humanos, solo aquellos de los tipos A y B son de interés epidemiológico. El tipo B posee una menor diversidad génica que el tipo A y es menos común en las infecciones. Los principales antígenos determinantes de la influenza A son la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA), glicoproteínas transmembranales.

Basado en la antigenicidad de estas glicoproteínas, el virus de la influenza A se subdivide en dieciséis H (H1-H16) y nueve N (N1-N9) subtipos. Cerca del 95% de las infecciones son causadas por el virus tipo A (Kamps y otros, 2006).

El virus de la influenza se transmite principalmente en aerosoles, que al respirarse infecta a células de la mucosa y las vías respiratorias, éstas penetra en la membrana plasmática entrando en las células de faringe, laringe o pulmones. Se ha observado que aquellos de influenza aviar y humanos H5N1, H3N2 y H1N1 infectan preferentemente a células que se encuentran en vías respiratorias bajas.

Los síntomas de la enfermedad son repentinos y empiezan uno o dos días después de la infección. Al igual que el resfriado común la fiebre, malestar general, y congestión nasal son los síntomas de la infección, con la diferencia de que la fiebre llega a una temperatura más elevada además de que el malestar general y fatiga son más severos (Zambon, 1999).

2.1 Situación actual

Cada año a pesar de los esfuerzos por incrementar la tasa de vacunación en la población más vulnerable, factores impredecibles determinan el costo de una epidemia. Nuevas epidemias de influenza se generan cada 1 a 2 años por algún cambio en las proteínas de su superficie.

En contraste a las epidemias las pandemias son eventos raros que ocurren cada 10 a 50 años. En los últimos 100 años han ocurrido 4 pandemias de influenza. La

pandemia de 1918 fue causada por un virus H1N1 aparentemente de origen aviar, las cepas subsecuentes causantes de una pandemia H2N2 en 1957, H3N2 en 1968 y H1N1 en 2009, fueron virus recombinantes que contienen genes de aves y en el último de cerdo (**Tabla 1**). Las pandemias de influenza recorren el mundo y no hay forma de prevenir su propagación.

Tabla 1. Pandemias de influenza en el último siglo.

| Año | Cepa (región de los primeros brotes detectados) | Resultado de la Pandemia | Muertes |
|-------------|--|---------------------------------|-----------------------|
| 1918 | H1N1 (España) | Devastadora | 20-50 millones |
| 1957 | H2N2 (China) | Moderada | 1-4 millones |
| 1968 | H3N2 (China) | Moderada | 1-4 millones |
| 2009 | H1N1(México) | Leve | 13 000 |

(Modificado de Influenza Report. Flying Publisher 2006).

Expertos en salud han estado monitoreando a la cepa altamente patógena H5N1. La cepa H5N1 fue encontrada en Hong Kong en 1997, causando 18 casos y 6 muertes. Desde mediados del año 2003 este virus ha causado los brotes más severos en aves de corral hasta el momento. A finales de ese mismo año, se llegaron a identificar infecciones en personas que estuvieron expuestas a aves enfermas. Desde entonces más de 440 casos han sido reportados, donde cerca del 60% de los infectados han muerto. En la mayoría de los casos las personas eran niños sanos y adultos jóvenes. Afortunadamente el salto de aves a humanos, humanos a humanos, y su sustentabilidad en estos no son efectivos. El temor de esta cepa se debe a que en caso de aumentar su transmisibilidad, podría ocurrir

un evento similar o más severo al de 1918(Kamps y otros, 2006).

.

El monitoreo constante de una cepa ayuda a la prevención de forma que la producción de vacunas se realice antes de que este empiece a circular alrededor del mundo, sin embargo la más reciente pandemia ha demostrado que la cepa que infecta puede no ser aquella para la que se esté preparando

En retrospectiva, la pandemia de influenza humana causada por el virus A/H1N1 de 2009 fue mucho más sutil que el pánico inicial generado por los medios, sin embargo, este evento no debe ser considerado trivial. Si bien la mejor defensa ante la aparición de un nuevo virus es la vacunación, la producción de una vacuna tardaría al menos 6 meses después del aislamiento de la cepa circulante. Dada la capacidad de producción actual, la oferta durante esos meses estaría limitada a un poco más de mil millones de dosis monovalentes. Ya que se requiere de 2 dosis para la inmunidad, solo se vacunarían alrededor de 500 millones de personas, 9% de la población mundial. Aun cuando la vacunación es la mejor estrategia para el tratamiento de la infección, su producción por los métodos actuales no se llevaría a cabo con la velocidad necesaria para contender contra una nueva pandemia, es por esto que los fármacos antivirales forman parte importante de la primera defensa(Osterholm, 2005).

2.2 Fármacos antivirales

Para su tratamiento los antivirales incluyen los inhibidores del canal proteico M2 (amantadina y rimantadina) y los inhibidores de neuraminidasa (NA) (oseltanivir y

zanamivir). De estos 2 tipos de antivirales se ha encontrado que los inhibidores de M2 son propensos a generar cepas resistentes al antiviral en al menos 30% de los individuos. En base a estos hallazgos la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda el uso de inhibidores de la neuraminidasa como primera opción para el tratamiento, cuando no exista vacuna disponible (Kamps y otros, 2006).

2.3 Ácido shikímico y oseltamivir fosfato

Tamiflu® es el nombre comercial del fármaco antiviral oseltamivir fosfato (OSF), comercializado por Hoffman La Roche en forma de capsulas o suspensión oral. (Roche, 2008) El proceso de síntesis de esta molécula es extremadamente laborioso tomando 11 reacciones para llevarse a cabo en un tiempo de 6 a 8 meses. No solo el proceso es tardado, durante las reacciones se llegan a manejar azidas que son compuestos explosivos demandando de la síntesis extremo cuidado (Abrecht y otros, 2007).

Aún con las dificultades que presenta la síntesis de OSF; la producción solo se ve limitada por el compuesto del cual parte, el ácido shikimico (AS). Éste es un metabolito común en plantas y bacterias precursor de diferentes compuestos aromáticos. El AS se obtiene en su mayoría a partir del fruto de la planta proveniente de China *Illicium verum*, comúnmente conocido como anís estrella. Considerando que la planta tarda alrededor de 6 años en dar frutos, solo se obtiene alrededor del 10% del peso del fruto como AS, y que la síntesis de OSF tiene un rendimiento cercano al 22% (Abrecht y otros, 2007) se ha buscado obtenerlo a través de otras fuentes. Como alternativa para sustituir la fuente de

AS diversos grupos de investigación han enfocado sus esfuerzos para obtener éste compuesto a partir de microorganismos recombinantes tales como *Escherichia coli* mediante ingeniería de vías metabólicas.

2.4 Ingeniería de vías metabólicas

La ingeniería de vías metabólicas (IVM). Se define como el mejoramiento de las propiedades celulares y de la capacidad de formación de un compuesto de interés. Para el caso de la producción del AS la IVM ha permitido aumentar la producción de este compuesto en diferentes microorganismos, de estos *E. coli* ha sido el ejemplo más exitoso. Es así que se ha logrado una producción de 84g/L en fermentadores de 10L con un rendimiento de 0.33 molSA/molGlc utilizando sistemas de fermentación lote-alimentado, la máxima producción reportada para este sistema de células recombinantes (Chandran y otros, 2003).

En el Instituto de Biotecnología, UNAM, en el grupo del trabajo del Dr. Francisco - Bolívar del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, se ha desarrollado la cepa *E. coli* sobreproductora de AS: PB12.SA22 (PTS⁻glc⁺ Δ aroL Δ aroK:cm aroG^{fbr} tktA aroB aroE) (Escalante y otros, 2010), con el rendimiento más alto reportado hasta el momento en cultivos de 500mL en sistemas de fermentación en lote. Con la finalidad de incrementar la producción de AS en esta cepa, además de la manipulación genética se ha considerado la modificación de las condiciones de fermentación. Es así que el objetivo de esta tesis es probar a la cepa PB12.SA22 en un sistema de células en reposo como alternativa para mejorar la producción de AS.

2. Generalidades

3.1 Estructura de virus de la influenza

Los virus de la influenza es unvirus de ácido ribonucleico (ARN) de apariencia variada con un diámetro promedio de 120nm. Proyecciones de HA y NA cubren la superficie de la partícula. **(Figura 1).**

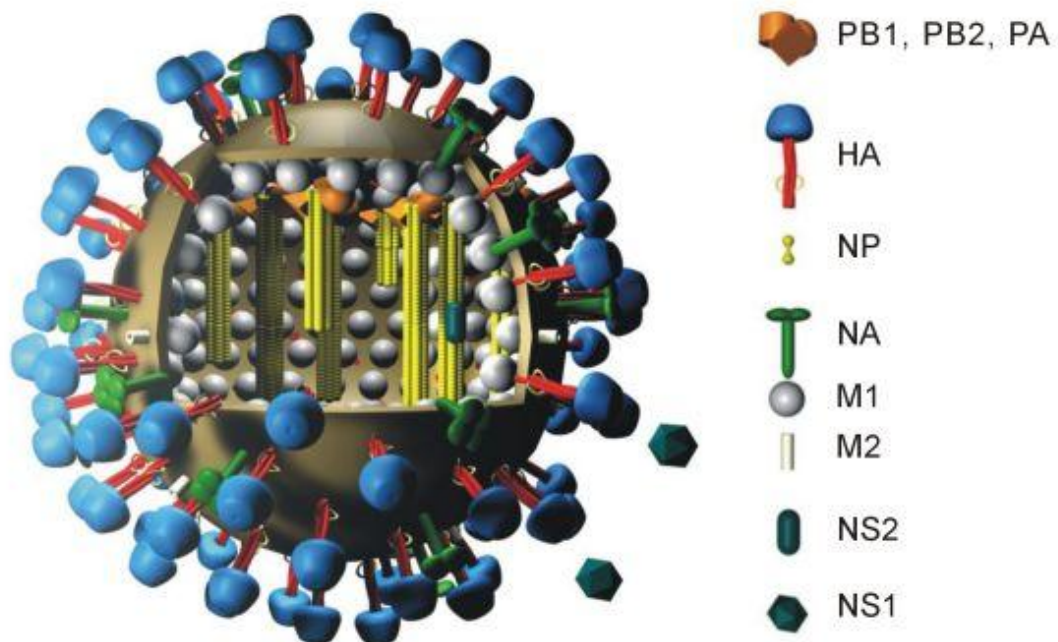


Figura 1 Estructura del virus de la influenza. (Tomado de Influenza Report. Flying Publisher 2006-2009)

El genoma del virus A y B consiste en 8 fragmentos separados de ARN cubiertos por la nucleocápside. Juntos forman la proteína ribonucleica (PRN), y cada segmento codifica para una proteína funcional:

- a) Proteína de la polimerasa B2 (PB2)
- b) Proteína de la polimerasa B1 (PB1)
- c) Proteína de la polimerasa A (PA)
- d) Hemaglutinina (HA)
- e) Proteína de la nucleocápside (NP)
- f) Neuraminidasa (NA)
- g) Proteína M (M): La proteína M1 construye la matriz. Solo en el virus tipo A, M2 actúa como un canal iónico para mantener el pH del endosoma.
- h) Proteínas NS1 y NS2: Aún se desconoce su función.

La polimerasa de ARN es responsable de la replicación y transcripción del virus. El complejo proteico se forma partir de PB2, PB1 y PA. Tiene una actividad deendonucleasa y está unida a PRN. Se cree que las proteínas NS1 y NS2 tienen una función reguladora de promover la síntesis de compuestos virales dentro de la célula infectada. Se propone que NS1 actúa formando un dímero con el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) humano, inhibiendo su exportación del núcleo a los ribosomas. La función hipotética de NS2 consiste en transportar PRN del núcleo al citoplasma para acelerar la producción del virus. La envoltura del virus es una bicapa lipídica que se origina de la célula productora, con HA, NA y M2 en la superficie, la bicapa cubre la matriz formada por M1(Kamps y otros, 2006).

3.2 Ciclo de replicación

El virus de la influenza se une a la superficie celular fijando HA al ácido siálico de las glicoproteínas y glicolípidos de la superficie celular. Se propone que de

acuerdo al enlace entre la galactosa y el ácido siálico en la membrana plasmática, ya sea $\alpha 2, 3$ o $\alpha 2, 6$ el virus infecta a diferentes células en el tracto respiratorio. Después de la adherencia del virus, éste entra en la célula mediante un proceso de endocitosis. Una vez internalizado, moléculas de clatrina forman el endosoma que abriga al virus. Posteriormente el contenido del endosoma es digerido por la disminución del pH. Cuando cierto nivel es alcanzado la disminución del pH se detiene por acción de la proteína M2, esto induce la liberación parcial del complejo PRN. El flujo de protones del endosoma a la partícula viral lleva a la desconexión de sus proteínas. Su agregación se ve interrumpida y el complejo PRN no se adhiere más a la proteína M1. La liberación del endosoma se completa de 20 a 30 min después de su sujeción a la célula.

PRN es transportado al núcleo donde el complejo de polimerasa se une al ARN, lo rompe por su actividad de endonucleasa y se lleva a cabo su elongación. El ARN viral es transportado a los ribosomas. Algunas de las nuevas proteínas virales sintetizadas son transportadas al núcleo donde se unen al ARN viral para formar el complejo PRN. Otras de las proteínas sintetizadas son llevadas al aparato de Golgi donde son glicosiladas. Estas proteínas modificadas se llevan a la superficie de la membrana. Cuando se llega una concentración suficiente en la membrana plasmática, PRN y M1 se agregan para formar la partícula viral. Finalmente la partícula es excretada de la célula y liberada por la actividad de NA. El tiempo de entrada a la producción de un nuevo virus toma aproximadamente 6 horas (**Fig. 2**).

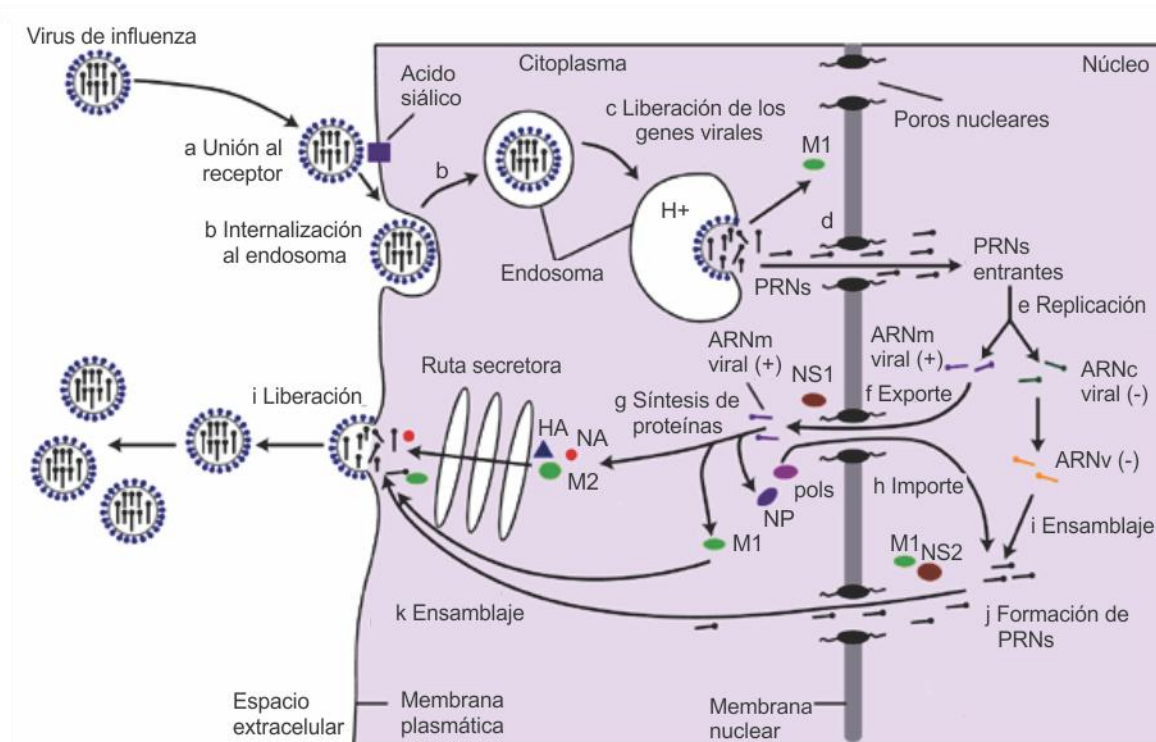


Figura 2 Mecanismo de replicación del virus de la influenza. (Modificado de Experts view in molecular medicine 2001 Cambridge University Press).

3.3 Riesgo de una pandemia

Los virus de ARN generalmente tienen una tasa de mutación muy alta, ya que la ARN polimerasa carece de la habilidad de corregir los errores generados durante la duplicación del material genético. Cuando ocurre un cambio significativo en alguna de las proteínas de superficie en el virus ya sea HA o NA, nadie tiene inmunidad ante este nuevo virus. Si además el virus logra una transmisión de humano-humano relativamente eficiente es cuando ocurre una pandemia. Estos nuevos virus se generan por dos vías diferentes:

- a) Por mutación en algún virus animal que ahora tiene la capacidad de infectar

al humano.

- b) Por algún evento de recombinación de virus de diferentes especies en algún hospedero que llegue a transmitirlo al humano(Cortés y otros, 2011)

3.4 Mecanismo de acción de antivirales actuales

De los antivirales existentes los más viejos, los adamantanos (amantadina y rimantadina) actúan bloqueando el canal proteico formado por la proteína viral M2. Debido a la ausencia de esta proteína en los virus pertenecientes al tipo B, los adamantanos no tienen un efecto antiviral en estos. La rápida diseminación de resistencia en años recientes ha disminuido la utilidad de este tipo de fármacos. Los inhibidores de NA actúan bloqueando la proteína que libera al virus de la célula, limitándolo a un solo ciclo de replicación y evitando la propagación de partículas virales a células no infectadas. De estos compuestos el oseltamivir es comercializado en forma de tableta y zanamivir como inhalable(Urban, 2009)(**Fig. 3**).

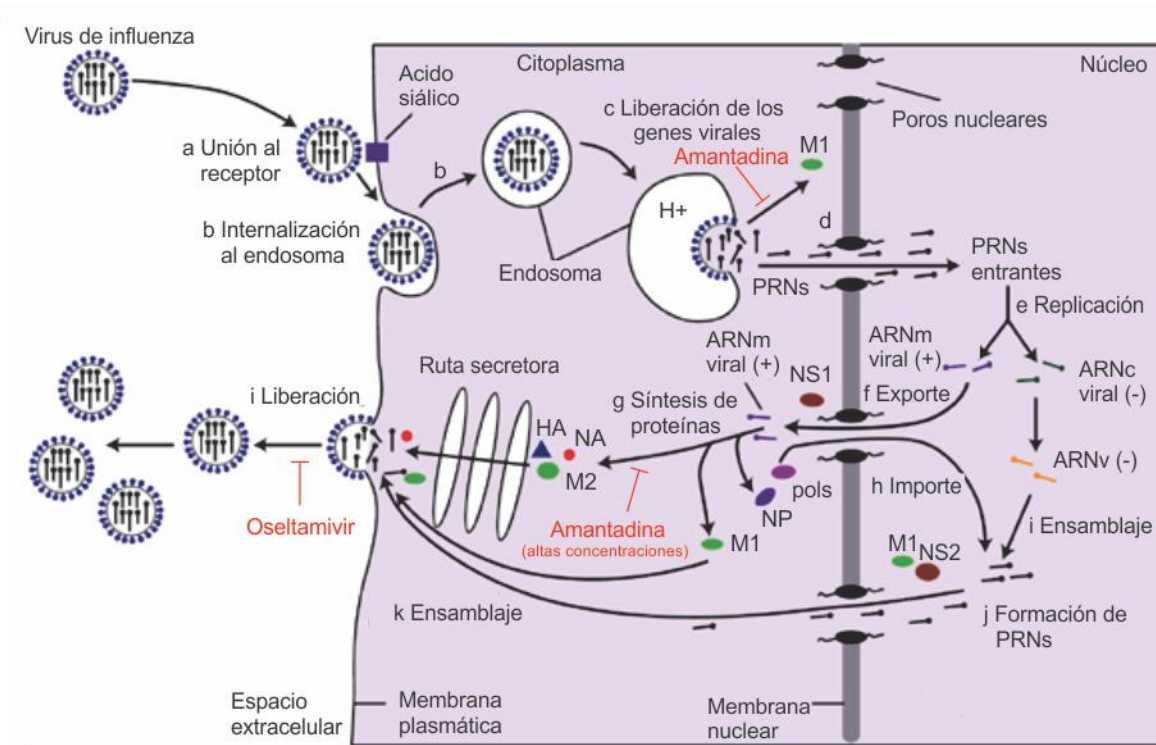


Figura 3. Sitios de acción de los antivirales. (Modificado de Experts view in molecular medicine 2001 Cambridge University Press).

La producción actual de OSF se lleva a cabo a partir de AS. Este compuesto es un intermediario de la vía del ácido shikímico (VAS), la ruta metabólica por la cual se sintetizan aminoácidos aromáticos a partir del metabolismo de carbohidratos (Herrman & Weaver, 1999).

3.5 Vía del ácido shikímico

Los aminoácidos aromáticos, fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr), y triptófano (Trp), son formados en la VASa partir de los precursores eritrosa-4-fosfato (E4P) y fosfoenolpiruvato (PEP). La secuencia metabólica convierte a éstos precursores en corismato, producto de la vía y precursor común a los tres aminoácidos

aromáticos. Ésta vía es común en bacterias, hongos y plantas, nunca en animales. En bacterias esta vía consiste en siete reacciones: La primera enzima de la vía controla el flujo de carbono condensando E4P y PEP en 3-deoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato (DAHP), la enzima lleva el nombre de DAHP sintasa. *E.coli* sintetiza tres enzimas diferentes de los genes *aroF*, *aroG* y *aroH*, dispersos en el cromosoma. Las enzimas en *E.coli* son metaloenzimas, el cofactor metálico suele ser un catión divalente (Fe^{2+} o Zn^{2+}), pero puede cambiar dependiendo de las condiciones en las que crece la bacteria. Cada isoenzima es susceptible a la inhibición por producto de uno de los aminoácidos aromáticos (*AroF* sensible a Tyr, *AroG* sensible a Phe, *AroH* sensible a Trp), esta inhibición es específica para cada isoenzima por cada aminoácido aromático. *AroF* y *AroG* son completamente inhibidas a 0.1mM de su aminoácido correspondiente. En contraste *AroH* es solo parcialmente inhibida por Trp. Esta deficiencia asegura suplir suficiente corismato para la biosíntesis de compuestos aromáticos cuando Tyr, Phe y Trp se encuentran en exceso en el medio. A nivel transcripcional son reguladas por los represores TyrR y TrpR, el primero regula la transcripción de *aroF* y *aroG* mientras que el último solo a *aroH*. El control transcripcional para la expresión de los 3 genes es complejo, sin embargo la regulación por la inhibición de producto es el mayor mecanismo regulatorio *in vivo*(Klaus, 1995).

La segunda reacción involucra la eliminación del fosfato de DAHP para generar 3-dehidroquinato (DHQ). La reacción la cataliza DHQ sintasa. La enzima es codificada por el gen *aroB* en *E. coli* y requiere de cationes divalentes para su actividad siendo los más usados Co^{2+} y Zn^{2+} , también necesita cantidades

catalíticas de NAD^+ . La siguiente reacción la lleva a cabo la enzima DHQ deshidratasa, codificada por el gen *aroD*. La reacción involucra la deshidratación de DHQ al ácido 3-dehidroshikímico (DHS). La reacción es reversible y la reacción contraria está involucrada con el equilibrio hidroaromático. Este fenómeno se lleva a cabo cuando a bajas concentraciones de glucosa, el AS es metabolizado por la célula a acetil-CoA y succinil-CoA por la vía del β -cetoadipato. Posteriormente el DHS es reducido para formar AS.

La reacción es catalizada por la enzima shikímato deshidrogenasa y utiliza NADPH como cofactor. Al igual que la enzima anterior esta reacción es reversible y el paso contrario está involucrado en el catabolismo del AS. El gen que codifica a esta enzima es el gen *aroE*.

La quinta reacción añade un grupo fosfato al AS obteniendo shikímato-3-fosfato (S3P) y es catalizada por la shikímato cinasa. Esta enzima requiere de ATP como sustrato y existen 2 isoformas para *E. coli*. Cada isoforma es codificada por un gen diferente, *aroK* codifica la isoenzima I y *aroL* la isoenzima II. La isoenzima tipo I tiene un K_m al menos 100 veces mayor que la tipo II.

El penúltimo paso de la vía consiste en la condensación de PEP y S3P para la obtención de 3-fosfo-5-enolpiruvilshikímato (EPSP), esto se realiza por la EPSP sintasa, codificada *E. coli* por el gen *aroA*.

La última reacción, catalizada por la corismato sintasa, añade el segundo doble

enlace al anillo mediante la eliminación del fosfato del 3-fosfo-5-enolpiruvilshikimato, dando corismato como producto final. La enzima en *E. coli* es codificada por el gen *aroC* y utiliza FADH_2 como cofactor para su actividad. (Herrman & Weaver, 1999)(**Fig. 4**).

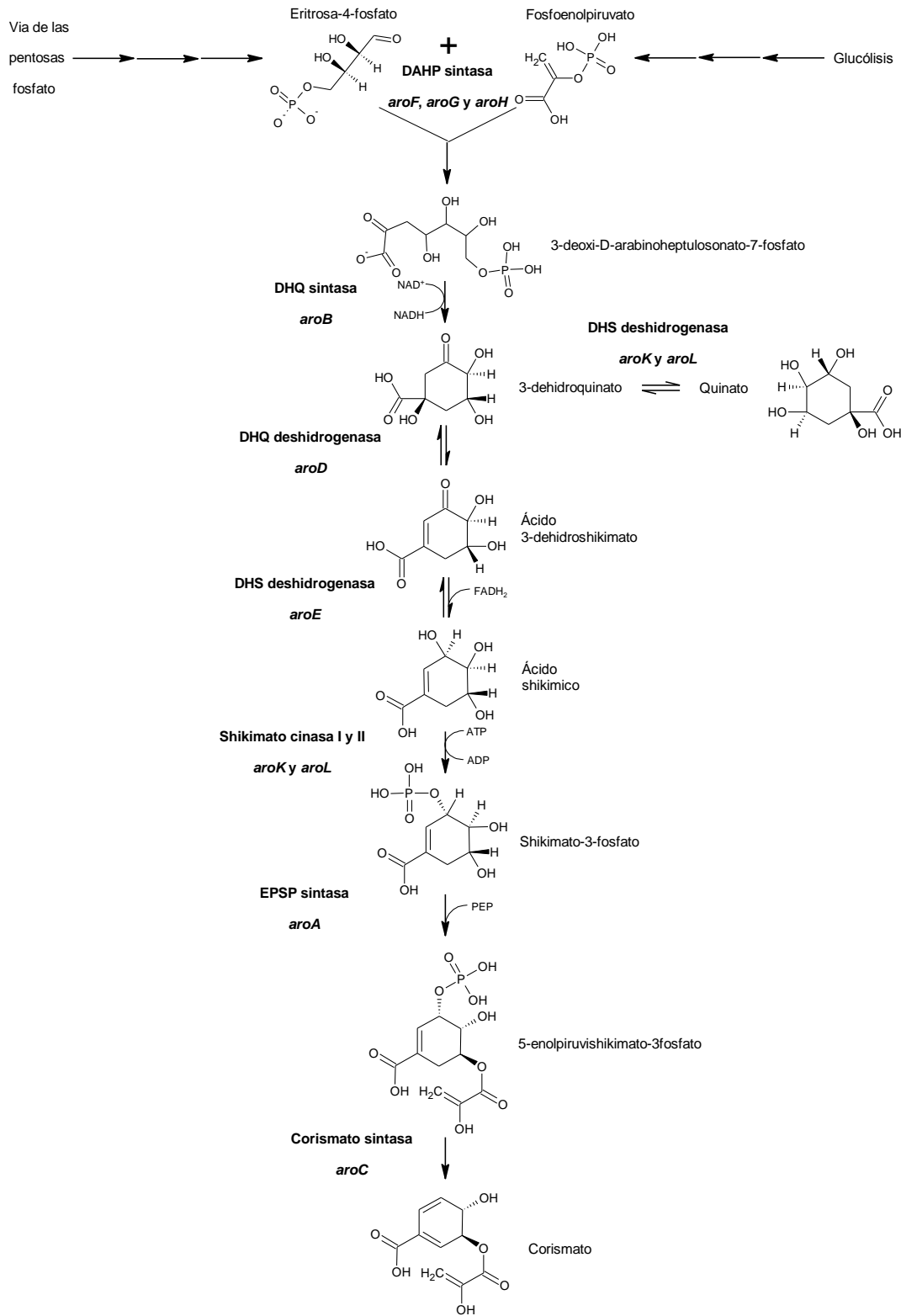


Figura 4. Vía del ácido shikímico en *E. coli*.

3.6 Ingeniería de vías metabólicas aplicado a la producción de AS

Como ya se mencionó la IVM se refiere a la aplicación de técnicas de biología molecular en un microorganismo a fin de obtener alguna mejora en sus propiedades. En general esto comprende:

- a) Incrementar el flujo de carbono por el cual se sintetiza el producto de interés.
- b) Identificar y bloquear en la vía aquellos pasos que representen una pérdida de carbono.
- c) Identificar y mejorar en la vía las reacciones limitantes.
- d) Eliminar los mecanismos de control transcripcional y alostérico en la vía.
- e) Modular la expresión de los genes involucrados en la vía de interés.(Cortés y otros, 2011).

Para el caso de cepas de *E.coli* deficientes en la producción de AS, se han realizado modificaciones en la VAS y a nivel del metabolismo central de carbono (MCC).

El MCC se refiere a las principales rutas metabólicas por las que se oxidan compuestos de carbono que sean capaces de suministrar energía. En *E.coli* comprende el transporte y oxidación de la glucosa, vía de las pentosas fosfato, el ciclo de Krebs.En *E.coli* el transporte de glucosa del medio al citosol, inicia con canales proteicos especializados llamados porinas, que permiten el paso del medio al periplasma. La difusión de glucosa a través de las porinas es un proceso pasivo. En condiciones de laboratorio las porinas OmpC y OmpF son las

más abundantes, lo que las hace los principales canales de entrada. Una vez en el periplasma el transporte al citosol se lleva a cabo por el sistema de fosfotransferasas (PTS), un sistema translocador de varios carbohidratos que consiste en las proteínas HPr, EI, y el complejo IIA, IIB y IIC codificadas por los genes *ptsH*, *ptsI*, *crrY* y *ptsG*. La glucosa entra del medio extracelular a la célula a través de canales denominados como porinas tales como LamB, OmpC y OmpF presentes en la membrana externa. Una vez en el periplasma éste azúcar es ingresado por el sistema PTS. El PEP proveniente del catabolismo de una molécula de glucosa dona el grupo fosfato al componente citoplasmático de PTS E1, a su vez esta proteína lo dona a Hpr, la cual lo transfiere a las proteínas IIA, IIB y IIC, una serie de proteínas integrales en la membrana interna para que la glucosa sea llevada al citosol como glucosa-6-fosfato. El consumo de una molécula de PEP representa una desventaja, desde el punto de vista de IVM, ya que como se mencionó, de dos moléculas de PEP generadas mediante el catabolismo de la glucosa, una es invertida para transportar y fosforilarla glucosa dejando solo uno disponible para alimentar el TCA y la VAS. Con el fin de aumentar su disponibilidad para incrementar su flujo a la VAS, el sistema PTS ha sido inactivado y remplazado por uno que dependa de otro compuesto como grupo donador de fosfato. Las cepas PTS⁻ poseen una capacidad muy limitada de transportar glucosa por otros sistemas. Como alternativa se han insertado sistemas de transporte heterólogos o sobreexpresado otros sistemas de transporte nativos mediante procesos de evolución adaptativa. Ejemplo del primero es la inserción de los genes *o* *glf* y *glk* ambos de *Zymomonas mobilis* y que codifican respectivamente para el facilitador de glucosa Glf y la glucocinasa (Gosset, 2005).

Para el segundo se han realizado experimentos en donde las cepas con un fondo genético PTS⁻ han sido crecidas en medio ricos en glucosa, de estos se seleccionaron las mutantes que sobreexpresaban el simportador de galactosa:H⁺ GalP, el cual también muestra afinidad por la glucosa. La expresión de *galP* bajo control del promotor fuerte *trc* demostró también ser de gran utilidad para incrementar el transporte de glucosa, mejorando la velocidad de crecimiento específica. Se ha determinado que solo el incremento en la disponibilidad de PEP no es suficiente para incrementar el flujo de carbono hacia la vía del AS y que se requiere de forma concomitante, una mayor disponibilidad del E4P para asegurar una máxima actividad de la DAHP sintasa. Para este fin se ha incrementado la disponibilidad de este compuesto como resultado de la sobreexpresión del gen *tktA* que codifica para la enzima transcetolasa I.(Cortés y otros, 2011).

Las modificaciones en la VAS se centran en la acumulación del compuesto y la modificación de los pasos limitantes en la vía. Se ha interrumpido la vía después de la formación del AS, mediante la transducción de genes de resistencia a antibióticos por *aroK* y *aroL*. Para eliminar los pasos limitantes de la vía se han introducido en plásmidos DAHP sintasas resistentes a la inhibición por producto, y sobreexpresado también los genes *aroB* y *aroE*(Krämer y otros, 2003)(**Tabla 2**).
(Figura 5).

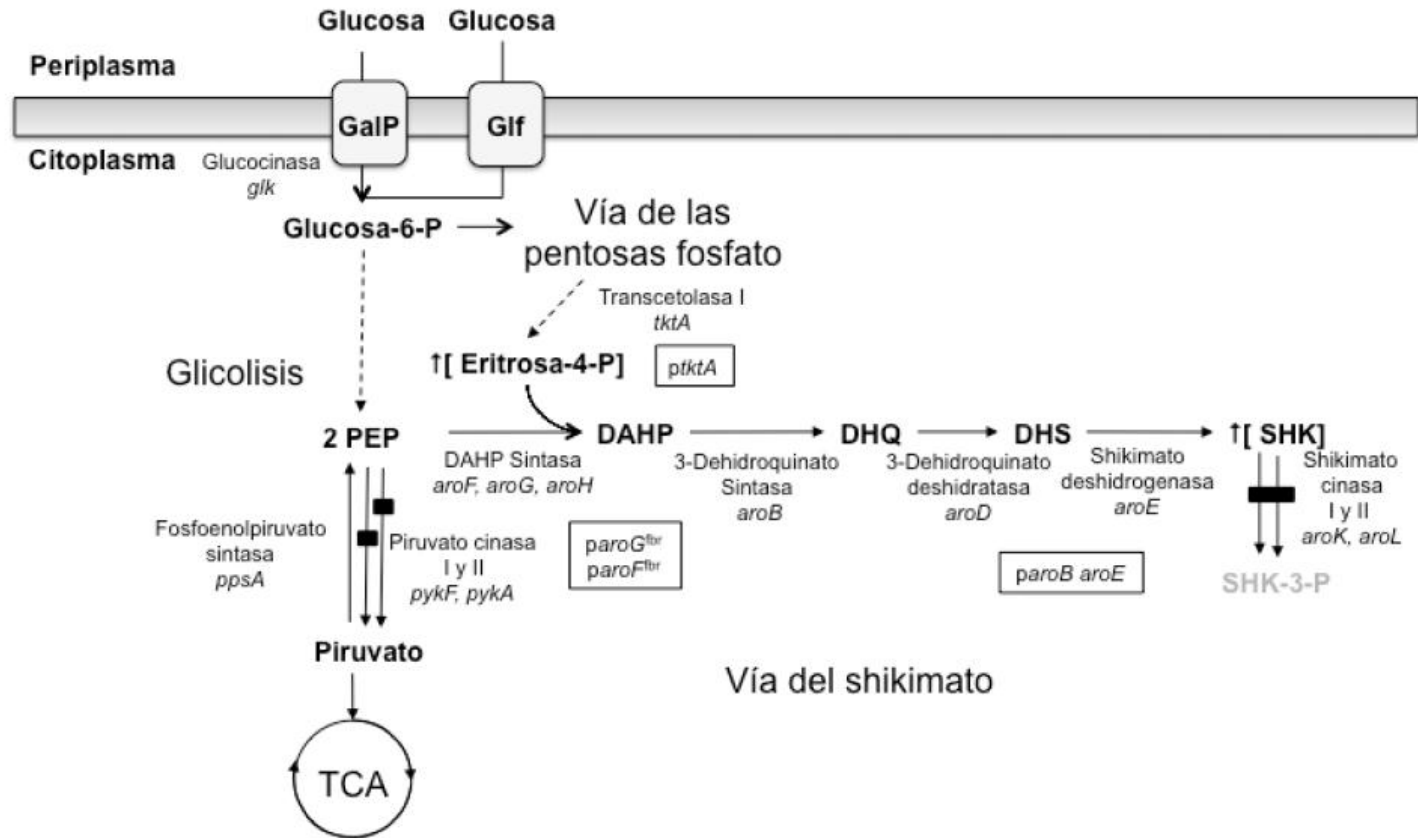


Figura 5. Ingeniería de vías metabólicas en cepas de *E. coli* PTS⁻ para la sobreproducción de AS en sistemas de fermentación. Tomado de Cortés y otros, 2011.

Tabla 2. IVM en *E. coli* para la producción de shikimato.

| Cepa productora | Fondo Genético | Producción (gSA/L) | Rendimiento (molSA/mol glc) | Referencia |
|-------------------|---|-----------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| SP1.1/pKD12.138 | <i>serA::aroB</i> Δ <i>aroL</i> <i>\Delta</i> <i>aroKpSU18*aroF^{ibr}</i> <i>PtacaroEserAtktA</i> | 52.00 ^{a, e} | 0.180 | Knopy otros, 2001 |
| SP1.1pts/pSC6.09B | <i>serA::aroB</i> Δ <i>aroL</i> <i>\Delta</i> <i>aroK PTS⁻</i> <i>PtacgIfglkaroF^{ibr}Ptac</i> <i>aroEserAtktA</i> | 71.00 ^{b, e} | 0.270 | Chandran y otros, 2003 |
| W3110.shik1 | <i>\Delta</i> <i>aroLaroG^{ibr}trpE^{ibr}p</i> <i>SGs26*aroF^{ibr}</i> | 6.85 ^{c, f} | 0.059 | Johansson y otros, 2005 |
| PB12SA22 | <i>PTS⁻\Delta</i> <i>aroL</i> <i>\Delta</i> <i>aroK</i> <i>pJLB*aroG^{ibr}tkApTO</i> <i>PO*aroBaroE</i> | 7.05 ^{d, e} | 0.290 | Escalante y otros, 2010 |

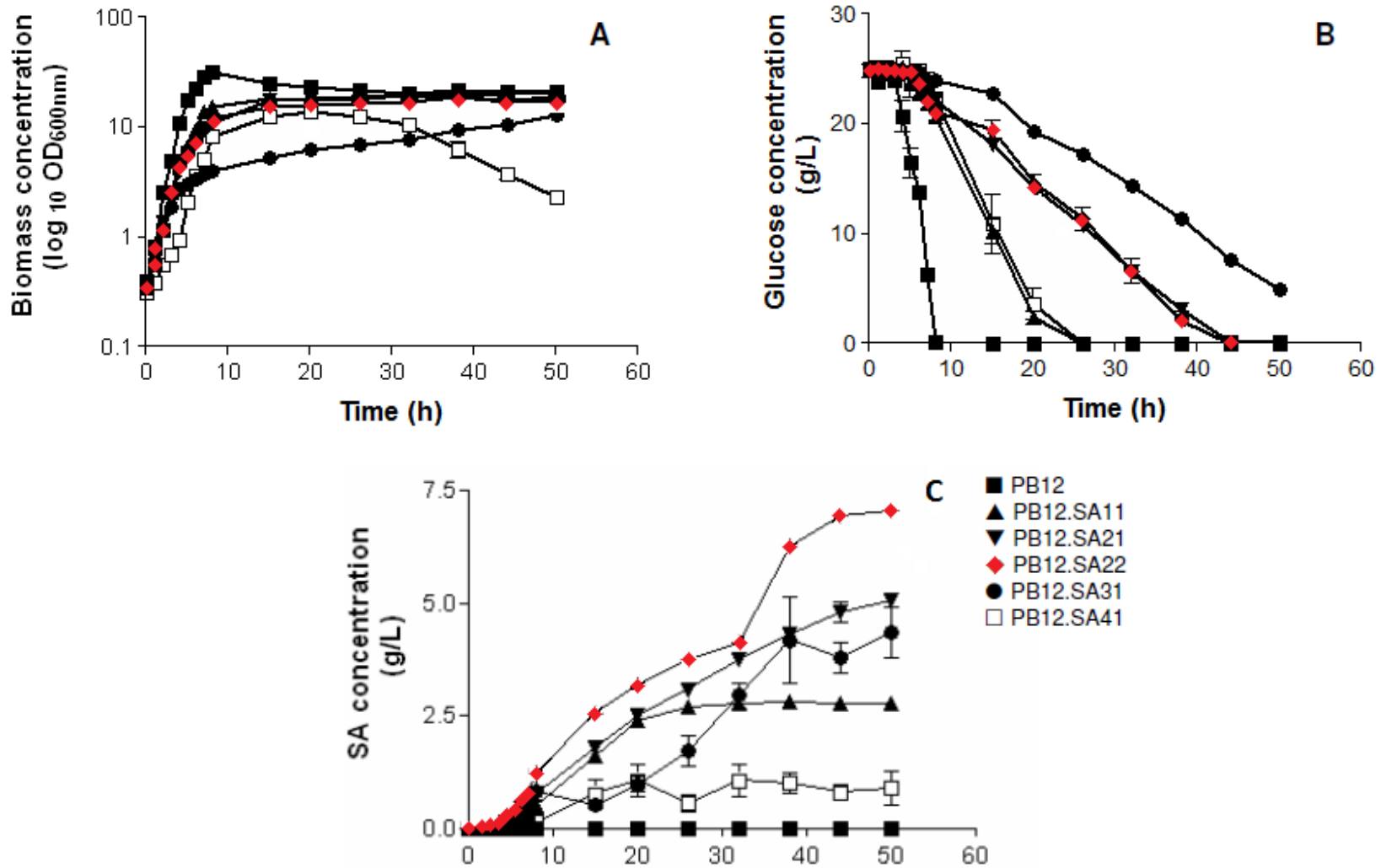
^{a, b} Cultivo en lote alimentado con 1L de volumen de trabajo. ^cCultivos en quimiostato en reactores de 3.5L de capacidad. ^dCultivo en lote con 0.5L de volumen de trabajo. ^eMedio mineral con 25g/L de glucosa y 15 g/L de extracto de levadura. ^fMedio mineral con limitación en fosfatos, 20g/L de glucosa inicialmente con una tasa de alimentación de 5g/L de glucosa al agotarse el fosfato.* Plásmidos con promotores inducibles por IPTG. (Tomado de Cortés y otros, 2011).

4. Justificación

En el grupo de investigación del Dr. Francisco Bolívar en el Instituto de Biotecnología, UNAM, se desarrolla un proyecto para generar un proceso de producción de OSF a partir del AS producido por la cepas de *E. coli* sobreproductoras. Como parte de éste proyecto se han abordado dos líneas principales: (1) El desarrollo de cepas de *E. coli* sobreproductoras de AS derivadas de la cepa PB12 (PTS⁻)(Flores y otros, 2007), que ha permitido la obtención de la

cepa sobreproductora PB12.SA22 que es capaz de producir 7 g/L de AS con un rendimiento de 0.29 mol AS/ mol glc (Escalante y otros, 2010), (2) Ésta cepa ha sido utilizada para la producción de AS en sistemas de fermentación en lote y lote alimentado permitiendo incrementar la producción hasta 13.5 g/L y 28.7 g/L, respectivamente, utilizando un medio mineral suplementado con extracto de levadura.

El proceso de fermentación en lote para la obtención de AS con la cepa PB12.SA22 involucra el cultivo de la cepa PB12.SA22 durante 50 horas observándose un crecimiento característico de dos etapas; una fase de crecimiento exponencial con una duración de 8-10 horas alcanzando una D.O. $_{600nm}$ que se caracteriza por tener una baja producción de AS y de otros intermediarios aromáticos y una fase estacionaria que se prolonga hasta las 50 horas, en la que se acumula AS. Asociado a la producción de AS en esta etapa estacionaria, ocurre el consumo exponencial de glucosa la cual se agota a las 48 horas (Escalante y otros, 2010) (**Figura 6**). Este comportamiento muestra que la mayor producción de AS se presenta cuando la cepa ha dejado de crecer. Con base en estos resultados, el presente trabajo plantea el uso de la biomasa generada durante el crecimiento exponencial de un cultivo en lote de la cepa PB12.SA22, para inocular y mantener un sistema de producción de AS en una condición de células en reposo, en el que se pretende que las células utilicen glucosa para la producción de AS. Se prueban diferentes medios con el fin de aumentar la producción y el rendimiento de AS.



Figuras6. Crecimiento, consumo de sustrato y producción de AS de cepasproductoras de AS en sistemas de fermentación en lote en medio de producción. (◆) Cepa PB12.SA22. A, Crecimiento, B. Consumo de glucosa y C, producción AS. (Tomado de Escalante y otros, 2010).

5. Objetivo

Evaluar a la cepa PB12SA22 en un sistema de células en reposo como una estrategia para la producción de AS.

5.1 Objetivos particulares

- a) Desarrollo de una fermentación en lote y separación (cosecha) de la biomasa desarrollada a las 8h y 40h.
- b) Desarrollo de un cultivo de células en reposo utilizando la biomasa obtenida del cultivo desarrollado en el punto anterior.
- c) Determinación de crecimiento, consumo de glucosa, formación de AS y DHS en cada condición de cultivo.

6. Métodos

6.1 Preparación de un stock de la célula PB12.SA22.

La cepa PB12SA22 (PTS- $\Delta aroK\Delta aroLaroG^{fbr} tktAaroBaroE$) posee las resistencias a kanamicina (km), tetraciclina (tet) y cloranfenicol (cm) (Flores y otros 1996; 2007; Escalante y otros, 2010), fué cultivada en medio LB suplementado con km (30 $\mu\text{g/mL}$), tet (30 $\mu\text{g/mL}$) y cm (30 $\mu\text{g/mL}$) a 37°C toda la noche (12-13h). Una alícuota de 1mL del cultivo se mezcló con 1mL de glicerol al 50%, se congeló en hielo seco y se almacenó a -70°C como un stock de ésta cepa para su posterior uso en cada una de las fermentaciones realizadas en este trabajo.

6.2 Preparación de inoculo y desarrollo de fermentaciones.

Una asada del glicerol conservado a -70°C fue usada para inocular 2 cajas de agar-LB con kan, cm y tet($30\mu\text{g}/\text{mL}$) incubando a 37°C por una noche. A partir de estas cajas se seleccionó y picó una colonia para inocular un matraz de 125mL con 50mL del medio a utilizar durante la fermentación(**Figura 7**): medio mínimo (MM), medio Knop (MK) y medio de producción (MP) (**Tabla 3**). Este cultivo se incubó a 37°C durante toda la noche(12-13h) con agitación a 300rpm en una incubadora orbital New Brunswick. Al siguiente día se midió el crecimiento determinado su $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$ en un espectrofotómetro Beckman DU®-70 Spectrophotometer (PaloAlto, CA) y se realizaron los cálculos correspondientes para ajustar la concentración celular a una $\text{D.O.}_{600\text{nm}} = 0.30$ para inocular 500mL del medio de cultivo en un fermentador de 1L marca Applikon (Schiedam, TheNetherlands) equipado con las consolas ADI 1010 BioControler y ADI 1025. Los cultivos de cada cepa se hicieron por duplicado a una temperatura de 37°C y un pH de 7.0 controlado mediante la adición de NH_4OH al 2.8-3.0%, la agitación osciló entre 500- 700rpm para mantener los niveles de oxígeno disuelto a no menos de 20%, la aireación fue de 1vvm (volumen de aire por volumen de medio por minuto). Estas condiciones corresponden a las utilizadas en los trabajos realizados en el grupo de trabajo con la cepa PB12.SA y otras derivadas en el laboratorio (Escalante y otros, 2010).



Figura 7. Sistema de Fermentación

6.3 Desarrollo de un cultivo de células en reposo a partir de la biomasa cosechada en fase estacionaria en MM, MK y MP.

Se realizaron cultivos por duplicado en 500mL de MM, MK y MP en fermentador durante 40h, muestreando 2mL durante cada hora las primeras 8 h y de éste punto hasta las 40h cada 8 h, momento en que se detuvo el cultivo, se cosecharon las células en frascos estériles de 500mL por centrifugación a 4000rpm durante 8min a temperatura ambiente (Centrifuga Eppendorff 5410, BrinkmanInstruments Inc., Westbury, USA). La biomasa obtenida en la primera fase de la fermentación fue lavados veces en 300mL de una solución de sales de acuerdo al medio que se usó, para finalmente resuspender el paquete celular en 100mL de la misma

solución de lavado e inocular un segundo fermentador con 500 mL de la base de sales del medio respectivo suplementado únicamente con glucosa, IPTG y antibióticos (30 µg/mL). Iniciada esta segunda fase de la fermentación se procedió a tomar muestra cada 5 h durante 30 h, momento en el que detuvo el cultivo. Durante la primera parte de cada fermentación en dos etapas se utilizó cada medio completo y durante la segunda etapa solo no se incluyó en la composición ningún aminoácido o extracto de levadura.

6.4 Desarrollo de un cultivo de células en reposo a partir de la biomasa cosechada en fase exponencial en MM y MP.

Para este caso, los cultivos fueron preparados y desarrollados en los tres medios tal y como se describió en la sección anterior pero la fermentación se detuvo a la hora 8 (fin de la fase exponencial). Las células fueron cosechadas, lavadas y utilizadas para inocular un segundo reactor tal y como se describió en la sección anterior, manteniendo también esta segunda etapa del cultivo durante 30 h.

Tabla 3. Composición de los diferentes medios utilizados.

| Composición | Medio de Producción | Medio Mineral | Medio de Knop |
|-----------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|
| Glucosa | 25g/L | 10g/L | 25g/L |
| Extracto de levadura | 15g/L | 5g/L | - |
| Kanamicina | 30mg/L | 30mg/L | 30mg/L |
| Cloranfenicol | 30mg/L | 30mg/L | 30mg/L |
| Tetraciclina | 30mg/L | 30mg/L | 30mg/L |
| Fenilalanina | - | - | 0.7g/L |

| | | | |
|---|---------|---------|---------|
| Tirosina | - | - | 0.7g/L |
| Triptófano | - | - | 0.35g/L |
| Fosfato monobásico de potasio | 7.5g/L | - | 7.5g/L |
| Fosfato dibásico de potasio | 7.5g/L | - | 7.5g/L |
| Ácido cítrico | 2.1g/L | - | 2.1g/L |
| Citrato de amonio férrico | 0.3g/L | - | 0.3g/L |
| Sulfato de magnesio | 1Mm | 1mM | 1mM |
| Cloruro de calcio | 0.1mM | 0.1mM | - |
| Cloruro de amonio | - | 1g/L | - |
| Cloruro de sodio | - | 0.5g/L | - |
| Tiamina | 10mg/L | 10mg/L | 10mg/L |
| IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) | 0.1mM | 0.1mM | 0.1mM |
| Elementos traza | 0.1mL/L | 0.1mL/L | 0.1mL/L |
| Ácido parahidroxibenzóico | - | - | 10mg/L |
| Paraminobenzoato de potasio | - | - | 10mg/L |
| Acido 2,3-dihidroxiaminobenzoico | - | - | 10mg/L |

6.5 Determinación de crecimiento, consumo de glucosa y concentración de AS.

6.5.1. Crecimiento

Cada muestra de 2mL fue colectada en un tubo de microcentrifuga y se centrifugó a 15000 rpm durante 1min para la separación de la biomasa. El sobrenadante se transfirió a otro tubo mientras que el paquete celular fue lavado 2 veces y resuspendido en 2mL de agua desionizada para leer la D.O._{600nm}. A partir

los resultados obtenidos de crecimiento se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ).

6.5.2 Cuantificación de glucosa

La glucosa contenida en cada una de las muestras analizadas se determinó en un analizador de glucosa (BiochemistryAnalyser YSI 2700 Select), el cual utiliza un estándar de glucosa de 10g/L. A partir de los resultados obtenidos de crecimiento y consumo de glucosa se calculó la velocidad específica de consumo de sustrato (q_s).

6.5.3 Cuantificación de AS y DHS

La cuantificación de AS y DHS contenido en el sobrenadante de las muestras de fermentación se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en un sistema Waters, Miliford, MA, el cual cuenta con una bomba 600E, inyector automático 717, un índice de refracción de 2410 y un detector de arreglo de diodos (996). Las muestras se corrieron en una columna Aminex HPX-87H (300x 7.8mm; 9 m) Bio – Rad, Hércules, CA, utilizando una fase móvil 5mM de H_2SO_4 con un flujo de 0.5 ml / min y una temperatura de 50°C (Escalante y otros, 2010). Para el análisis de las muestras se consideró el tiempo de retención de los estándares de AS y DHS, así como la λ de máxima absorbancia. El AS se detecta a 213.6nm y el DHS a 235.8nm.

7. Resultados

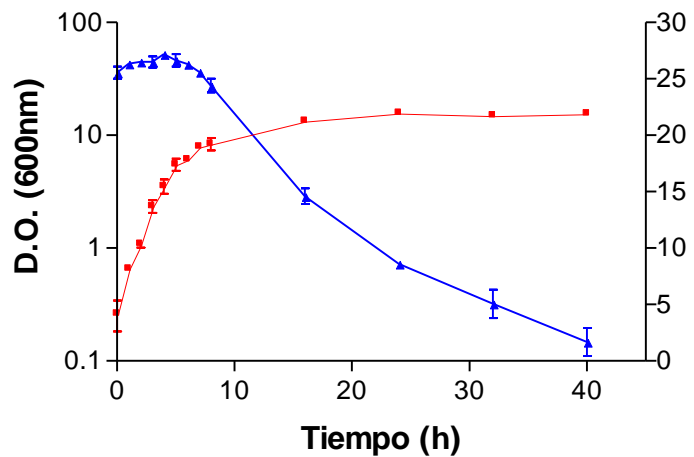
7.1 Fermentaciones en MP

En las fermentaciones en medio de producción muestra se observó que la cepa

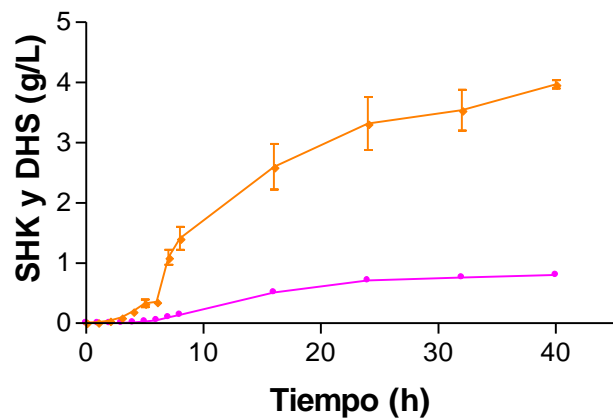
PB12.SA22 tiene un crecimiento típico de dos etapas: una fase exponencial de crecimiento de 8 h en la que alcanza un crecimiento con una $D.O_{600nm}$ 9.46, con una $\mu=0.48h^{-1}$ y consumiendo tan solo 3 g/L de glucosa (**Figura 8A**). A partir de ésta hora se observa una disminución en su crecimiento para entrar en una fase estacionaria hasta las 40 h de cultivo alcanzando una biomasa final de $D.O_{600nm}$ 15.50. La curva de producción de DHS y AS muestran que durante la fase exponencial se acumulan solo 0.14 g/L de DHS y 1.41 g/L de AS, observándose la máxima acumulación de estos compuestos durante la fase estacionaria (0.80 g/L para DHS y 4.00 g/L de AS)(**Figura8B**). La biomasa desarrollada durante esta primera etapa de 40 horas se cosecho para iniciar la segunda etapa del cultivo con un sistema de células en reposo mantenidas durante 30 h muestra que no hay un incremento en el crecimiento respecto a la biomasa inoculada, pero si se observa el consumo de 10.57g/L de glucosa durante las 30 h que se mantuvo éste cultivo produciendo 0.41g/L de DHS y 0.84g/L de AS(**Figura 8Cy D**).

Para la cosecha realizada al término de la fase exponencial, la primera etapa muestra la fase exponencial de crecimiento alcanzando una $D.O_{600nm}$ 9.01, con una $\mu= 0.47 h^{-1}$ y consumiendo 6 g/L de glucosa(**Figura 9 A**). La producción de DHS y AS es de 0.14 g/L y 1.00 g/L respectivamente(**Figura 9 C**). La segunda etapa de nuevo muestra que no hay ningún crecimiento por parte de la biomasa inoculada, el consumo de glucosa esta vez es de 8 g/L con una producción de AS de 1.44 g/L y DHS de 0.4g/L (**Figura 9By D**).

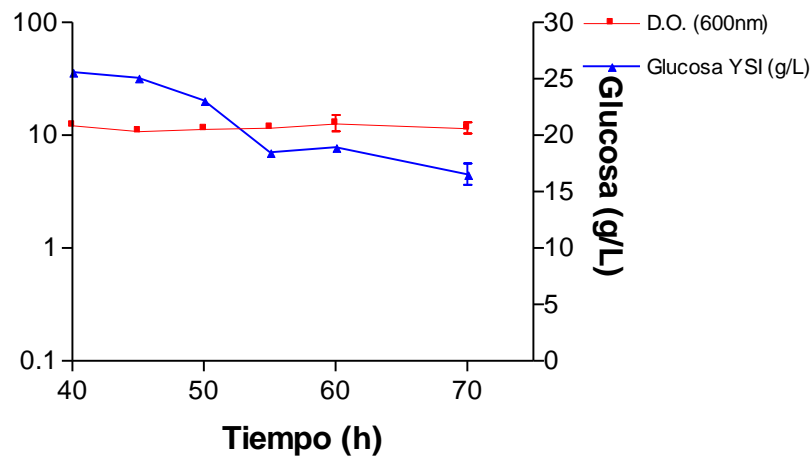
A)



B)



C)



D)

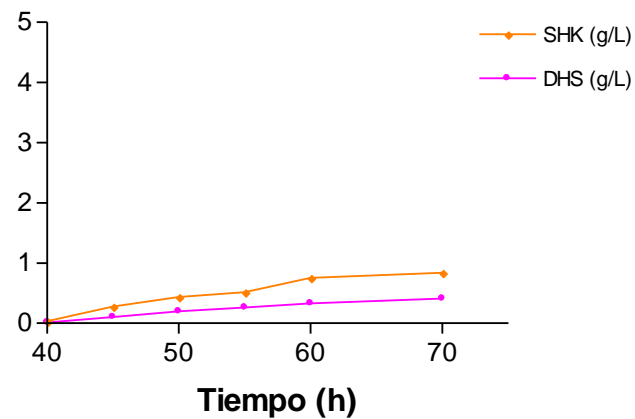


Figura 8. Fermentación en dos etapas de *E. coli* PB12.SA22 en MP con la cosecha en la fase estacionaria. A) Crecimiento y consumo de glucosa, Etapa 1. B) Producción de AS y DHS, Etapa 1. C) Crecimiento y consumo de glucosa, Etapa 2. D) Producción de AS y DHS, Etapa 2.

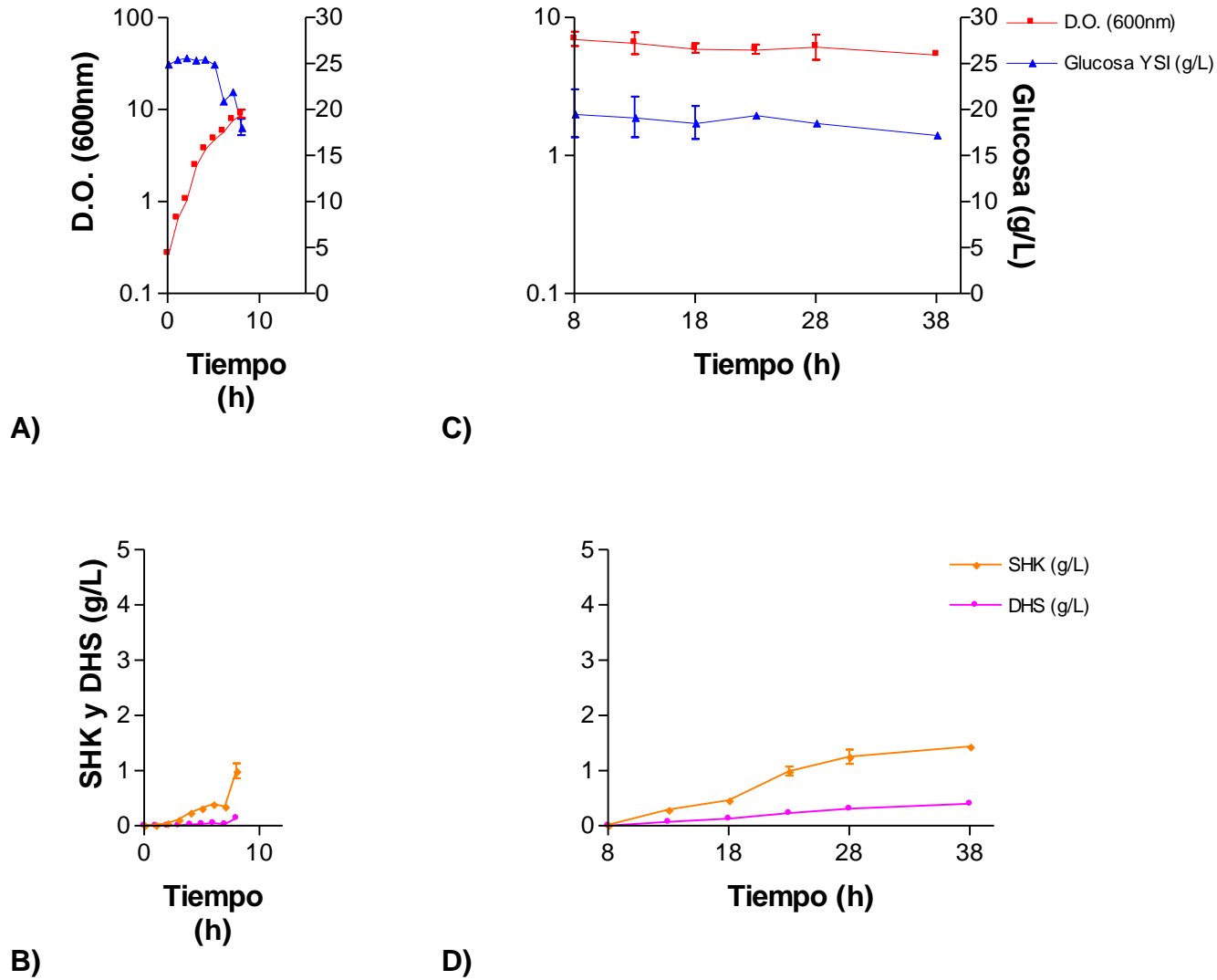


Figura 9. Fermentación en dos etapas de *E. coli* PB12.SA22 en MP con la cosecha en la fase exponencial. A) Crecimiento y consumo de glucosa, Etapa 1. B) Producción de AS y DHS, Etapa 1. C) Crecimiento y consumo de glucosa, Etapa 2. D) Producción de AS y DHS, Etapa 2.

7.2 Fermentaciones en MM con la cosecha en la fase estacionaria

La cosecha realizada durante la fase exponencial muestra que ésta cepa también presenta tal y como se observó para los cultivos en MP, un crecimiento de dos etapas: una fase exponencial de crecimiento de 8 h pero en la que se observa que tan solo alcanza un crecimiento con una $D.O_{600nm} 2.75$, (71% menor respecto al cultivo en MP), con una $\mu = 0.25 \text{ h}^{-1}$ y consumiendo tan solo 3 g/L de glucosa (**Figura 10A**). A partir de ésta hora se observa también una disminución en su crecimiento para entrar en una fase estacionaria hasta las 40 h de cultivo alcanzando una biomasa final de $D.O_{600nm} 4.30$. La curva de producción de DHS y AS muestran que durante la fase exponencial se acumulan también DHS y AS, 0.05 g/L y 0.25 g/L, respectivamente, observándose también la máxima acumulación de estos compuestos durante la fase estacionaria (0.28 g/L para DHS y 1 g/L de AS), pero en menor cantidad que lo observado para las fermentaciones en MP (**Figura 10 C**). La segunda etapa de este cultivo con un sistema de células en reposo mantenidas durante 30 h muestra que tampoco hay un incremento en el crecimiento respecto a la biomasa inoculada y se observa un consumo de 3 g/L de glucosa durante las 30 h que se mantuvo éste cultivo. Al final de esta segunda etapa solo se produjeron 0.14 g/L de DHS y 0.36 g/L de AS, 65% y 75% menos, respectivamente, con relación a los cultivos en MP (**Figura 10 B y D**).

Para la cosecha realizada durante el final de la fase exponencial, la primera etapa muestra un crecimiento de $D.O_{600nm} 2.63$, con $\mu = 0.25 \text{ h}^{-1}$ y un consumo de glucosa de 1 g/L (**Figura 10 A**). El AS y DHS producido en la primera etapa es de 0.31 y 0.07 g/L respectivamente (**Figura 10 C**). Durante la segunda etapa, de nuevo la biomasa se

mantiene constante. El consumo de glucosa llega a ser de 1.73 g/L y la producción de DHS y AS es de 0.13 y 0.34 g/L. **(Figura 11B y D)**. En cuanto a la reducción

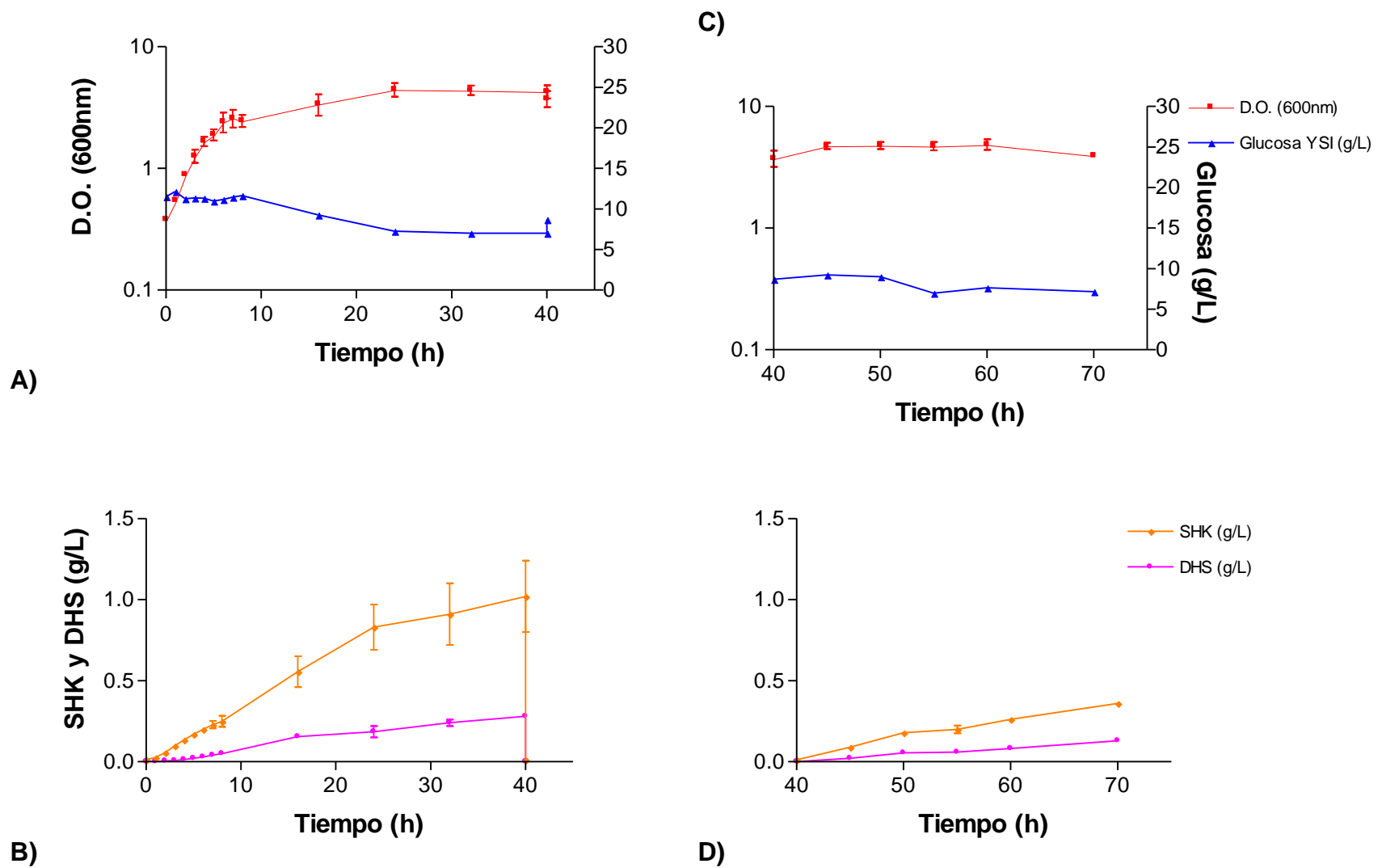


Figura 10. Fermentación en dos etapas de *E. coli* PB12.SA22 en MM con la cosecha en la fase estacionaria. A) Crecimiento y consumo de glucosa, Etapa 1. B) Producción de AS y DHS, Etapa 1. C) Crecimiento y consumo de glucosa, Etapa 2. D) Producción de AS y DHS, Etapa 2

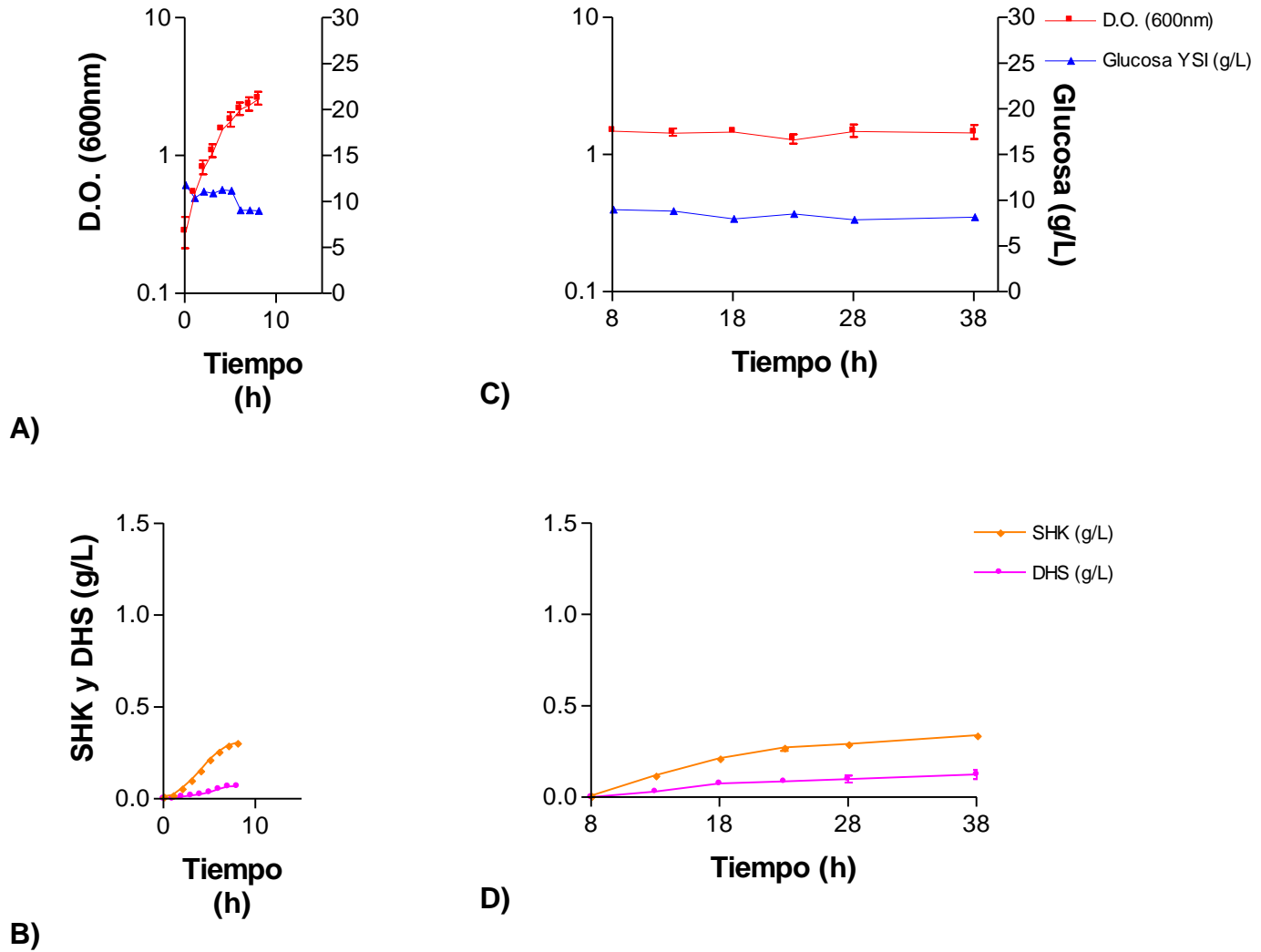


Figura 11. Fermentación en dos etapas de *E. coli* PB12.SA22 en MM con la cosecha en la fase exponencial. A) Crecimiento y consumo de glucosa, Etapa 1. B) Producción de AS y DHS, Etapa 1. C) Crecimiento y consumo de glucosa, Etapa 2. D) Producción de AS y DHS, Etapa 2.

7.3 Fermentaciones en el MK.

Los cultivos de la cepa PB12.SA22 no presentan crecimiento en el MK (Figura 11A y B), no hay consumo de glucosa y por lo tanto el AS y DHS no tienen un cambio importante en su concentración (**Figura 12 A y B**). Estos resultados permitieron tomar la decisión de no realizar un cultivo en una segunda etapa para esta condición.

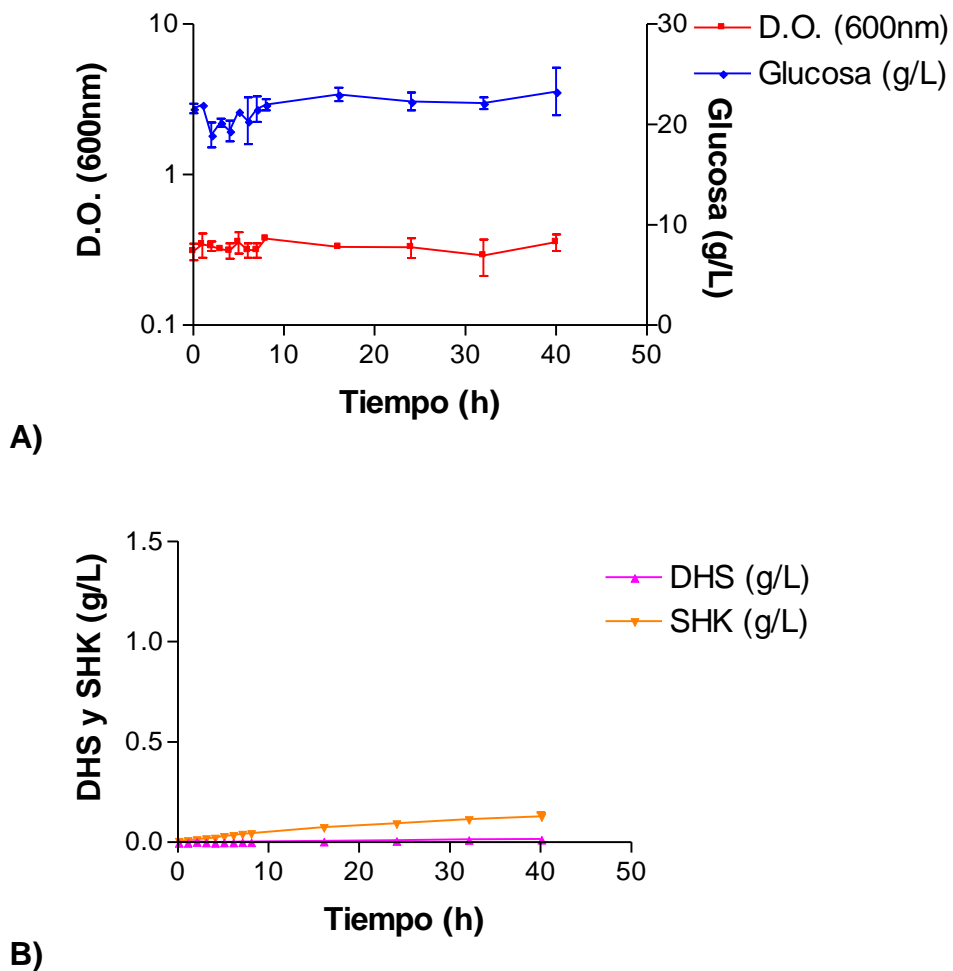


Figura 12. Fermentación de *E. coli* PB12.SA22 en MK. A) Crecimiento y consumo de glucosa. B) Producción de AS y DHS.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de las cultivos en dos etapas de la cepa de *E. coli* productora de AS en MP, MM y MK

| Medio usado y hora de la cosecha de biomasa | μ (h ⁻¹) | qs (mmolGLC/gDW*h) | Yx/s (gDW/gGLC) | Yp/s (molSA/molGLC) 1 ^a etapa, 2 ^a etapa | AS (g/L) 1 ^a etapa, 2 ^a etapa |
|--|-----------------------------|-----------------------|--------------------|--|---|
| MP 40 h | 0.4793 | 1.8691 | 1.4233 | 0.1755, 0.0829 | 3.9700, 0.8400 |
| MP 8 h | 0.4878 | 2.4640 | 1.0533 | 0.1669, 0.2989 | 0.9950, 1.400 |
| MM 40 h | 0.2626 | 0.4337 | 3.2318 | 0.2310, 0.2338 | 1.0200, 0.3600 |
| MM 8 h | 0.2486 | 0.3571 | 3.8343 | 0.2529, 0.2263 | 0.3060, 0.3400 |
| MK | ND | ND | ND | ND | ND |

ND= No determinado.

8. Discusión

Este trabajo evaluó un sistema alternativo de cultivo en el cual se pretendió aprovechar la biomasa generada durante el crecimiento de la cepa en tres diferentes medios: MP, MM y MK en el cual se decidió aprovechar la capacidad metabólica de la cepa PB12.SA22 para producir AS a partir de glucosa y con esto establecer una estrategia alternativa de cultivo que permitiera la producción de éste compuesto sin la utilización de un medio que incluya extracto de levadura.

Se debe considerar que las fermentaciones con células en reposo presentan ciertas ventajas con respecto a una en lote. El control del pH es más fácil de seguir, algunas reacciones del metabolismo que puedan competir con la vía de interés dejan de llevarse a cabo, y las transformaciones son más limpias, ya que se ha removido la biomasa de una mezcla compleja de compuestos se llegan a tener menos productos de reacciones no deseadas. Ejemplos exitosos de este proceso es el uso de *Pseudomonas* spp. Y *Torulopsis bombicola* para la producción de biotensoactivos, *Gluconobacter oxidans* para la producción de miglitol (fármaco para el tratamiento de la diabetes), y *Serratia marcescens* en la producción de ácido vainillínico (Grogan, 2009).

En este trabajo se varió el tiempo en el que las células del cultivo en lote fueron colectadas. Para la primera fase de los cultivos desarrollados, los medios minerales y de producción presentan el comportamiento típico de dos etapas observado previamente para esta cepa: Una fase exponencial de 8 h (**Figura 8**) en la que prácticamente no hay consumo de glucosa y una baja producción de AS

seguida de una fase estacionaria hasta el final de la fermentación en la que se observó la producción de AS asociada al consumo de glucosa, la cual se agota prácticamente a la hora 40. Esto no sucede para MK.

En el MP observó el desarrollo de la mayor cantidad de biomasa así como una concentración más alta de AS (**Tabla 4**) respecto a lo observado con los otros medios, aunque el rendimiento de AS bajo esta condición de cultivo no llega al nivel de lo reportado (Escalante y otros 2010).

Para el caso de los cultivos en MM se puede observar que la biomasa es ~ 4 veces menor que la generada en el MP en la primera parte de la fermentación, observándose también menor concentración de AS de la misma forma. Es importante mencionar que se decidió utilizar en este trabajo el MM debido a que se empleó previamente en nuestro grupo de trabajo para la producción de Phe en cultivos de células en reposo de la cepa PB12 (PTS-) (fondo genético de partida para la obtención de la cepa PB12.SA22) (Báez y otros, 2004), sin embargo, se puede observar en los resultados obtenidos con éste medio que la disminución en el crecimiento respecto al observado en el MP que se puede asociar, como ya se mencionó, a la baja concentración de algún componente del extracto de levadura, o bien la algún otro componente del medio como citrato o bien, algún componente inorgánico del medio como el excedente de fosfatos por parte de K_2HPO_4 o KH_2PO_4 .

El MK contiene una base mineral y es suplementado con aminoácidos aromáticos y vitaminas aromáticas (**Tabla 3**), que son teóricamente los componentes requeridos para complementar la auxotrofía de la cepa PB12.SA22 resultante de la interrupción de la VAS después de AS en ausencia de extracto de levadura. Este medio es reportado por Knop y otros para la producción de AS en cepas de *E. coli* (**Tabla 2**). Sin embargo, es importante considerar que en la cepa utilizada en este trabajo el sistema PTS no ha sido inactivado. El cultivo de la cepa PB12.SA22 (PTS-) en este medio no generó crecimiento alguno. Este resultado sugiere que ésta cepa tiene otros requerimientos diferentes a la sola suministración de aminoácidos y vitaminas aromáticas que está(n) presente(s) en el medio.

Los resultados obtenidos en este trabajo con la cepa sobreproductora de AS PB12.SA22 en las fermentaciones en MP y MM (Figuras 8-11, Tabla 4), mostraron que esta cepa presenta una serie de problemas en su crecimiento que se discuten a continuación. Como ya se había descrito, los cultivos de esta cepa en MP (Escalante y otros, 2010), muestran un crecimiento en el que llama la atención que la cepa deja de crecer entre 8-10 horas de cultivo (Figura 6 y 7) a pesar de que aún existe en el medio de cultivo glucosa, lo que lleva a proponer dos explicaciones: (a) el crecimiento se detiene debido a que se acumula o desaparece del medio de cultivo algún componente que afecta el crecimiento y (2) que el crecimiento está soportado de forma importante por el extracto de levadura presente en el medio y que probablemente al agotarse alguno de sus componentes, la cepa deja de crecer al no poder sintetizar proteínas. Es importante considerar que la cepa PB12.SA22 tiene inactivados los genes *arok* y

aroL, que codifican para las enzimas shikimato cinasa I y II, respectivamente (Figura 5), interrumpiendo la VAS y con ello la síntesis de los aminoácidos aromáticos y otros productos derivados del corismato de importancia para la célula tales como sideroforos (enterobactina), moléculas transportadoras de electrones (ubiquinol), vitaminas aromáticas (tetrahidrofolato), precursores de otras vías como el aminobenzoato, tetrahidrofolato e isocorismato.(Ecocyc, 2011). Sin embargo, el resultado observado en el MK muestra que la sola presencia de aminoácidos y otros compuestos aromáticos no satisface la auxotrofia generada por la inactivación de la VAS a diferencia de lo que se observa en los MP y MM, en los que el extracto de levadura satisface la auxotrofia y que las diferencias en crecimientos entre estos dos medios (MP y MM), se debe a la cantidad de extracto de levadura presente.

La segunda fase (células en reposo) realizados con la biomasa generada en la primera etapa de los cultivos en MP y MM, mostró que independientemente de que si las células fueron cosechadas en la fase exponencial de crecimiento o en la fase estacionaria, al ser inoculadas en la base mineral del medio suplementada con glucosa, no producen o producen muy poco AS (**Figuras 8-11, D**) a pesar, de que hay el consumo de 3 g de glucosa en la segunda etapa de los cultivos en los que la biomasa proviene del MP. El hecho de que los cultivos de células en reposo no produzcan AS, puede sugerir que las células se encuentran en un estado de estrés muy importante como resultado del procesamiento que implicó cosecharlas a partir del caldo de fermentación (etapa 1 en MP y MM), lavarlas y resuspenderlas para inocular el reactor en la segunda etapa. Este resultado

mostró que la estrategia propuesta como una alternativa para la producción de AS en un sistema de células en reposo en donde se pretendía utilizar la biomasa generada en la primera etapa de un cultivo empleando diferentes medios de cultivo, no es una alternativa viable, al menos para la cepa PB12.SA22. Sin ser la finalidad de esta tesis, se pueden realizar algunas suposiciones respecto al impacto que el extracto de levadura tiene sobre el crecimiento en esta cepa. La eliminación del sistema de transporte de glucosa por el sistema PTS en la cepa silvestre JM101 permitió obtener la cepa denominada como PB11 (PTS-) en la que además de verse afectada de forma importante su capacidad de crecer en glucosa, la cepa modifica el mecanismo de represión catabólica en el cual se consume preferencialmente la glucosa sobre cualquier otra fuente de carbono debido a la eliminación del componente EII^{Glc} del sistema PTS (Flores y otros, 1996; 2007; Gosset, 2005). El cultivo de la cepa PB11 en quimiostato permitió la selección de mutantes (entre ellas la cepa PB12, fondo genético de partida para la obtención de la cepa sobreproductora de AS PB12.SA22) que desarrollaron la capacidad de utilizar el sistema de permeasa de galactosa (GalP) como el principal sistema de transporte de glucosa, pero de forma interesante, desarrolló la capacidad de co-utilizar varias fuente de carbono (Flores y otros, 2005). Esta capacidad de co-utilizar otros sustratos aún en presencia de glucosa en la cepa PB12.SA22, permite en cultivos en los que se incluye extracto de levadura, que durante las primeras 8 horas de crecimiento se tenga un crecimiento soportado únicamente por este componente satisfaciendo la auxotrofia, cuando se agota algún componente, la cepa deja de crecer y entonces utiliza la glucosa en un sistema de biotransformación, en el cual éste azúcar se utiliza para la síntesis de AS.

9. Conclusiones

La evaluación de cepa de *E. coli* sobreproductora de AS PB12.SA22 en un sistema de células en reposo obtuvo una producción muy baja de este compuesto en comparación a lo obtenido en sistemas en lote, 3,97 g/L con respecto a 7.05g/L.

Los resultados obtenidos con respecto al extracto de levadura, permitieron determinar que existe una relación directa entre su concentración, la biomasa y la cantidad de AS obtenido.

La baja cantidad de AS obtenido en la segunda etapa sugiere que el estado metabólico de las células no permitió el consumo eficiente de glucosa para la producción de AS. Esto puede deberse a un problema de adaptación por parte de la cepa, probablemente se debe al estrés al que se someten durante su cosecha.

10. Apéndice

La tasa de crecimiento específica (μ) fue calculada como la pendiente del tiempo con respecto al ln del peso seco celular. Se considera que $1OD_{600}$ corresponde a $0.37g/L$ de peso seco celular. La tasa de consumo específica de glucosa (q_s) fue calculada durante la fase exponencial de crecimiento, como el cambio diferencial de glucosa con respecto al tiempo normalizada a la concentración de la biomasa ($q_s = \frac{\mu * 5.5506}{Y_{x/s}}$) (Escalante y otros, 2010). Se considero 5.5506 como el factor que permite el cambio de gramos de glucosa a milimoles de glucosa.

11. Referencias.

- Abrecht, S., Federspiel, M., Estermann, H., Fischer, R., Karpf, M., Oberhauser, T., y otros. (2007). The Synthetic-Technical Development of Oseltamivir Phosphate Tamiflu™: A Race against Time. *Chimia*, 93-99.
- Báez, J. V., Bolivar, F., & Gosset, G. (2001). Determination of 3-Deoxy-D-Arabinose-7-Phosphate Productivity and Yield from Glucose in *Escherichia coli* Devoid of the Glucose. *Biotechnology & Bioengineering*, 531-35.
- Báez, J. V., Osuna, J., Hernández, G. C., Soberón, X., Bolivar, F., & Gosset, G. (2004). Metabolic Engineering and Protein Directed Evolution Increase the Yield of L-Phenylalanine Synthesized From Glucose in *Escherichia coli*. *Biotechnology & Bioengineering*, 516-24.
- Chandran, S. S., Jian, Y., Draths, M. K., von Daeniken, R., Weber, W., & Frost, J. W. (2003). Phosphoenolpyruvate Availability and the Biosynthesis of Shikimic. *American Chemical Society and American Institute of Chemical Engineers*, 808-14.
- Cortés, T. L., Carmona, S. B., Salinas, A. C., García, M. A., Gosset, G., Escalante, A., y otros. (2011). Ingeniería de vías metabólicas en *Escherichia coli* para la producción de shikimate como precursor para la síntesis de compuestos antivirales contra la influenza. *Biotecnología*, 30-48.
- Escalante, A., Calderon, R., Valdivia, A., de Anda, R., Hernández, G., Ramírez, O., y otros. (2010). Metabolic engineering for the production of shikimic acid in an evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate:

- carbohydrate phosphotransferase system. *Microbial Cell Factories*, 9-21.
- Federspiel, M., Fischer, R., & Hennig, M. (1999). Industrial Synthesis of the Key Precursor in the Synthesis of the Anti-Influenza Drug Oseltamivir Phosphate. *Organic Process Research & Development*, 266-74.
- Flores, N., Sigala, J., de Anda, R., Escalante, A., Martinez, A., Ramirez, O., y otros. (2007). Growth recovery on glucose under aerobic conditions of an *Escherichia coli* strain carrying a phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system deletion by inactivating *arcA* and overexpressing the genes coding for glucokinase and gal. permease. *Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 105-116.
- Gosset, G. (2005). Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification. *Microbial Cell Factories*, 1-11.
- Grogan, G. (2009). *Practical Biotransformations*. Wiley.
- Herrman, K. M. (1995). The Shikimate Pathway as an Entry to Aromatic. *Plant Physiol.*, 7.12.
- Herrman, K. M., & Weaver, L. M. (1999). The Shikimate Pathway. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 473-503.
- Johansson, L., & Lidén, G. (2006). Transcriptome analysis of a shikimic acid producing strain of *Escherichia coli* W3110 grown under carbon- and phosphate-limited conditions. *Journal of Biotechnology*, 528-45.
- Kamps, S., Hoffman, C., & Preiser, W. (2006). En Influenza Report (págs. 19-29, 87-93, 194-197). Flying Publisher.
- Knop, D. R., Draths, M. K., Chandran, S. S., & Barker, J. L. (2001). Hydroaromatic Equilibration During Biosynthesis of Shikimic Acid. *J. Am. Chem. Soc.*

10173-182.

Krämer, M., Bongaerts, J., Bovener, R., Kremer, S., Müller, U., Orf, S., y otros.

(2003). Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid.

Metabolic Engineering, 277-83.

Liang-Deng, N., Xian-Xin, S., & Kwang, K. H. (2009). A Short and Practical

Synthesis of Oseltamivir. *Journal of Organic Chemistry*, 3970-73.

Osterholm, M. (2005). Preparing for the Next Pandemic. *The New England Journal*

of Medicine, 1939-42.

Panina, E., Vitreschak, A., Mironov, A., & Gelfand, M. (2001). Regulation of

Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Gamma-Proteobacteria. *J. Mol.*

Microbiol. Biotechnol., 529-43.

Ponce, E., Martinez, A., Bolivar, F., & Valle, F. (1997). Stimulation of Glucose

Catabolism Through the Pentose Pathway by the Absence of the Two

Pyruvate Kinase Isoenzymes in *Escherichia coli*. *Biotechnology &*

Bioengineering, 292-295.

Qing, L., Jiaxun, Q., Wei, Z., Vavricka, C., Shi, Y., Wei, J., y otros. (2010). The

2009 pandemic H1N1 neuraminidase N1 lacks the 150-cavity in its active

site. *Nature Structural & Molecular Biology*, 1266-68.

Roche. (Agosto de 2008). Tamiflu.

Ruohong, S. (2008). Separation of Shikimic Acid from Pine Needles. *Chem. Eng.*

Technol., 469-73.

Sheu, T., Deyde, V., Okomo, A., Garten, r., Xu, X., Bright, r., y otros. (2008).

Surveillance for Neuraminidase Inhibitor Resistance among Human

Influenza A and B Viruses Circulating Worldwide from 2004 to 2008.

Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 3284-392.

Urban, M. (2009). for Patients & Caregivers. Recuperado el 26 de 04 de 2011, de

The Merck Manual Home Health Handbook:

http://www.merckmanuals.com/home/infections/viral_infections/influenza.ht

[ml?qt=&sc=&alt=](http://www.merckmanuals.com/home/infections/viral_infections/influenza.html?qt=&sc=&alt=)

WHO. (Abril de 2009). Influenza (Seasonal).

Zambon, M. (1999). Epidemiology and Pathogenesis of Influenza. Journal of

Antimicrobial Chemoterapy, 3-9.