

INGENIERÍA METABÓLICA DE *Escherichia coli* PARA LA PRODUCCIÓN DE 2,3-BUTANODIOL MEDIANTE ESTRATEGIA DE INDUCCIÓN TÉRMICA

Eliseo Ronay Molina Vázquez, Georgina Hernández Chávez, Luis Caspeta, Guillermo Gosset, Alfredo Martínez Jiménez. Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Mor. CP 62210. México. emolina@ibt.unam.mx.

Palabras clave: 2,3-butanodiol, *Escherichia coli*, ingeniería metabólica.

Introducción. La limitada disponibilidad a futuro de petróleo ha llevado a la búsqueda de diversas alternativas para obtener productos obtenidos de este recurso. Una de las más prometedoras son los bioprocesos, ya permiten producir moléculas de interés industrial a partir de materias primas renovables. El 2,3-butanodiol (BDO), que algunos organismos producen como reserva de carbono y energía, tiene potenciales aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica (1). Utilizando *K. oxytoca* y *E. cloacae* se han alcanzado productividades elevadas y rendimientos cercanos al máximo teórico (2). Sin embargo, estos organismos son patógenos, lo que ha limitado su uso en la producción de BDO a gran escala (3). Otro obstáculo en la implementación de estas tecnologías han sido los altos costos de operación. En este sentido, los bioprocesos que requieren inducción química suelen ser caros. El objetivo de este estudio fue construir una cepa de *E. coli* capaz de sintetizar BDO a partir de glucosa bajo un sistema de inducción térmica y evaluar condiciones que favorecen su producción.

Metodología. Utilizando CRISPR-cas 9⁴, el gen de la RNA pol T7 se integró en el locus HtpG de la cepa afermentativa AV11 (MG1655 $\Delta pflB$, $\Delta frdA$, $\Delta poxB$, $\Delta xylFGH$, $\Delta midarpA$, Δreg 27.3 kb, $gatCS184L$, Δldh , $\Delta adhE$). Este locus se controla por el factor σ_{32} como respuesta a choque térmico. La cepa resultante (EM01) se transformó con el vector pAcycDuet-1 conteniendo el operón de BDO (pBDOop). Para favorecer la síntesis de BDO se realizaron estudios de transferencia de O₂ con la cepa EM01/pBDOop en biorreactores de 1 L con medio mineral AM1 y glucosa (40 g/L). La inducción térmica se realizó a las 10 h incrementando la temperatura de 37 a 41°C. Los productos de fermentación se analizaron por HPLC.

Resultados. Bajas transferencias de O₂ (0.1 vvm y 400 RPM) impactaron en la disponibilidad de poder reductor, lo que limitó el crecimiento de la cepa EM01/pBDOop y la actividad de la vía de BDO. Se acumuló el precursor de la vía (piruvato a 20 g/L), se detectaron trazas de acetoína y poco BDO (2 g/L). Por el contrario, elevadas transferencias O₂ (O_{2d}>5%) provocaron un metabolismo altamente oxidativo. La mayor parte del carbono se destinó a biomasa y CO₂. No se acumuló piruvato y del carbono dirigido a la vía de BDO, la mayoría terminó en acetoína (4 g/L). Para resolver la divergencia entre la

producción de biomasa y BDO se decidió realizar cultivos bifásicos. Para la etapa de crecimiento se utilizó una elevada transferencia de O₂ (O_{2d} 5%) para producir biomasa. En la etapa de producción se limitó el oxígeno transferido (0.1 vvm y 400 rpm). El resultado fue mayor producción de BDO (4 g/L) con menor acumulación de piruvato (4 g/L) y acetoína (3 g/L). Los cultivos sin inducción acumularon altas cantidades de piruvato (16 g/L) y bajas concentraciones de BDO y acetoína (1 g/L). En la **fig.1** se representa el efecto de las condiciones de cultivo en el metabolismo del BDO.

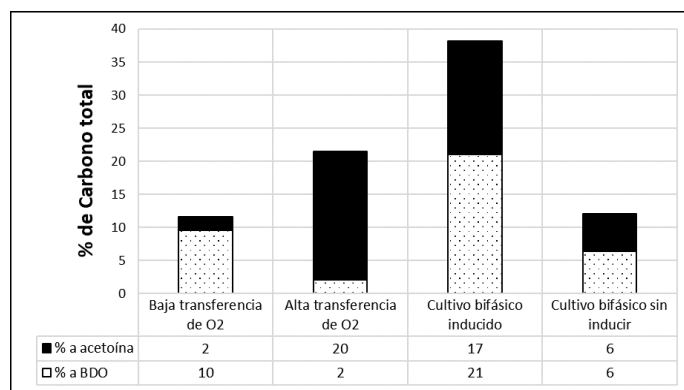


Fig. 1. Distribución del carbono destinado a la vía de BDO.

Conclusiones. El sistema de inducción térmica propuesto funciona eficientemente. La producción de BDO está fuertemente influenciada por la transferencia de oxígeno en el cultivo. Exceso o deficiencia de este sustrato resultan en bajos niveles de producción. La estrategia de cultivo bifásico permitió dirigir aproximadamente el 40% del carbono a la vía de síntesis de acetoína - BDO.

Agradecimientos. Al apoyo otorgado por CONACYT, proyecto FONCICYT ERANet-LAC SMIBIO - C0013 - 248192 y PAPIIT - DGAPA - UNAM, Clave IV100119.

Bibliografía.

1. Celińska E & Grajek W (2009). Biotechnol Adv. 27(6):715-725
2. Li L et al. (2015). Metab Eng. 28:19-27.
3. Tong Y et al. (2015). Appl Microbiol Biotechnol.100(2):637-647.
4. Jiang Y et al. (2015). Appl Environ Microbiol. 81(7):2506-2514.

