

PRODUCCIÓN DE (R)-3-HIDROXIBUTIRATO CON *Escherichia coli* A PARTIR DE GLICEROL

Ramírez Amador Fidel O., Flores Mejía Noemí, Gosset Lagarda Guillermo, Martínez Jiménez Alfredo.
Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología, Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Av. Universidad 2001, Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, CP 62210. fidelmz@ibt.unam.mx
Palabras clave: (R)-3-hidroxitirato, glicerol, *Escherichia coli*

Introducción. El (R)-3-hidroxitirato (R-3HB) es una molécula sintetizada en condiciones de inanición, para ser utilizado como combustible y así cumplir con diversas funciones metabólicas en humanos. Existen bacterias que polimerizan (R)-3HB para producir polihidroxicanoatos (PHA's). Además, se ha reportado el uso de (R)-3HB en el área farmacéutica y de la salud. Por ingeniería metabólica han surgido estrategias para la producción de (R)-3HB en microorganismos modelo como *E. coli* (1). Por otro lado, el glicerol, principal subproducto en la producción de biodiesel, representa una fuente de carbono abundante y de bajo costo (2) que puede ser metabolizada por *E. coli*.

Se busca generar una cepa de *E. coli* capaz de producir (R)-3HB a partir de glicerol, aprovechando así este residuo industrial.

Metodología. A la cepa silvestre (WT) *E. coli* MG1655 (DE3) se le sustituyó el gen *pta* por un casete de resistencia a kanamicina (3), buscando un mejor aprovechamiento del Acetil-CoA para redirigirlo a la producción de (R)-3HB. Por otra parte, se transformó con el vector pTrc-R3HB que contiene algunos genes de la vía de producción de PHB de *A. vinelandii* y la sobreexpresión de una tioesterasa propia de *E. coli* (4) (**Fig.1**). Luego de transformar la cepa silvestre y la mutante (Δpta) con el vector pTrc-R3HB se hicieron cultivos en matraz utilizando medio mínimo mineral con 10 g L⁻¹ de glicerol (37°C, 300 rpm, pH 7, MOPS 0.1 M).

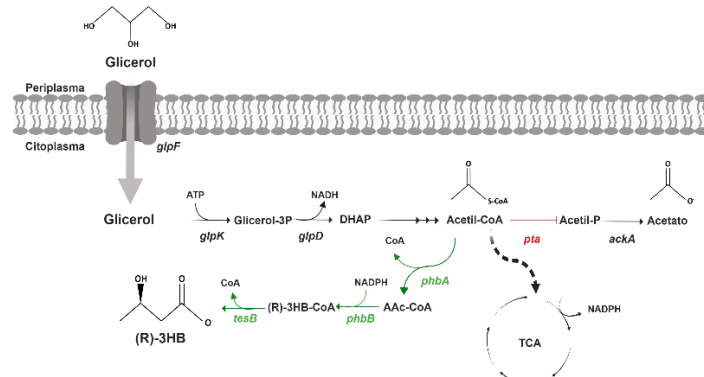


Fig. 1. Vía sintética para producción de (R)-3HB en *E. coli*. Verde: genes heterólogos/sobreexpresados; Rojo: gen inactivado.

Resultados. En la **Tabla 1** se muestran los parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos de la producción de (R)-3HB en matraz: valores de crecimiento celular, consumo de glicerol, rendimientos y generación de metabolitos (R-3HB, acetato), para las cepas WT y Δpta transformadas con el vector pTrc-R3HB.

Tabla 1. Parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos durante la producción de (R)-3HB con las cepas WT y Δpta transformadas con el vector pTrc-R3HB. ND: No detectado.

Parámetro	WT	Δpta
CDW _{máx} (g L ⁻¹)	2.01 ± 0.025	2.21 ± 0.089
μ (h ⁻¹)	0.31 ± 0.004	0.27 ± 0.009
Y _{XS} (g _{CDW} /g _{gli})	0.22 ± 0.004	0.25 ± 0.008
q _S (g FC g cél ⁻¹ h ⁻¹)	1.42 ± 0.015	1.09 ± 0.008
Q _P (g (R)-3HB L ⁻¹ h ⁻¹)	0.046 ± 0.009	0.064 ± 0.020
Y _{PS} (g _{R3HB} g _{gli} ⁻¹ ; %máxT)	0.080 ± 0.019 (14.15%)	0.114 ± 0.004 (20.17%)
(R)-3HB (g L ⁻¹)	0.69 ± 0.141	0.96 ± 0.309
Acetato (g L ⁻¹)	ND	0.63 ± 0.183

De acuerdo con los datos obtenidos el crecimiento de la cepa mutante no se ve afectado de forma importante por la eliminación del gen *pta*, que alcanzó una biomasa máxima mayor con respecto a la silvestre. En cuanto a la producción de (R)-3HB con ambas cepas, el título final incrementó de 0.69 g/L a 0.96 g/L, así como el rendimiento de producto-sustrato desde 0.08 g_{R3HB}/g_{gli} a 0.114 g_{R3HB}/g_{gli}, para la cepa silvestre y mutante, respectivamente. Por su parte sólo la mutante produjo acetato (0.63 g/L) a pesar de la eliminación de *pta*, posiblemente por la expresión de otros genes capaces de generar este metabolito.

Conclusiones. Se logró incrementar 39% el título y 42% el rendimiento de (R)-3HB a partir de glicerol utilizando la cepa mutante de *E. coli* Δpta transformada con el vector pTrc-R3HB, por lo que esta estrategia permite aprovechar una mayor poza de Acetil-CoA hacia la generación de (R)-3HB a partir de glicerol.

Agradecimientos. Al apoyo otorgado por CONACyT, proyecto FONCICYT ERANet-LAC SMIBIO - C0013 - 248192.

Bibliografía.

- Ren Q et al. (2010) *Appl Microbiol Biotechnol*, 87:41–52.
- Dobson R et al. (2012) *J Ind Microbiol Biotechnol*, 39:217–226.
- Baba T et al. (2006) *Molecular Systems Biology*, 2 (1).
- García-Benítez M et al. Ingeniería metabólica para la producción de (R)-3-hidroxitirato en *E. coli* aumentando la disponibilidad de NADPH. XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Guadalajara, Jal., México, 21-26 de junio del 2015, VIO-08.

