

### INGENIERÍA METABÓLICA DE *Escherichia coli* PARA PRODUCIR L-LACTATO

Laura J. Leal Reyes, Gerardo Huerta Beristain, Guillermo Gosset Lagarda, Alfredo Martínez Jiménez  
Instituto de Biotecnología-UNAM. Av. Universidad 2001 Col. Chamilpa. Cuernavaca Mor. 62210

Fax: 317 2388. Correo electrónico: lauleal@ibt.unam.mx

Palabras clave: *Escherichia coli*, L-lactato, L-lactato deshidrogenasa.

**Introducción.** Una aplicación del lactato es la obtención de plásticos biodegradables a partir de su polimerización a polilactato (PLA), cuyas propiedades físicas y de degradación están conferidas por una elevada proporción del isómero L (1). La producción biotecnológica actual de lactatos es a partir de lactobacilos, los cuales requieren medios de cultivo complejos, que resultan caros para la obtención a gran volumen de PLA. *Escherichia coli* fermenta azúcares, en medios minerales simples, a una mezcla de productos de fermentación, incluyendo el D-lactato a partir de piruvato y la enzima esteroespecífica LDHA.

El objetivo del presente trabajo fue integrar en *E. coli* no fermentativa (MG1655  $\Delta pf1B$ ,  $\Delta adhE$ ,  $\Delta frdA$ ,  $\Delta ldhA$ ) el gen que codifica para la LDH (enzima esteroespecífica para L-Lactato de *Bacillus subtilis*), bajo el control del promotor nativo del gen *ldhA* y evaluar la producción de L-lactato en medio mineral.

**Metodología.** La integración cromosomal de *ldh* de *B. subtilis* en *E. coli* no fermentativa se llevó a cabo por el método reportado en (2). La cepa lactogénica generada (MG1655  $\Delta pf1B$ ,  $\Delta adhE$ ,  $\Delta frdA$ ,  $\Delta ldh::ldh_{Bs}$ ) se caracterizó en mini-fermentadores (200 mL) no aireados, en medio mineral-40 g/L de glucosa, 37°C, 150 rpm controlándose a pH de 7 por medio de la adición de KOH 2N. Mediante HPLC se cuantificaron la glucosa y los productos de fermentación, y el L-lactato se confirmó con el analizador enzimático esteroespecífico para L-lactato.

**Resultados y discusión.** Los resultados obtenidos con el analizador bioquímico y por HPLC indican que la cepa modificada es capaz de producir L-Lactato ópticamente puro a partir de glucosa, demostrando que la integración de *ldh* de *B. subtilis* es funcional. La cepa convierte el 95% de la glucosa en L-lactato con tan solo 1.5 g/L de células en 48 h (Fig.1), sólo una mínima fracción (2 g/L) es transformada a acetato y succinato (datos no mostrados). La cepa progenitora (*E. coli* MG1655) cultivada en las mismas condiciones presenta una velocidad de crecimiento de 0.42 h<sup>-1</sup>, mientras que la cepa L-lactogénica crece a 0.29 h<sup>-1</sup>, probablemente debido a que la interrupción en el gen que codifica para la piruvato formato liasa (*pf1B*) disminuye la generación de Acetil-CoA y de ATP en la vía de síntesis de acetato. En la cepa obtenida se inactivaron los genes que compiten por la disponibilidad del piruvato, por lo tanto la única vía para regenerar NAD<sup>+</sup> y mantener el equilibrio redox es a través de la enzima heteróloga.

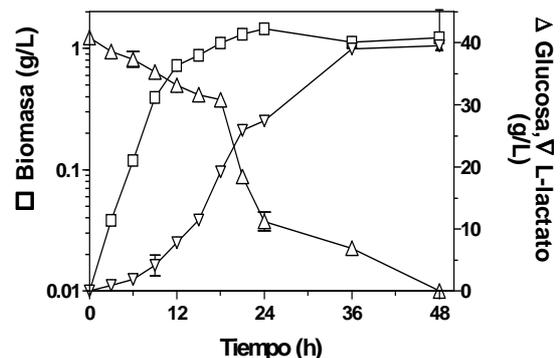


Fig. 1. Caracterización de la cepa L-lactogénica en medio mineral-glucosa 40 g/L en condiciones de fermentación.

Los lactobacilos presentan productividades volumétricas entre 1 y 4 g/L h de lactato en cultivos lote en medios ricos. En este trabajo el L-lactato se obtuvo ópticamente puro con una productividad volumétrica de 1.33 g/L h durante la fase de crecimiento. Trabajos previos (3) han demostrado que es posible generar cepas de *E. coli* productoras de L-lactato al reemplazar el gen *ldhA* de *E. coli* B con el gen *ldh* *Streptococcus bovis*. Estos autores obtuvieron un rendimiento de 0.61 g<sub>L-LACTATO</sub>/g<sub>GLUCOSA</sub> y una productividad volumétrica de 0.70 g/L h en medio rico-glucosa. Esto demuestra que *E. coli* modificada es una alternativa que permite competir con tecnologías actuales de producción de L-lactato, pero empleando condiciones y medios de cultivo simples.

**Conclusiones.** La cepa lactogénica es en términos prácticos homofermentativa y produce L-lactato a partir de glucosa con rendimientos del 95% respecto al teórico. La presencia de acetato es atribuible a que la cepa está empleando vías alternas de generación de acetil CoA y acetato.

**Agradecimiento** Fondos CONACyT-SAGARPA-2004-C01-22 y UNAM: PAPIIT-DGAPA-IN220908.

#### Bibliografía.

- Hieto, T. (2005). Poly lactide stereocomplexes: formation, structure, properties, degradation and applications. *Molec. Biosci.* 5: 569-597
- Datsenko, K, Wanner, B. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl. Acad. Sci USA.* 97: 6640-6645
- Dien, B. S. Nichols, N. (2001) Recombinant *Escherichia coli* engineered for production of L-lactic acid from hexose and pentose sugars. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 27: 259-264