



INGENIERÍA METABÓLICA PARA LA PRODUCCIÓN DE R-3-HIDROXIBUTIRATO EN *ESCHERICHIA COLI* AUMENTANDO LA DISPONIBILIDAD DE NADPH.

Mauricio García Benítez, Alejandra Vargas Tah, Georgina Hernández Chávez, Guillermo Gosset Lagarda, Alfredo Martínez Jiménez. Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado postal 510-3, 62210, Cuernavaca, MOR, México. maugarb@ibt.unam.mx.

Escherichia coli, NADPH, R-3-hidroxitirato.

Introducción. El R-3-hidroxitirato (R3HB) es el monómero base dentro de los polihidroxicanoatos (PHA's), con aplicaciones como químico de partida para la elaboración de antibióticos, feromonas y vitaminas. Biotecnológicamente su producción puede llevarse a cabo utilizando la vía de síntesis de los PHA's y sustituyendo la polimerasa por una tioesterasa, la cual cataliza la remoción de Coenzima A en el precursor directo del R3HB (1; Fig. 1). Un paso limitante en la producción de este y otros compuestos de interés industrial es la disponibilidad del cofactor NADPH en la célula; por lo cual se han realizado estudios para aumentar su disponibilidad utilizando la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP (GapN) de *Streptococcus mutans* (2).

El objetivo de este estudio es acoplar la generación de NADPH mediante una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa heteróloga y crear una ruta sintética de producción del R3HB en *E. coli*, a partir de la vía de síntesis de PHA's de *Azotobacter vinelandii* (Fig. 1).

Metodología. Se realizó la construcción del vector pTrc-R3HB, mediante la clonación de los primeros genes de la vía de síntesis de PHA's de *Azotobacter vinelandii* (*phbB* y *phbA*) y el gen *tesB* de *E. coli* que codifica para la tioesterasa II en el vector pTrc992A. El gen *gapN* de *S. mutans*, optimizado para uso preferencial de codones en *E. coli* (OptimumGene™ Codon Optimization system, GenScript, USA), fue integrado en cromosoma mediante una variante del método de inactivación cromosomal en un paso usando productos de PCR (3). Esta se llevó a cabo en la cepa AV14 la cual carece de todas las vías nativas de fermentación de *E. coli*, incluyendo las vías descritas de producción de acético (Fig. 1). La cepa obtenida denominada AV14N1 se transformó con el vector pTrc-R3HB. Los cultivos se realizaron a 37°C en medio mineral en matraces de 500 mL con 50 mL de medio y 5 g/L de Glucosa y en biorreactores de 1 L con 750 mL de medio y 50 g/L de Glucosa. La inducción del vector fue realizada con 0.1 mM de IPTG durante la fase de crecimiento exponencial. La cuantificación de glucosa y R3HB se realizó mediante HPLC.

Resultados. Se obtuvo la cepa AV14N1 con la integración cromosomal del gen *gapN* río abajo del gen endógeno *gapA*, bajo el control del promotor nativo de este gen en una estructura de operón en tándem. En pruebas de crecimiento y producción de acetato en

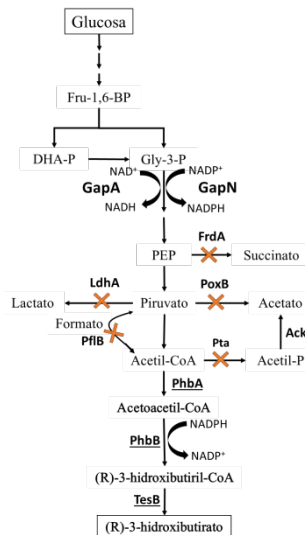


Fig1. Esquema de las vías metabólicas para la conversión de Glucosa a R3HB en la cepa AV14N1.

condiciones aeróbicas, a nivel de matraz, no se encontró diferencia significativa en el crecimiento entre la cepa parental AV14 y la cepa AV14N1, y la producción de acetato fue prácticamente nula.

La Producción del R3HB se realizó a nivel de biorreactor con la cepa AV14N1 / pTrc-R3HB. Con 0.3 vvm y 460 rpm, a 41 h de cultivo se obtuvieron 5.8 g/L de R3HB (Fig. 2), indicando que es

posible acoplar la generación de NADPH a la producción heteróloga de R3HB en *E. coli*.

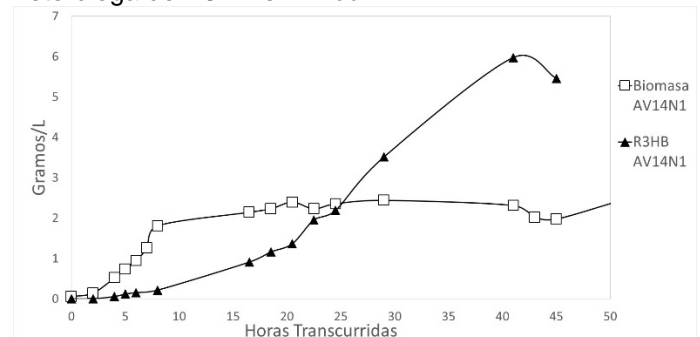


Fig. 2. Cinética de crecimiento y producción de R3HB en biorreactor con la cepa de *E. coli* AV14N1 / pTrc-R3HB.

Conclusiones. La integración del gen *gapN* no causó efectos negativos en el crecimiento de la cepa. Así mismo, se logró la producción eficiente de R3HB a partir de glucosa en *E. coli*.

Agradecimiento. Al apoyo otorgado por DGAPA-PAPIIT-UNAM IT201414.

Bibliografía.

1. Liu, Q., Ouyang, S., Chung, A., Wu, Q., Chen, G. (2007). *Appl Microbiol Biotechnol.* 76(4): 811-818.
2. Centeno-Leija, S., Huerta, G., Giles-Gómez, M., Bolivar, F., Gosset, G., Martínez, A. (2014). *Antonie van Leeuwenhoek.* 105(4): 687-696.
3. Datsenko, K. A, Wanner, B. L. (2000). *PNAS USA.* 97(12): 6640-6645.