



INGENIERIA METABÓLICA PARA LA PRODUCCIÓN DE D-LACTATO EN *ESCHERICHIA COLI*: EFECTO DE LA LIMITACIÓN DE ATP EN EL FLUJO GLUCOLÍTICO Y PRODUCTIVIDAD DE LACTATO.

JOSÉ UTRILLA, GUILLERMO GOSSET, ALFREDO MARTÍNEZ

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Instituto de Biotecnología – UNAM.
Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Mor. 62210, México. Fax (+777) 329 1601. utrilla@ibt.unam.mx

Palabras clave: lactato, ATP, Escherichia coli

Introducción. Debido a su uso en la manufactura de plásticos biodegradables de alta calidad, conocidos por el nombre genérico de polilactatos (PLA), la demanda de lactato se está incrementando sustancialmente. La síntesis y las propiedades físicas y de biodegradación del PLA dependen de la relación usada de los enantiómeros ópticamente puros [1]. Las bacterias lácticas tienen requerimientos nutricionales complejos, consecuentemente no pueden crecer en fuentes simples de carbono y sales inorgánicas de nitrógeno [1] [2]. Por lo que los medios para la producción deben ser suplementados con fuentes de nitrógeno complejas (extracto de levadura, sólidos de licor de maíz, harina de soya, etc.), esto incrementa de manera significativa el costo de producción y purificación del producto. *Escherichia coli* produce D-lactato como parte de una mezcla de productos de fermentación y crece bien en medios minerales.

El objetivo de este trabajo fue obtener cepas de *E. coli* capaz de producir D-lactato ópticamente puro en medios minerales con alta productividad y rendimiento.

Metodología. Basados en antecedentes y evidencias metabólicas, se evaluó el efecto de la interrupción en *E. coli* MG1655 de los genes que codifican para: a) piruvato formato liasa (*pflB*) b) alcohol deshidrogenasa (*adhE*) c) fumarato reductasa (*frdA*), sobre las velocidades específicas de crecimiento, de consumo de glucosa y de producción de D-lactato y otros ácidos orgánicos. Las cepas CL1 (*E. coli* MG1655 $\Delta pflB \Delta adhE$) y CL3 (*E. coli* MG1655 $\Delta pflB \Delta adhE \Delta frd$) fueron evaluadas por duplicado en minifermentadores sin aireación (pH.7), 100 rpm de agitación usando medio mineral glucosa 4%.

Resultados y discusión. Se obtuvieron cepas interrumpidas en las vías que compiten por piruvato y cofactores reducidos, y cuya única vía para crecer en anaerobiosis es la producción de D-lactato. En la cepa CL1 se abatió por completo la producción de formato y etanol, y se redujo drásticamente la producción de acetato y succinato, y dicha cepa tiene un rendimiento de producción de lactato de 95% con respecto al teórico ($1 \text{ g}_{\text{Lact}} / \text{g}_{\text{Glu}}$). La interrupción de la piruvato formato liasa trae como consecuencia una reducción del 36% en la velocidad específica de crecimiento, atribuida a la reducción en la poza de AceCoA y a la reducción del rendimiento de ATP por mol de glucosa debido a la incapacidad de la célula para producir acetato como la cepa

silvestre. Se ha reportado que la disminución de ATP incrementa el flujo glucolítico [3], en este caso como respuesta de la a la disminución de dicho rendimiento debido a la reducción de la producción de acetato, la cepa CL1 aumenta 80% su flujo glucolítico. En consecuencia, la productividad volumétrica alcanzada fue de $1.1 \text{ g}_{\text{Lact}}/\text{L.h}$, productividad comparable a la obtenida por bacterias lácticas en medios ricos [1]. La cepa CL3 presenta una velocidad específica de crecimiento igual a CL1 y flujo glucolítico mayor y en ella se abatió la producción de succinato (mediante la inactivación de *frdA*), y de tal manera se aumento la productividad volumétrica a $1.66 \text{ g}_{\text{Lact}}/\text{L.h}$ con rendimiento del 95%.

Tabla 1. Comparación de parámetros cinéticos y rendimientos de las cepas evaluadas

Parámetro	MG1655	CL1	CL3
μ (h^{-1})	0.38	0.25	0.25
q_{Glu} ($\text{g}_{\text{Glc}}/\text{g}_{\text{DWC.h}}$)	4.44	7.96	8.8
q_{Lact} ($\text{g}_{\text{Lact}}/\text{g}_{\text{DWC.h}}$)	0.097	5.32	5.23
Q ($\text{g}_{\text{Lac}}/\text{L.h}$)	0.31	1.11	1.66
Rendimiento global de conversión de glucosa a lactato (% del teórico) MG1655 = 40 CL1 = 95 CL3 = 95			

Conclusiones. Se obtuvo una cepa de *E. coli* en la que se eliminó la producción de formato, etanol y succinato, capaz de producir D-lactato ópticamente puro con un rendimiento del 95%. Debido a la limitación de ATP en esta cepa se incrementó el flujo glucolítico. Esto permitió conseguir altas productividades específicas y volumétricas de D-Lactato usando medio mineral-glucosa 4%.

Agradecimientos. Al financiamiento otorgado por los proyectos: CONACYT-SAGARPA:2004-CO1-224, CONACYT-MORELOS: 2004-CO2-048

Bibliografía .

- [1] John R.P., Nampoothiri K.M., Pandey A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. 2007 *Appl Microbiol biotechnol* DOI 10.1007/s00253-006-0779-6
- [2] Narayanan N., Roychoudhury P.K., Srivastava A., 2004. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Elec J Biotechnol* 7-2: 167-179
- [3] Koebmann B.J., Westerhoff H.V., Snoep J.L., Nilsson D., Jensen P.R., 2002. The Glycolytic Flux in *Escherichia coli* Is Controlled by the Demand for ATP. *J Bacteriol* 14: 3909-3916