



## OBTENCIÓN DE CEPAS DE *Escherichia coli* SOBREPDUCTORAS DE HIDRÓGENO A PARTIR DE LACTOSUERO

Luis Manuel Rosales Colunga,<sup>1</sup> Elías Razo Flores,<sup>2</sup> Antonio De León Rodríguez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>División de Biología Molecular, <sup>2</sup>División de Ciencias Ambientales, IPICYT, Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4ª secc. CP78216, San Luis Potosí, SLP. Tel. + (444)8342000 Ext. 2057, Fax + (444)8342010. E-mail: aleonr@ipicyt.edu.mx

*Palabras clave:* hidrógeno, lactosuero, *E. coli* W3110.

**Introducción.** Los problemas causados por la contaminación ambiental y la disminución de las reservas mundiales de petróleo han conducido a la búsqueda de nuevas fuentes energéticas que permitan un desarrollo sustentable. El hidrógeno parece ser una buena alternativa ya que se puede utilizar en celdas de combustible y solo genera calor y vapor de agua como subproducto. La producción biológica de hidrógeno presenta algunas ventajas respecto a otras formas de obtención, debido a que se lleva a cabo a temperatura ambiente y bajas presiones, además se puede acoplar a la utilización de subproductos orgánicos. El objetivo de este trabajo es la construcción y uso de cepas de *E. coli* manipuladas genéticamente para realizar la fermentación anaerobia de lactosuero (subproducto de la industria de lácteos) y obtener como producto principal hidrógeno molecular. Se escogió la cepa de *E. coli* W3110 que es capaz de utilizar la lactosa del lactosuero como fuente de carbono.

**Metodología.** Se siguieron dos estrategias: la primera consistió en la remoción del gen *hycA*, que produce el regulador negativo del operón del formiato, debido a que a través de esta ruta se produce el hidrógeno en *E. coli* (1, 2). La segunda estrategia consistió en obtener mutantes de la vía Tat, mediante la remoción del gen *tatC*. El producto de este gen tiene un papel fundamental en la vía Tat del transporte de formiato deshidrogenasas e hidrogenasas que compiten por los electrones que darían origen a hidrógeno molecular. De tal forma que las cepas Tat<sup>-</sup> presentan un fenotipo similar a las cepas *hycA*<sup>-</sup> referente a la capacidad de sobreproducir hidrógeno (3). Para llevar a cabo la remoción de cada uno de los genes se siguió el método descrito en (4), utilizando los plásmidos pKD3 y pKD46.

**Resultados y discusión.** Se realizó la transformación de la cepa de *E. coli* W3110 con el plásmido pKD46. Posteriormente, en algunas colonias se comprobó la presencia del plásmido pKD46 por restricción con *EcoRI*. La digestión origina un patrón característico para dicho plásmido formado por los fragmentos de 1.5 Kpb y 4.8 Kpb. El plásmido pKD3 se utilizó como molde para amplificar por PCR una región que comprende el gen de resistencia a cloranfenicol, utilizando oligonucleótidos específicos para realizar la remoción de los genes *hycA* y *tatC*. Estos productos de PCR se utilizaron para transformar células de *E. coli* W3110/pKD46 crecida en medio LB y la inducción se realizó con 0.15 g/l de arabinosa. Las colonias que crecieron en cloranfenicol se evaluaron por PCR de colonia

con oligonucleótidos específicos para el gen *hycA* (OGH), *tatC* (OGT) y para el gen de resistencia a cloranfenicol (ORC). En el caso de las cepas  $\Delta hycA$  (Fig. 1A), la cepa transformada origina un producto de 1.1 Kpb con los oligonucleótidos ORC y un producto de 1.3 Kpb con los oligonucleótidos OGH, mientras que la cepa silvestre no generó producto de PCR con los oligonucleótidos ORC, y utilizando el par OGH se obtuvo un producto de 700 pb correspondiente al gen *hycA*. En el caso de las cepas  $\Delta tatC$  (Fig. 1B), utilizando los oligonucleótidos ORC, la cepa silvestre no generó producto, y la mutante originó un producto de 1.1 Kpb, utilizando los oligonucleótidos OGT la cepa silvestre generó un producto de 900 pb correspondiente al gen *tatC* y la cepa transformada generó un producto de 1.2 Kpb que corresponde al gen de resistencia cloranfenicol.

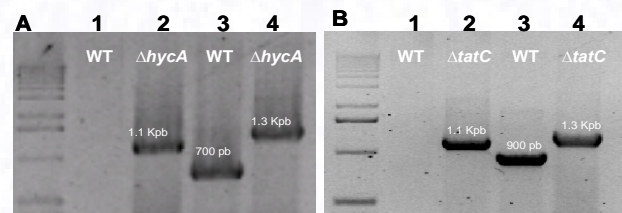


Fig. 1. Productos de PCR de colonia de las cepas silvestre (WT), mutante *hycA* ( $\Delta hycA$ ) y mutante *tatC* ( $\Delta tatC$ ) de *E. coli* W3110.

**Conclusiones.** El tamaño de los fragmentos amplificados por el PCR de colonia demostró la remoción de los genes y que se obtuvieron las cepas *E. coli* W3110  $\Delta hycA$  y de *E. coli* W3110  $\Delta tatC$ . El siguiente paso es la evaluación de la capacidad de producción de hidrógeno por cada cepa.

**Agradecimientos.** El trabajo fue financiado por el proyecto FOMIX SLP-2005-C01-23.

### Bibliografía.

- Leonhartsberger, S, Korska, I, Böck, A. (2002). The Molecular Biology of Formate Metabolism in Enterobacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4(3): 269-276.
- Sawers, R, G. (2005). Formate and its role in hydrogen production in *Escherichia coli*. *Biochemical Society Transactions* 3(1) 42-46
- Penfold, D,W, Sargent, F, Macaskie, L, (2006) Inactivation of the *Escherichia coli* K-12 twin-arginine translocation system promotes increased hydrogen production. *FEMS Microbiol. Lett* 262 135-137.
- Datsenko, K, A, Wanner, B, L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6640-6645.