

EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE *ESCHERICHIA COLI* PARA OBTENER CEPAS TOLERANTES A ETANOL USANDO UN PLÁSMIDO MUTADOR.

Teresa Brito, Guillermo Gosset, Alfredo Martínez. Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad # 2001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Mor., México. C.P. 62210. albavera@ibt.unam.mx, Tel/Fax: (777) 3291601.

Palabras clave: Etanol, tolerancia, Escherichia coli.

Introducción. La producción de etanol carburante a partir de residuos agroindustriales requiere de microorganismos que asimilen los azúcares generados en la hidrólisis ácida (pentosas y hexosas) y que sean resistentes a los compuestos tóxicos que se forman (furanos, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos) (1). *Escherichia coli* etanologénica construida mediante técnicas de Ingeniería de Vías Metabólicas, cumple con estos requisitos, pero su principal limitación radica en su baja tolerancia al etanol que produce (1).

La generación de cepas más robustas y tolerantes, requiere de la acumulación de muchas mutaciones favorables (2). Se ha comprobado que las mutaciones se pueden incrementar con un plásmido mutador que contiene el alelo *mutD5* que codifica para una subunidad ϵ de la DNA polimerasa III no funcional (2).

En el presente trabajo utilizamos estrategias de evolución dirigida enfocadas a generar mutantes de *E. coli* W3110 capaces de crecer en concentraciones elevadas de etanol usando un plásmido mutador.

Metodología. Para aumentar la frecuencia de mutación se transformó a *E. coli* W3110 con el plásmido mutador (pMutD5) y un plásmido control (pNMut). La evolución se llevó cabo en tubos estáticos combinando dos métodos reportados (2 y 3). Se inició con una concentración de 35 g/l de etanol, con incrementos de 5 g/l hasta alcanzar 60 g/l. Cuando se alcanzaron concentraciones de 50, 55 y 60 g/l, se realizaron ensayos de sobrevivencia a etanol y n-propanol. A cepas seleccionadas se les determinó la concentración mínima inhibitoria para etanol (MIC_{EtOH}) en pruebas dosis-respuesta a 30 °C, sin agitación. Para evaluar el desempeño de las mutantes en la producción de etanol, se transformaron con el plásmido pLOI510, que contiene los genes que codifican para las enzimas piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa de *Zimomonas mobilis* y se realizaron cultivos en minifermentadores no aireados, a 35 °C, en medio Luria-Bertani con 100 g/l de glucosa.

Resultados y discusión. En la Tabla 1 se presentan los valores de MIC_{EtOH} de tres mutantes seleccionadas y la cepa original. Las cepas evolucionaron durante 36 días (aproximadamente 32 generaciones). Se observa un incremento en la tolerancia en las cepas que fueron sometidas a la evolución con el plásmido mutador, mientras que aquellas que se sometieron al mismo tratamiento peor con el plásmido control no incrementaron su tolerancia a etanol.

Las cepas seleccionadas de los tubos a 55 y 60 g/l, con el plásmido mutador resultaron 10 y 15 g/l más tolerantes que su cepa progenitora y que la cepa de *E. coli* con mayor MIC_{EtOH} reportada en la literatura (LY01).

Tabla I. Valores de MIC_{EtOH} de cepas aisladas en este trabajo y etanologénicas (LY01 y KO11) (3).

Cepa	MIC_{EtOH}
W3110	55
LY01	50
KO11	40
W3110/pMutD5-50	55
W3110/pMutD5-55	65
W3110/pMutD5-60	65
W3110/pNMut-50	55
W3110/pNMut-55	55
W3110/pNMut-60	55

Adicionalmente, se comprobó que el mecanismo de resistencia no se da a través del consumo del alcohol.

En cultivos no aireados de las cepas mutantes curadas del plásmido mutador y transformadas en etanologénicas con el plásmido pLOI510, se encontró que tienen una velocidad específica de crecimiento similar a la silvestre (0.10 h^{-1} , comparada con 0.088 h^{-1}) y una productividad específica para etanol de $0.36 \text{ g}_{EtOH}/\text{g}_{CEL}\text{h}^{-1}$ en contraste con $0.28 \text{ g}_{EtOH}/\text{g}_{CEL}\text{h}^{-1}$ que se obtuvo con la silvestre.

Conclusiones. Con el uso del plásmido mutador, fue posible aislar cepas con una MIC_{EtOH} 10 g/l mayor que la cepa progenitora. En cultivos no aireados de las cepas mutantes, transformadas con el plásmido pLOI510 se probó que la velocidad específica de producción de etanol es 25% mayor en comparación con la cepa silvestre.

Agradecimiento. Se reconoce el apoyo financiero del CONACyT proyecto Z-003. Teresa Brito agradece las becas CONACyT # 169934 y DGEP que le fueron otorgadas.

Bibliografía.

- Ingram, L, Gómez, P, Lai, X, Moniruzzaman, M, Wood, E, Yomano, L, York, S, (1998). Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. *Biotechnol. Bioeng.* 58 (2-3): 204-214.
- Selifonova, O, Valle, F, Schellenberger, V. (2001). Rapid evolution of novel traits in microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (8): 3645-3649.
- Yomano, L, York, S, Ingram L. (1998). Isolation and characterization of ethanol-tolerant mutants of *Escherichia coli* KO11 for fuel ethanol production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20: 132-138.

