

DESARROLLO DE UN OPERÓN ARTIFICIAL PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL EN *ESCHERICHIA COLI*

Susana Romero, Alfonso Gómez, Paul Gaytan, Alfredo Martínez, Enrique Merino
Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM.
Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Mor., CP 62210, México.
Tel (777) 3291601, Fax (777) 3172388. sugarcia@ibt.unam.mx

Palabras clave: *E. coli*, piruvato descarboxilasa, etanol.

Introducción. Los microorganismos silvestres etanologénicos como *Zymomonas mobilis* no metabolizan xilosa ni arabinosa pero presentan otras características ventajosas para la producción de etanol como el poseer enzimas con constantes de afinidad mejores para redirigir el flujo de carbono de piruvato hacia etanol. De esta forma es deseable aprovechar de microorganismos silvestres, características innatas y útiles para la construcción de cepas nuevas que por ejemplo sobreexpresen los genes que codifican para las enzimas piruvato descarboxilasa (*pdc*) y alcohol deshidrogenasa (*adhB*) de *Z. mobilis*, que además metabolizan los azúcares presentes en residuos agroindustriales de bagazo de caña. A partir de *E. coli* se han construido cepas que producen etanol metabolizando los azúcares más abundantes en los residuos agroindustriales como xilosa, glucosa, arabinosa y manosa (1).

Con este objetivo, se construyó un operón artificial para la producción de etanol, cuya región reguladora puede ser reconocida por bacterias Gram positivas y Gram negativas, como *E. coli* y *B. subtilis* respectivamente, en un vector reconocido por ambas (replicativo en *E. coli* e integrativo en *B. subtilis*).

Metodología. El diseño del operón artificial incluyó los siguientes elementos en tándem: el promotor del gen *aprE* (*PaprE*), sitio de unión a ribosoma (RBS), gen *pdc*, RBS, gen *adhB* y el terminador de la transcripción del gen *cryIII* de *Bacillus thuringiensis* (Fig. 1).

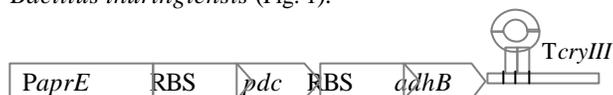


Figura 1. Diseño del operón etanologénico.

PaprE es un promotor fuerte y constituye la región reguladora del gen que codifica para la subtilisina, enzima que *B. subtilis* sintetiza en la fase estacionaria. En nuestro caso utilizamos la secuencia del promotor *aprE* que tiene la modificación consenso TTGACA en la caja -35(2).

La construcción del operón se llevó a cabo mediante la amplificación por PCR de cada uno de sus elementos. Cada elemento por separado se clonó en el vector pTOPO-Blunt. Después ayudados por los sitios de restricción que enmarcaban a cada elemento, se construyó el operón, sumando cada uno de éstos en pUC19, dando lugar a la clona pUC-operón. Finalmente, el operón etanologénico se cortó y ligó al vector pSG-BFAE (plásmido integrativo para *B. subtilis*), obteniendo la clona pSG-operón.

En las cepas obtenidas se evaluó la actividad de PDC, la producción de etanol y el rendimiento etanol/glucosa ($Y_{EtOH/Glc}$), a partir de cultivos en matraces de 125ml con 50 ml de medio luria suplementado con 20 g/l de glucosa, realizados a 120 rpm y 30°C. Las actividades se determinaron en fase de crecimiento y la producción de etanol se evaluó a las 24 horas de iniciado el cultivo.

Resultados y discusión. *E. coli* KO11 es una cepa productora de etanol que se utilizó como control positivo, *E. coli* XLI-Blue silvestre fue incluida como control negativo.

Cuadro 1. Evaluación de la actividad de PDC, producción de etanol y rendimiento etanol/glucosa (Y) en *E. coli* XLI-Blue.

Cepas	??? h ⁻¹	PDC U/mg prot	Etanol g/l	Y _{EtOH/Glc}
KO11	0.64	0.66	6.40	0.33
XLI-Blue	0.35	0.0	0.0	0.0
XLI-Blue/pUC-operón	0.39	1.11	5.55	0.38
XLI-Blue/pSG-operón	0.32	1.76	6.95	0.42

Las cepas modificadas crecieron de manera similar a la cepa silvestre, lo que indica que la presencia del plásmido no ocasionó un problema de carga metabólica. El operón construido es funcional ya que una cepa que originalmente no es etanologénica llega a producir etanol al contener el operón construido en este trabajo, y aunque XLI-Blue no es una cepa robusta de producción, la cantidad de etanol producida es comparable con la cantidad obtenida en KO11.

Conclusiones. La sobreexpresión de los genes que codifican para las enzimas piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa de *Z. mobilis* bajo la regulación de *PaprE* en *E. coli* XLI-Blue conduce a un rendimiento de EtOH/Glc comparable con una cepa robusta de producción de etanol como lo es KO11. Por otra parte, el plásmido construido podrá ser integrado en *B. subtilis*.

Agradecimiento. Se agradece el apoyo financiero de CONACyT proyecto Z-003, y el apoyo técnico de Mercedes Enzaldo.

Bibliografía. 1. Martínez, A., York, SW., Yomano, LP., Pineda, VL., Davis, FC., Shelton, JC., Ingram, LO. (1999) Biosynthetic burden and plasmid burden limit expression of chromosomally integrated heterologous genes (*pdc*, *adhB*) in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog.* 15: 891-897.

2. Jan, J., Valle, F., Bolivar, F., Merino E. (2001) Construction of protein overproducer strains in *Bacillus subtilis* by an integrative approach. *Appl Microbiol Biotechnol.* 55: 69-75.

