



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CINÁMICO Y ACIDO *p*-HIDROXICINÁMICO EN *Escherichia coli*.

Ana Alejandra Vargas-Tah, Georgina Hernández, Luz María Martínez, Mario Rocha, Alfredo Martínez, Francisco Bolívar y Guillermo Gosset.

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM. A.P. 510-3. Cuernavaca, Mor. 62250, México. Correo electrónico: gosset@ibt.unam.mx

Palabras clave: Fenilalanina Amonio Liasa, ácido cinámico, ácido *p*-hidroxicinámico.

Introducción. Los ácidos cinámico (CA) y *p*-hidroxicinámico (pHCA) son dos compuestos de interés industrial, pues son precursores de saborizantes, fármacos (resveratrol), cosméticos, *p*-hidroxiestireno, etc. Estos ácidos son producidos principalmente en plantas como una continuación de la vía de los aminoácidos aromáticos. El CA se produce por la desaminación de la fenilalanina (FEN) a través de la enzima Fenilalanina Amonio Liasa (PAL por sus siglas en inglés); y el pHCA por la desaminación de la tirosina (TIR) con la actividad Tirosina amonio Liasa (TAL) de la misma enzima.

En el grupo de investigación donde se realiza el presente trabajo se clonó la enzima PAL/TAL de *Rhodotorula glutinis* en el plásmido pRW300 (1). Éste plásmido fue expresado junto con el pACYCtyrCpheA (2) en dos cepas de *Escherichia coli* (W3110 y VH33), con el fin de evaluar la producción de ambos ácidos. La cepa W3110 es una cepa silvestre, mientras que la VH33 es una cepa carente del sistema PTS que dispone de mayor flujo de carbono hacia la vía de los aminoácidos aromáticos (3).

Metodología. A partir del RNA total de *R. glutinis* se obtuvo cDNA, del cual se amplificó con oligos específicos el gen PAL para ser clonado en el plásmido pTrc99A (pTrcPALRg). Posteriormente, el gen se subclonó incluyendo la región promotora y los terminadores de pTrc99A en el plásmido pRW300 (pRwPALRg). Para determinar la funcionalidad del gen fue determinada la bioconversión de la TIR y de la FEN en sus respectivos ácidos. La producción de CA y pHCA fue evaluada en medio M9 con 10 g/L de glucosa como única fuente de carbono, a 37 °C y 300 rpm. La inducción de los plásmidos se realizó con 0.1 mM de IPTG. La cuantificación de TIR, FEN, CA y pHCA se realizó por HPLC.

Resultados. Los resultados de bioconversión de la TIR (Fig.1a) muestran que ésta es convertida a pHCA por la enzima PAL/TAL de *R. glutinis*, observándose así la actividad TAL; así mismo se observó en la conversión de la FEN a CA (Fig. 1b). Los datos muestran que la enzima es funcional en sus dos actividades.

Las productividades (Fig. 2), muestran que en el fondo W3110 los plásmidos que contienen la PAL y dirigen flujo de carbono hacia TIR, producen principalmente pHCA; indicando que toda la TIR producida es transformada a

pHCA. Sin embargo, hay una elevada acumulación de FEN. Este mismo efecto se observó en el fondo VH33, no obstante, el CA se produjo en mayor cantidad. De los dos fondos evaluados, el fondo VH33 es el más apto para la producción de los ácidos aromáticos. Los resultados sugieren que el paso limitante para la producción es la estabilidad de la enzima PAL y su afinidad a cada uno de sus sustratos.

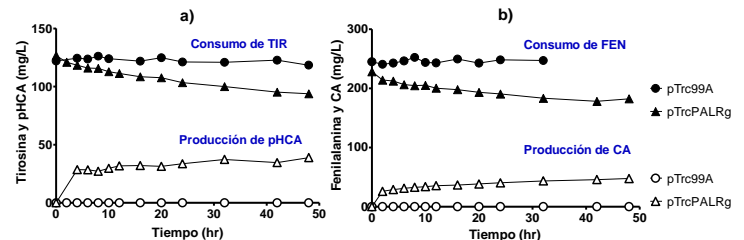


Fig. 1. Bioconversión de a) TIR a pHCA y b) FEN a CA. Fue realizada en medio M9 sin fuente de carbono, a 37 °C y 300 rpm.

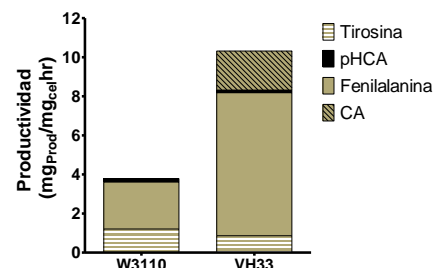


Fig 2. Productividades de TIR, FEN, pHCA y CA en las cepas evaluadas

Conclusiones. Se observó la producción de ambos ácidos en *E. coli*, siendo el fondo más adecuado el PTS. Se deberá seleccionar una enzima más afín al sustrato del ácido que se desee producir en mayor proporción. Para este fin, se ha iniciado la clonación y evaluación del gene PAL de *Arabidopsis thaliana*.

Agradecimiento. Al CONACyT por la beca de doctorado otorgada a Ana Alejandra Vargas Tah.

Bibliografía.

- Gosset G., Yong-Xiao J., Berry A. (1996) *J. Ind. Microbiol.* 17: 47-52.
- Chávez Béjar M.I. (2010). Tesis Doctoral. Ingeniería de vías metabólicas para la producción de tirosina y melanina a partir de glucosa en *E. coli*. Instituto de Biotecnología. UNAM.
- Hernández-Montalvo V., Martínez A., Hernández-Chávez G., Bolívar F., Valle F., Gosset G. (2003). *Biotech. and Bioeng.* 83, 687-694.