



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



EFFECTO DE LA INDUCCIÓN EN LA EXPRESIÓN DEL GEN *phaG* SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LOS BIOPLÁSTICOS SINTETIZADOS POR UNA CEPA RECOMBINANTE DE *Azotobacter vinelandii*.

Miguel Mejía, Carlos Peña, Guadalupe Espín y Daniel Segura

Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM Apdo. Post. 510-3, Cuernavaca, 62210 Morelos, MÉXICO Tel: (777) 329 16 29, e-mail: miguelm@ibt.unam.mx.

Palabras clave: *phaG*, PHAs, *Azotobacter*, recombinante.

Introducción. *Azotobacter vinelandii* produce poliésteres llamados polihidroxicanoatos (PHAs) que son de interés industrial, por lo que pueden ser usados como plásticos biodegradables. Esta bacteria produce polihidroxibutirato cuando crece en carbohidratos y un copolímero de hidroxibutirato e hidroxivalerato en pentanoato o heptanoato. Sin embargo, *Pseudomonas putida* es capaz de sintetizar PHAs con otro tipo de hidroxialcanoatos a partir de carbohidratos. En este caso la formación de precursores para la síntesis de PHAs se da a través de la vía de síntesis de novo de ácidos grasos. En *P. putida* el vínculo entre la síntesis de novo de ácidos grasos y la síntesis de PHAs, es proporcionado por una β -hidroxilacil ACP:CoA aciltransferasa.

El objetivo del presente estudio fue construir una cepa recombinante de *A. vinelandii* capaz de expresar la β -hidroxilacil-ACP:CoA aciltransferasa con la finalidad de producir diversos tipos de bioplásticos con composición monomérica controlada.

Metodología. El aislamiento del DNA geonómico y plasmídico, la digestión del DNA con endonucleasas de restricción y la transformación de *A. vinelandii* se llevaron a cabo mediante procedimientos estándar. La cepa recombinante de *A. vinelandii* se cultivó en medio PY. Los cultivos se desarrollaron en matraces agitados de 250 ml con 50 ml de volumen de llenado a 30 °C durante 72 horas. La composición de los PHAs aislados se analizó por cromatografía de gases.

Resultados. Para expresar la enzima ACP:CoA aciltransferasa se implementó un sistema que permitiera controlar la expresión del gen *phaG* (que codifica para esta enzima) de *P. putida* en *A. vinelandii*. Se fusionó el gen *phaG* con el promotor del gen *scrX* (*pscrX*), el cual es inducible por sacarosa, realizando una integración cromosómica, (Fig. 1) [1]. Durante los cultivos sin inducir la expresión del gen *phaG*, la cepa recombinante tuvo un comportamiento similar a la cepa silvestre de *A. vinelandii*, exhibiendo el mismo patrón de crecimiento, utilización de la fuente de carbono y producción del β -polihidroxibutirato. La expresión del gen *phaG* en la cepa recombinante durante los cultivos donde se realizó la inducción, tuvo un efecto notable sobre el crecimiento de la cepa, provocando una disminución en el crecimiento celular. Reduciendo de este modo la concentración de biomasa en aproximadamente un 50 %. Sin embargo, el análisis realizado de la composición monomérica de los

polímeros acumulados por la cepa recombinante, demostró que al inicio del cultivo el PHA sintetizado por la cepa recombinante está conformado exclusivamente por unidades estructurales de hidroxibutirato (Fig. 2a). 12 h después de la inducción se puede observar que la composición monomérica del PHA se modifica, obteniendo un copolímero constituido por unidades de hidroxibutirato-co-hidroxihexanoato, contribuyendo en ~ 90 y 10 % respectivamente (Fig. 2b).

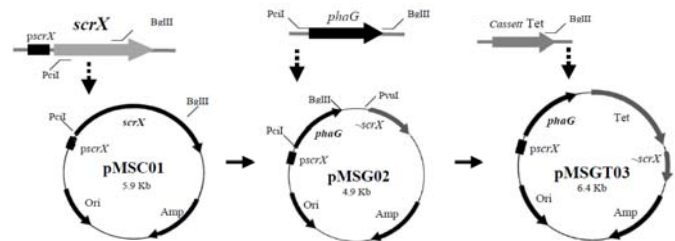


Fig. 1. Construcción de los plásmidos empleados en este trabajo.

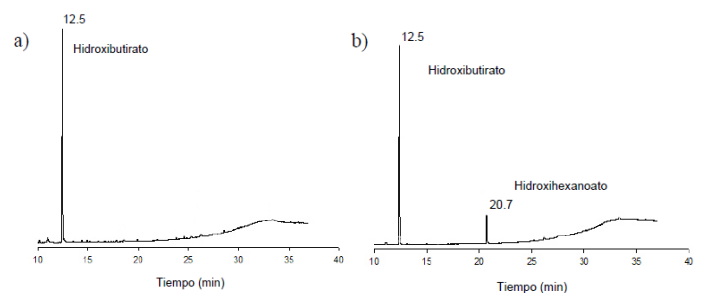


Fig. 2. Análisis cromatográfico de los PHAs obtenidos de la cepa recombinante de *A. vinelandii*.

Conclusiones. La ACP:CoA aciltransferasa clonada a partir de *P. putida* es funcionalmente activa en *A. vinelandii*, estableciendo una nueva ruta metabólica que permite emplear la vía de novo de ácidos grasos para generar un nuevo tipo de bioplástico.

Agradecimiento. Al apoyo financiero de CONACyT proyecto No. 127979 y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, UNAM, IN221809-3.

Bibliografía.

1. Johnson, D., Unciuleac, M., Dean, D. (2006). *J Bacteriol.* 188: 7551-7561.