



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



ANCLAJE DE LA BETA-GLUCOSIDASA DE *Thermobifida fusca* EN LA MEMBRANA DE *Escherichia coli* ETANOLOGÉNICA PARA METABOLIZAR CELOBIOSA A ETANOL

Iván Muñoz Gutiérrez, Luz María Martínez Mejía, Guillermo Gosset Lagarda y Alfredo Martínez Jiménez.
Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Instituto de Biotecnología - , UNAM. A.P. 510-3. Cuernavaca, Mor.
62250, México.
ivanmugu@ibt.unam.mx.

Palabras clave: AIDA-I, celobiosa, etanol.

Introducción. La Adhesina Involucrada en la Adherencia Difusa (AIDA-I) de *Escherichia coli* enteropatogénica, es una de las proteínas autotransportadoras más estudiadas para la secreción de proteínas heterólogas (1). Al reemplazar la región del gen que codifica para la Adhesina por la secuencia de una proteína de interés, se obtiene un sistema que permite anclar en la membrana externa de *E. coli* la proteína heteróloga (1). Emplear este sistema para la secreción de β -glucosidasas en cepas de *E. coli* etanológicas permitiría producir etanol directamente de celobiosa. El objetivo del presente trabajo fue anclar la beta-glucosidasa (BglC) de *Thermobifida fusca* (activa a pH 7 y 37 °C; 2), utilizando el sistema AIDA-I, en una cepa etanológica de *E. coli* (3), para conferirle la capacidad de fermentar celobiosa a etanol.

Metodología. A partir de plásmidos disponibles (1, 2) se amplificaron el péptido señal (PS) el autotransportador AIDA-I, y el gen *bgIC* de *Thermobifida fusca*. Los fragmentos se clonaron en pTrc99A (inducible por IPTG), generándose el plásmido pAIDABglCRHis. Para probar la funcionalidad del sistema, la cepa de *E. coli* etanológica (3) fue transformada con dicho plásmido y se cultivó en medio mineral con glucosa (2 g/L) y celobiosa (8 g/L). Para evaluar la producción de etanol, se utilizó medio mineral solo con celobiosa (10 g/L) en mini-fermentadores sin aireación (pH 7, 37°C, 150 rpm). Los experimentos se realizaron por duplicado.

Resultados. Como se observa en la figura 1, el control negativo (cepa etanológica sin el plásmido pAIDABglCRHis) dejó de crecer cuando se agotó la glucosa a las 10 horas, sin consumir celobiosa; mientras que las células con pAIDABglCRHis, presentaron un crecimiento diaxúico, generando más del doble de células, y consumieron ambas fuentes de carbono. La figura 2 muestra el crecimiento, consumo de celobiosa y producción de etanol. Las células crecieron a una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.067 h^{-1} , con una velocidad específica de consumo de celobiosa (q_s) de $1.28 \text{ g}_{\text{CELOBIOSA}} \text{ g}_{\text{CELULAS}}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Estos valores reflejan de forma indirecta la actividad específica presente en el biocatalizador construido. Adicionalmente, una mayor expresión posiblemente genere una mayor velocidad de hidrólisis de celobiosa y por ende las células crecerían a un μ mayor. Los datos muestran que con una cantidad pequeña de células (0.02 a 0.5 g/L), se tiene un

biocatalizador que permite hidrolizar y convertir 10 g/L de celobiosa en etanol con una eficiencia del 80% respecto al máximo teórico en 36 horas.

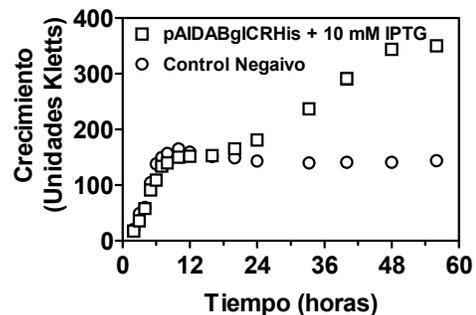


Figura 1. Cinética de crecimiento de *E. coli* etanológica transformada con el plásmido que le confiere la capacidad de anclar BglC en la membrana externa. Control negativo: *E. coli* etanológica transformada con pTrc99A.

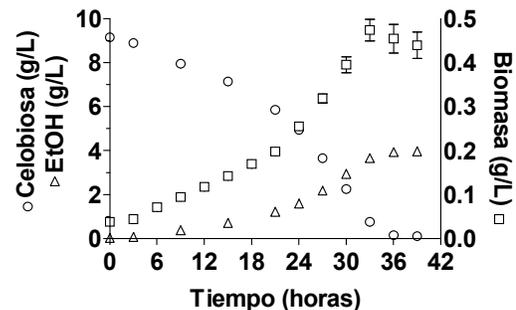


Figura 2. Cinética de crecimiento, consumo de celobiosa y producción de etanol con *E. coli* etanológica transformada con pAIDABglCRHis.

Conclusiones. La proteína autotransportadora AIDA permitió anclar la BglC de *T. fusca* en la membrana externa de *E. coli* etanológica. El correcto anclaje de BglC se comprobó fermentando celobiosa a etanol, lográndose una eficiencia del 80% del máximo teórico de conversión de celobiosa en etanol.

Agradecimiento. Al CONACyT proyecto 154298 y beca de doctorado a IMG: 226751.

Bibliografía.

1. Jose J., Meyer T.F. (2007). *Microbiol Mol Biol Rev.* 71:600-619.
2. Spiridonov N.A. and Wilson D.B. (2001). *Curr Microbiol.* 42:295-301.
3. Fernandez-Sandoval M.T., Díaz-López D., Gosset-Lagarda G., Martínez-Jiménez A. (2009). *Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.* Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería. Acapulco, Gro. 21-26 de Junio, 2009, OIX-01.