



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE POLIHIDROXIBUTIRATO EN *Escherichia coli*

Centeno-Leija Sara, Huerta-Beristain Gerardo, Alvarado-López María José, Gosset-Lagarda Guillermo, Martínez-Jiménez Alfredo. Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, A.P. 510-3. Cuernavaca, Mor. CP 62250
sarita@ibt.unam.mx

polihidroxitirato-pentosas fosfato-carbono:nitrógeno

Introducción. El polihidroxitirato (PHB) es un poliéster biodegradable que desplazará parte del mercado de los petro-plásticos. *Azotobacter vinelandii* sintetiza PHB a partir de acetil-CoA y NADPH utilizando una reductasa (PhbA), una cetotiolasa (PhbB) y PHB polimerasa (PhbC) codificadas en el operón *phbBAC*. La producción heteróloga de PHB en *Escherichia coli* permite utilizar medios minerales suplementados con glucosa y obtener altas concentraciones de biomasa, siendo uno de los retos para la acumulación de PHB aumentar la disponibilidad del cofactor NADPH (1). El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión heteróloga de *phbBAC* en *E. coli* y evaluar la capacidad de acumulación de PHB en mutantes con flujo de carbono incrementado hacia la vía de pentosas fosfato (PF), lo cual eleva los niveles de NADPH (2).

Metodología. El operón de *phbBAC* se clonó en el vector pTrc99A (inducible por IPTG) para obtener el plásmido pPHBAv. Para favorecer el flujo de carbono hacia pentosas y la formación de NADPH (2), se interrumpió en *E. coli* MG1655 la expresión de la fosfoglucosa isomerasa (*pgi*, cepa MG*pgi*-) y fosfofructocinasa (*pfk*; cepa MG*pfk*-), utilizando el sistema λ red (3). El PHB fue detectado por fluorescencia y gravimétricamente a partir de cultivos en microplacas y matraces, usando medio mineral y glucosa.

Resultados. El análisis mediante microscopía de contraste revela la acumulación intracelular de PHB en las cepas transformadas con el plásmido pPHBAv (figura 1), demostrando el éxito de la expresión heteróloga.

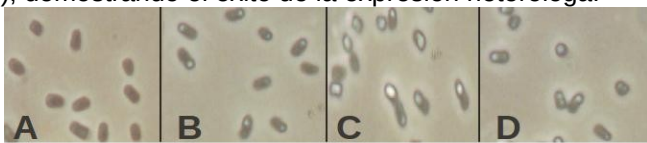


Fig. 1. A) Cepa MG1655 (control negativo) y acumulación intracelular de PHB al expresar el plásmido pPHBAv en B) MG1655; C) MG*pgi*- y D) MG*pfk*-

En el cultivo en microplacas se encontró que las cepas MG*pgi*- y MG*pfk*- producen 5.6 y 4 veces más PHB que la cepa silvestre respectivamente (figura 2), lo cual indica que el estímulo de la vía de las PF mejora la capacidad de acumulación del bioplástico.

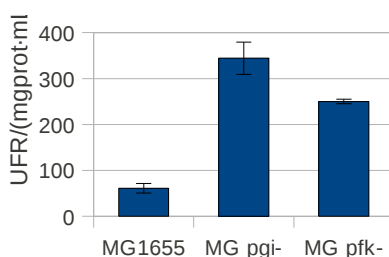


Fig. 2. Producción de PHB en las cepas MG1655, MG*pgi*- y MG*pfk*-

Por otro lado, se ha demostrado, que la mayor acumulación de PHB se da cuando el oxígeno o la fuente de nitrógeno están limitados (4), por lo que se estudió la acumulación en la cepa MG*pgi*- utilizando relaciones molares de Carbono (Glucosa) a Nitrógeno (cloruro de amonio) (C:N) de 15, 25 y 35. El análisis de los resultados indica que con las relaciones C:N de 15 y 35 se acumuló entre 15 y 40 % de PHB con respecto a la proteína total celular, mientras que con la relación de 25, MG*pgi*- acumuló más del 60%. Lo anterior revela que la relación de 25 es más favorable para la acumulación de PHB en esta cepa (figura 3).

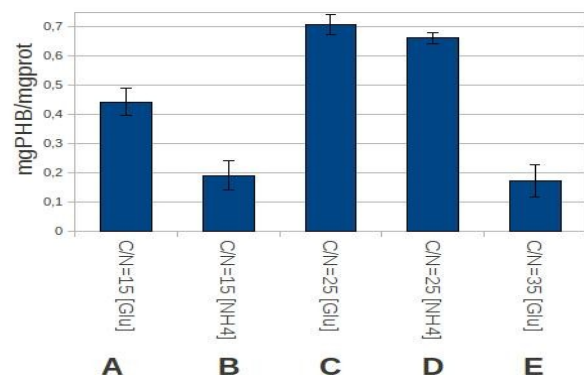


Fig. 3. Producción de PHB en matraces con la cepa MG*pgi*- . A) Glucosa 8 g/L; B) NH₄Cl 2.45 g/L; C) glucosa 14 g/L; D) NH₄Cl 1.43 g/L; E) Glucosa 20 g/L

Conclusiones.

1. Se logró producir de forma heteróloga PHB en *E. coli* MG1655 al expresar el operón *phbBAC* de *A. vinelandii*.
2. El estímulo de la vía de las PF mejora hasta 5 veces la producción del bioplástico.
3. La cepa MG*pgi*- acumula más polímero utilizando una relación C:N de 25 en medio mineral con 14 g/L de glucosa.

Agradecimiento. Al CONACyT proyecto 154770 y beca de doctorado a SGCL.

Bibliografía.

1. Wegen R., Lee S-Y., Middelberg A. Biotechnology and Bioengineering. 2001. 74(1):70-80
2. Fraenkel D. Ann. Rev. Biochem. 1989. 55:317-37
3. Datsenko K., Wanner B. PNAS. 2000. 97(12):6640-6645.
4. Wang F., Lee S-Y. Appl. Env. Microbiol. 1997. 63(12):4765-4769.