

# ESTUDIO DE LA REGULACION ENZIMATICA EN LA BIOSINTESIS DEL COPOLIMERO DE HIDROXIBUTIRATO E HIDROXIVALERATO P(HB-HV) POR *Ralstonia eutropha*.

Ricardo Jiménez Suárez, Ma. Teresa Ponce Noyola, Ana Ramos Valdivia, Fermín Pérez Guevara

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN

Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, C.P. 07300, México D.F.

Tel: 57473800 ext. 4318 Fax: 57473800 ext. 4305, fperez@mail.cinvestav.mx

**Palabras clave:** *Ralstonia eutropha*, P(HB-HV), enzimas

**Introducción.** *Ralstonia eutropha* (anteriormente llamada *Alcaligenes eutrophus*)(1) produce el homopolímero (PHB) y el copolímero P(HB-HV) como reserva de carbono y energía en respuesta a limitación de nitrógeno y en presencia de glucosa, propionato, butirato y valerato como fuentes de carbono. Tres enzimas participan en la biosíntesis del P(HB-HV), la  $\beta$ -cetotiolasa, la acetoacetyl-CoA sintetasa y la PHB sintasa. Las diferencias en los substratos disponibles durante la producción de estos polialcanoatos puede afectar la actividad enzimática y por consiguiente regular la velocidad de biosíntesis del copolímero. La comprensión de los mecanismos regulatorios es esencial no solo para definir las mejores condiciones de cultivo y su relación con la calidad del polímero, si no también para el desarrollo de mejores cepas.

El presente trabajo, se reporta la actividad de las enzimas involucradas en la ruta biosintética de polialcanoatos durante la síntesis de P(HB-HV) por *R. eutropha*, usando ácido butírico y ácido valérico en un cultivo por lote alimentado a diferentes proporciones.

**Metodología.** Se utilizó la cepa de *Ralstonia eutropha* ATCC 17699. Después de crecer la cepa en medio rico, las células fueron inoculadas a un fermentador BIOFLO III de 3 L a 30°C, pH 7.0, 550 rpm y aireación 5 L/min en un medio de producción no limitado por nitrógeno y con 3 g/L de ácido butírico. Las células se dejaron crecer por 18 h, iniciando la alimentación a 50 mL/h con un medio limitado en nitrógeno (relación C/N de 100), a una concentración de fuente de carbono de 15 g/l, usando valérico y butírico a una relación 1:1. El crecimiento se determinó por peso seco; el extracto crudo celular y la determinación de las actividades enzimáticas, se realizaron de acuerdo a Kidwell y col. (1995)(2), monitoreando el decremento en OD<sub>303</sub> para la  $\beta$ -cetotiolasa, la oxidación de NADPH a 340 nm para la acetoacetyl-CoA sintetasa y el incremento en OD<sub>412</sub> para la PHB sintasa.

**Resultados y Discusión.** Cuando la bacteria creció en modo en lote,  $\beta$  cetotiolasa, acetoacetyl-CoA reductasa y PHB sintasa presentaron una actividad basal de 4, 6 y 1 unidades totales respectivamente, sin embargo,

cuando se inició la alimentación, tanto la  $\beta$ -cetotiolasa como la acetoacetyl-CoA reductasa incrementaron su actividad hasta casi 70 y 88 unidades respectivamente, siendo constante la actividad de la PHB sintasa a lo largo de la cinética de 1 a 2 unidades al final de la cinética (Fig. 1). Estos datos sugieren que cuando la bacteria se encuentra en limitación de nitrógeno y en presencia de una fuente de carbono, la  $\beta$  cetotiolasa, participa en la biosíntesis de P(HB-HV) en dos pasos, la primera en la condensación de acetyl-CoA de la ruta de glicolisis hacia acetoacetyl-CoA y en la segunda en la condensación de propionil-CoA. Por otro lado, la acetoacetyl-CoA reductasa reduce acetoacetyl-CoA y acetopropionil-CoA hacia hidroxibutiril-CoA e hidroxivaleril-CoA respectivamente, por lo que la tasa de acumulación de P(HB-HV) puede ser controlada pasos arriba de la ruta más que en el paso de polimerización de la PHB sintasa., siendo estos pasos, posibles limitantes para la PHB sintasa debido a la baja actividad de esta o la degradación de los intermediarios previos a la polimerización del copolímero.

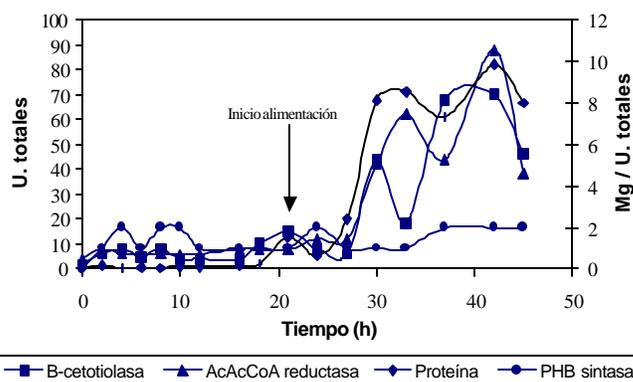


Fig. 1. Actividad enzimática en la biosíntesis de P(HB-HV) por *R. eutropha* en un cultivo por lote alimentado.

## Conclusiones.

Se encontró que las enzimas presentes en el sistema, se encuentran mas activas al final de la cinética, sin embargo como *R. eutropha* presenta dos  $\beta$ -cetotioalastas y con el fin de elucidar cual de las dos cetotioalastas interviene para la bifurcación de la ruta y por ende en

la velocidad de síntesis e incorporación de monómeros 3HV en el copolímero, es necesario realizar estudios de incorporación usando  $^{14}\text{C}$ .

**Bibliografía.**

1. Slater, S., Houmiel K., Tran M., Mitsky T., Taylor N., Padgett S. and Gruys K. (1998). Multiple  $\beta$ ketothiolases mediate poly( $\beta$ -hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*. *J. Bacteriol.* 180(8): 1979-1987.
2. Kidwell, J., Valentin, H. and Dennis, D. (1995). Regulated expression of the *Alcaligenes eutropha pha* biosynthesis genes in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(4): 1391-1398.