

MUTANTES DE *Azotobacter vinelandii* MODIFICADAS PARA LA SOBREPDUCCIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO O ALGINATO MEDIANTE LA INACTIVACIÓN DE LOS GENES *algA*, *phbB* O *phbC*.

Daniel Segura, Josefina Guzmán y Guadalupe Espín
Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM. Apdo. Post.510-3,
Cuernavaca Morelos. C.P. 62250. Fax 0173172388. daniel@ibt.unam.mx

Palabras claves: *polihidroxitirato*, *alginato*.

Introducción: *Azotobacter vinelandii* es una bacteria que produce dos polímeros de importancia industrial: el polisacárido extracelular alginato; el cual se utiliza principalmente como agente espesante y gelificante en diversas industrias como la farmacéutica y la alimentaria; y el poliéster intracelular polihidroxitirato (PHB), que se puede utilizar en la fabricación de plásticos biodegradables. El uso de *A. vinelandii* como fuente de obtención de alginato o PHB se ha considerado posible (1). Sin embargo, dado que esta bacteria puede convertir la fuente de carbono en PHB o en alginato, cuando se busca optimizar la producción de PHB, la síntesis del exopolisacárido constituye un desperdicio de la fuente de carbono, y viceversa, cuando se busca producir alginato la síntesis del poliéster puede resultar inconveniente. Dado que los dos polímeros están involucrados en el proceso de formación de quistes en esta bacteria, resulta difícil canalizar la fuente de carbono hacia uno de los dos polímeros en la cepa silvestre mediante el manejo de las condiciones de cultivo. Sin embargo, es posible bloquear una u otra vía mediante mutación. Los genes que codifican para las enzimas que intervienen en la síntesis de PHB y alginato se han caracterizado en nuestro grupo (2-5). En este trabajo se evaluó el efecto de la inactivación del gen *algA*, que codifica para la enzima responsable del primer paso en la ruta biosintética de alginato, sobre la producción de PHB, y de la inactivación de los genes *phbB* y *phbC*, que codifican para el segundo y tercer paso de la síntesis de PHB, sobre la producción de alginato.

Metodología. La inactivación de los genes *algA*, y *phbC* se realizó mediante la inserción *in vitro* de cassettes de resistencia a los antibióticos gentamicina y espectinomicina y el posterior remplazo génico por doble recombinación en la cepa *A. vinelandii* ATCC 9046. La inactivación de *phbB* se realizó mediante mutagénesis con el transposón mini-Tn5-*lacZ*.

Resultados y Discusión: La inactivación del gen *algA* bloqueó completamente la producción de alginato. Esta mutación ocasionó, como se esperaba, un notable incremento en la acumulación del poliéster PHB. La mayor producción de PHB observada en esta cepa (AT41) es debida posiblemente a una mayor disponibilidad de fuente de carbono para la producción de este poliéster y a

la mayor cantidad de biomasa alcanzada en los cultivos de la cepa AT41.

Con respecto a la inactivación de los genes *phbB* y *phbC*, estas mutaciones consiguieron bloquear completamente la síntesis de PHB. De manera similar al resultado descrito anteriormente, este bloqueo ocasionó una mayor producción de alginato, aunque únicamente para la inserción en *phbB*, la cual se demostró que es polar sobre el gen *phbA*, involucrado en el primer paso de esta ruta biosintética y que se encuentra hacia la parte 3' de *phbB*. La inserción en *phbC*, a pesar de lograr bloquear la síntesis de PHB no tuvo efecto sobre la producción de alginato. La diferencia de producción de alginato con dos bloqueos en puntos diferentes de la ruta de síntesis de PHB podría explicarse considerando que ocasionan efectos metabólicos diferentes. Al bloquear el primer paso de la ruta se consigue una más eficiente canalización del carbono hacia la producción de alginato que bloqueando el último paso.

Conclusiones. Es posible incrementar la producción de PHB bloqueando la síntesis de alginato mediante la inactivación del primer paso de esta ruta. De igual forma se puede incrementar la producción de alginato si se impide la producción de PHB desde el primer paso enzimático de esta vía.

Agradecimientos. El presente trabajo fué apoyado por DGAPA-UNAM Proyecto IN209399 y por el CONACyT Proyecto 27767N.

Bibliografía.

1. Byrom, D. (1987). *Trends Biotechnol.* 5: 246-250.
2. Campos, M. E., Martínez-Salazar J. M., Lloret L., Moreno, S., Nuñez C., Espín G. and Soberón-Chávez, G. (1996). Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 178:1793-1799.
3. Lloret L, Barreto R, Leon R, Moreno S, Martinez-Salazar J, Espin G, Soberon-Chavez G (1996). Genetic analysis of the transcriptional arrangement of *Azotobacter vinelandii* alginate biosynthetic genes: identification of two independent promoters. *Mol. Microbiol.* 21:449-457.
4. Segura, D., Vargas E., and Espín, G. (2000). Bketoethylase genes in *Azotobacter vinelandii*. *Gene.* 260: 113-120.
5. Vázquez, A., Moreno, S., Guzmán J., Alvarado, A., and Espín G. (1999). Transcriptional organization of the *Azotobacter vinelandii* algXLVIFA genes: characterization of *algF* mutants. *Gene.* 232: 217-222.