

Producción y detección simultánea de ácido cumárico en una cepa modificada de *Escherichia coli*

José Ignacio Rodríguez Ochoa, Luz María Martínez Mejía, Georgina Hernández, Alfredo Martínez, Guillermo Gosset. Instituto de Biotecnología, Cuernavaca, 62210. guillermo.gosset@ibt.unam.mx

Biosensor, detección, proceso

Introducción. La generación de cepas de *E. coli* modificadas para producción de metabolitos sigue un ciclo de Diseño-Construcción-Prueba-Aprendizaje (DCPA), el cual suele ser laborioso, costoso y tardado. Dentro de este ciclo, la detección y cuantificación del metabolito de interés es uno de los pasos más limitantes y costosos. En el presente trabajo, se desarrolló una cepa de *E. coli* productora de ácido cumárico (p-CA), sobreexpresando los genes *aroG^{fabr}* y *tktA*, y el gen de la enzima tirosina amonía liasa (*talopt*), que cataliza la desaminación de tirosina a p-CA. Esta cepa también detecta el p-CA a través de un biosensor fluorescente basado en una fusión transcripcional del operón *aaeXAB* con el gen de la proteína verde fluorescente *gfpmut2*. La metodología propuesta en este trabajo reduce en gran medida el costo y el tiempo del ciclo DCPA en el desarrollo de cepas productoras de p-CA en *E.coli*.

Metodología. Se empleó la cepa W3110 de *E. coli* para todos los experimentos, la cual se transformó con los plásmidos pJLBaroG^{fabr} *tktA*, pTrc99A*talopt* y pUA66 PaaeX*gfp*. Las cinéticas de fluorescencia se realizaron en microplacas de 96 pozos negras y se cultivaron en medio mínimo mineral M9 con 2 g/L glucosa o 10 g/L glicerol a 37°C, adicionando o no 0.4 g/L de tirosina, e IPTG 0, 0.1mM, 0.5 mM y 1 mM. Se cuantificó la densidad óptica con una longitud de onda de 600 nm (OD₆₀₀), y la fluorescencia se excitó con una longitud de onda de 479 nm y se detectó a 520 nm.

Resultados. El biosensor de p-CA se obtuvo fusionando la secuencia promotora del operón *aaeXAB*, el cual es inducido por p-CA^{1,2}, con el gen *gfpmut2* en el plásmido pUA66, y se evaluó con distintas concentraciones de p-CA

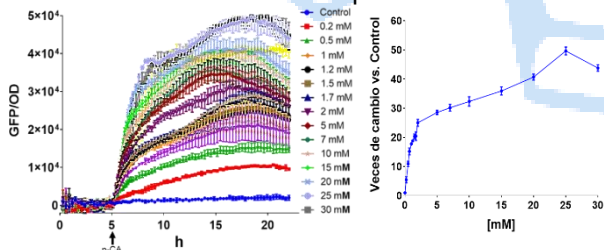


Fig. 1. Respuesta del biosensor pUA66 PaaeX*gfp* a diferentes concentraciones de p-CA, y veces de cambio respecto al control 3 h después de la adición del p-CA.

El biosensor pUA66 PaaeX*gfp* responde desde la concentración de 0.2 mM, mostrando una correlación de R²=0.98 entre las concentraciones de 2mM a 25 mM de p-CA.

Este biosensor se empleó en conjunto con el plásmido pTrc99A*talopt*, generando una cepa capaz de desaminar tirosina a p-CA, y a la vez detectarlo por fluorescencia.

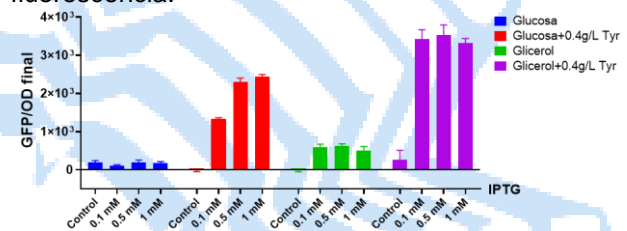


Fig. 2. Valores de GFP/OD a las 24 h de cultivo de la cepa transformada con los plásmidos pTrc99A*talopt* y pUA66 PaaeX*gfp*.

La cepa se transformó con un tercer plásmido que codifica para los genes *aroG^{fabr}* y *tktA*, el cual se ha reportado para la producción de aminoácidos aromáticos como tirosina³. De esta forma, la cepa con los 3 plásmidos es capaz de producir tirosina a partir de la fuente de carbono, transformarlo a p-CA y por último detectar el p-CA a través de fluorescencia.

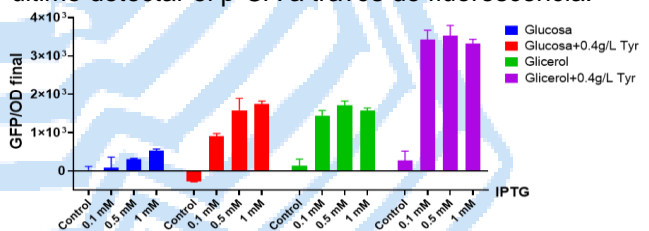


Fig. 3. Valores de GFP/OD a las 24 h de cultivo de la cepa transformada con los plásmidos pJLBaroG^{fabr} *tktA*, pTrc99A*talopt* y pUA66 PaaeX*gfp*

Conclusiones. El sistema de 3 plásmidos para la producción y detección de p-CA permitirá facilitar la evaluación de variables para mejorar la producción de p-CA en *E. coli*

Agradecimiento. El presente trabajo es financiado por el donativo CONACyT A1-S-8646.

Bibliografía. ¹Van Dyk T., et. al. (2004). *J. of Bacteriology*. Vol. 186, No. 21. ²Rodríguez J.I, et. al. (2022). *Microb Cell Fact*. Vol. 21, No.148. ³Vargas Tah A. et. al. (2015). *Microb Cell Fact* Vol. 12, No.1.