

BIOSENSOR FLUORESCENTE PARA LA DETECCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN HIDROLIZADOS LIGNOCELULÓSICOS.

José Ignacio Rodríguez Ochoa, Luz María Martínez Mejía, José Utrilla Carreri, Rosa María Gutiérrez Ríos, Guillermo Gosset Lagarda. Instituto de Biotecnología, UNAM. Depto. de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Cuernavaca, Morelos, 62216. gosset@ibt.unam.mx

Palabras clave: Fenólicos, Lignocelulosa, Fermentación.

Introducción. El uso de hidrolizados de biomasa vegetal en procesos de fermentación representa una alternativa económica y de bajo impacto al medio ambiente. La biomasa vegetal esta principalmente constituida por polímeros de celulosa y hemicelulosa, que al ser hidrolizados, se libera glucosa y xilosa principalmente; sin embargo, en la hidrolisis también se liberan compuestos fenólicos provenientes de la lignina. Estos compuestos son tóxicos microbianos y representa un paso limitante para su utilización en un proceso de fermentación, por lo que la valoración de estos compuestos en un hidrolizado es fundamental.

El operón *aaeXAB* codifica para exportadores de este tipo de compuestos, su expresión es regulada positivamente por AaeR, el cual activa la transcripción del operón en presencia de ácidos carboxílicos aromáticos, como los fenilpropanoides (Van Dyk, 2004). En el presente trabajo se evaluó la fusión de la región de regulación del gen *aaeX* fusionado al gen que codifica para la proteína verde fluorescente (*gfpmut2*) y se evaluó como biosensor para la valoración de compuestos fenólicos en hidrolizados lignocelulósicos.

Metodología. Se obtuvo la región de regulación del gen *aaeX* a partir de una librería de reporteros transcripcionales fluorescentes (Uri Alon, 2006) y se fusionó río arriba al gen *gfpmut2* en el plásmido pUA66. El plásmido fue transformado en la cepa W3110 de *Escherichia coli*. Se realizaron cinéticas en microplacas de 96 pozos utilizando un lector Biotek, se cuantifico la fluorescencia (479/520) y OD₆₀₀ cada 20 minutos por 22 horas, a la hora 3, se adicionó 6 diferentes compuestos fenólicos y a diferentes concentraciones. Los valores de fluorescencia (URF) y de OD₆₀₀ se utilizaron para cuantificar la fluorescencia específica (URF/OD).

Resultados

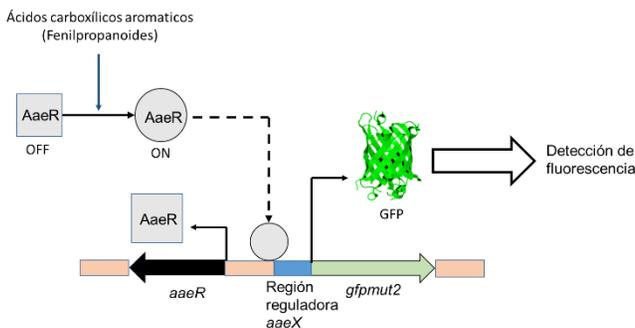


Fig. 1. Sensor de compuestos fenólicos. El regulador AaeR se activa en presencia de ácidos carboxílicos aromáticos y se une a la secuencia reguladora del gen *aaeX* activando la transcripción.

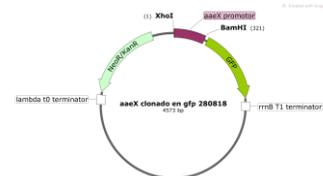


Fig. 2. Región reguladora del gen *aaeX* fusionado río arriba al gen *gfpmut2* en el plásmido pUA66.

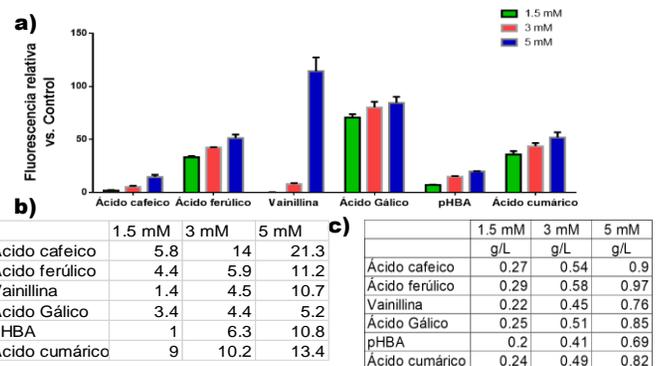


Fig. 3. a,b) Número de veces de cambio de fluorescencia específica (GFP/OD) una hora después de agregar el compuesto. c) Concentración en g/L de los compuestos fenólicos utilizados.

Conclusiones. La fusión de la región reguladora *aaeX:gfpmut2* respondió de manera dosis dependiente a diferentes compuestos fenólicos encontrados en polímeros de lignina. A través de este método se puede valorizar la presencia de fenólicos en hidrolizados lignocelulósicos de una manera fácil y económica, y correlacionar la concentración con la toxicidad en *E. coli*.

Agradecimientos. El presente proyecto es financiado por UNAM PAPIIT IT200217.

Bibliografía.

- Zaldivar J, Ingram LO. (1999). *Biotechnol Bioeng* 66:203–210
- Martinez A, Rodriguez M, York S, Preston J, Ingram L. (2000) *Biotechnol Bioeng*. 2000 Sep 5;69(5):526-36.
- Van Dyk T, Templeton L, Cantera K, Sharpe P, Sariaslani F. (2004) *J. Bacteriol.* 10.1128/JB.186.21.7196–7204.2004.
- Zaslaver A, Bren A, Ronen M, Itzkovitz S, Kikoin I, Shavit S, Liebermestier W, Surette M, Alon U. (2006) *Nature Methods*. 10.1038/NMETH895.
- Kalanjana Monnappa A, Lee S, Mitchell R. (2013) *Bioresour technol.* 127 (2013) 429–434.