

EFECTO DE LA INACTIVACIÓN DEL SISTEMA AAEXAB DE *E. COLI* SOBRE LA CAPACIDAD DE SÍNTESIS DE ÁCIDO CAFEICO.

Raúl Alejandro Calzada Hernández, Luz María Martínez Mejía, Georgina Teresa Hernández Chávez, Guillermo Gosset Lagarda. Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Código Postal: 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, México, gosset@ibt.unam.mx

Palabras clave: aaeXAB, Escherichia coli, ácido cafeico

Introducción. Los transportadores bacterianos han sido objeto de estudio debido a su capacidad de catalizar el movimiento de sustratos a través de la membrana (1). Se ha demostrado que el sistema de eflujo AaeXAB de *E. coli* está involucrado en el transporte de ácidos carboxílicos aromáticos del interior hacia el exterior de la célula (2). Considerando que una alternativa sostenible de producción de compuestos aromáticos es su biosíntesis bacteriana (3), el estudio de transportadores asociados con esta clase de compuestos resulta útil para el descubrimiento de estrategias enfocadas en el mejoramiento de la producción. El ácido cafeico (AC) es un ácido hidroxicinámico que, debido a su capacidad antioxidante en diversos estudios se le han atribuido propiedades como antiinflamatorio, antiviral, antidiabético y anticancerígeno (4). Por esta razón existe un creciente interés en su producción.

El objetivo de esta investigación fue el estudio del efecto de la inactivación del sistema de eflujo de ácidos carboxílicos aromáticos, AaeXAB de *E. coli* sobre la capacidad de síntesis de AC a partir de ácido *p*-cumárico (ACm). La hipótesis está centrada en que la inactivación de este sistema evitará el escape del precursor, el ácido *p*-cumárico, y mejorará la producción de ácido cafeico.

Metodología. En una primera etapa se determinó la toxicidad tanto del precursor como del producto a través de cinéticas de crecimiento bacteriano en donde se adicionaron distintas concentraciones de ácido *p*-cumárico y de ácido cafeico. Posteriormente se suprimió la expresión del operón *aaeXAB* que codifica para el sistema del mismo nombre en la cepa *E. coli* W3110 a través del método de inactivación de genes cromosomales reportado por Datzenko & Wanner (5). La cepa mutante se transformó con el plásmido pTrcpaBC que contiene los genes que codifican a la enzima responsable de la bioconversión del ácido *p*-cumárico a ácido cafeico, la 4-hidroxifenilacetato 3-hidroxilasa (4HPA3H) de la especie *E. coli* W. La cepa control fue una cepa con el sistema *aaeXAB* activo, (*E. coli* W3110/pTrcpaBC). Para probar la capacidad de síntesis de ácido cafeico de estas construcciones se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento en matraz en medio mínimo mineral M9 utilizando glicerol como fuente de carbono en una concentración de 10 g/L y suministrando ácido *p*-cumárico en una concentración de 4 g/L. Las condiciones de cultivo fueron 37°C y 300 rpm.

Bibliografía.

1. Lv H. et al. (2016). *Appl Microbiol Biotechnol*.100:6 119-6130
2. Van Dyk T. et al. (2004). *J. Bacteriol*. 186:7196-7204.
3. Gosset G. (2009). *Curr. Opin. Biotechnol*. 20:651-658.
4. Rodrigues J. et al. (2015). *Enzyme Microb. Technol*. 71:36-44.
5. Datsenko K. & Wanner B. (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 12:6640-6645.

Resultados

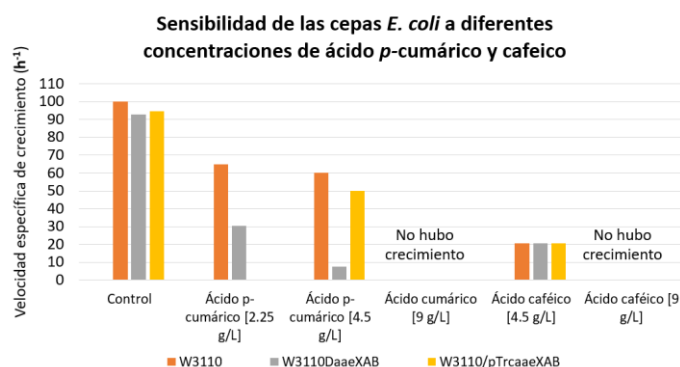


Fig. 1. Resultados de las pruebas de sensibilidad de distintas cepas *E. coli* para el ácido *p*-cumárico y ácido cafeico a distintas concentraciones.

Tabla 1. Comparación de los parámetros cinéticos de la fermentación de síntesis de ácido cafeico entre la cepa control y la cepa inactivada en el sistema AaeXAB.

Cepa	μ (h ⁻¹)	qs Glicerol g/g _{DWC} *h	Qs Cumárico g/g _{DWC} *h	Yp/s (En el punto de máxima producción)	Máx. Título (g/L)	Qp	Yp/x (Producto/Biomasa)
Control	0.15	1.5	0.53	0.80	3.31	0.12	0.98
AaeXAB inactivo	0.07	0.18	0.82	0.43	1.43	0.04	1.64

Conclusiones. En *E. coli* el AC resulta más tóxico que el ácido ACm. Los resultados de las pruebas de sensibilidad sugieren que el sistema de transporte de ácidos carboxílicos aromáticos AaeXAB tiene como sustrato al precursor (ACm) pero no al AC. Las dos cepas empleadas en la fermentación son capaces de sintetizar AC a partir de ACm. Respecto a la productividad volumétrica la cepa control resulta mejor productora (3.31 g/L) que la cepa mutada en el transportador (1.43 g/L). Sin embargo, en términos de productividad específica, la cepa inactivada en el sistema AaeXAB resulta ser mejor con un rendimiento producto/biomasa de 1.64 que la cepa con el sistema AaeXAB activo con un valor de 0.98.

Agradecimientos. Para la realización de este proyecto se contó con el financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT/UNAM a través del proyecto IT200217.