

PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CAFEICO POR UN SISTEMA DE COCULTIVO CON CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*.

Jimena Barrientos Parás, Luz María Martínez Mejía, Georgina Hernandez Chavez, Guillermo Gosset Lagarda, Ingeniería metabólica y biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, México, gosset@ibt.unam.mx.

Palabras clave: producción heteróloga, ingeniería metabólica, ácido cafeico

Introducción. El ácido cafeico es un compuesto que naturalmente se encuentra en plantas como intermediario para la formación de lignina (1). Dicho compuesto ha despertado interés biotecnológico por sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, anticancerígenas, antivirales, anti diabéticas y antidepresivas (2). La extracción de plantas es costosa y poco eficiente, por lo cual se han desarrollado procesos biotecnológicos para la producción de ácido cafeico en microorganismos (3). Un sistema de cocultivo propone una estrategia que posibilita dividir rutas metabólicas para la producción de un compuesto, haciendo posible la optimización de cada cepa productoras y así lograr una alta productividad.

En este trabajo se utilizó ingeniería metabólica para generar dos cepas de *Escherichia coli*, una productora de ácido cumárico a partir de glicerol (W(pheA-)Rg, al expresar heterológamente la enzima PAL de *Rhodotorula glutinis*. Una segunda cepa (WhpaBC) introduce ácido cumárico con genes codificantes para hpaBC produce ácido cafeico. Se caracterizó las cepas en monocultivos y cocultivos para optimizar el sistema y buscar una mayor producción de ácido cafeico.

Metodología. La cepa de *E. coli* productora de ácido caféico W3110(pheA::Km)/pJLBaroG[■]*f^{br}tkA/pTrcPALRg* (W(pheA-)Rg) se realizó sobreexpresando los genes *aroG* y *tktA* para dirigir el flujo del carbono a la vía del shikimato, la inactivación de *pheA* para que en la vía de los compuestos aromáticos se produzca tirosina solamente, y la expresión heteróloga de la enzima PAL de *Rhodotorula glutinis* para la conversión de tirosina a ácido cumárico. La cepa W3110/pTrchpaBC (WhpaBC) productora de ácido caféico a partir de ácido cumárico fue generada con los genes *hpaB* y *hpaC* codificantes para una hidroxilasa. Se realizaron monocultivos por cuadruplicado de las cepas de *E. coli* W(pheA)Rg y WhpaBC en medio mineral M9 con 10 g/L de glicerol, IPTG 0.5 mM a 37°C y con agitación de 300 rpm. Se midió la D.O. a 600 nm en las horas 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 36 y 50. Se tomó muestra del cultivo a las horas 0, 4, 8, 24, 36 y 50, cuantificando metabolitos por HPLC. Posteriormente se realizaron cocultivos de las cepas W(pheA)Rg y WhpaBC con una relación de 1:1, se caracterizaron en las condiciones ya mencionadas para los monocultivos.

Resultados. Comparando la velocidad específica de producción de ac. cumárico por la cepa W(pheA-)Rg y la velocidad específica de consumo de ac. cumárico en la cepa WhpaBC (Fig. 1.) se determinó que la velocidad de consumo de WhpaBC es 9 veces mayor, por lo que realizar un cocultivo con relación 9:1 de las cepas W(pheA-)Rg y WhpaBC respectivamente es de interés. Se puede observar que la cepa productora de ac. cafeico es capaz de convertir por completo el ac. cumárico consumido en ac. caféico.

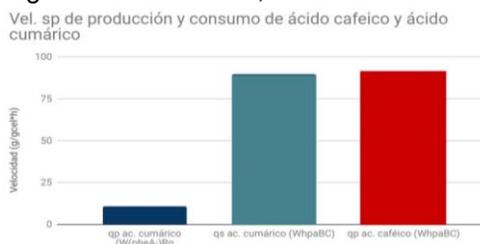


Figura 1. Velocidad específica de producción de ac. cumárico y cafeico en intervalos de tiempo variantes

Los valores de título y rendimiento en los monocultivos y el cocultivo (Tabla 1) sugieren que posiblemente la cepa W(pheA-)Rg puede verse beneficiada por la cepa WhpaBC ya que en el cocultivo se produce más ac. cumárico (53.4 mg/L sumando el título de ac. cumárico y ac. cafeico) que la cepa W(pheA-)Rg en monocultivo (41.8 mg/L).

Tabla 1. Título y rendimiento de ácido cumárico en monocultivos y cocultivos. Producción y rendimiento de ácido cafeico en monocultivos y cocultivos.

Cepa / Sistema	Título ac. cumárico (mg/L)	Rendimiento ac. cumárico/biomasa (mg/L/p.s.)	Producción ac. cafeico (mg/L)	Rendimiento ac. cafeico/biomasa (mg/L/p.s.)
W(pheA-)Rg (50 h)	41.8	8.52		
WhpaBC (36 h)			496	162.1
Cocultivo 1:1 (36 h)	9.7	15.5	43.7	69.7

Conclusiones. Se logró generar una cepa productora de ácido cumárico a partir de glicerol y otra que utiliza ác. cumárico para producir ác. cafeico. Al caracterizar las cepas W(pheA-)Rg y WhpaBC en monocultivos se determinó que la relación de 9:1, respectivamente, sería óptima para el sistema de cocultivo. Al realizar un cocultivo con relación 1:1 se comenzó a estudiar la dinámica entre las dos cepas.

Agradecimientos. Agradecemos el apoyo de UNAM PAPIIT IT200217.

Bibliografía.

- Chapple, C. C. S., Vogt, T., Ellis, B. E., & Somerville, C. R. (1992). An Arabidopsis mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. *The Plant Cell*, 4(11), 1413-1424.
- Razzaghi-Asl, N., Garrido, J., Khazraei, H., Borges, F., & Firuzi, O. (2013). Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure-activity relationships. *Current medicinal chemistry*, 20(36), 4436-4450.
- Rodriguez, J. L., Araújo, R. G., Prather, K. L., Kluskens, L. D., & Rodriguez, L. R. (2015). Heterologous production of caffeic acid from tyrosine in *Escherichia coli*. *Enzyme and microbial technology*, 71, 36-44.

