

Desarrollo de un proceso biotecnológico basado en co-cultivo utilizando *Synechocystis sp.* recombinante y *Corynebacterium glutamicum* para la producción de ácido glutámico a partir de CO₂

Humberto Geovani Rosas Mejía^a y José Ruben Morones Ramirez^{a*}

^aCentro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología (CIByN), Alianza Sur S/N, Parque de Investigación e Innovación Tecnológica, Apodaca N.L. México, C.P. 66628.

*jose.moronesr@uanl.edu.mx/ humberto.rosasmj@uanl.edu.mx

Palabras clave: Cianobacteria, co-cultivo, bioprocesos, ácido glutámico y *Synechocystis sp.* PCC6803.

Introducción

Los bioprocesos utilizan un microorganismo para la producción de diversos metabolitos con interés industrial, sin embargo, la ingeniería de cultivos se enfoca en investigar el empleo de dos o más microorganismos para facilitar y lograr la síntesis de diversos sustratos no asimilables por un microorganismo en particular¹. Los cultivos y co-cultivos es necesario suministrar una fuente de carbono para el crecimiento de los microorganismos y producción del metabolito de interés, que puede representar hasta un 60% de los costos de operación, además, algunos son productos de consumo humano y entran en competencia con los procesos biotecnológicos². Las cianobacterias tienen la capacidad de producir compuestos similares a materias primas industriales, por ejemplo, la cianobacteria *Synechocystis sp.* PCC 6803 tiene la capacidad de acumular sacarosa como respuesta al aumento de la presión osmótica del sistema². La sacarosa es un disacárido capaz de ser metabolizado por distintos microorganismos, por ejemplo, *Corynebacterium glutamicum* que es el principal productor industrial del ácido glutámico que es materia prima para la producción del saborizante y conservador alimenticio el glutamato monosódico³. Por tal motivo *Synechocystis sp.* PCC 6803 puede proporcionar una fuente de carbono para el crecimiento de *Corynebacterium glutamicum* gracias a la manipulación genética, esto se logra colocando una proteína de transporte que sea capaz de transportar la sacarosa al exterior de la célula, el gen *cscB* de *E. coli* se conoce como transportador de sacarosa⁴. En este trabajo se propone realizar un sistema de co-cultivo entre *Synechocystis sp.* PCC 6803 recombinante y *Corynebacterium glutamicum* para la producción de ácido glutámico, no obstante, la modificación genética de *C. glutamicum* podrá proporcionar distintos metabolitos con interés industrial y comercial todo esto utilizando como fuente de carbono principal CO₂ proveniente del aire atmosférico.

Metodología

Se amplificó mediante PCR el fragmento del gen *CscB* contenido en el vector PUC57 utilizando primers de extracción, el vector pEERM3 KM se linealizó con las enzimas de restricción *XbaI* y *PstI*, ambos fragmentos se purificaron con SureClean para ser ligados y transformados en células de *E. coli* DH5α mediante electroporación, se sembraron en placas de agar LB y otras con marcador de selectividad kanamicina (0.05mg/mL) para seleccionar colonias crecidas y extraer el ADN plasmídico con el fin de cerciorarse la correcta asimilación del plásmido mediante un análisis de restricción con la enzima *EcoRV*. Una vez obtenido el plásmido se plantea transformar la cianobacteria *Synechocystis sp.* PCC6803 mediante transformación natural, dejando incubarse

condiciones óptimas junto con una concentración del plásmido de 10µg/mL y sembrando en placas agar BG-11 con kanamicina (50µg/mL) para seleccionar colonias y verificar la asimilación del vector. Se procederá a realizar producciones de sacarosa para determinar la concentración máxima de este disacárido y así colocar a *Corynebacterium glutamicum* en el mismo medio de cultivo con el fin de realizar la producción de ácido glutámico, adicional se analizará la posibilidad de inmovilizar las células de cada microorganismo en esferas de alginato para facilitar la extracción de los productos deseados.

Resultados y discusión

Se muestran los geles de electroforesis, la figura 1a ligación del plásmido pEC BG, carril 2 construcción del plásmido pEC BG muestra las 3 conformaciones típicas de un plásmido, carril 3 control negativo el cual no contiene ligasa y por ende deberán de aparecer las dos piezas correspondientes al gen *CscB* (1.6kb) y vector pEERM3 KM (4kb). Figura 1b muestra el análisis de restricción de 4 colonias levantadas de caja Petri con el marcador de selectividad, la única colonia que contiene el plásmido es la colonia 4 (C4) ya que aparecen las 2 bandas que se esperaban (2kb y 4kb) al realizar la digestión con *EcoRV*.

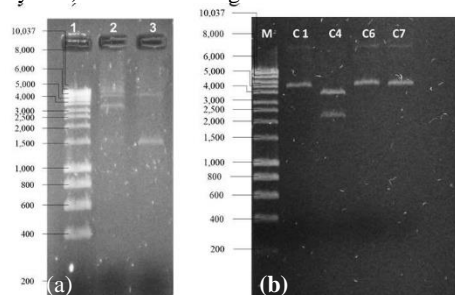


Figura 1. (a) Ligación de la construcción del plásmido pEERM3 KM y el gen *CscB*; (b) Análisis de restricción del plásmido pEC BG utilizando la enzima *EcoRV*.

Conclusiones

El análisis de restricción indica la correcta construcción del plásmido pEC BG. Como perspectivas se espera realizar la transformación de *Synechocystis sp.* PCC 6803 y sea capaz de secretar hasta una concentración de 200mM de sacarosa.

Referencias

1. Jones, J. A.; Wang, X. Elsevier. **2018**, 53, 33 – 38.
2. Du, W.; Liang, F.; Duan, Y. Elsevier. **2018**, 19, 17 – 25.
3. Hernández, A.; Picado, V. *Microbiología Industrial*. Primera ed. Ed.; Universidad Estatal a Distancia: Costa Rica, **2003**; pp 130.
4. Pao, S.; Paulsen, T.; Saier, M. Med. Centr. **1998**, 62, 1 – 34.
5. Ducat, C.; Way, A.; Silvera, C. Appl. Environ. Microbiol. **2012**, 78, 2660–2668.