

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS



Modificaciones en la cadena respiratoria de *Azotobacter vinelandii*
para la producción del bioplástico poli-beta-hidroxibutirato

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A

ANDREA ALVA SILVA

DIRECTOR DE TESIS: Dr. DANIEL SEGURA GONZÁLEZ

Lugar de publicación: México Distrito Federal, Ciudad Universitaria,
UNAM.

Fecha de publicación: 28/agosto/2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el Departamento de Microbiología Molecular, bajo la dirección del Dr. Daniel G. Segura González y con apoyo de los proyectos CONACyT 127979 y PAPIIT IT200612 e IT209411.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elda Guadalupe Espín

Por haberme dado la oportunidad de haber trabajado en su grupo de investigación durante la realización de este proyecto, por su apoyo y confianza, gracias.

Al Dr. Daniel G. Segura González

Por haberme apoyado, por sus enseñanzas y orientaciones por haber sido objeto de su confianza, por sus estímulos y regaños, sinceramente: “gracias”.

A la Biol. Soledad Moreno y la M. en C. Josefina Guzmán, por su ayuda en la construcción de las cepas mutantes, por sus enseñanzas, por haberme apoyado y aconsejado. Mil gracias.

A mis compañeros de laboratorio: A todos mis compañeros de laboratorio por su buen trabajo en el laboratorio, su ayuda y ejemplo a seguir.

A mi familia:

Mamá, papá, Paty, Rafa (Q.P.D) e Isabel; Gracias por todo el apoyo y la confianza que logró que yo llegaré hasta aquí. A todos los demás, simplemente, gracias.

AL PAPIIT:

Por la beca otorgada, para realizar este proyecto de tesis. Proyecto IT209411.

Índice General

I. Resumen	8
II. Introducción.....	9
Generalidades de los Polihidroxialcanoatos (PHAs).....	9
Azotobacter vinelandii, una bacteria productora dePHAs.....	9
La biosíntesis de PHB en Azotobacter vinelandii	11
La regulación de la síntesis de PHB en A. vinelandii.....	12
III. Antecedentes.....	15
Componentes de la cadena respiratoria de A. vinelandii involucrados en la protección respiratoria.....	21
Efecto de la inactivación de la NADH:Ubiquinona oxidoreductasa: translocadora de Na ⁺	23
IV. Hipótesis.....	27
V. Objetivo general.....	27
VI. Objetivos particulares.....	27
VII. Materiales y métodos.....	28
VII.1 Medios y condiciones de cultivo de las cepas de A. vinelandii y Escherichia coli.....	28
VII.2 Oligonucleótidos utilizados.....	29
VII.3 Determinación de proteína.....	30
VII.4 Determinación de sacarosa.....	31
VII.5 Determinación de pH.....	32
VII. 6 Determinación de PHB.....	32
VII.7 Extracción de ADN cromosomal de A. vinelandii.....	33
VII.8 Electroforesis del ADN.....	34
VII.9 Purificación de las construcciones génicas.....	34
VII.10 Reacciones de ligación.....	35
VII.11 Preparación de células competentes de E. coli DH5α por el método de CaCl ₂	35
VII.12 Transformación en E. coli DH5α.....	36
VII.13 Extracción de ADN plasmídico (“Miniprep”).....	36
VII.14 Preparación de células competentes de A. vinelandii.....	36
VII.15 Construcción de la mutante ndhI::gm de A. vinelandii OP.....	37
VII.16 Construcción de la mutante cydA::km de A. vinelandii OP.....	38
VII.17 Construcción de la mutante nqrE::Tn5 de A. vinelandii OP.....	39

VII.18 Caracterización de las mutantes <i>cydA::km</i> y <i>nqrE</i> de <i>A. vinelandii</i> OP.....	40
VIII. Resultados y discusión.....	41
VIII.1 Construcción de la mutante <i>ndhII::gm</i>	41
VIII.2 Construcción de la mutante <i>cydA::km</i>	48
VIII.3 Construcción de la mutante <i>nqrE::Tn5</i>	50
VIII. 4 Caracterización de las mutantes <i>cydA::km</i> y <i>nqrE::Tn5</i> de <i>A. vinelandii</i> OP.....	51
VIII. 4.1 Caracterización del crecimiento como peso seco (mg/ml).....	53
VIII. 4.2 Caracterización del crecimiento como concentración de proteína (µg/ml).....	56
VIII. 4.3 Caracterización de la producción volumétrica de PHB alcanzada (µg/ml).....	58
VIII. 4.4 Rendimientos de la producción de biomasa peso seco/sacarosa consumida (g de Biomasa /g de sacarosa).....	62
VIII. 4.5 Rendimientos de la producción de biomasa como proteína/sacarosa consumida (mg de Proteína/ g de sacarosa).....	63
VIII. 4.6 Rendimientos de la producción PHB (mg PHB/g de sacarosa consumida; y específica g PHB/g proteína).....	64
VIII. 4.7 Medición del pH alcanzado en los cultivos al tiempo final (36 hrs).....	65
IX. Conclusiones	¡Error! Marcador no definido.
X. Apéndice.....	699
X. Referencias.....	70

Índice de figuras

Fig 1. Micrografía electrónica de <i>A. vinelandii</i>	11
Fig 2. Estructura química del poli-β-hidroxibutirato (PHB).	11
Fig 3. Biosíntesis del PHB.	13
Fig 4. Regulación de la síntesis de PHB en <i>A. vinelandii</i>	15
Fig 5. Cadena transportadora de electrones ramificada de <i>A. vinelandii</i>	19
Fig 6. Mapa de la región del genoma de <i>A. vinelandii</i> donde se encuentra el gen <i>ndhII</i>	21
Fig 7 . Mapa del operón <i>cyd AB</i> del genoma de <i>A. vinelandii</i>	22
Fig 8. Mapa del operón <i>nqr</i> del genoma de <i>A. vinelandii</i>	25
Fig 9. Producción de biomasa y PHB por la mutante ATCN4.	25
Fig 10. Amplificación del gen <i>ndh II</i> de <i>A. vinelandii</i>	42
Fig 11. Digestión con la enzima <i>SmaI</i> de la construcción del plásmido pBR1MCS:: <i>ndhII</i>	43
Fig 12. Amplificación del gen <i>ndhII</i> de <i>A. vinelandii</i>	45
Fig 13. Digestión de pJET:: <i>ndhII</i> con <i>SmaI</i>	45
Fig 14. Electroforesis en gel de la construcción pJET:: <i>ndhII::gm</i>	46
Fig 15. Mapa de restricción del pJET:: <i>ndhII::gm</i> Fig. 15 PCR de la construcción pJET:: <i>ndhII::gm</i> en <i>A. vinelandii</i> OP.....	46

Fig 16. CydA::km	47
Fig 17. CydA::km digerido con la enzima de digestión <i>Sma</i> I.....	49
Fig18. Colonias candidatas de <i>A. vinelandii</i> OP portadoras de la construcción cydA::km.....	49
Fig 19. Determinación de la polaridad de la construcción nqrE::Tn5 de las colonias candidatas de <i>A. vinelandii</i> OP.....	51
Fig 20. Matrices utilizados en este trabajo.....	52
Fig 21. Crecimiento como Peso seco (mg/ml) con aireación baja a las 36 hrs de las cepas OP (wt), cydA y nqrE.....	54
Fig 22. Crecimiento medido como peso seco (mg/ml) de las cepas OP (wt), cydA y nqrE con aireación media a las 36 hrs.....	54
Fig 23. Crecimiento como Peso seco (mg/ml) con aireación alta a las 36 hrs de las cepas OP (wt), cydA y nqrE.....	55
Fig 24. Crecimiento como concentración de proteína (µg/ml) con aireación baja a las 36 hrs de las cepas OP (wt), cydA y nqrE.....	57
Fig 25. Crecimiento como concentración de proteína (µg/ml) con aireación media a las 36 hrs de las cepas OP (wt), cydA y nqrE.....	57
Fig 26. Crecimiento como concentración de proteína (µg/ml) con aireación alta a las 36 hrs de las cepas OP (wt), cydA y nqrE.....	58
Fig 27. Concentración de PHB producido por las cepas cydA::km, nqrE::Tn5 y OP en condición de baja aireación	58
Fig 28. Concentración de PHB producido por las cepas cydA::km, nqrE::Tn5 y OP en condición de media aireación	60
Fig 29. Concentración de PHB producido por las cepas cydA::km, nqrE::Tn5 y OP en condición de alta aireación.....	61
Fig 30. Caracterización del pH del medio de cultivo para el tiempo final (36 hrs) en diferentes condiciones de aireación (baja, media y alta).....	67

Índice de tablas

Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo	28
Tabla 2. Oligos utilizados	29
Tabla 3. Prueba de Tukey para el análisis de varianza de los valores de peso seco obtenidos para las tres cepas (OP, cydA y nqrE) en una condición de aireación baja.....	55
Tabla 4. Prueba de Tukey para el análisis de varianza de los valores de peso seco obtenidos para las tres cepas (OP, cydA y nqrE) en una condición de aireación media.	55
Tabla 5. Prueba de Tukey para el análisis de varianza de los valores de producción de PHB obtenidos para las tres cepas (OP, cydA y nqrE) en una condición de aireación baja.	61
Tabla 6. Prueba de Tukey para el análisis de varianza de los valores de producción de PHB obtenidos para las tres cepas (OP, cydA y nqrE) en una condición de aireación alta.....	61
Tabla 7. Rendimiento Peso seco/Sacarosa en condición de aireación baja, media y alta (g de Biomasa/g de sacarosa).....	62
Tabla 8. Rendimiento PROTEÍNA/Sacarosa en condición de aireación baja, media y alta (mg de Proteína/g de sacarosa).....	63

Tabla 9. Rendimiento PHB/Sacarosa en condición de aireación baja, media y alta (mg de PHB/g de sacarosa)65

Tabla 10. Rendimiento específico de PHB en condición de aireación baja, media y alta (g PHB/g de Proteína).....65

I. Resumen

El poli- β -hidroxibutirato (PHB), es un poliéster de la familia de los polihidroxicanoatos (PHAs) compuesto por unidades de hidroxibutirato. El PHB tiene importancia industrial, pues es un plástico biodegradable. *Azotobacter vinelandii* es una bacteria que presenta características interesantes para la producción de PHB, como son, su capacidad para crecer en gran variedad de sustratos y de acumular estos polímeros hasta en un 90% de su peso seco. Esta bacteria es aerobia estricta y fijadora de nitrógeno. Dado que la fijación de nitrógeno es un proceso altamente sensible a oxígeno, para crecer en condiciones de aerobiosis esta bacteria debe proteger a su nitrogenasa del daño por oxígeno. Una característica distintiva de *A. vinelandii* es su alta tasa de respiración. Estudios con *Azotobacter* sugieren que la protección de la nitrogenasa se da en parte mediante la llamada protección respiratoria, que consiste en la generación de un ambiente intracelular anóxico gracias a la respiración muy activa que presenta esta bacteria. Esto se logra por la presencia de una cadena respiratoria ramificada que tiene componentes alternativos que están sólo parcialmente acoplados a la generación de un potencial de protones transmembranal. Así, estas vías alternativas para el transporte de los electrones generan menos energía que la completamente acoplada. En la protección respiratoria están implicados dos componentes de la cadena respiratoria: una NADH:ubiquinona oxidoreductasa de tipo II (NdhII) en la porción inicial, y una citocromo oxidoreductasa terminal CydAB I. Adicionalmente, existen componentes alternativos adicionales, como una NADH:ubiquinona oxidoreductasa translocadora de Na^+ cuya función en *A. vinelandii* se desconoce. En esta tesis se propuso evaluar el efecto de la eliminación de estos tres componentes de la cadena respiratoria mediante la inactivación de los genes *ndhII*, *cydA* y *nqrE*, que codifican para la NADH: ubiquinona oxidoreductasa desacoplada (NdhII), la citocromo bd quinol oxidasa terminal (CydAB), y una subunidad de la NADH:ubiquinona oxidoreductasa translocadora de Na^+ (Nqr), sobre el crecimiento y la producción de PHB de *A. vinelandii* OP. Esto se realizó con la hipótesis de que la inactivación de los genes *ndhII*, *cydAB* y *nqrE* disminuirá la demanda de oxígeno durante el cultivo en matraces de agitación de *A. vinelandii* OP. Así, se construyeron las cepas mutantes *ndhII::Gm*, *cydAB::Km* y *nqrE::Tn5*, y se caracterizaron bajo tres condiciones de aireación (baja, media y alta), en cultivo líquido, dos de las mutantes: *cydAB::Km* y *nqrE::Tn5* y se compararon con la cepa silvestre OP. Los resultados de esta caracterización demuestran que la cepa mutante de *cydAB::km* de *A. vinelandii* OP, presentó un mayor crecimiento en una condición de aireación media, pudiendo crecer más que la mutante *nqrE::Tn5* y que la cepa silvestre OP. La cepa *nqrE::Tn5*, presentó un rendimiento en la producción de PHB volumétrico (mg de PHB/g de sacarosa) mayor que el de la cepa mutante *cydAB::km* y que la cepa silvestre OP. También se determinó que el pH del medio de cultivo es un factor fundamental para el crecimiento de *A. vinelandii*, por lo que es importante controlarlo durante el cultivo.

II. Introducción

Generalidades de los Polihidroxicanoatos (PHAs).

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son una compleja clase de polímeros producidos por diferentes bacterias. Son poliésteres de ácidos hidroxialcanóicos, que se sintetizan como compuestos de almacenamiento de energía y de carbono y son almacenados en forma de gránulos intracelulares (Kung *et al.*, 2007). Todos los PHAs comparten algunas propiedades que los hacen interesantes para la industria: (1) son termoplásticos y elastómeros que pueden ser procesados para la fabricación de diferentes productos; (2) son insolubles; (3) presentan un alto grado de polimerización que llega hasta los 4 millones de Da; (4) son productos químicos enantioméricamente puros, que consisten, únicamente del estereoisómero *R*; (5) no son tóxicos; (6) son biocompatibles; (7) exhiben propiedades piezoeléctricas (que son un fenómeno presentado por determinados materiales que al ser sometidos a tensiones mecánicas adquieren una polarización eléctrica en su masa, apareciendo una diferencia de potencial y cargas eléctricas en su superficie); (8) Se producen a partir de recursos renovables como son los carbohidratos; (9) todos los PHAs son biodegradables, pues son hidrolizados por depolimerasas extracelulares, para ser utilizados como fuente de carbono y energía por muchas bacterias y hongos (Steinbüchel, A., 2001).

Azotobacter vinelandii, una bacteria productora de PHAs

A. vinelandii (Figura 1) es una bacteria productora de poli- β -hidroxibutirato (PHB), un PHA compuesto por unidades de hidroxibutirato (Figura 2), que es el

más común y mejor caracterizado de estos poliésteres. *A. vinelandii* presenta características interesantes para la producción de PHB, como son: su capacidad para crecer en gran variedad de sustratos como glucosa, sacarosa, otros tipos de azúcares, alcoholes y sales inorgánicas (Page, 1992; Chen y Page 1994; Page y Cornish, 1993; Chen y Page 1997), y de acumular estos polímeros hasta en un 90% de su peso seco. También puede producir PHB de alto peso molecular (hasta de 4 millones de Daltones) bajo ciertas condiciones (Chen y Page, 1994).

En cuanto a la biología de *A. vinelandii*, se trata de una bacteria *Gram negativa* del suelo, que se mueve a través de flagelos peritricos, de vida libre, aeróbica obligada. Este microorganismo es quimioorganotrófico, utiliza azúcares, alcoholes y sales inorgánicas para crecer. Además, es fijador de nitrógeno; en vida libre fija al menos 10 mg de N₂ por gramo de carbohidrato consumido. También utilizan nitrato y sales de amonio y ciertos aminoácidos como fuentes de nitrógeno (Consultado en: <http://biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/>. CIFN).

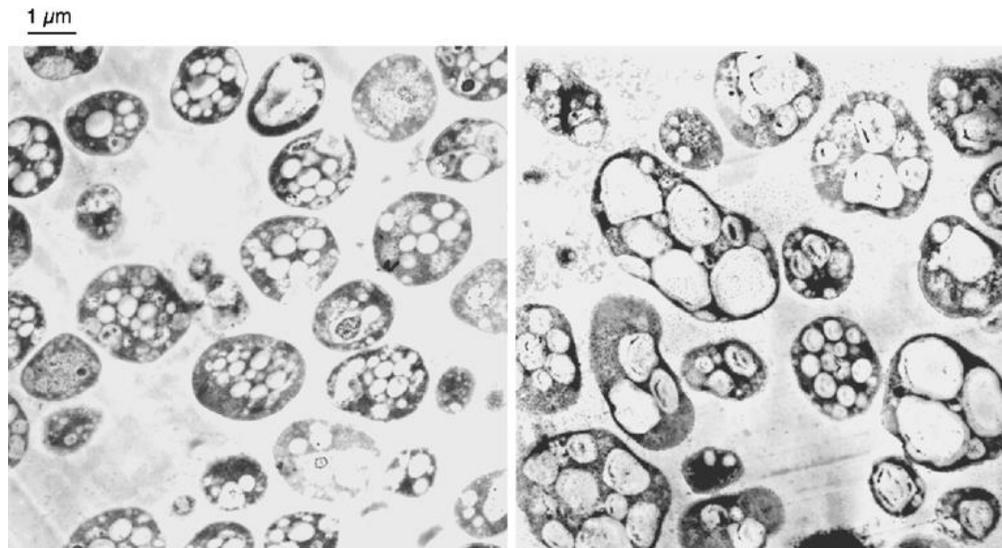


Figura 1. Micrografía electrónica de *A. vinelandii*. Se pueden observar los gránulos de PHB dentro del citoplasma, (Segura *et al.* 2003)

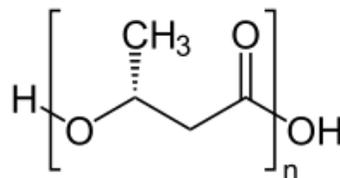


Figura 2. Estructura química del poli- β -hidroxibutirato (PHB). Obtenida en (<http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar>)

La biosíntesis de PHB en A. vinelandii

En *A. vinelandii*, el PHB se sintetiza en tres pasos enzimáticos a partir del acetil-CoA (Figura 3): El primer paso consiste en la condensación de dos moléculas de acetil-CoA. La enzima β -cetotilasa cataliza esta primera reacción para generar acetoacetil-CoA, el cual es reducido por una acetoacetil-CoA reductasa dependiente de NADPH produciendo beta-hidroxibutiril-CoA, que finalmente es

polimerizado por la PHB sintasa, liberando CoA (Manchak y Page, 1994). Los genes que codifican estas enzimas, están incluidos en el operón *phbBAC*, (Segura *et al.*, 2000 (Figura 3).

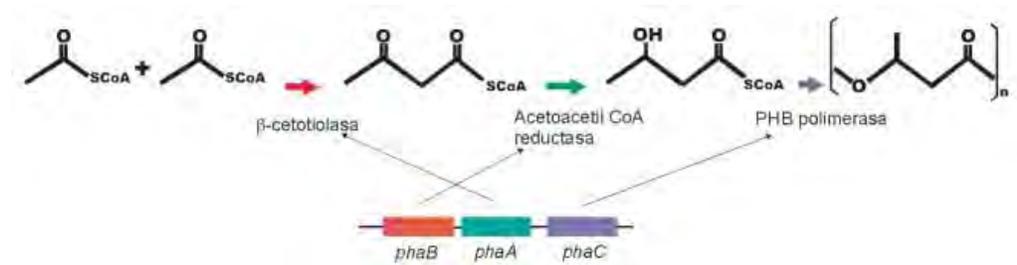


Figura 3. Biosíntesis del PHB. Obtenida en (<http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar>)

La regulación de la síntesis de PHB en *A. vinelandii*

La cantidad de PHB que produce *A. vinelandii* depende de diversos factores, como son: las condiciones de cultivo, la capacidad metabólica de la bacteria para utilizar los nutrientes para la síntesis del polímero y los mecanismos de regulación genética de la expresión de los genes *phbBAC* y de control de las actividades de las enzimas biosintéticas. Un nivel de regulación se da mediante el control alostérico de la primera enzima de la ruta, la β -cetotilasa, afectada negativamente por CoA libre, y positivamente por acetil-CoA (Senior y Dawes, 1973; Manchak y Page, 1994). Es por esta regulación que el nivel de oxígeno es un factor determinante de la cantidad de polímero que sintetiza *A. vinelandii*. Cuando la cadena respiratoria se ve limitada por falta de oxígeno, el poder reductor (NADH y NADPH) se incrementa, lo que inhibe la actividad de enzimas

del ciclo de Krebs (Choi y Lee, 1999; Senior *et al.*, 1972). Esto disminuye tanto la entrada de acetil-CoA a este ciclo, como la generación de CoA, lo cual permite que haya disponibilidad del precursor de PHB y libera la inhibición de la β -cetotiolasa por una relación acetil-CoA/CoA alta, incrementando la síntesis de PHB (Senior y Dawes, 1973; Segura y Espín, 2004).

Otro nivel de regulación se da mediante el control de la expresión de los genes biosintéticos. En este control participan el regulador PhbR, actuando como activador de la transcripción de los genes *phbBAC* (Peralta-Gil *et al.*, 2002); el factor sigma RpoS, que participa en la transcripción tanto del regulador *phbR* como de *phbBAC* (Peralta-Gil *et al.*, 2002), y el regulador tipo *Fnr* denominado *CydR* (Wu *et al.*, 2001). Además de estos reguladores directos existen sistemas de regulación global que participan en el control de la expresión de los genes *phbBAC*. El primer sistema de regulación global que afecta la expresión de los genes *phb* está conformado a su vez por dos sistemas reguladores: el sistema de regulación de dos componentes conformado por la proteína cinasa detectora transmembranal GacS y el regulador transcripcional GacA (Castañeda *et al.*, 2000; Castañeda *et al.*, 2001); y el sistema de regulación postranscripcional RsmA/RsmZ-Y (Cocótl, 2007; Manzo *et al.*, 2012). El sistema GacS/GacA funciona cuando GacS se autofosforila y fosforila luego al regulador GacA, activándolo. GacA activo, controla a su vez al sistema RsmA/RsmZ-Y de la siguiente manera: en el sistema RsmA/RsmZ-Y el efector es una proteína pequeña denominada RsmA que se une, entre otros, a los RNAs mensajeros del gen del activador *phbR* y del operón biosintético *phbBAC*, (figura 4). Esta unión inhibe la traducción de estos mensajeros y disminuye la vida media de éstos (Hernandez-Eligio *et al.*,

2012). RsmA es por lo tanto, un regulador negativo de la síntesis de PHB. La actividad de RsmA es controlada por unos RNAs pequeños denominados RsmZ1-7 y RsmY cuya función es unirse a la proteína RsmA, titulándola e impidiendo su efecto negativo sobre sus blancos. La expresión de estos RNAs es activada por GacA fosforilada, inhibiendo de esta forma al regulador negativo RsmA.

Un sistema de regulación adicional que participa en el control de la síntesis de PHB, es el conocido como Sistema Fosfotransferasa relacionado a nitrógeno (PTS^{Ntr}). PTS^{Ntr} consta de tres proteínas, la Enzima I^{Ntr} (EI^{Ntr}) y las proteínas Npr y II^{Ntr}. Se ha demostrado que éstas forman la siguiente cadena de transferencia de un grupo fosforilo: fosfoenolpiruvato (PEP) → EI^{Ntr} → Npr → IIA^{Ntr}, donde IIA^{Ntr} al parecer es el aceptor terminal del fosforilo (Segura y Espín, 1998; Noguez *et al.*, 2008). La proteína IIA^{Ntr} en su forma no fosforilada actúa como un regulador negativo de la síntesis de PHB al afectar negativamente la expresión de los genes *phbR* y *phbBAC* por un mecanismo aún desconocido (Noguez *et al.*, 2008).

Con la finalidad de obtener cepas de *A. vinelandii* mejoradas para la producción de PHB para generar plásticos biodegradables, en el laboratorio donde se realizó esta tesis recientemente se construyó una cepa de esta bacteria que lleva las mutaciones *ptsN* y *rsmA*, la cual acumula grandes cantidades de PHB cuando se crece en placas o en matraces (Andres Garcia Tesis de Maestría).

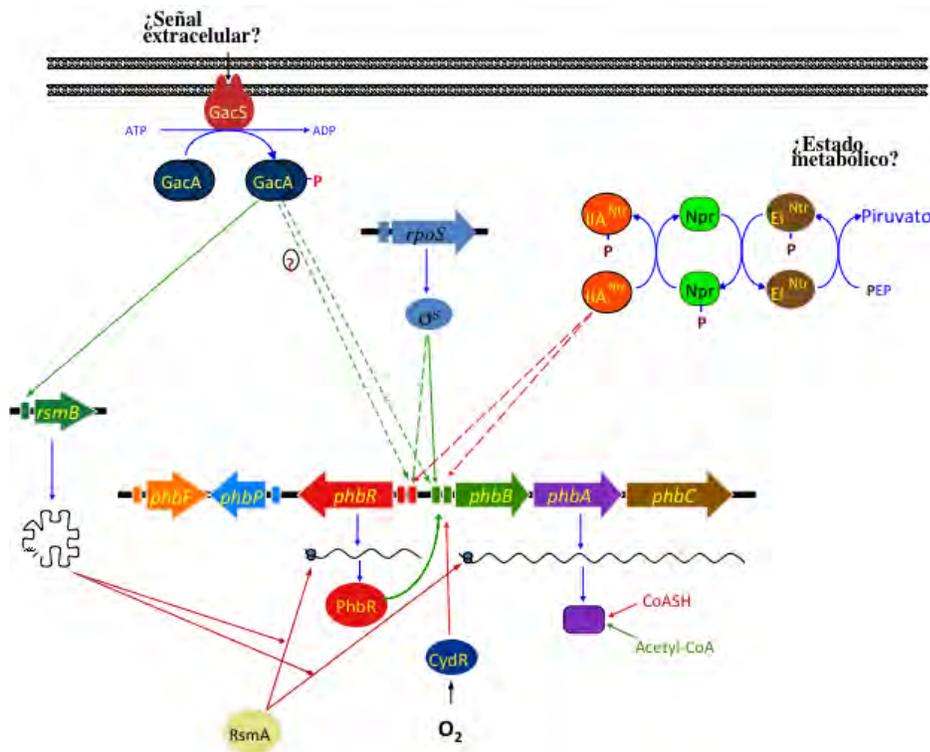
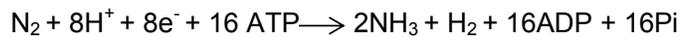


Figura 4. Regulación de síntesis de PHB en *A. vinelandii*

III. Antecedentes

A. vinelandii es una bacteria interesante para la producción de PHB por su gran capacidad de acumulación del polímero, por su capacidad para utilizar ciertos substratos económicos y porque gracias al conocimiento que se tiene de los sistemas genéticos que regulan la producción de PHB se cuenta con mutantes mejoradas (Galindo *et al.*, 2007). Sin embargo, el uso de esta bacteria aun presenta algunos inconvenientes que hay que resolver.

Una característica distintiva de *A. vinelandii* es su alta tasa de respiración. Esta característica está probablemente ligada al fenómeno de fijación biológica del nitrógeno que esta bacteria puede llevar a cabo. Las bacterias de este género son aerobias obligadas que utilizan una cadena de transporte de electrones con oxígeno como aceptor final y son capaces de asimilar el nitrógeno atmosférico vía una nitrogenasa que, paradójicamente, es sensible al oxígeno. La fijación biológica de N₂ es pues, un proceso anaerobio que requiere una gran cantidad de ATP y una fuente de electrones de bajo potencial.



Las nitrogenasas, las enzimas que catalizan este proceso, difieren en su contenido metálico, pero todas contienen hierro y están compuestas por dos proteínas. Las más estudiadas tienen molibdeno, aunque otras contienen vanadio o sólo hierro. En todos los casos estas enzimas se inactivan en presencia de oxígeno (Bishop y Premakumar, 1992).

Estudios con *Azotobacter* en cultivo continuo sugieren que la manera como estas bacterias aerobias pueden fijar nitrógeno en presencia de oxígeno es protegiendo a la nitrogenasa por dos mecanismos:

- 1) Protección conformacional: Se manifiesta vía un cambio conformacional rápido en el complejo de la nitrogenasa que se presenta cuando la concentración de oxígeno aumenta; en este proceso interviene la proteína FeSII que detecta el estado redox celular e interacciona con la nitrogenasa, lo que la estabiliza, aunque la vuelve temporalmente inactiva. Este es un proceso reversible, ya que al disminuir la concentración de oxígeno, la actividad de la nitrogenasa se restablece (Gallon, 1992).

2) Protección respiratoria: Este mecanismo consiste en la remoción de oxígeno al mantener una tasa de respiración alta, lo que permite generar un ambiente celular anóxico adecuado para la fijación de nitrógeno (Gallon, 1992).

Diferentes estudios del complejo sistema respiratorio de *A. vinelandii*, muestran claramente que la concentración del oxígeno ambiental existente durante su crecimiento, tiene un profundo efecto en la actividad y composición de la cadena respiratoria de este organismo, ya que ésta tiene componentes alternativos que se expresan dependiendo de las condiciones existentes (Bertsova *et al.*, 2001). Esta respuesta tiene que ver con la protección respiratoria de la nitrogenasa.

Dentro de estas cadenas respiratorias alternativas presentes en *A. vinelandii* (Figura 5), se ha reportado que existen, en la porción inicial, varias deshidrogenasas (malato deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, NADPH deshidrogenasa, NADH deshidrogenasa, e hidrogenasa), siendo NADH y succinato los principales donadores de electrones (Poole y Hill, 1997). Estas deshidrogenasas transfieren los electrones a la ubiquinona. De hecho, la actividad de NADH deshidrogenasa en realidad está constituida por varias NADH:ubiquinona oxidoreductasas, una llamada NdhI del tipo Nuo acoplada a bombeo de protones para la síntesis de ATP, y una Ndh tipo-II (no acoplada). Esta última se ha visto que está involucrada en la protección respiratoria (Bertsova *et al.*, 1998; Bertsova *et al.*, 2001). En el genoma de *A. vinelandii* existen adicionalmente dos oxidoreductasas implicadas en el transporte de cationes a través de la membrana, una de tipo Sha y una de tipo Nqr (Setubal *et al.*, 2009). Recientemente, se caracterizó la de tipo Nqr, una NADH:ubiquinona

oxidoreductasa, que transloca sodio en vez de protones (Fadeeva *et al.*, 2008). El papel de esta oxidoreductasa en el metabolismo de *A. vinelandii* se desconoce. En otras bacterias genera un potencial electroquímico de sodio que se utiliza en la importación de solutos, en la síntesis de ATP y en el movimiento flagelar (Nuñez *et al.*, 2009). No se ha visto asociación de Nuo, Nqr o Sha con la protección respiratoria de la nitrogenasa. Además de las oxidoreductasas hasta aquí enumeradas, en el genoma de *A. vinelandii* hay dos copias del sistema Rnf (Rnf1 y Rnf2) que, de acuerdo con Setubal *et al.*, (2009), muestran similitud con NADH-ubiquinona oxidoreductasas dependientes de sodio, sin que esté claro su papel en el metabolismo.

En la porción terminal de las cadenas respiratorias de *A. vinelandii* también existen distintas alternativas para el transporte de los electrones de la ubiquinona reducida (ubiquinol) al aceptor final oxígeno.

Esta oxidoreducción ubiquinol-oxígeno, puede ocurrir por una vía de dos pasos, vía una citocromo *c* reductasa (complejo III) seguida por una citocromo C oxidasa terminal (complejo IV), o por un proceso de un solo paso, vía una oxidasa terminal dependiente de ubiquinol. De acuerdo con Setubal *et al.*, (2009), el genoma de *A. vinelandii* codifica para cinco oxidasas terminales de la cadena transportadora de electrones (Figura 5): la citocromo *c* oxidasa (oxidasa Cdt), citocromo *o* oxidasa (Cox), citocromo *cbb*₃ (Cco), citocromo bd copia I (Cyd AB I), citocromo bd copia II (CydAB II). La presencia de dos oxidasas citocromo bd en *A. vinelandii* no se esperaba. La CydAB oxidasa I, ha sido caracterizada extensamente, mientras que la función precisa la CydAB oxidasa II permanece por ser elucidada, (Setubal *et al.*, 2009). La protección respiratoria de la

nitrogenasa se ha determinado que se da mediante la NADH:ubiquinona oxidoreductasa tipo II, (NdhII) en la porción inicial de la cadena respiratoria y de la oxidasa CydAB I, en la porción terminal de reducción de oxígeno a agua (Bertsova *et al.*, 2001). Estas oxidasas protegen a la nitrogenasa, incrementando la respiración y generando un ambiente intracelular anóxico (Dalton y Postgate, 1968; Dalton y Postgate, 1969). Estas cadenas respiratorias alternativas son muy activas y, como ya se mencionó, están sólo parcialmente acopladas a la generación de un potencial de protones trans-membranal. Cuando se utiliza NdhII en combinación con la oxidasa CydAB I se genera 5 veces menos energía que al utilizar una vía completamente acoplada (Bertsova *et al.*, 1998). Esto probablemente repercute en el consumo y demanda de oxígeno, el crecimiento y los rendimientos de PHB.

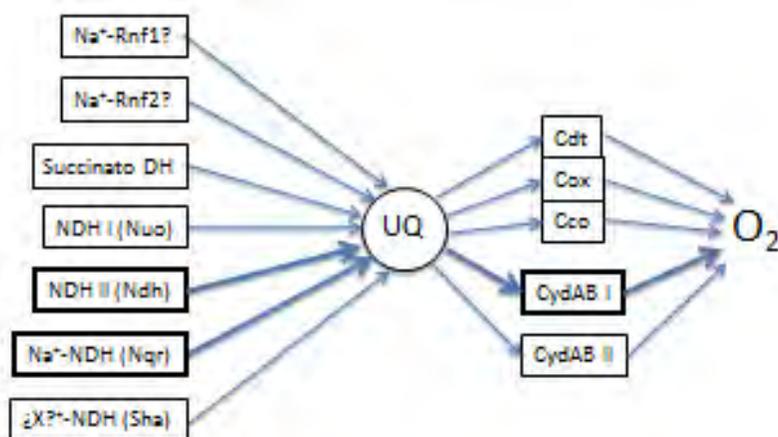


Figura 5. Cadena transportadora de electrones ramificada de *A. vinelandii* (en negritas la NdhII, Na⁺ Ndh (nqr) y CydAB).

Cuando se cultiva *A. vinelandii* en matraces agitados o en fermentadores instrumentados, ésta exhibe un menor crecimiento en comparación con el de otras bacterias utilizadas en procesos biotecnológicos (Peña *et al.*, 2002; Galindo *et al.*, 2007; Mejía *et al.*, 2010). Así, a pesar de que se han generado cepas que sobreproducen PHB, las concentraciones volumétricas al final del cultivo son bajas (datos no publicados).

Dada la alta tasa de respiración que presenta *A. vinelandii*, es común que en cultivos donde no existe un control de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) se presenten limitaciones de oxígeno desde etapas muy tempranas en el proceso de fermentación (Díaz-Barrera *et al.*, 2007). También se ha observado que en una TOD mayor al 5 % la bacteria utiliza la fuente de carbono principalmente para la producción de biomasa (Peña *et al.*, 2000), lo cual puede ser explicado a través de una mayor actividad en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, mientras que en cultivos realizados a una baja TOD se favorece la acumulación intracelular del PHB, debido a una baja actividad de este ciclo metabólico. Estas observaciones implican que el oxígeno disuelto juega un papel relevante en la producción de biomasa y de PHB en esta bacteria. Es importante señalar que la limitación de oxígeno puede también reducir la capacidad respiratoria de la bacteria, lo que puede también reducir el crecimiento, repercutiendo en la cantidad de PHB producida.

Componentes de la cadena respiratoria de A. vinelandii involucrados en la protección respiratoria.

La NADH: ubiquinona oxidoreductasa del tipo II está codificada por el gen *ndhII* (Bertsova *et al.*, 2001; Fig. 6). De acuerdo con Bertsova *et al.*, (2001), la inactivación de este gen en la cepa de *A. vinelandii* UW136 provocó un marcado descenso en su actividad respiratoria. Esta mutante fué incapaz de crecer diazotóricamente (fijando nitrógeno) bajo una aireación alta, mientras que el crecimiento no se vió afectado en condiciones de baja aireación o en presencia de NH_4^+ (condición de no fijación de nitrógeno). Estos resultados demostraron que la NdhII es un componente esencial del sistema de protección respiratoria de la nitrogenasa en *A. vinelandii*.

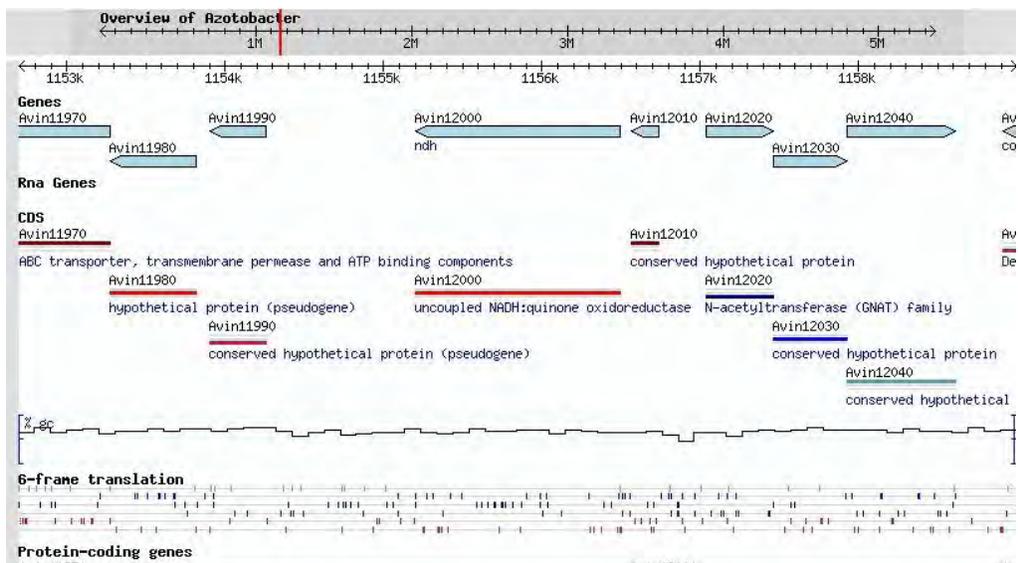


Figura 6. Mapa de la región del genoma de *A. vinelandii* donde se encuentra el gen *ndh II* (<http://www.azotobacter.org>).

Además de la participación de NdhII en la protección respiratoria, existen datos que demuestran que la oxidasa terminal citocromo bd I (CydAB I) también es importante. Esta oxidasa está codificada por los genes *cydAB* (Kelly *et al.*, 1990; Figura 7).

De acuerdo con Kelly *et al.*, (1990) la inactivación de los genes *cydAB* por inserción de un Tn5-B20, resultó en la pérdida de la capacidad de crecer en medio deficiente de nitrógeno fijado cuando se incubaban en condiciones aerobias, pero la mutante fué capaz de fijar nitrógeno cuando la concentración de oxígeno ambiental se redujo a 1.5% (vol/vol). En ese trabajo se propuso que la cadena respiratoria de *A. vinelandii* requerida para la protección respiratoria de la nitrogenasa termina con el citocromo bd. Posteriormente, Wu *et al.*, (2000), reforzaron la idea de que en *A. vinelandii*, la fijación del nitrógeno aero-tolerante requiere del citocromo bd y propusieron que la regulación de la expresión de este citocromo está dada por CydR, una proteína homóloga a Fnr de *E. coli*, que reprime la transcripción de los genes *cydAB* de esta oxidasa terminal bajo condiciones de baja oxigenación.

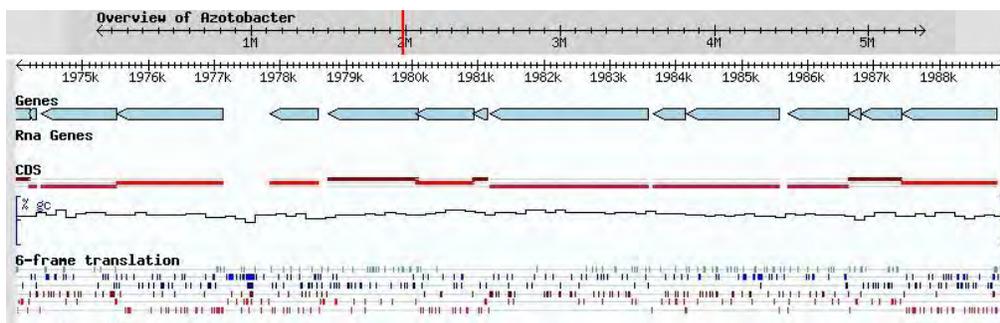


Figura 7. Mapa del operón *cydAB* en el genoma de *A. vinelandii*, (<http://www.azotobacter.org>)

Efecto de la inactivación de la NADH:Ubiquinona oxidoreductasa translocadora de Na⁺.

Las NADH:ubiquinona oxidoreductasas: translocadoras de Na⁺ (Na⁺NQR) son bombas redox de sodio compuestas por seis subunidades (NqrA-F) que están codificadas por el operon *nqr* (Fig. 8), (Nuñez *et al.* 2009). Este complejo enzimático acopla la oxidación exergónica de NADH y la reducción concomitante de ubiquinona, con el transporte de Na⁺ del espacio citoplasmático al periplasmático (Bertsova; *et al.* 1998). Estas Na⁺NQR disminuyen la concentración de Na⁺ intracelular y contribuyen a la generación de un potencial electroquímico de Na⁺. Este potencial transmembranal de sodio juega un papel importante en el metabolismo de diferentes bacterias, está involucrado en la importación de solutos, en la síntesis de ATP y en la rotación flagelar (Skulachev, 1989). Nuñez *et al.* (2009), describieron el aislamiento y caracterización de una cepa mutante de *A. vinelandii* denominada GG4, derivada de la cepa AEIV, que tiene un minitransposón Tn5 insertado en el gen *nqrE*. Este gen codifica para una de las subunidades de la ubiquinona oxidoreductasa NADH: translocadora de Na⁺ anteriormente descrita. Esta cepa presentó una sobreproducción del exopolisacárido alginato. Por otro lado, Gaytán *et al.*, (2012), trabajaron con la mutante ATCN4 de *A. vinelandii*, que posee esta misma mutación en el fondo genético de la cepa *A. vinelandii* ATCC 9046. Esta mutante también mostró un fenotipo de sobre-producción del polisacárido alginato (fenotipo altamente mucoide), al ser cultivada en medio mínimo y medio rico en matraces. La mutante

ATCN4 mostró una mayor eficiencia en la conversión de la sacarosa a alginato y también al poliéster PHB; teniendo respectivamente rendimientos (gramos de alginato o PHB producidos por gramo consumido de sacarosa) de 3.6 y 1.6 veces los obtenidos en los cultivos de la cepa silvestre. La mutante ATCN4 mostró también un mayor crecimiento (medido como contenido de proteína) y una mayor tasa de crecimiento (μ), pues para la mutante la μ fue de 0.05 h^{-1} con una concentración máxima de proteína de 0.7 g L^{-1} mientras que en la cepa silvestre estos valores fueron de 0.04 h^{-1} y 0.48 g L^{-1} respectivamente. Estos investigadores mostraron que el contenido de PHB en la cepa silvestre ATCC 9046 se mantuvo constante entre 40-55% del peso seco durante el crecimiento; mientras que en los cultivos de la mutante ATCN4, el porcentaje de PHB se incrementó durante la fase de crecimiento exponencial y llegó a un máximo de 66% después de las 48hrs de cultivo (Figura 9). Estos datos muestran que la inactivación de esta oxidasa terminal tuvo un efecto positivo en dos parámetros importantes para la producción de PHB: el crecimiento y el contenido del polímero. Esto se logró además con una mayor eficiencia de conversión de la fuente de carbono en biomasa y en PHB; sin embargo, esta cepa sobreproduce alginato, y la síntesis de este exopolisacárido compete con la producción PHB por la fuente de carbono suministrada (Segura *et al.*, 2003).

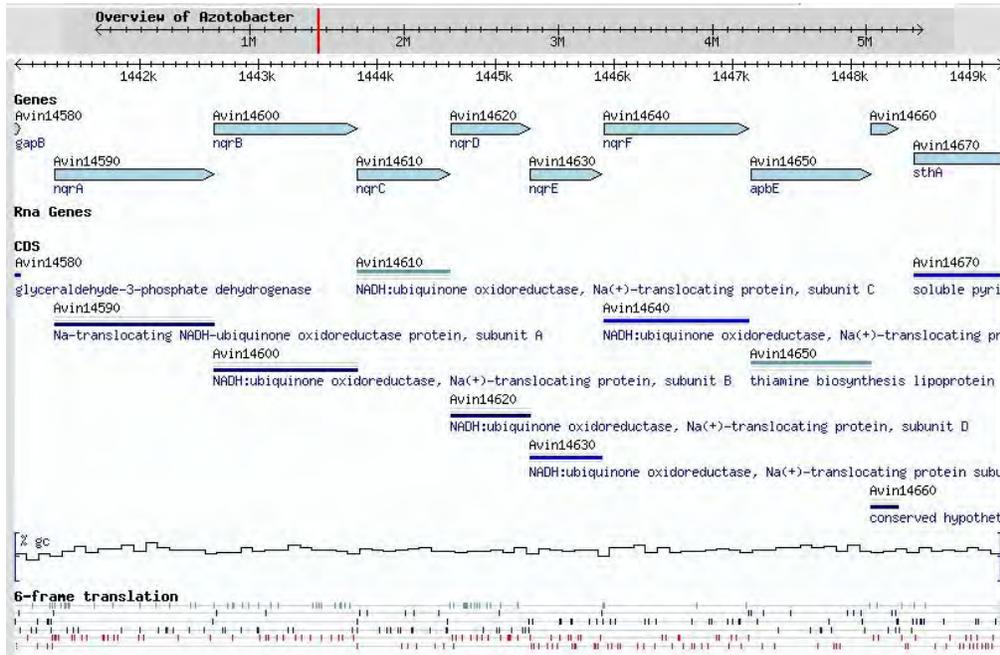


Figura 8. Mapa del operón *nqr* en el genoma de *A. vinelandii*, (<http://www.azotobacter.org>)

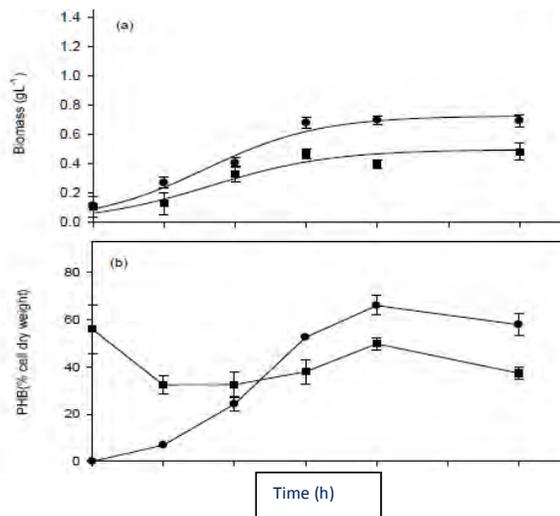


Figura 9. Producción de biomasa (a) y PHB (b) por *A. vinelandii* ATCC 9046 (cuadros) y su derivada mutante ATCN4 (círculos) (Gaytán *et al.*, 2012).

Se sabe que uno de los parámetros críticos en la producción del PHB es la producción de biomasa que se alcanza, y ésta, al igual que la acumulación del polímero, depende de la concentración de oxígeno existente en los cultivos de *A. vinelandii*.

Una dificultad que tiene *A. vinelandii* como productor de PHB a gran escala, es que, durante la fijación aerobia de nitrógeno, esta requiere altas concentraciones de oxígeno para soportar el gasto energético de la fijación del N₂. Además de que en esta bacteria la protección respiratoria conlleva un gasto energético considerable (Oelze, 2000). Aunque una parte de estos inconvenientes se soluciona en los cultivos de *A. vinelandii* utilizando una fuente de nitrógeno fijado, como puede ser el amonio o fuentes más complejas como las peptonas o el extracto de levadura, *A. vinelandii* presenta una tasa de respiración alta aún bajo condiciones de no fijación de nitrógeno. Así, el cultivo de *A. vinelandii* requiere altas concentraciones de oxígeno (Gaytán *et al.*, 2012). Esto aumenta los costos de producción en los fermentadores al necesitarse velocidades de agitación altas, y un mayor consumo de potencia para suministrar el oxígeno necesario. Se ha determinado que este fenómeno se debe probablemente a la existencia de las cadenas respiratorias alternativas descritas anteriormente (Bertsova *et al.*, 1998, Bertsova *et al.*, 2001, Poole y Hill, 1997, Cruz-Ramos, 2000).

Con objeto de mejorar la producción de PHB o el rendimiento de biomasa en *A. vinelandii*, en este proyecto se propuso la inactivación de los genes *ndhll*, *cydA* y *nqrE*, que codifican para componentes de las cadenas respiratorias alternativas para reducir la tasa de respiración.

IV. Hipótesis

Si se inactivan los genes *ndhll*, *cydAB* o *nqrE*, cuyos productos participan en cadenas respiratorias alternativas, aumentará la producción de biomasa y de PHB, y disminuirá la demanda de oxígeno durante el cultivo de *A. vinelandii*.

V. Objetivo general

Evaluar en la cepa de *A. vinelandii* OP el efecto de la inactivación de los genes *nqrE*, *ndhll* y *cydA*, que codifican para la NADH:ubiquinona oxidoreductasa translocadora de Na⁺, la NADH:ubiquinona oxidoreductasa desacoplada Ndhll y la citocromo bd quinol oxidasa terminal de las cadenas respiratorias desacopladas, sobre su crecimiento y la producción de PHB .

VI. Objetivos particulares

- Caracterizar la capacidad de crecimiento y producción de PHB de las mutantes generadas en cultivos en matraces agitados.
- Estudiar la influencia de diferentes condiciones de aireación (baja, media y alta) en el crecimiento y producción de PHB por las distintas cepas mutantes de *A. vinelandii* en cultivos en matraces agitados.

VII. Materiales y métodos

VII.1 Medios y condiciones de cultivo de las cepas de *A. vinelandii* y *E. coli*

Las cepas de *A. vinelandii* y *E. coli* utilizadas en este trabajo se describen en la tabla 1. Los plásmidos utilizados en este trabajo se enlistan en la tabla 2.

Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo

Cepas	Fenotipo/genotipo	Referencia
<i>Azotobacter vinelandii</i>		
OP	Silvestre, Nal ^r , No produce alginato	Bush y Wilson, 1959
GG4	Derivada de AEIV con mutación <i>nqrE::Tn5, Sp^r</i>	Nuñez <i>et al.</i> , 2009
ndhII	Derivada de la OP <i>ndhII::gm</i> , Nal ^r , Gm ^r	Este trabajo
cydA	Derivada de la OP <i>cydA::km</i> , Nal ^r , Km ^r	Este trabajo
nqrE	Derivada de la OP <i>nqrE::Tn5</i> , Nal ^r , Sp ^r	Este trabajo
<i>E. coli</i>		
DH5α	supE44 ΔlacU169 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	GIBCO BRL

Las cepas de *E. coli* se crecieron en medio LB (en g/L): peptona de caseína, 10; cloruro de sodio, 10; extracto de levadura, 5; agar, 15 (para medio sólido). Estos cultivos se incubaron a 37 °C por 12 h. Las cepas de *A. vinelandii* se crecieron a 30 °C por 72 h en medio Burk modificado (en g/L): sacarosa, 20; extracto de levadura, 3; K₂HPO₄, 0.66; KH₂PO₄, 0.16; MOPS, 1.42; CaSO₄, 0.05; NaCl, 0.2; MgSO₄·7H₂O, 0.2; Na₂MoO₄·2H₂O, 0.0029; FeSO₄·7H₂O, 0.027;

suplementado con 14 g de agar para medio sólido y eliminando el extracto de levadura. Las cepas de *A. vinelandii* se conservaron en medio BS (en g/L): $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.160; $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.0002; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.073; Na_2SO_4 , 0.183; de K_2HPO_4 , 0.8 y KH_2PO_4 , 0.2. Los antibióticos usados para *E. coli* fueron: ampicilina 200 µg/ml, tetraciclina 20 µg/ml y 10µg/ml de gentamicina en medio líquido o sólido. Para *A. vinelandii* fueron: ácido nalidíxico 15 µg/ml, gentamicina 1 µg/ml, kanamicina 1 µg/ml y espectinomicina 50 µg/ml, en medio líquido o sólido. Alternativamente, las cepas de *A. vinelandii* se crecieron bajo las mismas condiciones en medio PYS (en g/L): sacarosa, 20; petona de caseína, 5; extracto de levadura, 3; suplementado con 14 g de agar para medio sólido.

VII.2 Oligonucleótidos utilizados.

Los oligonucleótidos empleados para las distintas PCR se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Nombre	Secuencia	Uso
AASF	GGGCCACCCCTACCCGGTTTTT	Amplificación del gen <i>ndh</i> de <i>A. vinelandii</i>
AASR	GGATCCGGAGGGGACTCAGTGAAGC	Amplificación del gen <i>ndh</i> de <i>A. vinelandii</i>
nqrEFF	GCAAACGTTCGGCTTCACC	Comprobación de la inserción y polaridad del minitransposon Tn5 en el gen <i>nqrE</i> de la cepa OP de <i>A. vinelandii</i> . Amplificación del gen <i>nqrE</i> .
nqrEFR	ATGGCGGGCTTCAGCAGTG	Comprobación de la inserción y polaridad del minitransposon Tn5 en el gen <i>nqrE</i> de la cepa OP de <i>A. vinelandii</i> . Amplificación del gen

		<i>nqrE</i> .
Tn5O	GGCCGCACTTGTGTATAAG	Comprobación de la inserción y polaridad del minitransposon Tn5 en el gen <i>nqrE</i> de la cepa OP de <i>A. vinelandii</i> . Complementario a la secuencia O del Tn5.
Tn5I	GGCCAGATCTGATCAAGAG	Comprobación de la inserción y polaridad del minitransposon Tn5 en el gen <i>nqrE</i> de la cepa OP de <i>A. vinelandii</i> . Complementario a la secuencia I del Tn5.
RposR	GACAGCGATCGAGGCCGTTTC	Amplificación del gen <i>rpoS</i> de <i>A. vinelandii</i>
RposF	GATTTGTTCGAGAGTATCG	Amplificación del gen <i>rpoS</i> de <i>A. vinelandii</i>
cydA upC	GTGTGGCAGTGCAAGATC	Amplificación del gen <i>cydA</i> de <i>A. vinelandii</i>
CydA LwC	CGAGGGCGAAGTTGATGC	Amplificación del gen <i>cydA</i> de <i>A. vinelandii</i>

VII.3 Determinación de proteína

La cuantificación de proteína se realizó por el método de Lowry et al., (1951). Los ensayos se realizaron por triplicado. El procedimiento fue el siguiente: se tomó 1ml de medio de cultivo y se centrifugó a 13, 000 r.p.m para obtener el paquete celular, esto se resuspendió en 1 ml de H₂O. Se tomaron 10 µl de las células resuspendidas y se llevó a 200 µl con H₂O. Se añadió 1ml de la solución reactiva, se agitó y dejó reposar 10 min. Se añadió 0.1 ml de reactivo de Folin diluido con 1 vol de H₂O y se dejó reposar 30 min. Finalmente se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a 595 nm. Simultáneamente se corrió una

curva de calibración utilizando un patrón de albúmina con las siguientes concentraciones en $\mu\text{g/ml}$: 5, 10, 25, 50, 75, 100 y 150.

Preparación de solución reactiva

Soluciones

Solución A: Na_2CO_3 2% en NaOH 0.1 N

Solución B: Tartrato de Na y K 2%

Solución C: CuSO_4 1%

Solución reactiva:

Se mezcló 0.01ml de solución C+ 0.01 ml de solución B + 0.980 ml de solución A

VII.4 Determinación de sacarosa

Previo al análisis a las muestras se les realizó una dilución 1/25. Posteriormente se tomaron 90 μl de cada una de las diluciones y se mezclaron con 0.1 ml de solución enzimática (3-fructosidasa), se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se adicionó 0.1 ml de solución de 3,5 ácido dinitrosalicílico (DNS) a cada muestra. Los tubos se calentaron a 95°C durante 5 min y después se enfriaron en hielo. Finalmente, se agregó 1 ml de agua destilada y se leyó en el espectrofotómetro a 540 nm.

Preparación de reactivos

- Amortiguador de citratos: 0.32 M y pH 4.6: 0.197 g de ácido cítrico disueltos en 50 ml de agua destilada. De igual forma, se pesó 9.1 g de citrato de sodio y se llevó a 50 ml con agua destilada. Se agregó gota a gota el citrato de sodio al ácido cítrico hasta alcanzar un pH de 4.6.

- Solución enzimática: Se pesaron 10 mg de enzima (3-fructosidasa) y disolvieron en 4 ml de amortiguador de citratos.
- Solución de DNS (3,5 ácido dinitrosalicílico): Se pesaron 16 g de hidróxido de sodio, 300 g de tartrato de sodio y potasio y 10 g de DNS (almacenar en frasco ámbar). Se mezclaron en ese orden en 1L de agua destilada.

VII.5 Determinación de pH

Para la determinación del pH del medio de cultivo se tomaron 3 ml del medio de cultivo (PY sacarosa) antes de inocular con las cepas correspondientes (tiempo inicial) y 3 ml a las 36 hrs de cada uno de los matraces correspondientes a cada condición de aireación (baja, media y alta) y a cada una de las cepas. El pH se midió usando un potenciómetro CORNING pH meter 240.

VII. 6 Determinación de PHB

La determinación de PHB se llevó a cabo utilizando la metodología reportada por Law y Slepecky (1961) modificada de la siguiente manera: Se tomó 1 ml de muestra, se centrifugó a 13, 000 r.p.m eliminando el sobrenadante. Se agregó 1 ml de hipoclorito comercial diluido al 30 %, la pastilla se resuspendió y se dejó reposando 1 hr; transcurrido ese tiempo se lavó con 1 ml de H₂O, posteriormente con 1 ml de etanol y finalmente con 1 ml de acetona. Se secó la pastilla y disolvió en 1 ml de ácido sulfúrico. El PHB disuelto en ácido se calentó a 95°C por 10 minutos, convirtiendo el PHB en crotonato. Finalmente, se diluyó la muestra en ácido sulfúrico lo necesario para obtener una lectura en espectrofotómetro a 235nm inferior a 0.8. Para el cálculo de la concentración de crotonato se utilizó la

ecuación de Lambert y Beer y el coeficiente de extinción molar del crotonato ($15600 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

VII.7 Extracción de ADN cromosomal de *A. vinelandii*

A. vinelandii se creció en 50 ml de medio BS líquido en agitación a 200 r.p.m. a 30°C , durante 46 h. Se centrifugaron 10 ml de cultivo a 8000 r.p.m. 5 min, para obtener la pastilla celular, la cual se transfirió a un tubo de 1.5 ml tipo Eppendorf. Se adicionaron 100 μl de NaCl 5 M, se dejó reposar 10 min a 65°C . Se agregaron 80 μl de CTAB 10 % / NaCl 0.7 M (ver apéndice) y se dejó incubando 20 min a 65°C . Posteriormente, se realizó una extracción con 400 μl de cloroformo-isoamílico (24:1). Se centrifugó a 13,000 r.p.m., recuperando el sobrenadante. Se extrajo con 400 μl de fenol-cloroformo-isoamílico. Ésto se realizó tres veces, hasta obtener una interfase limpia, centrifugándose cada vez 10 min, y recuperando cuidadosamente la fase acuosa. Se extrajo una vez más con 400 μl de cloroformo-isoamílico. Posteriormente, se centrifugó a 13,000 r.p.m. por 3 min, recuperando cuidadosamente el sobrenadante. Se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol. Se centrifugó a 13,000 r.p.m. por 10 min y se desechó el sobrenadante, recuperando únicamente la pastilla. La pastilla se lavó tres veces con etanol al 70 %. Cuidadosamente se retiró el etanol, y la pastilla se dejó secar a 37°C por 10 min. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 30 μl de H_2O con RNAsa (ribonucleasa 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), incubando la muestra por 1 h a 37°C (Sambrook *et al.*, 1989).

VII.8 Electroforesis del ADN

Se prepararon geles de agarosa al 1% en solución amortiguadora de TRIS-acetatos (ver apéndice). Los pozos del gel fueron cargados de acuerdo a la concentración necesaria de la muestra de interés, más 1-2 μ l de colorante. Como marcador de peso molecular se utilizó una solución de ADN del fago λ digerido con las enzimas *HindIII* y *BamHI* (100 ng/ml), que fue utilizado para calcular el tamaño de los fragmentos de ADN y su concentración. También se utilizó como marcador de peso molecular ADN 1 Kb *plus ladder* (Invitrogen). La electroforesis se corrió a 80 volts, por 45-60 min en solución amortiguadora de acetatos al 1X. Posteriormente, el gel fue teñido con bromuro de etidio (0.5 μ g/ml) durante 3-5 min, enseguida se lavó con agua por 5 minutos y posteriormente se observó en el transiluminador de luz UV, para visualizar el ADN (Sambrook *et al.*, 1989).

VII.9 Purificación de las construcciones génicas *cydA::km* y *ndhII::gm*

Para purificar las construcciones génicas *cydA::km* y *ndhII::gm* del gel de electroforesis se corrió suficiente ADN en un gel de agarosa al 1%. Las condiciones de corrida fueron de 80 volts por 45-60 min. Se cortó la banda deseada y se transfirió a un tubo eppendorf, posteriormente se utilizó GeneJET™ gel extraction kit de fermentas para terminar la purificación, siguiendo el procedimiento propuesto por el fabricante (Fermentas).

VII.10 Reacciones de ligación

Para la clonación de fragmentos de ADN, una vez que se obtuvo el fragmento de ADN deseado, éste se ligó a un vector que previamente fue digerido con una enzima de restricción adecuada, en una relación molar 3 (inserto): 1 (vector). Se utilizó la enzima T4 ADN ligasa siguiendo las instrucciones del fabricante (New England Biolabs). Las condiciones de ligación fueron las siguientes: se incubó la reacción por 12 h a 16 °C, posteriormente se procedió a realizar transformación en *E. coli* (DH5α).

VII.11 Preparación de células competentes de *E.coli* DH5α por el método de CaCl₂

Se transfirió una colonia bacteriana a 5 ml de LB y se creció a 37 °C por 16-20 h. Posteriormente, se inocularon 100 ml de LB líquido (en matraz de 250 ml) con 1 ml de este cultivo y se incubó a 37 °C por 3 h, en agitación vigorosa hasta que se alcanzó una D.O.₆₅₀ de 0.4-0.5. Después, el cultivo se transfirió a tubos de polipropileno y se incubaron en hielo durante 10 min. Enseguida, la muestra se centrifugó a 4000 r.p.m. 10 min a 4°C (ultra centrifuga Beckman) y se recuperó el paquete celular. Éste se resuspendió en 30 ml de CaCl₂ 50 mM dejándose en hielo por 15 min. La muestra se centrifugó a 4000 r.p.m. por 10 min a 4°C y la pastilla se resuspendió en 3-5 ml de CaCl₂ 50 mM frío por cada 50 ml del cultivo original. Se hicieron alícuotas de 0.2 ml en tubos eppendorf de 1.5 ml y se mantuvieron a -70°C en solución de glicerol al 14 % hasta el momento de usarlas (Sambrook *et al.*, 1989).

VII.12 Transformación en *E. coli* DH5 α

Se mezclaron 0.1 μ g de ADN con 0.2 ml de células competentes de *E.coli* con los plásmidos pJET::ndh, pJET::ndh::Tc y pJET::ndh::Gm . Ésta mezcla se incubó en hielo por 30 minutos, posteriormente, se le dió un choque térmico a 42 $^{\circ}$ C por 2 minutos y se volvió a incubar en hielo por 2 min. A la muestra se le adicionó 1 ml de medio LB (sin antibiótico) y se creció a 37 $^{\circ}$ C por 1 h, a 200 r.p.m. Después, se sembraron de 0.1 a 0.2 ml, en cajas con medio sólido LB con el antibiótico correspondiente (Sambrook *et al.*, 1989).

VII.13 Extracción de ADN plasmídico (“Miniprep”)

Para la extracción del ADN plasmídico de las células DH5 α de *E. coli* se utilizó el GeneJETTM Plasmid miniprep kit de Fermentas y se llevó a cabo la metodología propuesta por el fabricante.

VII.14 Preparación de células competentes de *A. vinelandii*

Como primer paso la cepa OP de *A. vinelandii* se cultivó 2 veces en medio CM (Medio de Competencia) incubándolas por 48 h a 30 $^{\circ}$ C. Después se recolectaron todas las células para inocular 50 ml de medio CM líquido. Se incubó a 30 $^{\circ}$ C por 48 h a 200 r.p.m. Posteriormente, las células se recolectaron por centrifugación a 400 r.p.m. por 10 min y se lavaron las células con MgSO₄ 10 mM.

Finalmente, las células se resuspendieron en 2 ml de medio CM con 16 mM de MgSO_4 .

VII.15 Construcción de la mutante *ndhII::gm* de *A. vinelandii* OP

Para inactivar el gen *ndhII* en *A. vinelandii* OP primero se clonó el gen *ndhII*. Con base en la secuencia de este gen de la cepa DJ de *A. vinelandii* (www.azotobacter.org), se diseñaron oligonucleótidos para amplificar *ndhII* por PCR. En la amplificación se utilizó como molde ADN cromosomal de la cepa OP y se emplearon los oligonucleótidos: AASF y AASR (Tabla 2). Las condiciones de la amplificación utilizando la enzima Taq polimerasa de Fermentas fueron las siguientes: temperatura de desnaturalización $94^{\circ}\text{C}/1$ minuto, temperatura de alineamiento $61^{\circ}\text{C}/45$ segundos, temperatura de extensión $72^{\circ}\text{C}/1.5$ min, 30 ciclos. Posteriormente, se le dio un ciclo más de extensión a $72^{\circ}\text{C}/10$ min. El producto de PCR de 1360 pb obtenido se clonó en el plásmido pBR1MCS-gm, resultando el plásmido pBR1MCS::*ndhII*. Posteriormente, para inactivar el gen *ndhII* se intentó insertar un casete de resistencia al antibiótico tetraciclina en el sitio *BlnI* del gen *ndhII*. Aunque no se logró obtener esta construcción, paralelamente se realizó la clonación del fragmento de PCR con *ndhII* utilizando una estrategia diferente. El fragmento de PCR fue clonado en el vector pJET 1.2 (Clone JET™ PCR Cloning kit, Fermentas) obteniendo el plásmido pJET-ndh. Posteriormente, el gen *ndhII* se inactivó insertando en el sitio *SmaI* de *ndhII* un casete de resistencia a gentamicina, obteniendo el plásmido pJET-ndh-gmr. El cambio a gentamicina en la

selección se realizó para facilitar la selección de verdaderas transformantes en las que se hubiera logrado el remplazo del gen silvestre de *ndhII* por el mutante mediante doble recombinación homóloga, porque *A. vinelandii* es muy sensible a este antibiótico. El remplazo alélico del gen silvestre por el inactivado con el casete de resistencia a gentamicina se verificó por PCR, utilizando los oligos AASR y AASF (Tabla 2). La orientación del casete de gentamicina, determinante de la polaridad de esta inserción, se determinó mediante análisis de restricción usando la enzima *Bgl*II.

VII.16 Construcción de la mutante *cydA::km* de *A. vinelandii* OP

Para inactivar el gen *cydA* en *A. vinelandii* OP, se contaba con el plásmido pSM-cydA1 en el que se tenía clonado un fragmento de ADN de *A. vinelandii* UW136 de 1.6 Kb con la región 5' del gen *cydA* interrumpida por la inserción de un casete de resistencia al antibiótico kanamicina en el sitio *Pst*I. Con este plásmido se transformaron células competentes de *A. vinelandii* OP y se seleccionaron transformantes resistentes a kanamicina. Para confirmar el remplazo alélico del gen silvestre por el alelo mutante generado por doble recombinación homóloga, se extrajo el ADN cromosomal de las transformantes obtenidas y se realizó un PCR con los oligos *cydA* upC y *cydALwC* (Tabla 2). Las condiciones usadas para la PCR fueron las siguientes: temperatura de desnaturalización 94 °C/3 minutos, temperatura de alineamiento 61 °C/45 segundos y temperatura de extensión 72 °C/2.00 minutos, por 30 ciclos. Posteriormente, se le dio un ciclo más de

extensión a 72 °C/10 min. Como control positivo se usó la construcción pKS-*cydA::km*. Así se confirmó la presencia del alelo *cydA::km* y la ausencia del alelo silvestre en el genoma de una transformante, a la que se denominó *cydA::km*.

VII.17 Construcción de la mutante *nqrE::Tn5* de *A. vinelandii* OP

Para generar la mutante de *A. vinelandii* OP en la que se tuviera inactivado el gen *nqrE*, se utilizó ADN cromosomal de la cepa mutante GG4 (*nqrE::Tn5*), derivada de *A. vinelandii* AEIV (Nuñez *et al*, 2009). El ADN cromosomal extraído de la cepa GG4 se utilizó para transformar células competentes de *A. vinelandii* OP. Se seleccionaron transformantes resistentes a espectinomicina, ya que el transposón Tn5 insertado en *nqrE* contiene un gen de resistencia a este antibiótico. Esto permitió identificar aquellas transformantes en las que ocurrió el remplazo alélico por doble recombinación. Se hizo una PCR utilizando ADN de las transformantes para comprobar la presencia del alelo mutante inactivado por inserción del Tn5 y la polaridad de la inserción. Como control positivo se usó el ADN cromosomal de la cepa GG4. Los oligos *nqrEF*, *nqrEFR*, Tn50 y TN5I (Tabla 2) se utilizaron para la PCR las siguientes condiciones: temperatura de desnaturalización 94 °C/3 minutos, temperatura de alineamiento 58 °C/45 segundos y temperatura de extensión 72 °C/45 segundos, por 30 ciclos. Posteriormente, se le dió un ciclo más de extensión a 72 °C/10 minutos. Una transformante que se confirmó que contenía la inserción y que ya no contenía el alelo silvestre se aisló y se denominó *nqrE::Tn5*.

VII.18 Caracterización de las mutantes *cydA::km* y *nqrE* de *A. vinelandii* OP

En una primera etapa se llevaron a cabo cultivos líquidos de las cepas OP (wt), y *cydA::km* y *nqrE* durante 48 hrs en matraces agitados en medio PY sacarosa, BS con citrato de NH_4 y BS, para determinar el medio de cultivo adecuado para el crecimiento de las diferentes cepas.

Una vez determinado el medio de cultivo, las mutantes *cydA::km* y *nqrE::Tn5* y la cepa OP de *A. vinelandii* se probaron en tres diferentes condiciones de aireación. Para estos experimentos, los inóculos se cultivaron por 24 hrs en matraces Erlenmeyer convencionales con 50 ml de medio PY con 20% de sacarosa. Para lograr tres condiciones diferentes de aireación se utilizaron dos tipos diferentes de matraces: matraces de 500 ml con deflectores y con 100 ml de cultivo (fracción de llenado de 1/5) y matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 y 125 ml de medio de cultivo (fracciones de llenado de 1/5 y 1/2 respectivamente). La modificación de la fracción de llenado de los matraces cambia la relación superficie de intercambio gaseoso/volumen de medio de cultivo. Mientras menor sea fracción de llenado (menor volumen de medio de cultivo contenido en los matraces), esta relación es mayor y la aireación es más alta. En los matraces con deflectores existe una mayor transferencia de oxígeno que en los matraces convencionales (Peña *et al.*, 1997). El cultivo en estos matraces se consideró una condición de alta oxigenación. Los matraces convencionales con fracción de llenado de 1/5 se consideraron de oxigenación media, mientras que los matraces convencionales con fracción de llenado de 1/2 se consideraron de baja

oxigenación. En estos cultivos también se utilizó medio PY con 20% sacarosa. Las condiciones de cultivo fueron: 30°C, 220 r.p.m. y 36 hrs. Los matraces se inocularon en todos los casos con el equivalente al 1% del inóculo (1ml de inóculo a los matraces con aireación alta, 0.5 ml a los de aireación media y 1.25ml de inóculo a los de aireación baja). Se tomaron muestra al inicio (tiempo 0) y final del cultivo (36 hrs) para medir diferentes parámetros: Concentración de proteína (determinada por el método de Lowry et al., 1951), concentración de sacarosa, peso seco, concentración de PHB y pH.

VIII. Resultados y discusión

VIII.1 Construcción de la mutante *ndhII::gm*

Con el fin de obtener una mutante derivada de la cepa OP que careciera de la NADH:ubiquinona oxidoreductasa de tipo II, se amplificó por PCR un fragmento de 1360 pb que contiene el gen *ndhII*. En la figura 10 (A), se observa el fragmento obtenido.

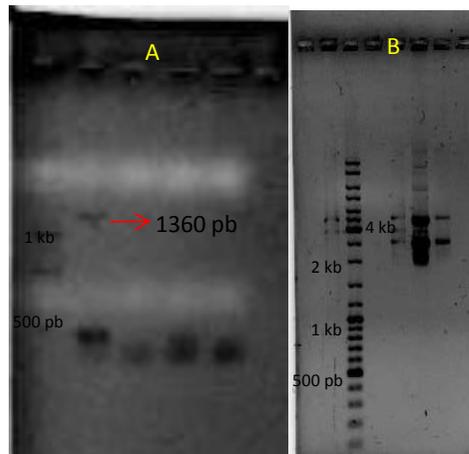
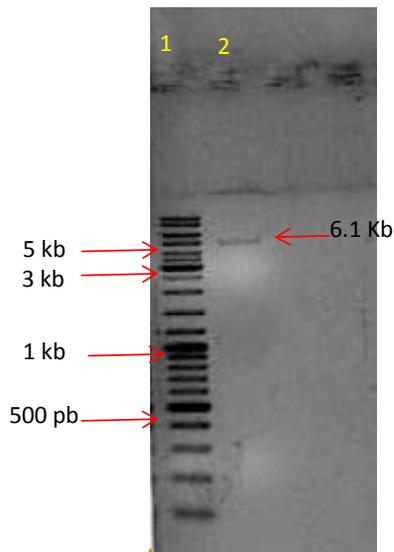


Figura 10. Amplificación del gen *ndh II* de *A. vinelandii* de 1360 pb (A). Purificación del vector de clonación pBR1MCS-gm de 4768 pb (B).

Este fragmento de PCR (gen *ndhII*), se clonó en el vector pBR1MCS-gm (Kovach *et al.*, 1994). El plásmido obtenido (pBR1MCS: *ndhII*) se digirió con las enzimas *Apal* y *BamHI*, liberándose un fragmento de 1360 pb, lo que demostró la clonación del gen *ndhII* (no mostrado).

En la Figura 11 se muestra la digestión de la construcción pBR1MCS::*ndhII* con la enzima *SmaI* (sitio único), con lo que se confirmó la clonación del gen *ndhII*. Posteriormente, se intentó inactivar el gen *ndhII* mediante la inserción de un casete de resistencia al antibiótico tetraciclina en el sitio *BlnI*, sin que se lograra obtener el plásmido con la inserción deseada.



Con formato: Fuente:
(Predeterminado) Arial, 12 pto

Figura 11. Digestión con la enzima *SmaI* de la construcción del plásmido pBR1MCS::ndhII obteniendo una banda de 6.1 Kb.

De forma paralela a los esfuerzos por inactivar *ndhII* por inserción del casete Tc en el plásmido pBR1MCS::ndhII, se realizó la clonación del mismo fragmento de PCR que contiene el gen *ndhII*, en el vector pJET 2.1 de 2974bp, obteniendo el plásmido pJET::ndh (Figura 12 panel A) fue digerido con la enzima de digestión *SmaI* para comprobar la clonación del gen en el vector Figura 12, Panel B). Posteriormente, para inactivar el gen *ndhII* se utilizó el plásmido pJET::ndh digerido con la enzima de restricción *SmaI*, obteniendo una banda de 4336 pb (Figura 13), y se ligó en este sitio un casete de resistencia a gentamicina cortado con la misma enzima. El plásmido resultante se llamó pJET::ndhII::gm de 5265 pb. Para comprobar la inserción del casete en este plásmido, se realizó la digestión con la enzima de restricción *XhoI*, resultando los fragmentos de los

tamaños esperados (Figura 14, carriles 3 (bandas de 4108 y 228 pb), y 4 (banda de 4336)), lo que confirmó la inactivación de *ndhII*. Antes de transformar *A. vinelandii*, se determinó también la dirección en la que se insertó el casete de Gm en dos aislados diferentes de la construcción pJET::ndhII::gm, dado que la orientación determina la polaridad del casete sobre genes que se encuentren río abajo. Los dos plásmidos aislados se digirieron con la enzima *BglII*, pues el análisis del tamaño de los fragmentos permitiría determinar la orientación del casete. En la orientación no polar (deseable para la generación de la mutante de *A. vinelandii*) se generarían bandas de 2928, 1270 y 1067 pb. De los dos plásmidos aislados se demostró una orientación no polar en uno de ellos (Figura 13, carril 7). En la Figura 15 se ilustra el mapa de restricción de este plásmido que contiene el gen *ndhII* inactivado por inserción del casete de resistencia a gentamicina en orientación no polar. Posteriormente se digirió esta construcción pJET::ndhII::gm no polar con la enzima de digestión *SphI* (Figura 13, carril 7) para facilitar la selección de mutantes en las que hubiera ocurrido una doble recombinación homóloga con un remplazo alélico, disminuyendo la posibilidad de una cointegración por recombinación sencilla.

Con este ADN digerido se transformaron células competentes de *A. vinelandii* OP y se seleccionaron transformantes resistentes a gentamicina (figura 16). Para confirmar que hubiera ocurrido el remplazo alélico por doble recombinación, se obtuvo ADN de varias transformantes resistentes y se confirmó la ausencia del alelo silvestre (1360 pb) en tres de éstas transformantes por PCR usando los oligos AASF y AASR. En estas transformantes (Figura 14, carriles 1, 2 y 3) no se observó la amplificación del alelo silvestre, confirmando la inactivación

del gen *ndhII*. Aunque este resultado indicaba que el remplazo génico se había logrado, la morfología de las transformantes vistas al microscopio fue muy diferente del observado para las otras cepas de *A. vinelandii*.

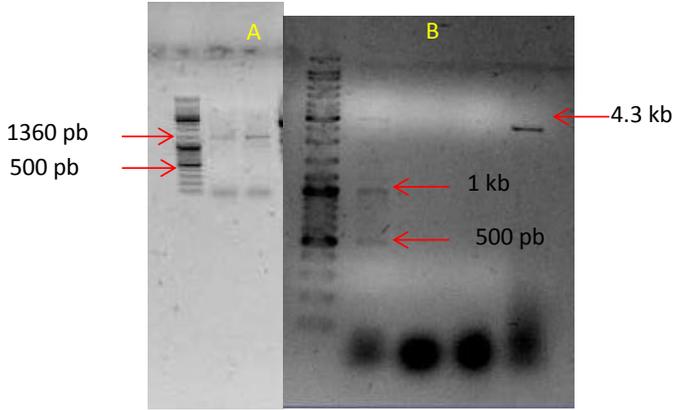


Figura12. Amplificación del gen *ndhII* de *A. vinelandii* de 1360 pb (A). Digestión de pJET::*ndhII* con *SmaI*, obteniendo una banda de 4.3 Kb (B).

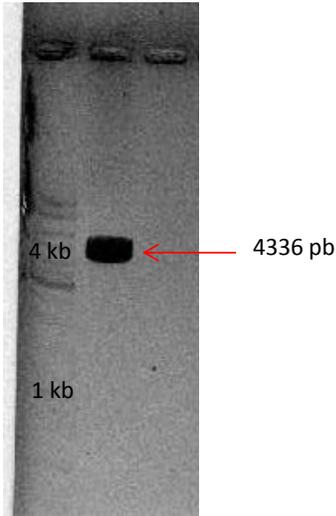


Figura 13. Digestión de pJET::*ndhII* con *SmaI*, obteniendo una banda de 4336 pb (carril1).

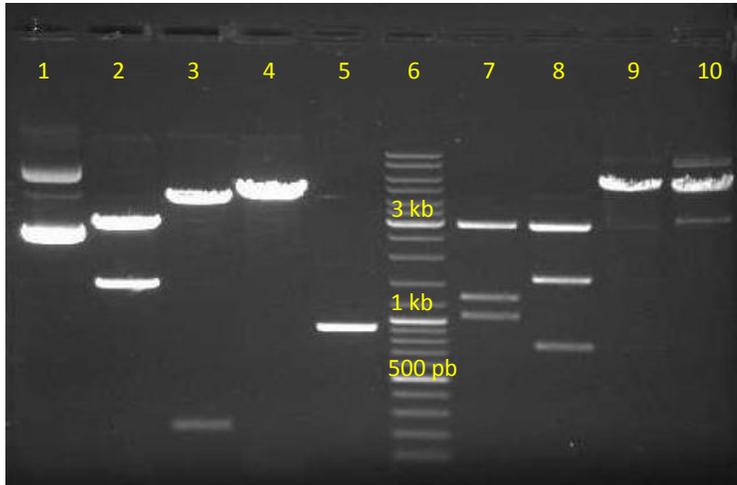


Figura 14. Electroforesis en gel de digestiones de los plásmidos pJET::ndh y pJET::ndh::gm con diversas enzimas, confirmando el mapa de restricción pJET::ndh sin digerir, 2)pJET::ndh digerido con *Bgl*II (bandas de 2928 y 1408 pb), 3)pJET::ndh con *Xho*I (bandas de 4108 y 228 pb), 4)pJET::ndh con *Sma*I (banda de 4336), 5)casete de resistencia a gentamicina con *Sma*I purificado (banda de 900), 6)Marcador de tamaño molecular, 7)pJET::ndh::gm orientación no polar con *Bgl*II (bandas de 2928, 1270 y 1067), 8)pJET::ndh::gm orientación polar con *Bgl*II (bandas de 2928, 1580 y 757), 9) pJET::ndh::gm orientación no polar con *Sph*I (5265) y 10)pJET::ndh::gm orientación polar con *Sph*I (5265).

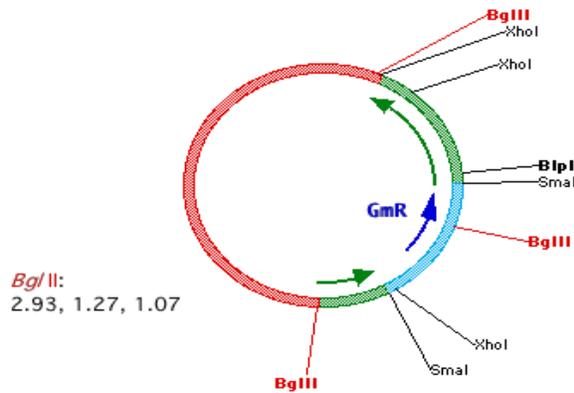


Figura 15. Mapa de restricción de la construcción pJET::ndhII:gm mostrando los sitios de corte con la enzima de digestión *Bgl*II, cuando el casete de resistencia está en orientación no polar.

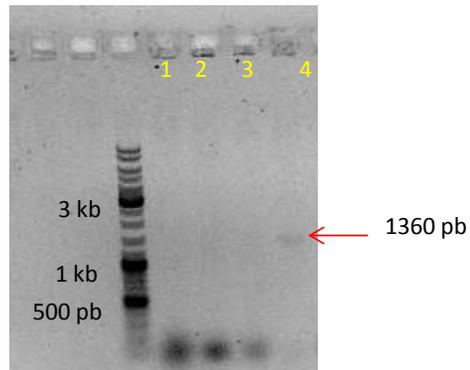


Figura 16. Confirmación del genotipo de las mutantes *ndhII*. Amplificación por PCR del gen *ndhII* usando ADN de las colonias de *A. vinelandii* resultantes de la transformación de *A. vinelandii* OP con la construcción pJET::ndhII::gm. Transformantes 1, 2 y 3 (carriles 1-3), control positivo del gen *ndhII* usando ADN de la cepa silvestre *A. vinelandii* OP (carril 4), mostrando una banda de 1360 pb.

VIII.2 Construcción de la mutante *cydA::km*

Para obtener una mutante derivada la cepa OP de *A. vinelandii* en la que se tuviera inactivada la citocromo oxidasa terminal CydAB I, se utilizó el plásmido pSM-cydA1 de 5.7 pb. Este plásmido contiene un alelo mutante de *cydA* en el que hay una inserción de un casete de resistencia a kanamicina. Esta mutación se transfirió a *A. vinelandii* OP por transformación de células competentes con éste plásmido, seleccionando transformantes resistentes a kanamicina para identificar dobles recombinantes. Para favorecer la presencia de las dobles recombinantes entre las transformantes, el plásmido se digirió con *Sma*I antes de la transformación (Figura 17), eliminando así la posibilidad de obtener cointegración del plásmido pSM-cydA1 por recombinación sencilla. Se obtuvieron varias transformantes resistentes a kanamicina y su genotipo se analizó mediante PCR, usando los oligos *cydA* upC y *cydA* LwC (Figura 16). Con estos oligos se amplificó un fragmento de 245 pb con el ADN de la cepa silvestre, que corresponde al tamaño esperado del alelo silvestre. Con el ADN de las transformantes aisladas no se obtuvo amplificación, mostrando que contienen el alelo mutante (Figura 18).

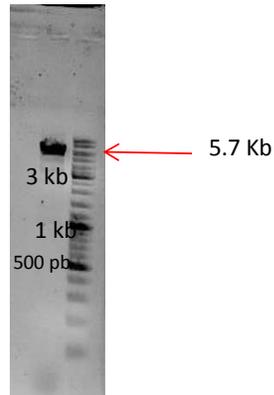


Figura 17. Digestión del plásmido pSM-cydA1 (cydA::km) con la enzima de digestión *SmaI*, obteniendo una banda de 5.7 Kb (carril 1).

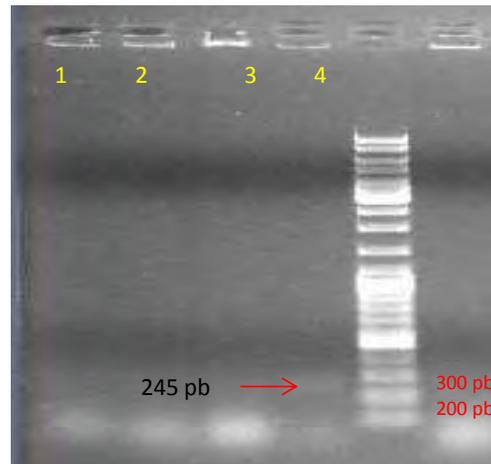


Figura 18. Análisis por PCR del genotipo de las transformantes de *A. vinelandii* OP con el plásmido pSM-cydA1 (cydA::km). Productos de PCR obtenidos usando el ADN de las distintas transformantes (carriles 1-3), y de la cepa silvestre *A. vinelandii* OP (carril 4). Se observa una banda de 245 pb, correspondiente al fragmento esperado del gen *cydA* en la cepa silvestre OP (control positivo).

VIII.3 Construcción de la mutante *nqrE*::Tn5

Con el fin de obtener una mutante de la cepa OP de *A. vinelandii* que careciera de la porción inicial de la cadena respiratoria correspondiente a la NADH:ubiquinona oxidoreductasa translocadora de Na⁺, para evaluar el efecto de esta mutación, en el crecimiento y la producción de PHB, se introdujo una mutación *nqrE*::Tn5, que tiene inactivado el gen que codifica para la subunidad E de este complejo enzimático respiratorio. Esto se logró utilizando ADN de una mutante denominada *A. vinelandii* GG4, derivada de la cepa AEIV de esta bacteria (Nuñez et al., 2009). Esta cepa contiene este alelo mutante del gen *nqrE* por inserción de un transposón miniTn5. Se purificó el ADN cromosomal de esta cepa y se utilizó para transformar células competentes de *A. vinelandii* OP. Se seleccionaron colonias transformantes resistentes a espectinomicina, ya que el miniTn5 contiene un gen de resistencia a este antibiótico. Posteriormente, se analizó el genotipo de estas transformantes mediante amplificación por PCR utilizando los oligos *nqrEF*-F (complementario al gen *nqrE*) y Tn5O (complementario a uno de los extremos del transposón). El resultado de la amplificación (Figura 19) comprobó el remplazo alélico de *nqrE* en dos candidatas obtenidas de la cepa *A. vinelandii* OP, generando la cepa *nqrE*::Tn5 en este fondo silvestre.

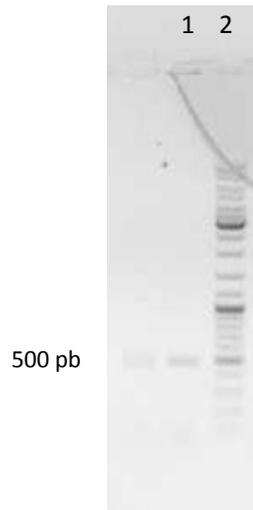


Figura 19. Confirmación del genotipo de las transformantes de *A. vinelandii* OP nqrE::Tn5. Se realizó un PCR con la combinación de oligos nqrEF-F y Tn5O utilizando como molde ADN cromosomal de la cepa GG4 (carriles 1 y 2, donde se observa una banda de 500 pb)

VIII. 4 Caracterización de las mutantes *cydA::km* y *nqrE::Tn5* de *A. vinelandii* OP

La caracterización de las mutantes generadas fue hecha con las cepas *cydA::km* y *nqrE::Tn5*. Ninguna transformante de la mutante *ndhII::gm* se utilizó para este experimento, pues aunque se logró construir el plásmido con el gen inactivado por inserción del casete y se aislaron posibles mutantes tras la transformación de células competentes con éste plásmido, éstas transformantes mostraron una morfología celular muy diferente a la de *A. vinelandii*. Tras repetidas transformaciones en las que se obtuvo un resultado similar, se decidió continuar el estudio únicamente con las otras dos cepas obtenidas. Así, las mutantes *cydA::km*, *nqrE::Tn5* y la cepa OP silvestre (control), se utilizaron para comparar su crecimiento (concentración proteína y peso seco), producción volumétrica de

PHB (μg PHB/ml de cultivo); y producción específica (μg PHB/ μg proteína), consumo de sacarosa (g/L), rendimiento de PHB ($Y = \text{g de PHB producidos/gramos de sacarosa consumidos}$) y rendimiento de biomasa ($Y = \text{gramos de biomasa obtenidos/gramos de sacarosa consumidos}$). En este experimento se utilizó el medio PY con sacarosa pues en este medio se obtiene un mejor crecimiento de *A.vinelandii*, resultados no mostrados. Con la finalidad de comparar las características de las cepas mutantes crecidas bajo distintas condiciones de oxigenación, se utilizaron tres distintos niveles de aireación (baja, media o alta), obtenidos modificando la fracción de llenado de los matraces y el tipo de matraz utilizado (matraces convencionales con fracción de llenado de 1/2, con fracción de llenado de 1/5 y matraces con deflectores y fracción de llenado de 1/5 respectivamente). En estudios anteriores (Galindo *et al.*, 1993; Serrano-Carreón *et al.*, 1995; Büchs, 2001) se ha reportado que en los matraces con deflectores (Figura 20) existe una mayor transferencia de oxígeno, debido principalmente a que éstos proveen un mejor mezclado, mejorando la transferencia de oxígeno.

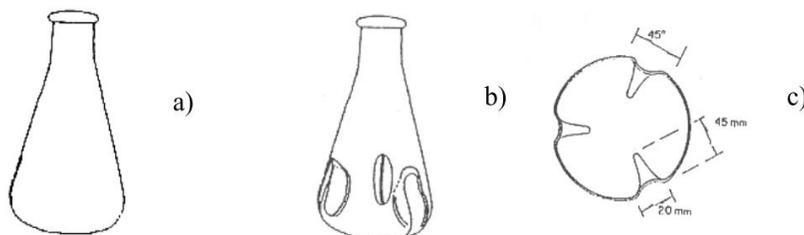


Figura 20. Matraces utilizados en este trabajo. a) Matraz convencional (baja oxigenación), b) y c) matraz con deflectores (alta oxigenación).

Los cultivos se desarrollaron durante 36 h debido a que en este tiempo se alcanza un buen crecimiento y producción de PHB, pues la bacteria logra entrar en la fase estacionaria de su crecimiento.

III. 4.1 Caracterización del crecimiento como peso seco (mg/ml)

En la figura 21 se observa que bajo condiciones de aireación baja el crecimiento de la cepa silvestre OP, medido como peso seco, fue mayor (1.73 mg/ml) comparado con el de las cepas *cydA::km* (1.33 mg/ml) y *nqrE::Tn5* (1.66 mg/ml). El crecimiento bajo condiciones de aireación media (Figura 22) fue también mayor para la cepa silvestre (2.06 mg/ml), seguida de la mutante *cydA::km* (1.93 mg/ml), que en esta condición creció más que la cepa *nqrE::Tn5* (1.86 mg/ml). Bajo una condición de aireación alta (Figura 23), las cepas mutantes *cydA::km* y *nqrE::Tn5* presentaron un comportamiento similar al de la condición de aireación media, crecieron menos que la cepa silvestre (1.56 mg/ml y 0.88 mg/ml, respectivamente, contra 1.83 mg/ml de la cepa OP). En las tabla 3 y 4, se presentan los resultados de la prueba de Tukey que muestran que las diferencias crecimiento son estadísticamente significativas entre las cepas OP y las mutantes en condiciones de aireación baja y media. En una condición de aireación alta, aunque se observó un aparente menor crecimiento de las mutantes, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativa, por lo que no se muestra la tabla. Los resultados muestran que las mutaciones generadas tuvieron un efecto negativo en el crecimiento de *A. vinelandii*.

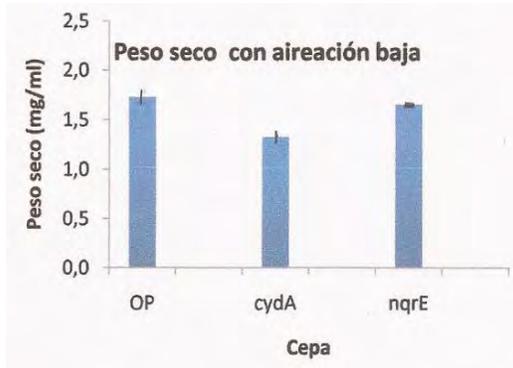


Figura 21. Crecimiento medido como peso seco (mg/ml) de las cepas OP (wt), cydA y nqrE con aireación baja a las 36 hrs. Las barras SD son los valores de las desviaciones estándar correspondientes a cada cepa (OP, cydA::km y nqrE::Tn5).

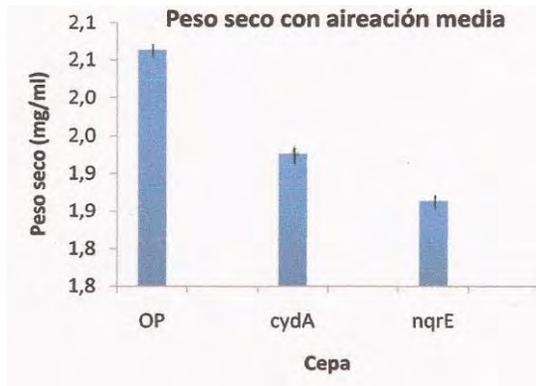


Figura 22. Crecimiento medido como peso seco (mg/ml) de las cepas OP (wt), cydA y nqrE con aireación media a las 36 hrs. Las barras SD son los valores de las desviaciones estándar correspondientes a cada cepa (OP, cydA::km y nqrE::Tn5).

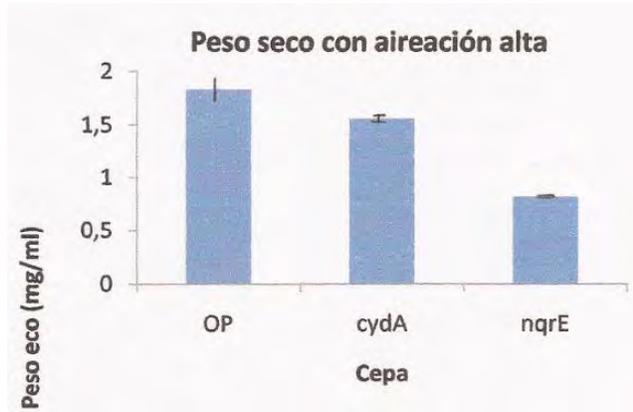


Figura 23. Crecimiento medido como peso seco (mg/ml) de las cepas OP (wt), cydA y nqrE con aireación alta a las 36 hrs. Las barras SD son los valores de las desviaciones estándar correspondientes a cada cepa (OP, cydA::km y nqrE::Tn5).

Tukey Test	OP	cydA	nqrE
OP	-----	0.019714	0.714501
cydA	0.019714	-----	0.050916
nqrE	0.714501	0.050916	-----

Tabla 3. Prueba de Tukey para el análisis de varianza de los valores de peso seco obtenidos para las tres cepas (OP, cydA y nqrE) en una condición de aireación baja. Existe una diferencia estadística significativa entre los pesos secos de la cepa OP y cydA (color rojo).

Tukey Test	OP	cydA	nqrE
OP	-----	0.045939	0.000364
cydA	0.045939	-----	0.000530
nqrE	0.000364	0.000530	-----

Tabla 4. Prueba de Tukey para el análisis de varianza de los valores de peso seco obtenidos para las tres cepas (OP, cydA y nqrE) en una condición de aireación media.

Existe una diferencia estadística significativa entre los pesos secos de las cepas OP, *cydA* y *nqrE* (color rojo).

VIII. 4.2 Caracterización del crecimiento como concentración de proteína ($\mu\text{g/ml}$)

Además de evaluar el efecto de las mutaciones generadas sobre el crecimiento midiendo el peso seco alcanzado, éste también se cuantificó midiendo la concentración de proteína de los cultivos

En la figura 24 se observa, que la concentración de proteína (crecimiento) de la cepa silvestre OP ($536.9 \mu\text{g/ml}$) fue similar a la alcanzada con las cepas *cydA::km* ($538.4 \mu\text{g/ml}$) y *nqrE::Tn5* ($646.6 \mu\text{g/ml}$), en condiciones de aireación baja; es decir, las tres cepas presentaron un crecimiento similar en presencia de una condición baja de oxígeno. Las pruebas de Tukey mostraron que no existen diferencias (análisis no mostrados). La figura 25, muestra que el crecimiento en condiciones de aireación media, fue aparentemente mayor en la mutante *cydA::km* ($817.2 \mu\text{g/ml}$), con respecto a la cepa OP ($718.7 \mu\text{g/ml}$); sin embargo, las pruebas estadísticas no mostraron diferencias (análisis no mostrados). En esta condición, la cepa *nqrE::Tn5* presentó un crecimiento menor que el de la cepa silvestre, siendo este de $683.0 \mu\text{g/ml}$ (Figura 26). Bajo la condición de aireación alta (Figura 25), aunque el crecimiento de la cepa silvestre OP ($870.3 \mu\text{g/ml}$) fue al parecer mayor que el de las cepas mutantes *cydA::km* y *nqrE::Tn5* ($714.2 \mu\text{g/ml}$ y de $713.3 \mu\text{g/ml}$, respectivamente), las pruebas estadísticas tampoco mostraron diferencias significativas como en el resto de las condiciones (análisis no mostrados).

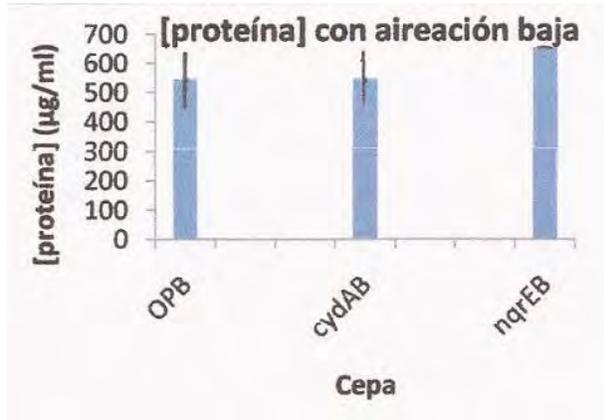


Figura 24. Crecimiento como concentración de proteína en condiciones de aireación baja a las 36 hrs de las cepas OP (wt), cydA y nqrE. Las barras SD son los valores de las desviaciones estándar correspondientes a cada cepa (OP, cydA::km y nqrE::Tn5).

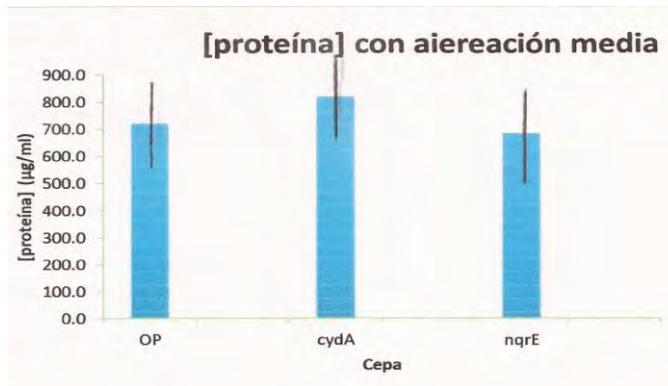


Figura 25. Crecimiento como concentración de proteína en condiciones de aireación media a las 36 hrs de las cepas OP (wt), cydA y nqrE. Las barras SD son los valores de las desviaciones estándar correspondientes a cada cepa (OP, cydA::km y nqrE::Tn5).

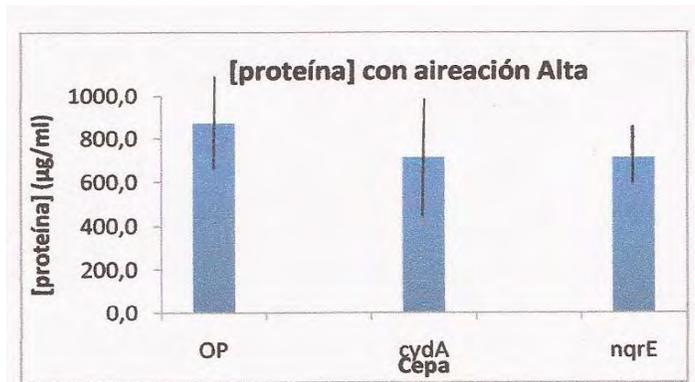


Figura 26. Crecimiento como concentración de proteína en condiciones de aireación alta a las 36 hrs de las cepas OP (wt), *cydA* y *nqrE*. Las barras SD son los valores de las desviaciones estándar correspondientes a cada cepa (OP, *cydA::km* y *nqrE::Tn5*).

VIII. 4.3 Caracterización de la producción volumétrica de PHB alcanzada (µg/ml)

Aunque las mutaciones generadas no tuvieron un efecto positivo en el crecimiento de *A. vinelandii*, se decidió analizar su efecto en la producción de PHB. Los resultados de producción de PHB se muestran en la figura 27. La cepa *cydA::km* produjo volumétricamente una concentración de PHB en una condición de aireación baja de 19.96 µg/ml, mientras que la cepa mutante *nqrE::Tn5*, produjo una concentración de PHB de 19.02 µg/ml, comparadas con la cepa silvestre OP (18.05 µg/ml). Por otro lado, en la figura 28, se observa que la cepa silvestre es la que mayor concentración de PHB obtuvo en una condición de aireación media (34.99 µg/ml), en contraste con las cepas mutantes, cuya concentración de PHB fue de: *cydA::km* (28.78 µg/ml) y *nqrE::Tn5* (18.38 µg/ml). De manera similar, bajo la condición de aireación alta, las cepas mutantes *cydA::km* y *nqrE::Tn5*, tuvieron una menor producción de PHB, comparadas con la cepa silvestre OP, siendo ésta de 554.39 µg/ml, de 491.58 µg/ml y 1129.83 µg/ml,

respectivamente (Figura 29). Las pruebas de Tukey para los análisis de varianza de los valores de producción obtenidos en las tres condiciones de aireación, muestran que existe una diferencia estadísticamente significativa en la producción de PHB entre las tres cepas en una condición de aireación baja (Tabla 5), y entre la producción de PHB de la cepa OP con la de las dos mutantes *cydA* y *nqrE* en una condición de aireación alta (Tabla 6). En contraste, bajo una condición de aireación media las pruebas de Tukey no mostraron diferencias estadísticamente significativas (valores no mostrados). A pesar de que en las muestras de Tukey se muestran diferencias estadísticamente significativas en la producción volumétrica de PHB bajo condiciones de aireación baja y media, al observar los valores de las desviaciones estándar obtenidas en estas condiciones de aireación, se podría decir que realmente no hay diferencias estadísticas en la producción volumétrica de PHB para las cepas comparadas en este estudio.

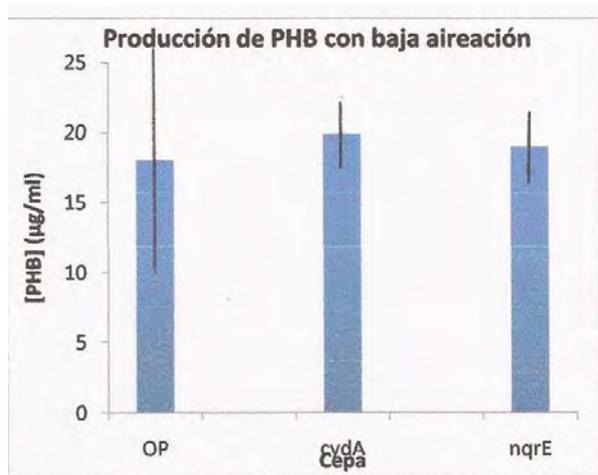


Figura 27. Concentración de PHB producido por las cepas *cydA::km*, *nqrE::Tn5* y OP en condición de **aireación baja**. Las barras SD son los valores de las desviaciones estándar correspondientes a cada cepa.

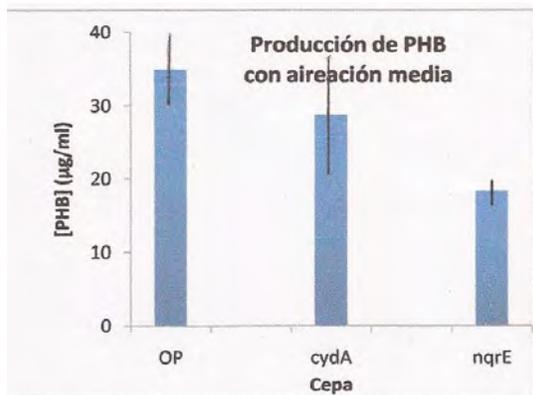


Figura 28. Concentración de PHB producido por las cepas *cydA::km*, *nqrE::Tn5* y OP en condición de **aireación media**. Las barras SD son los valores de las desviaciones estándar correspondientes a cada cepa.

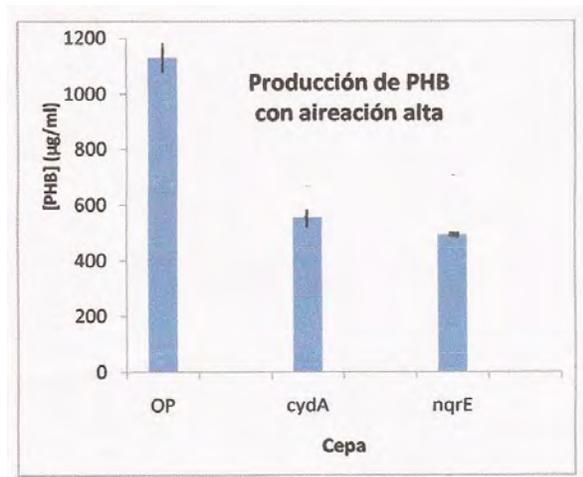


Figura 29. Concentración de PHB producido por las cepas *cydA::km*, *nqrE::Tn5* y OP en condición de alta aireación. Las barras SD son los valores de las desviaciones estándar correspondientes a cada cepa.

Tukey	OPM	cydAM	nqrEM
OPM		0.456008	0.004063
cydAM	0.456008		0.014343
nqrEM	0.004063	0.014343	

Tabla 5. Prueba de Tukey para el análisis de varianza de los valores de producción de PHB obtenidos para las tres cepas (OP, *cydA* y *nqrE*) en una condición de aireación baja. Existe una diferencia estadística significativa entre la producción de PHB de la cepa mutante *nqrE* con las cepas OP y *cydA* (color rojo).

Tukey	OPA	cydAA	nqrEA
OPA		0.001810	0.001047
cydAA	0.001810		0.716244
nqrEA	0.001047	0.716244	

Tabla 6. Prueba de Tukey para el análisis de varianza de los valores de producción de PHB obtenidos para las tres cepas (OP, *cydA* y *nqrE*) en una condición de aireación alta. Existe una diferencia estadística significativa entre la producción de PHB de la cepa OP con la de las dos mutantes *cydA* y *nqrE* (color rojo).

Dado que un cambio en la capacidad de respiración de la bacteria podría modificar la manera como se utiliza la fuente de carbono disponible, se decidió analizar el efecto de las mutaciones generadas en el rendimiento de células (medido como

peso seco y como proteína) y del polímero PHB, es decir, qué cantidad de sacarosa se consume para el crecimiento y la producción alcanzadas en cada cepa. A continuación se describen esos resultados.

VIII. 4.4 Rendimientos de la producción de biomasa peso seco/sacarosa consumida (g de Biomasa /g de sacarosa).

De acuerdo con la tabla 7, el rendimiento de biomasa ($Y_{x/s}$), medido como peso seco, con respecto a la fuente de carbono consumida (Peso seco/sacarosa) en la condición de aireación baja, fue mayor en la cepa silvestre OP (0.267 g de Biomasa/g de sacarosa), que en las cepas mutantes *cydA::km* y *nqrE::Tn5* (0.135 g/g de sacarosa y 0.239 g/g de sacarosa, respectivamente). En condiciones de aireación media, que es la condición de aireación utilizada regularmente para el crecimiento de *A. vinelandii* en el laboratorio, el rendimiento peso seco/sacarosa igualmente fue mayor en la cepa silvestre OP (0.235 g/g de sacarosa) que en las cepas mutantes *cydA::km*, (0.152 g/g de sacarosa) y *nqrE::Tn5* (0.151 g/g de sacarosa). Bajo una condición de aireación alta, también la cepa silvestre OP de *A. vinelandii*, tuvo el mejor rendimiento de Peso seco/Sacarosa (0.684 g de Biomasa/g de sacarosa), al compararlo con el de las cepas mutantes *cydA::km* y *nqrE::Tn5* (0.453 g/g de sacarosa y 0.177 g/g de sacarosa, respectivamente), por lo que la hipótesis de que la inactivación de los genes *cydA* y *nqrE*, cuyos productos participan en cadenas respiratorias alternativas, permitiría canalizar más eficientemente la fuente de carbono para la producción de biomasa al disminuir la generación de CO₂ durante el cultivo de *A. vinelandii* no se cumplió bajo las condiciones probadas.

Aireación	OP	SD	<i>cydA</i>	SD	<i>nqrE</i>	SD
Baja	0.267	0.070	0.135	0.052	0.239	0.002
media	0.235	0.073	0.152	0.013	0.151	0.002
alta	0.684	0.081	0.453	0.103	0.177	0.197

Tabla 7. Rendimiento Peso seco/Sacarosa en condición de aireación baja, media y alta (g de Biomasa/g de sacarosa).

VIII. 4.5 Rendimientos de la producción de biomasa como proteína/sacarosa consumida (mg de Proteína/ g de sacarosa)

Además de evaluar el rendimiento de biomasa como peso seco, se analizó la biomasa producida como proteína por gramo de sacarosa consumida. De acuerdo con la tabla 8 y considerando la desviación estándar obtenida en estas mediciones, el rendimiento proteína/sacarosa en condición de aireación baja, fue muy similar en las tres cepas. La mutante *cydA::km* produjo 61.26 mg de Proteína/g de sacarosa, una cantidad en apariencia ligeramente mayor que la cepa mutante *nqrE::Tn5* y la cepa silvestre OP (52.70 mg de biomasa/g de sacarosa y 54.28 mg de biomasa/g de sacarosa, respectivamente). Igualmente, en condiciones de aireación media, el rendimiento peso seco/sacarosa fue ligeramente mayor en la cepa mutante *cydA::km* (823.03 mg de proteína/g de sacarosa), que en la cepa silvestre OP y en la cepa *nqrE::Tn5*, (726.06 mg de Proteína/g de sacarosa y 689.7 mg de Biomasa/g de sacarosa, respectivamente); sin embargo, las diferencias entre estos valores son muy pequeñas. Por otro lado, bajo una condición de aireación alta (Tabla 6), la cepa silvestre OP de *A. vinelandii*, tuvo un mayor rendimiento de proteína/Sacarosa (307.32 mg de proteína/g de sacarosa), que las cepas mutantes *cydA::km* y *nqrE::Tn5* (204.27 mg de Proteína/g de sacarosa y 153.11 mg de biomasa/g de sacarosa, respectivamente). Los resultados obtenidos en las tres condiciones de aireación no mostraron una mejoría en la utilización de la fuente de carbono para el crecimiento de la bacteria al modificar las cadenas respiratorias de *A. vinelandii* como se esperaba.

Aireación	OP	SD	<i>cydA</i>	SD	<i>nqrE</i>	SD
Baja	54.284	12.284	61.260	23.034	52.695	1.899
Media	726.061	109.595	823.030	168.938	689.697	163.973
Alta	307.322	75.023	204.270	270.820	153.105	118.071

Tabla 8. Rendimiento Proteína/Sacarosa en condición de aireación baja, media y alta (mg de Proteína/g de sacarosa).

VIII. 4.6 Rendimientos de la producción PHB (mg PHB/g de sacarosa consumida; y específica g PHB/g proteína)

Aunque las mutaciones generadas no tuvieron un efecto positivo en la producción volumétrica de PHB alcanzada, salvo para la condición de aireación media, donde la mutante *cydA::km* presentó una ligera mejoría, se decidió analizar el efecto en el rendimiento del polímero PHB para determinar si los cambios generados en las cadenas respiratorias podrían haber modificado la utilización de la fuente de carbono, permitiendo una producción similar pero con un menor consumo de sacarosa. De acuerdo con la tabla 9, el rendimiento de PHB en la condición de aireación baja, fue mayor en la cepa silvestre OP (307.322 mg de PHB/g de sacarosa), que en las cepas mutantes *cydA::km* y *nqrE::Tn5* (204.270 mg de PHB/g de sacarosa y mg de 153.105 PHB/g de sacarosa, respectivamente). De manera similar en condiciones de aireación media, el rendimiento de la producción volumétrica de PHB, fue mayor en las cepa silvestre OP (4.592 mg de PHB/g de sacarosa), que en las cepas mutantes *cydA::km* y *nqrE::Tn5* (4.483 mg de PHB/g de sacarosa y 2.728 mg de PHB/g de sacarosa, respectivamente). Sin embargo, bajo esta condición de aireación la cepa mutante *nqrE::Tn5* tuvo un menor rendimiento en la producción volumétrica de PHB, que la cepa mutante *cydA::km*. Por otro lado, bajo una condición de aireación alta el rendimiento de la producción volumétrica de PHB, fue mayor en las cepa silvestre OP (1142.99 mg de PHB/g de sacarosa), que en las cepas mutantes *cydA::km* y *nqrE::Tn5* (567.82 mg de PHB/g de sacarosa y 496.15 mg de PHB/g de sacarosa, respectivamente). Sin embargo, bajo esta condición de aireación las tres cepas tuvieron un rendimiento en la producción volumétrica de PHB, que bajo las otras condiciones de aireación (baja y media), por lo que la hipótesis de que la inactivación de los genes *cydA* y *nqrE*, aumentaría la producción de PHB y disminuirá la demanda de oxígeno durante el cultivo de *Azotobacter vinelandii*, no se cumplió, pues las tres cepas requirieron una alta concentración de oxígeno para tener un mayor rendimiento en la producción volumétrica de PHB.

Aireación	OP	SD	cydA	SD	nqrE	SD
Baja	307.322	75.023	204.270	270.820	153.105	118.071
Media	481.451	52.020	422.097	80.638	229.516	22.136
Alta	1142.987	14.68	567.818	1.106	496.152	47.101

Tabla 9. Rendimiento de PHB/sacarosa consumida en condición de aireación baja, media y alta (mg de PHB/g de sacarosa).

Por otro lado, la producción específica de PHB (cantidad de polímero producida por unidad de biomasa; Tabla 10) en condiciones de aireación baja fue similar en la cepa *cydA::km* (0.63 g PHB/g proteína) al de la cepa OP (0.59 g PHB/g proteína), mientras que la mutante *nqrE::Tn5* presentó una producción específica mucho menor (0.36 g PHB/g proteína). De manera similar a lo observado en la condición de aireación media para la producción volumétrica de PHB, la producción específica del polímero (Tabla 10) fue mayor en la cepa silvestre OP (0.67 g de PHB/g de sacarosa), que en las cepas mutantes *cydA::km* y *nqrE::Tn5* (0.54 g de PHB/g de proteína y 0.35 g de PHB/g de proteína respectivamente). De igual forma, bajo una condición de aireación alta (tabla 10) la producción específica de PHB fue mayor en la cepa silvestre OP (1.303 g de PHB/g de proteína), que en las cepas mutantes *cydA::km* y *nqrE::Tn5* (0.817 g de PHB/g de proteína y 0.562 g de PHB/g de proteína, respectivamente).

Baja	0.588	0.174	0.633	0.157	0.361	0.069
Media	0.669	0.077	0.539	0.194	0.347	0.093
Alta	1.303	0.724	0.817	0.247	0.690	0.562

Tabla 10. Producción específica de PHB en condición de aireación baja, media y alta (g PHB producidos/g de Proteína).

VIII. 4.7 Medición del pH alcanzado en los cultivos al tiempo final (36 hrs).

Dado que el metabolismo de la bacteria cambia conforme se modifica la actividad respiratoria, ya sea por las mutaciones generadas o por los cambios en el nivel de aireación, se decidió medir el pH alcanzado en los cultivos. Esto debido a que en ocasiones se secretan ácidos orgánicos al medio. En la figura 30 se

observa que el pH alcanzado fue muy similar en los cultivos de las tres cepas. También es importante destacar que mientras mayor fue la aireación utilizada, el pH fue más bajo, siendo el pH inicial de 7.0. En la condición de aireación alta el medio de cultivo se acidificó, independientemente de la cepa de *A. vinelandii* OP (cydA::km, nqrE::Tn5 u OP (wt)) que se encuentre en el medio hasta alcanzar valores de 4.87, 4.6 y 4.7. En condiciones de aireación media, los valores alcanzados fueron de 5.18, 5.05 y 5.03 y de 6.49, 6.51 y 6.37 en condiciones de aireación baja, en las cepas OP, cydA::km y nqrE::Tn5, respectivamente. Es posible que *A. vinelandii* bajo condiciones de alta aireación cambie su metabolismo y produzca una mayor cantidad de ácidos orgánicos; sin embargo es más probable que la mayor aireación haya provocado la generación de ácido carbónico (H₂CO₃), ya que el CO₂ presente en el aire reacciona con el agua produciendo este ácido. Es importante recordar que, de acuerdo con Espin (2010), aunque *A. vinelandii* crece en un rango de pH en presencia de nitrógeno combinado de 4.8.- 8.5, pero que el pH óptimo para crecer cuando fijan nitrógeno es 7.0-7.5.

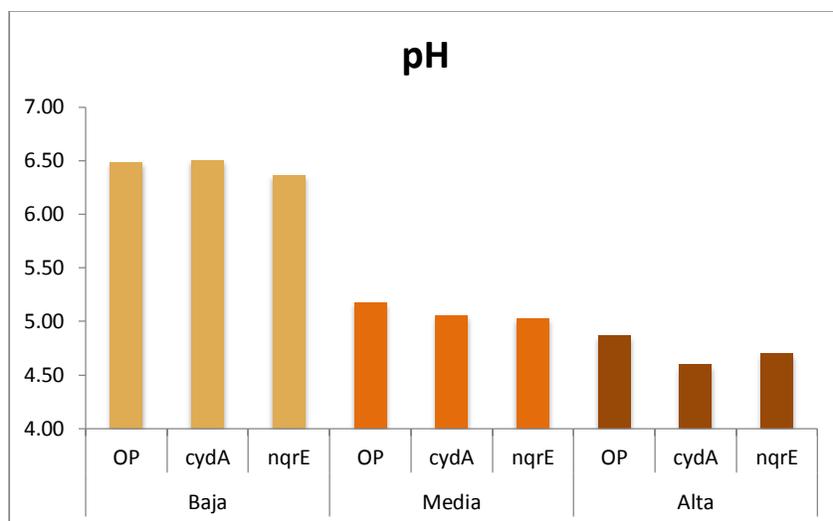


Figura 30. Caracterización del pH del medio de cultivo para el tiempo final (36 hrs) en diferentes condiciones de aireación (baja, media y alta)

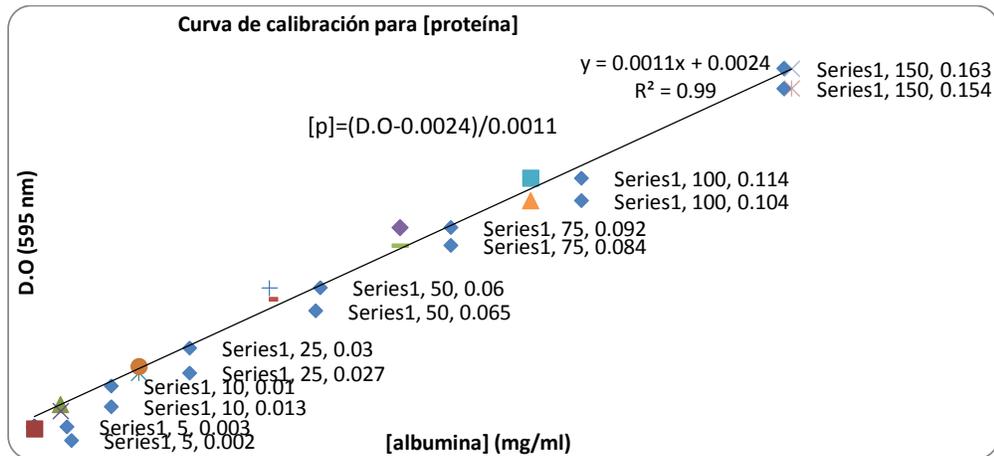
IX. Conclusiones

En este trabajo se propuso que la inactivación de los componentes de cadena respiratorias alternativas *NqrE* y *CydAB*, aumentaría la producción de biomasa y/o de PHB, y disminuirá la respiración durante el cultivo de *Azotobacter vinelandii*, pues se ha visto que sobre todo cuando el nivel de oxígeno es más alto, las cadenas respiratorias desacopladas entran en función y provocan una pérdida de fuente de carbono como CO_2 . Esta hipótesis no se cumplió para las cepas mutantes *cydA::km* y *nqrE::Tn5* bajo las condiciones probadas. Aunque la cepa mutante de *cydA:: km* de *A. vinelandii* OP, presentó un mayor crecimiento en una condición de aireación media, pudiendo crecer más que la mutante *nqrE::Tn5* y que la cepa silvestre OP, en general presentó un menor crecimiento y producción bajo las condiciones de aireación utilizadas en este trabajo. Es importante destacar que la cepa *nqrE::Tn5* presentó un fenotipo muy diferente del reportado cuando la misma mutación del gen *nqrE* se caracterizó en el fondo genético de la cepa AEIV de *A. vinelandii* (Peña, *et al.* 2012), pues esa mutante presentó una mayor producción de PHB y un mayor crecimiento que la cepa silvestre. Aunque se trata de dos cepas distintas, la principal diferencia conocida es la falta del factor sigma E (AlgU) en el fondo genético OP. Este factor sigma se ha visto que es necesario para la expresión de *CydR* (León y Espín, 2008), un regulador que controla la expresión de los genes *cydAB* (Wu *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2000), y se ha sugerido que podría estar regulando otros componentes de la respiración de *A.*

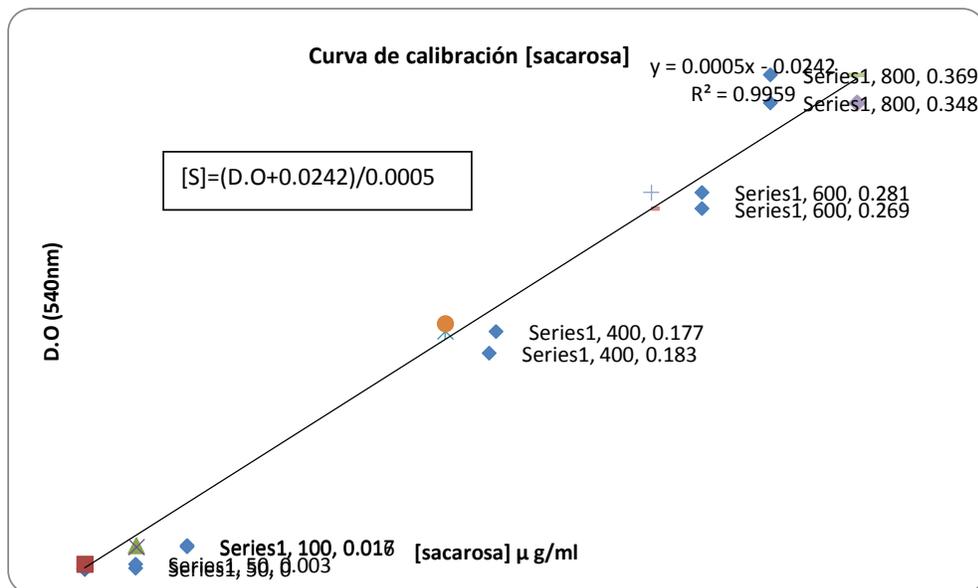
vinelandii (Bertsova et al., 1998; Bertsova et al., 2001), por lo que ésta podría ser la razón de las diferencias entre los dos fondos genéticos. También es posible que el desempeño pobre de las mutantes, sobre todo en condiciones de aireación media y alta, se deba en parte a la disminución en el pH del medio de cultivo que no se controló en estos experimentos (Figura 30). Por los resultados obtenidos, se propone que en estudios posteriores a estos, en los que se trabaje con diferentes condiciones de aireación, se realice un control del pH o se utilice un amortiguador que permita mantener el pH del medio de cultivo entre 7.0 y 7.5 para poder determinar el potencial real de las cepas mutantes en cuanto a crecimiento y producción del polímero.

X. Apéndice

Curva de calibración y ecuación utilizada para la determinación de concentración de proteína



Curva de calibración y ecuación utilizada para la determinación del consumo de sacarosa



X. Referencias

Bertsova, Y.V., Bogachev, A.V., Skulachev, V.P. 1998. Two NADH:ubiquinone oxidoreductases of *Azotobacter vinelandii* and their role in the respiratory protection. Bioch Biophys Acta. 1363, 125-133.

Bertsova, Y.V., Bogachev, A.V., Skulachev, V.P. (2001). Noncoupled NADH:Ubiquinone Oxidoreductase of *Azotobacter vinelandii* Is Required for Diazotrophic Growth at High Oxygen Concentrations. J. Bacteriol. 183: 6869-6874.

Bush, J. A., and P. W. Wilson. 1959. A Non-gummy chromogenic strain of *Azotobacter vinelandii*. Nature 184:381.

Chen G, Page W. 1994. The effect of substrate on the molecular weight of polyhydroxybutyrate produced by *Azotobacter vinelandii* UWD. Biotechnol Lett, 16:155-160.

Chen, G., Page, W. 1997. Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* in a two-stage fermentation process. Biotechnol Techniques. 11: 347-350.

Choi, J., Lee, S.Y. 1999. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51:13-21.

Cheng, G. G. Gessey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Disgupta and T. Marrie. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. Ann. Rev. Microbiol. 41:435-464

Choi, J., Lee, S. Y. 1999. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51:13-21.

Cruz-Ramos H, Hill S, Green J, Sawers G, Poole RK. 2000. Regulation of cytochrome bd expression in the obligate aerobe *Azotobacter vinelandii* by CydR (Fnr). Sensitivity to oxygen, reactive oxygen species, and nitric oxide. J Biol Chem. 2000 Feb 18;275(7):4679-86.

Dalton H., JR. Postgate. 1968. Effect of oxygen on growth of *Azotobacter chroococcum* in continuous culture. J. Gen. Microbiol. 54:463-473.

Dalton H., JR. Postgate. 1969. Growth and physiology of *Azotobacter chroococcum* in continuous culture. J. Gen. Microbiol. 56:307-319.

- Fadeeva M.S, Nuñez, C., Bertsova Y. V., Espín, G., and Bogachev, A. V. 2008. Catalytic properties of Na⁺-translocating NADH:quinone oxidoreductases from *Vibrio harveyi*, *Klebsiella pneumoniae* and *Azotobacter vinelandii*. FEMS Microbiol Lett 279: 116–123
- Galindo E., Peña C., Núñez C., Segura D. and Espín G. 2007, Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. Microbial Cell Factories, 6 (7).
- Gallon, J. R. 1992. Reconciling the incompatible: N₂ fixation and O₂. New Phytol. 122:571–609.
- Gaytán, I., Peña, C., Núñez, C., Córdova, M.S., Espín, G., Galindo, E. 2012. *Azotobacter vinelandii* lacking the Na⁺-NQR activity: A potential source for producing alginates with improved properties and at high yield. World Journal of Microbiology and Biotechnology 28 (8): 2731-2740
- Hernandez-Eligio, A., Moreno, S., Castañeda, M., Nuñez, C., Muriel-Millan, L.F., Espín, G. 2012. RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology (United Kingdom)* 158 (8):1953-1963
- Kelly MJ, Poole RK, Yates MG, Kennedy C. 1990. Cloning and mutagenesis of genes encoding the cytochrome bd terminal oxidase complex in *Azotobacter vinelandii*: mutants deficient in the cytochrome d complex are unable to fix nitrogen in air. J Bacteriol. 172(10):6010-9.
- Kovach M.E., R. W. Phillips, P. H. Elzer, R. M. Roop, K. M. Peterson. 1994. PBRIMCS: a broad-host-range cloning vector. Biotechniques; 16(5):800-2.
- León R, and Espín G. 2008. flhDC, but not fleQ, regulates flagella biogenesis in *Azotobacter vinelandii*, and is under AlgU and CydR negative control. Microbiology
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A. L., Randall, R. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Manchak, J; Page, WJ. 1994. Control of polyhydroxyalkanoate synthesis in *Azotobacter vinelandii* strain UWD. Microbiology. 140: 953-963.
- Manzo J., Cocotl-Yañez M., Tzontecomani T, Martínez V., Bustillos R, Velásquez C., Goiz Y., Solís Y., López L., Fuentes L., Nuñez C., Segura D., Espín G. and M. Castañeda. 2012. Post-transcriptional regulation of the alginate biosynthetic gene *algD* by the Gac/Rsm system in *Azotobacter vinelandii*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 21 (3-4): 147-159

Mejía, M.A., Segura, D., Espín, G., Galindo, E., Peña C*. 2010. Two stage fermentation process for alginate production by *Azotobacter vinelandii* mutant altered in poly-β-hydroxybutyrate PHB synthesis. Journal of Applied Microbiology, 108: 55-61. FI (2.09).

Núñez C, Bogachev AV, Guzmán G, Tello I, Guzmán J, Espín G. 2009. The Na⁺-translocating NADH : ubiquinone oxidoreductase of *Azotobacter vinelandii* negatively regulates alginate synthesis. Microbiology 249-56

Oelze, J. 2000. Respiratory protection of nitrogenase in *Azotobacter* species: is a widely held hypothesis unequivocally supported by experimental evidence? FEMS Microbiol. Rev. 24: 321-333.

Page W. 1992. Production of poly-β-hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* UWD in media containing sugars and complex nitrogen sources. Appl Microbiol Biotechnol, 31:329-333.

Page,W.,Manchak, J.,Rudy, B. 1992. Formation of poly (hydroxybutyrate-Co-hydroxyvalerate) *Azotobacter vinelandii* UWD.Appl Environ Microbiol. 58:2866-2873.

Page, W, Cornish A. 1993. Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in Fish Peptone Medium and Simplified Extraction of Poly-beta-Hydroxybutyrate. Appl Environ Microbiol, 59:4236-4244.

Page,W.,Bhanthumnavin, N., Manchak, J. 1997. Production of poly(β-hydroxybutyrate-β-hydroxyvalerate) copolymer from sugar by *Azotobacter salinestrans*. Appl Microbiol Biotechnol. 48:88-93.

Peña, C., Miranda, L., Segura, D., Núñez, C., Espín, G., and Galindo, E. 2002. Alginate production by *Azotobacter vinelandii* mutants altered in poly-β-hydroxybutyrate (PHB) and alginate biosynthesis. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 29:209-213.

Peralta-Gil M, Segura D, Guzman J, Servin-Gonzalez L, Espin G. 2002. Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic phbBAC operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. J Bacteriol, 184:5672-5677.

Segura D., Espín G. 2004. Inactivation of *pycA*, encoding pyruvate carboxylase activity, increases poly-beta-hydroxybutyrate accumulation in *Azotobacter vinelandii* on solid medium. Appl Microbiol Biotechnol. 65:414-418.

Segura D., Espín G. 2004. Inactivation of *pycA*, encoding pyruvate carboxylase activity, increases poly-beta-hydroxybutyrate accumulation in *Azotobacter vinelandii* on solid medium. *Appl Microbiol Biotechnol.* 65:414-418.

Segura, D., Guzmán, J., Espín, G. 2003. *Azotobacter vinelandii* mutants that overproduce poly-β-hydroxybutyrate or alginate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63(2): 159-63.

Senior, P. J., G. A. Beech, G. A. Richie, and E. A. Dawes 1972. The role of oxygen limitation in the formation of poly-b-hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* 128:1193-1201.

Setubal, J.C., dos Santos, P., Goldman, B.S., Ertesvåg, H., Espin, G., Rubio, L.M., Valla, S., Almeida, N.F., Balasubramanian, D., Cromes, L., Curatti, L., Du, Z., Gotsy, E., Goodner, B., Hellner-Burris, K., Hernandez, J.A., Houmiel, K., Imperial, J., Kennedy, C., Larson, T.J., Latreille, P., Ligon, L.S., Lu, J., Mærk, M., Miller, N.M., Norton, S., O'Carroll, I.P., Paulsen, I., Raulfs, E., Roemer, R., Rosser, J., Segura, D., Slater, S., Stricklin, S.L., Studholme, D.J., Sun, J., Viana, C.J., Wallin, E., Wang, B., Wheeler, C., Zhu, H., Dean, D.R., Dixon, R., Wood, D. 2009. The genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *J. Bacteriol.* 191(14): 4534-4545.

Steinbüchel, A. 2001. Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example. *Macromol Biosci.* 1: 1-24.

Wu, G., Cruz-Ramos, H., Hill, S., Green, J., Sawers, G., and Poole, R. K. (2000) Regulation of cytochrome bd expression in the obligate aerobe *Azotobacter vinelandii* by CydR (Fnr). Sensitivity to oxygen, reactive oxygen species, and nitric oxide, *J. Biol. Chem.* 275, 4679-4686.

Wu, G., Hill, S., Kelly, M. J. S., Sawers, G. and Poole R. K. 1997 The *cydR* gene product, required for cytochrome bd expression in obligate aerobe *Azotobacter vinelandii*, is an FNR-like protein. *Microbiology* 143:2197–2207.

Wu G, Moir AJ, Sawers G, Hill S, Poole RK. 2001. Biosynthesis of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) is controlled by CydR (Fnr) in the obligate aerobe *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 194:215-220.

Microbios en línea. Consultado en <http://biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/>. CIFN