



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**GENERACIÓN DE NADPH MEDIANTE LA VÍA DE EMBDEN-
MEYERHOF-PARNAS Y SU EFECTO SOBRE LA SÍNTESIS DE POLI-
3-HIDROXIBUTIRATO EN *Escherichia coli***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

Sara Guillermina Centeno Leija

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Alfredo Martínez Jiménez

Instituto de Biotecnología – Universidad Nacional Autónoma de México

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Cinthia Núñez López

Instituto de Biotecnología – Universidad Nacional Autónoma de México

Dr. Sergio Encarnación Guevara

Instituto de Biotecnología – Universidad Nacional Autónoma de México

México, D.F.

Octubre 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 bajo la dirección del Dr. Alfredo Martínez Jiménez en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para la realización del mismo se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca CONACyT No. De Registro 207175 y de la Universidad Nacional Autónoma de México a través del proyecto DGAPA/PAPIIT/UNAM IT201414.

*-“Donde hay fe, hay amor, donde hay amor, hay paz, donde existe paz, está Dios y donde
está Dios no falta nada”-*

*Con amor, dedico este logro a mi **madre**, mi mayor ejemplo,*

*a mi **hermano Alejandro**, mi mejor amigo,*

*y a mi **hermano Carlos**, mi primer maestro*

Por la fortaleza, amor y paciencia que me brindaron durante

todos estos años lejos.

¡Los amo!

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, el Dr. Alfredo Martínez Jiménez

A los miembros del comité tutorial:

Dra. Cinthia Núñez López

Dr. Sergio Encarnación Guevara

A los miembros del jurado:

Dra. Guadalupe Espín Ocampo

Dra. Gloria Saab Rincón

Dr. Juan Carlos Sigala Alanís

Dr. Carlos Peña Malacara

Dr. Víctor Bustamante

Por el apoyo técnico y metodológico:

Dr. Guillermo Gosset Lagarda

Dr. Adelfo Escalante Lozada

Q.I. Luz María Martínez Mejía

M. en C. Ramón de Anda Herrera

M. en C. Georgina Hernández Chávez,

C. D. Mercedes Enzaldo Cruz

Sra. Aurelia González Guzmán

A la unidad de síntesis y secuenciación del IBt-UNAM:

Dr. Rubén Paul Gaytán Colín

M. en C. Jorge Arturo Yáñez Ponce de León

Q. I. Santiago Becerra Ramírez

M. en C. Eugenio López Bustos

A la Dra. Noemí Flores por su apoyo para la realización del análisis transcripcional.

A la M. en C. Martha Giles-Gómez de la Facultad de Química de la UNAM, por la donación de la cepa de *Streptococcus mutans*

Al Dr. José Utrilla Carreri de la Universidad de California, San Diego, EUA, por la aportación de ideas y su asesoría.

Al Dr. Gerardo Huerta-Beristain de la Universidad Autónoma de Guerrero por la construcción del plásmido pPHBAv.

A la Dra. Adriana Longoria Hernández por su colaboración para la cuantificación del polímero.

A la QFB Myriam Ortiz García de la Unidad de Escalamiento y Planta Piloto por el apoyo con la liofilización de las cepas utilizadas en este trabajo.

Al grupo de la Dra. Guadalupe Espín del Instituto de Biotecnología de UNAM por la donación del ADN cromosomal de *A. vinelandii*.

Agradezco a todas las personas que colaboraron con ideas y/o reactivos durante la realización de este proyecto:

Dr. Luis Caspeta Guadarrama
Dr. Marco Tulio Fernández Sandoval
Dra. Clarita Olvera Carranza
Dr. Enrique Rudiño Piñera
Dr. Leobardo Serrano Carreón
M. en C. Alberto Rodríguez Ruiz
M. en C. Juan Andrés Martínez Álvarez
M. en C. Andrea Sabido Ramos
M. en C. Cesar Aguilar Martínez
M. en C. Laura Grecia Fuentes Ponce
M. en C. Larisa Cortés Tolalpa
Dr. Iván Muñoz Gutiérrez
Ing. Christian Hannali Cuevas Solís
Ing. Cessna Moss Acosta
Dra. Celia Flores Ocampo
M. en I. Alejandra Vargas Tah
T. L. Aurelia Ocampo Vargas
Sra. Delia Caro Cárdenas
M. C. María Elena Rodríguez Alegría
Biol. Mario Caro Bermúdez
L. Antonio Bolaños Guillén
Sra. Gloria Villa Herrera
Ing. Jalil Saab Hassanille

-“La gratitud es la memoria del corazón”-

Con especial cariño agradezco a LuzMa y a Lili por brindarme un segundo hogar.

¡Gracias a todos los miembros del laboratorio 4 por su compañía y apoyo!

-“Cuando el corazón encuentra el verdadero amor, las perspectivas personales se convierten en deseos compartidos”-

Gracias a mi esposo Hugo

INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS	1
INDICE DE TABLAS	3
ABREVIATURAS	4
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	8
1. ANTECEDENTES	10
1.1 EL POLI-3-HIDROXIBUTIRATO, UN POLIÉSTER NATURAL	10
1.1.1 Características Fisicoquímicas y Biosíntesis	10
1.1.2 Regulación de la biosíntesis de P3HB en <i>Azotobacter vinelandii</i>	12
1.2 PRODUCCIÓN DE P3HB Y METABOLISMO DE <i>E. coli</i>	14
1.2.1 Producción heteróloga de P3HB en <i>E. coli</i>	14
1.2.2 Proceso de producción de P3HB en <i>E. coli</i>	14
1.2.3 Metabolismo y poder reductor	15
1.2.4 El acetyl-CoA como nodo del metabolismo celular	18
1.2.5 Estrategias para aumentar la disponibilidad de NADPH para la producción de P3HB	19
1.2.6 Estrategias para incrementar la disponibilidad de acetyl-CoA para la producción de P3HB	20
1.2.7 Producción de NADPH mediante la ruta Embden-Meyerhof-Parnas	21
1.3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	24
MATERIALES Y METODOS	25
2.1 PROCEDIMIENTOS MOLECULARES, PLÁSMIDOS Y CEPAS	25
2.1.1 Reemplazo del gen <i>gapA</i> por el gen <i>gapN</i>	26
2.1.2 Construcción del plásmido pTregapN	27
2.1.3 Construcción del plásmido pPHB _{Av}	28
2.1.4 Eliminación del operón <i>ackA-pta</i>	28
2.2 CONDICIONES Y MEDIOS DE CULTIVO	28
2.3 ANÁLISIS DE METABOLITOS, PARÁMETROS CINÉTICOS Y ESTEQUIOMÉTRICOS	29
2.4 DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS Y DE COFACTORES	30
2.4.1 Mediciones Enzimáticas	30
2.4.2 Medición de cofactores	31
2.5 ANÁLISIS TR-qPCR	31
2.5.1 Extracción de ARN	31
2.5.2 Síntesis de cADN para el Análisis TR-qPCR	32
2.6 DETERMINACIÓN DE P3HB	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
3.1 RESPUESTA METABÓLICA Y TRANSCRIPCIONAL DE <i>E. coli</i> CON UNA GLICERALDEHÍDO-3-FOSFATO DESHIDROGENASA DE <i>Streptococcus mutans</i>	34
3.1.1 Reemplazo de la enzima GAPDH-NAD ⁺ nativa por la enzima GAPDH-NADP ⁺ de <i>S. mutans</i> ¹	34
3.1.2 Respuesta Metabólica y Transcriptómica al reemplazo de GAPDH-	

NAD ⁺ por GAPDH-NADP ⁺	37
3.1.3 Conclusiones de esta sección	41
3.2 INCREMENTO EN LA PRODUCCIÓN DE POLI-3-HIDROXIBUTIRATO EN <i>E. coli</i> POR EL AUMENTO DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE NADPH Y DE LA POZA DE ACETIL-CoA	42
3.2.1 Generación de NADPH mediante la vía de EMP y su efecto sobre la síntesis de P3HB	42
3.2.2 Incremento en la poza de acetil-CoA sumada a los altos niveles de NADPH y su efecto sobre la síntesis de P3HB	46
3.2.3 Conclusiones de esta sección	48
3.3 CONCLUSIONES GENERALES	48
 COMENTARIO FINALES Y PERPECTIVAS	 49
 BIBLIOGRAFÍA	 51
 MATERIAL COMPLEMENTARIO	 61
 ANEXOS	
ANEXO 1 Manuscrito publicado con la información obtenida en el Capítulo 3.1.	
ANEXO 2 Manuscrito en preparación con la información obtenida en el Capítulo 3.2.	
ANEXO 3 Resumen de la participación en el “113th General Meeting of American Society of Microbiology”	
ANEXO 4 Resumen de la participación en el “12th International Symposium on Genetics of Industrial “	
ANEXO 5 Resumen de la participación en el “XIV Congresos Nacional de Biotecnología y Bioingeniería”	

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1A	Estructura general de un monómero 3-hidroxiácido	11
Figura 1.1B	Estructura del poli-3-hidroxiacetato	11
Figura 1.1C	Estructura del poli-3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato (P3HB-co-V)	11
Figura 1.2	Vía de síntesis de poli-3-hidroxiacetato	11
Figura 1.3	Distribución de los genes del operón <i>phbBAC</i> en <i>A. vinelandii</i>	12
Figura 1.4A	Esquema del metabolismo de acetil-CoA acoplada al ciclo de los ácidos tricarboxílicos y a la producción de P3HB bajo condiciones aerobias	13
Figura 1.4B	Esquema del metabolismo de acetil-CoA acoplada al ciclo de los ácidos tricarboxílicos y a la producción de P3HB bajo condiciones limitadas de oxígeno	13
Figura 1.5	Esquema del metabolismo central de <i>E. coli</i>	16
Figura 1.6	Representación gráfica de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa	17
Figura 1.7	Sistema de transhidrogenasas	17
Figura 1.8	Esquema del metabolismo de acetil-CoA	18
Figura 1.9	Estrategia para incrementar los niveles de NADPH mediante la expresión del UdhA durante la producción de P3HB	19
Figura 1.10A	Nodo gliceraldehído-3-fosfato de la ruta EMP en <i>E. coli</i> catalizado por la enzima GAPDH-NAD ⁺ (GapA)	21
Figura 1.10B	Nodo gliceraldehído-3-fosfato de la ruta EMP en otros microorganismos por la enzima GAPDH-NADP ⁺ (GapN o GapC)	21
Figura 2.1A	Estrategia de reemplazo del gen <i>gapA</i> por el gen <i>gapN</i> basado en el sistema λ red	34
Figura 2.1B	Plásmido pTrcgapN	34
Figura 2.2A	Perfil de crecimiento de las cepas MG1655 $\Delta gapA::gapN$ y MG1655 $\Delta gapA::gapN/pTrcgapN$	36
Figura 2.2B	Perfil consumo de glucosa de las cepas MG1655, MG1655 $\Delta gapA::gapN$ y MG1655 $\Delta gapA::gapN/pTrcgapN$	36
Figura 2.2C	Perfil de producción de ácido acético de las cepas MG1655, MG1655 $\Delta gapA::gapN$ y MG1655 $\Delta gapA::gapN/pTrcgapN$	36
Figura 2.3	Relaciones molares de los cofactores de las cepas MG1655 y MG1655 $\Delta gapA::gapN/pTrcgapN$	37
Figura 2.4	Expresión relativa de los genes involucrados en la cadena respiratoria de la cepa MG1655 $\Delta gapA::gapN/pTrcgapN$	38
Figura 2.5	Expresión relativa de los genes involucrados en el metabolismo central de la cepa MG1655 $\Delta gapA::gapN/pTrcgapN$	39
Figura 2.6	Expresión relativa de los genes involucrados en el sistema de transhidrogenasas de la cepa MG1655 $\Delta gapA::gapN/pTrcgapN$	40
Figura 2.7A	Esquema del metabolismo central de la cepa MG1655 $\Delta gapA::gapN/pTrcgapN$ acoplado a la síntesis de P3HB	42
Figura 2.7B	Esquema del metabolismo central de la cepa MG1655/pTrcgapN en la que coexisten tanto la enzima nativa GapA y la enzima de <i>S. mutans</i> GapN	42
Figura 2.8	Relación molar de los niveles intracelulares de NADPH/NADH de las cepas silvestre MG1655, MG1655 $\Delta gapA::gapN/pTrcgapN$,	

	MG1655/pTregapN, MG1655 Δ <i>ackA-pta</i> y MG1655 Δ <i>ackA-pta</i> /pTregapN	43
Figura 2.9	Plásmido pPHBAv	44
Figura 2.10	Cinéticas de crecimiento durante la acumulación de P3HB	45
Figura 2.11	Rendimiento de acumulación intracelular de P3HB (g _{PHB} /g _{DWC})	46
Figura 2.12	Rendimiento de producción de P3HB (g _{PHB} /g _{GLC})	47

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Propiedades fisicoquímicas de algunos PHA comparadas con el polipropileno.....	10
Tabla 2	Plásmido y oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	25
Tabla 3	Parámetros cinéticos de crecimiento y actividad GAPDH de las cepas MG1655 $\Delta gapA::gapN$, MG1655 $\Delta gapA::gapN/pTrcgapN$ y MG1655 de cultivos lote en medio mineral con glucosa	35
Tabla 4	Parámetros cinéticos de las cepas MG1655 y MG1655 $\Delta gapA::gapN/pTrcgapN$ de cultivos lote en medio mineral con glucosa.....	38
Tabla 5	Parámetros cinéticos de las cepas MG1655 y sus derivadas de cultivos lote en medio mineral con glucosa.....	43

ABREVIATURAS

3PG	3-Fosfoglicerato
α -KG	α -cetoglutarato
<i>adhE</i>	Gen de la Alcohol deshidrogenasa
AcCoA	Acetil coenzima A
AckA-Pta	Operón acetato quinasa-fosfato acetil transferasa (<i>gen ackA-pta</i>)
Acn	Aconitato hidratasa
<i>atpA</i>	Gen de la subunidad alfa I del complejo F ₁ de la ATP sintasa
Atp	ATP sintasa
CAT	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
CoA	Coenzima A
<i>cydA</i>	Gen de la citocromo oxidasa <i>bd</i> -I subunidad I
<i>cyoB</i>	Gen de la citocromo oxidasa <i>bo</i> subunidad I
E4P	Eritrosa-4-fosfato
EMP	Embden-Meyerhoff-Parnas
Eno	Enolasa
F1,6P	Fructosa-1,6-bifosfato
Fba	Fructosa bi-fosfato aldolasa
Fru6P	Fructosa-6-fosfato
Fum	Fumarasa
FUM	Fumarato
G1,3P	1,3-Bifosfoglicerato
G3P	Gliceraldehído 3-fosfato
<i>gapA</i>	Gen de la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD ⁺ de <i>E. coli</i>
<i>gapC</i>	Gen de la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD ⁺ de <i>C. acetobutyricum</i>
<i>gapN</i>	Gen de la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD ⁺ de <i>S. mutans</i>
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GAPDH-NAD ⁺	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD ⁺
GAPDH-NADP ⁺	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP ⁺
gP _{3HB}	gramos de poli-3-hidroxibutirato
g _{DCW}	gramos de peso seco celular (“grams dry cell weight”)
Glc6P	Glucosa-6-fosfato
Glk	Glucoquinasa
GltA	Citrato sintasa
Gnd	6-Fosfogluconato deshidrogenasa
ICIT	Isocitrato
IcdA	Isocitrato sintasa
<i>ldhA</i>	Gen de la Lactato deshidrogenasa
MAL	Malato
Mdh	Malato deshidrogenasa
<i>ndh</i>	Gen de la ubiquinona oxidoreductasa II
Nuo	NADH:ubiquinona oxidoreductasa
OaA	Oxaloacetato
P3HB	Poli-3-hidroxibutirato
P3HB-co-Hx	Poli-3-hidroxibutirato-co-hexanoato
P3HB-co-V	Poli-3-hidroxibutirato-co-valerato

PCR	Polymerase Chain Reaction
Pdh	Piruvato deshidrogenasa
PEP	Fosfoenolpiruvato
PF	Pentosas Fosfato
PfkA	Fosfofructoquinasa
<i>pflB</i>	Gen de la Piruvato formato liasa
Pgi	Fosfoglucosa isomerasa
Pgk	Fosfoglicerato quinasa
Pgm	Fosfoglucosomutasa
PntAB	Transhidrogenasa unida a membrana subunidad α y β
PoxB	Piruvato oxidasa
Pyk	Piruvato quinasa
Ri5P	Ribosa-5-fosfato
Ru5P	Ribulosa-5-fosfato
S7P	Sedoheptulosa-7-fosfato
Sdh	Succinato deshidrogenasa
SUC	Succinato
SucA	2-oxoglutarato descarboxilasa
SucB	Dihidrolipoamida succiniltransferasa
<i>tktA</i>	Gen de la transcetolasa
UdhA	Transhidrogenasa soluble
X5P	Xilulosa-5-fosfato
Zwf	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

RESUMEN

El poli-3-hidroxitirato (P3HB) es un plástico biodegradable cuya ruta de biosíntesis requiere acetil-CoA como precursor y NADPH como cofactor. *E. coli* ha sido utilizada como modelo heterólogo para la producción de P3HB, con la desventaja que durante el catabolismo de la glucosa el NADPH se produce de forma limitada y el acetil-CoA es convertido a ácido acético y dirigido al ciclo de Krebs. La enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) dependiente de NAD⁺ (GAPDH-NAD⁺), codificada por *gapA*, es esencial para sostener la función glucolítica mediante la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas y es clave para la regeneración del cofactor NADH. En ausencia de la enzima GAPDH-NAD⁺, la función glucolítica en *E. coli* puede ser restaurada mediante la expresión heteróloga de una GAPDH dependiente de NADP⁺ (GAPDH-NADP⁺), lo que además eleva los niveles intracelulares de NADPH. En este trabajo, se incrementaron los niveles de NADPH mediante la expresión del gen que codifica para la enzima GAPDH-NADP⁺ de *Streptococcus mutans* (*gapN*); se eliminó la principal vía de producción de ácido acético (*AckA-Pta*) y se sobre-expresó la vía de síntesis de P3HB de *Azotobacter vinelandii* (PHBAv) para mejorar la producción del P3HB en *E. coli* MG1655. Cuando *gapA* fue eliminado y *gapN* fue sobre-expresado por un promotor fuerte (*trc*) mediante un plásmido (cepa MG1655 Δ *gapA::gapN/pTrc*gapN), las tasas de crecimiento y consumo de glucosa fueron 15% y 25% menores a las de la cepa silvestre. La relación NADPH/NADP⁺ incrementó 2 veces, pero la relación NADH/NAD⁺ disminuyó 25%, lo que aumentó 3 veces la relación NADPH/NADH. Dada la importancia del NADH en el transporte de electrones, la tasa específica de respiración y los niveles energéticos (ATP/ADP) disminuyeron 17% y 54% respectivamente, lo cual correlacionó con la sub-expresión de genes de la cadena respiratoria y fosforilación oxidativa (*ndh*, *cydA*, *cyoB* y *atpA*). Además, el rendimiento de CO₂ por mol de glucosa disminuyó un 40% y el rendimiento de síntesis de ácido acético aumentó un 22%, lo cual coincidió con la sub-expresión de genes de la vía de las pentosas fosfato y del ciclo de Krebs. MG1655 Δ *gapA::gapN/pTrc*gapN fue transformada con el plásmido pPHBAv para producir P3HB, pero el rendimiento de producción de P3HB fue solo 10% mayor que en la cepa silvestre, atribuible a la deficiencia energética y a la alta producción de ácido acético. Posteriormente, se generó la cepa *E. coli* Δ *ackA-pta/pTrc*gapN, la cual no produce ácido acético; conserva el gen *gapA* en el cromosoma y sobre-expresa a *gapN*, permitiendo producir tanto NADH como NADPH durante la ruta EMP. Esta estrategia permitió incrementar 1.8 veces la relación NADPH/NADH sin disminuir drásticamente los niveles de NADH. Como resultado del aumento en los niveles de NADPH y la eliminación de la síntesis de ácido acético, el rendimiento de acumulación de P3HB ($g_{\text{PHB}}/g_{\text{GLC}}$) incrementó un 30% comparado con la cepa silvestre, lo que corresponde al 73% del rendimiento máximo teórico (0.48 $g_{\text{PHB}}/g_{\text{GLC}}$); demostrando que la sobreexpresión de *gapN* y eliminación del operón *ackA-pta* permitieron mejorar la disponibilidad de precursor acetil-CoA y del cofactor NADPH, favoreciendo la acumulación de P3HB.

ABSTRACT

The biosynthesis of polhydroxybutyrate (P3HB), a biodegradable bio-plastic, requires acetyl-CoA as precursor and NADPH as cofactor. *E. coli* has been used as a heterologous production model for P3HB, but metabolic pathway analysis shows a deficiency to sustain high levels of NADPH and the acetyl-CoA is mainly converted to acetic acid and it is directed to Krebs cycle. The NAD⁺-dependent glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (NAD⁺-GAPDH) is a key enzyme of Embden-Meyerhoff-Parnas pathway to sustain the glycolytic function in *Escherichia coli* and to generate NADH. In absence of NAD⁺-GAPDH activity, the glycolytic function can be restored through NADP⁺-dependent GAPDH heterologous expression and increase NADPH levels. The goal of this work was to boost the pool of NADPH, abolish the production of acetate and increase the production of P3HB in *E. coli* MG1655 through the heterologous expression of the NADP⁺GAPDH gene (*gapN*) from *Streptococcus mutans*, deleting the main acetate production pathway (*AckA-pta*) and over-expressing the P3HB synthesis pathway from *A. vinelandii* (PHB_{Av}). When *gapA* was eliminated and *gapN* was overexpressed by the constitutive *trc* promoter in a multicopy plasmid (strain *E. coli* $\Delta gapA::gapN/pTrcgapN$), the specific growth and glucose consumption rates decreased 15% and 25% in comparison with wild type strain. The NADPH/NADP⁺ ratio increased 2 times but NADH/NAD⁺ ratio decreased 25% increasing 3 times the NADPH/NADH ratio. Because NADH plays a key role in the electron transport, the specific respiration rate and energy levels (ATP/ADP) decreased 17% and 54%, respectively, correlating with a down-expression of the respiration chain and oxidative phosphorylation genes (*ndh*, *cydA*, *cyoB* y *atpA*). Besides, the yield of CO₂ per mol of glucose decreased 40% and the yield of acetic acid synthesis increased 22%, which was consistent with a down-expression of pentoses phosphate and Krebs cycle genes. MG1655 $\Delta gapA::gapN/pTrcgapN$ carrying pPHBA_v plasmid was used to produce P3HB. However, the P3HB yield on glucose increased only 10 % respect to that in wild type strain, attributable to low energy levels and to high production of acetic acid. Therefore, the acetic acid was abolished in the strain *E. coli* $\Delta ackA-pta/pTrcgapN$, which keeps *gapA* in chromosome and overexpresses *gapN*, allowing increase 1.8 times the NADPH/NADH ratio. As a result of high NADPH levels and the acetic acid elimination, the yield of P3HB on glucose (g_{PHB}/g_{GLC}) increased 30% as compare with wild type strain, which is 73% of theoretical maximum yield (0.48 g_{PHB}/g_{GLC}), proving that overexpression of *gapN* and the *ackA-pta* elimination improves acetyl-CoA availability and NADPH pool increasing P3HB accumulation.

INTRODUCCIÓN

El poli-3-hidroxi-butirato (P3HB) es un poliéster biodegradable que se produce a partir de fuentes de carbono renovables y que posee características fisicoquímicas similares a los plásticos basados en petróleo (1–3). El P3HB es producido por diversos microorganismos que incluyen a los géneros *Ralstonia*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (4–6), dichos microorganismos acumulan el polímero a manera de gránulos intracelulares como material de reserva de carbono y energía bajo condiciones de estrés y limitación de nutrientes (7). La biosíntesis de P3HB se lleva a cabo en tres pasos iniciando con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA que posteriormente conduce a 3-hidroxi-butiril-CoA (3HB-CoA) y finalmente cada monómero de 3HB-CoA es polimerizado para formar P3HB (reacciones catalizadas por β -cetotiolasa (PhbA), acetoacetil-CoA reductasa dependiente de NADPH (PhbB) y PHB sintetasa (PhbC) respectivamente) (8). Las tres enzimas se encuentran dentro de un operón que en *Azotobacter vinelandii* es llamado operón *phbBAC* (43). El control de la vía está dado por la propia β -cetotiolasa ya que altos niveles de CoA inhiben su actividad, esto ocurre cuando existe suficiencia de oxígeno y una alta concentración de sustrato, lo que produce una intensa desasimilación de acetil-CoA y eleva los niveles de CoA (9). Debido a esta regulación, la producción heteróloga de P3HB en *E. coli* se lleva a cabo en dos etapas (10–12), la primera etapa de alta proliferación celular y una segunda etapa con oxígeno o nitrógeno limitados, en donde la actividad del ciclo CAT disminuye, permitiendo elevar la poza de acetil-CoA, disminuir los niveles de CoA y favorecer la síntesis de P3HB (13, 14). Uno de los mayores retos para mejorar la producción de P3HB en *E. coli* es aumentar la disponibilidad del precursor acetil-CoA y del cofactor NADPH (11, 12). Para aumentar la disponibilidad de acetil-CoA y dado que en ocasiones la producción de P3HB se lleva a cabo bajo limitación de oxígeno, la eliminación de vías de producción de acético (*ackA-pta*), lactato (*ldh*) y etanol (*adh*) mejora hasta 4.7 veces la eficiencia en la acumulación intracelular de P3HB (15), sin embargo, presentan una producción limitada por la baja disponibilidad de NADPH. Por otro lado, ya que la producción catabólica de NADPH en *E. coli* resulta insuficiente para sustentar la demanda anabólica (16, 17), la producción de metabolitos cuya síntesis depende de este cofactor es especialmente difícil (18, 19). Una de las estrategias más exploradas para aumentar los niveles de NADPH ha sido la manipulación metabólica para estimular el flujo de carbono hacia la rama oxidativa de las Pentosas Fosfato (PF) (20–22); sin embargo, como resultado del sobre-flujo hacia PF y como consecuencia del arresto de la glucólisis, ocurre una disminución en la velocidad de crecimiento y entrada de glucosa, lo que genera bajas productividades (23). La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) dependiente de NAD⁺ (GAPDH-NAD⁺) (E.C. 1.2.1.12) (24) codificada por *gapA* (25), es una enzima de la ruta

Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) clave para sostener la función glucolítica y generar el cofactor NADH. En *E. coli*, la función de GAPDH-NAD⁺ es esencial para el crecimiento y es reconocida por tener una actividad relativamente alta con respecto a otras enzimas de la ruta EMP (25, 26). Las mutantes carentes de la actividad GAPDH-NAD⁺ son incapaces de crecer en presencia de hexosas, posiblemente por la acumulación de intermediarios de la vía EMP que llegan a ser tóxicos para el crecimiento (27, 28). Diversos géneros de microorganismos, tales como *Bacillus*, *Streptococcus* y *Clostridium*, poseen además de la enzima GAPDH-NAD⁺ una enzima GAPDH dependiente de NADP⁺ (GAPDH-NADP⁺) (E.C. 1.2.1.9), lo que permite la producción simultánea de NADH y NADPH durante la ruta EMP (29). Se ha demostrado que la actividad de GAPDH-NADP⁺ puede complementar mutantes de *E. coli* carentes de la actividad nativa GAPDH-NAD⁺ (30–32). Dichas mutantes son capaces de crecer en condiciones aerobias a pesar de la disminución de los niveles necesarios de NADH para la generación de energía, pero no en condiciones anaerobias, probablemente por la incapacidad de las células para sostener un balance redox efectivo (19, 33). Martínez y colaboradores (19), reportan que el reemplazo de la GAPDH-NAD⁺ de *E. coli* por una GAPDH-NADP⁺ de *Clostridium acetobutyricum* (GapC) incrementa 1.7 veces el rendimiento de NADPH en glucosa, en consecuencia, la producción heteróloga de licopeno, un metabolito dependiente de NADPH, incrementa 2.5 veces en medio rico (19). Así mismo, mediante un análisis metabólico, dichos autores demuestran que para evitar el exceso de NADPH, el flujo de carbono disminuye significativamente hacia la vía oxidativa de PF y el CAT, además, aumenta la pérdida de carbono por la acumulación de ácido acético, lo que podría disminuir el rendimiento de producción de licopeno (19). La producción de NADPH mediante la vía glucolítica EMP podría ser explotada para producir metabolitos dependientes de NADPH de interés industrial (19, 34). Así mismo, los efectos fisiológicos relacionados con el reemplazo de la actividad GAPDH y las implicaciones metabólicas derivadas de la alteración del recambio del cofactor NAD(P)H no han sido ampliamente estudiados. En este trabajo se realizó un análisis metabólico y transcriptómico acerca de la respuesta fisiológica de *E. coli* al reemplazo de la actividad nativa GAPDH-NAD⁺ por la actividad GAPDH-NADP⁺ de *S. mutans*. El análisis permitió generar una cepa con características de crecimiento, consumo de glucosa y niveles de NADPH deseables para la producción de P3HB. En esta cepa, además se eliminó la principal vía de síntesis de ácido acético (*ackA-pta*) y se sobre-expresó el operón *phbBAC* de *A. vinelandii* para estudiar el efecto de los altos niveles de NADPH y una mejor disponibilidad de la poza de acetyl-CoA sobre la producción de P3HB.

ANTECEDENTES

1.1 EL POLI-3-HIDROXIBUTIRATO, UN POLIÉSTER NATURAL

1.1.1 Características Físicoquímicas y Biosíntesis

Los polihidroxicanoatos (PHA), son poliésteres que poseen características similares a algunos plásticos basados en petróleo tales como el polipropileno (Tabla 1). Dichos bio-plásticos sirven como material de reserva de carbono y energía para diversas eubacterias, que los acumulan a manera de gránulos intracelulares bajo condiciones de estrés y limitación de nutrientes (7). La estructura más común de los monómeros de PHA es el 3-hidroxiácido cuya cadena lateral posee una configuración estereoquímica R y alcanza longitudes variables (Tabla 1, Figura 1.1A) (35).

Tabla 1. Propiedades físicoquímicas de algunos PHA comparadas con el polipropileno (PP)

GRUPO-R	NOMBRE	ABREVIACIÓN
CH ₃	Poli-3-hidroxibutirato	P3HB
CH ₂ -CH ₃	Poli-3-hidroxivalerato	P3HV
CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	Poli-3-hidroxihexanoato	P3HHx

PROPIEDAD	P3HB	P3HB-co-V	P3HB-co-Hx	PP
Temperatura de fusión (°C)	177	145	127	176
Temperatura de transición vítrea (T _g , °C)	2	-1	-1	-10
Cristalinidad (%)	60	56	34	50-70
Resistencia a la tensión MPa	43	20	21	38
Resistencia al quiebre (%)	5	50	400	400

(T_g) Temperatura intermedia entre el estado fundido y el estado rígido

Dichas características químicas confieren diferentes propiedades físicoquímicas a los PHA haciéndolos termoplásticos biodegradables dependiendo del tamaño de la cadena lateral y los grupos funcionales unidos a cada monómero (Tabla 1) (2, 3, 36). Los PHA cortos, son frecuentemente rígidos y quebradizos; mientras que, los de cadena mediana son elastoméricos y los co-polímeros tienen propiedades entre los dos estados dependiendo de la proporción entre ellos (P3HB-co-V, P3HB-co-Hx; Tabla 1) (35, 37). El poli-3-hidroxibutirato (P3HB) (Figura 1.1B), uno de los PHA más comunes, posee propiedades físicoquímicas que lo hacen deseable en la industria (Tabla 1); entre estas que son termoestables, insolubles en agua,

enantioméricamente puros y no tóxicos, además de ser 100% biodegradables, por lo que son ideales para ser utilizados como contenedores, empaques, consumibles y bio-películas (38). También es utilizado como fibra textil, similar al nylon, y sus monómeros se utilizan como precursores químicos (38). En la industria farmacéutica y biomédica tiene aplicaciones como material para implantes y vehículo de fármacos ya que es biocompatible y bioabsorbible (3, 38). Además, el P3HB hidrolizado en su forma de metil-éster puede mezclarse un 10% con el etanol para aumentar su capacidad calórica (39).

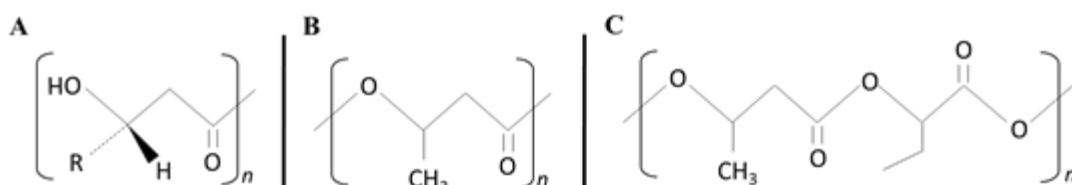


Figura 1.1 (A) Estructura general de un monómero 3-hidroxiácido; (B) Estructura del poli-3-hidroxi butirato; (C) Estructura del poli-3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato (P3HB-co-V).

El P3HB es producido por diversos microorganismos que incluyen a los géneros *Ralstonia*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (4–6) y su biosíntesis se lleva a cabo por la acción concertada de tres enzimas (Figura 1.2). En el primer paso, la enzima β -cetotiolasa (codificada por *phbA*) condensa dos moléculas de acetyl-CoA para producir acetoacetyl-CoA. Enseguida, el acetoacetyl-CoA es reducido a R-3-hidroxi butiril-CoA por la acetoacetyl-CoA reductasa dependiente de NADPH (codificada por *phbB*) y finalmente, cada monómero es unido mediante una reacción de esterificación realizada por una P3HB sintetasa (codificada por *phbC*) (8).

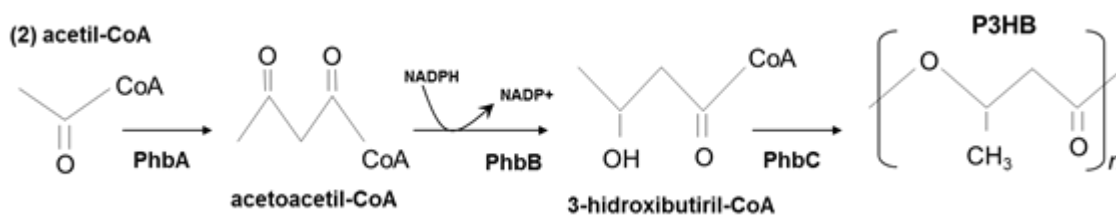


Figura 1.2. Vía de síntesis de poli-3-hidroxi butirato: β -cetotiolasa (PhaA); acetoacetyl-CoA reductasa (PhaB); PHB sintetasa (PhaC).

Otros polímeros derivados pueden ser sintetizados a partir de esta misma ruta mediante la adición de precursores tales como propionato, valerato, valina, o treonina (40), lo cual lleva a la formación del respectivo hidroxiacil-CoA (p. ej. 3-hidroxi valeril-CoA). Lo anterior permite

la producción de co-polímeros tales como el poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato (Figura 1.1C) que posee propiedades elastoméricas deseables para usos industriales (Tabla 1) (35, 37, 41).

1.1.2 Regulación de la biosíntesis de P3HB en *Azotobacter vinelandii*

Azotobacter vinelandii es una bacteria aerobia estricta y fijadora de nitrógeno que se somete a diferenciación para formar quistes resistentes a la desecación y produce dos polímeros que tienen importancia industrial, el alginato y el P3HB (42). Se sabe que en *Azotobacter* los genes de las tres enzimas involucradas en la síntesis de P3HB se encuentran en un operón denominado *phbBAC* dentro del cromosoma (5). Según los reportes de Peralta-Gil y colaboradores (43), la transcripción de los genes del operón *phbBAC* es iniciada por dos promotores superpuestos (p_{B1} y p_{B2}) que son activos durante la fase estacionaria del crecimiento. El promotor p_{B1} es más fuerte que p_{B2} y es estimulado por el activador transcripcional tipo AraC llamado PhbR, el cual está codificado en dirección opuesta al operón *phbBAC* (Figura 1.3). A su vez, el activador PhbR posee dos promotores (p_{R1} y p_{R2}), siendo el segundo estimulado en la fase estacionaria por el factor σ^s y reprimido por el mismo PhbR (Figura 1.3). Lo anterior implica que la expresión de los genes de la vía de síntesis de P3HB en *A. vinelandii* está regulada positivamente a nivel transcripcional durante el arresto del crecimiento. Así mismo y enseguida del gen *phbR* se encuentra el gen *phbP* que codifica para una proteína llamada “fasina”, la cual se asocia a la superficie de los gránulos influyendo sobre el número y tamaño de los mismos, además de facilitar el anclaje de de-polimerasas que degradan el polímero (44).

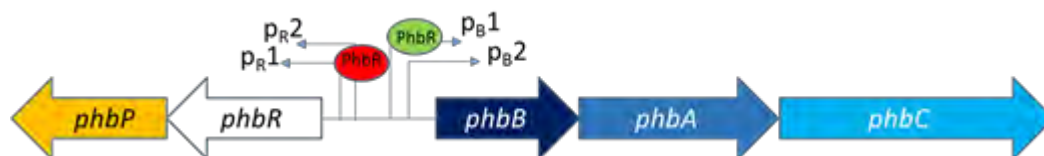


Figura 1.3 Distribución de los genes del operón *phbBAC* en *A. vinelandii*. En orden de transcripción: Acetoacetyl-coA reductasa *phbB*, β -cetotiolasa *phbA*, P3HB sintasa *phbC*. En dirección opuesta al operón: genes del regulador transcripcional *phbR* (rojo: reprime, verde: activa) y fasina *phbP*.

Por otro lado, la síntesis de P3HB también tiene un control a nivel enzimático, ya que la β -cetotiolasa (PhbA), la primer enzima de la vía, es inhibida de forma competitiva por CoA (45).

Esto ocurre durante el crecimiento bajo condiciones no limitantes de oxígeno, en la que existe una constante hidrólisis de acetil-CoA para alimentar el ciclo de los ácidos tricarbónicos (CAT). La hidrólisis de acetil-CoA libera CoA que a su vez inhibe la actividad de la β -cetotiolasa impidiendo la síntesis de P3HB (Figura 1.4A).

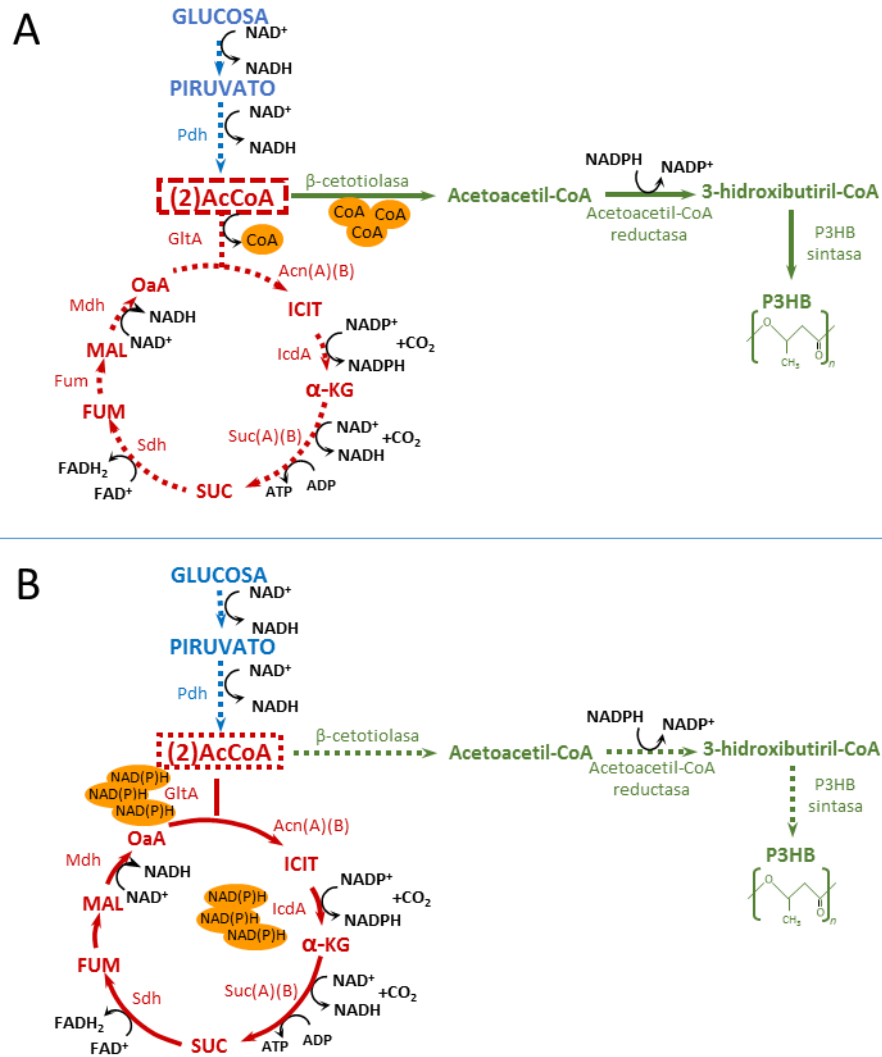


Figura 1.4 Esquema del metabolismo de acetil-CoA (AcCoA) acoplada al CAT (flechas rojas) y a la producción de P3HB (flechas verdes): (A) durante el crecimiento en condiciones aeróbicas; y (B) bajo condiciones limitadas de oxígeno. Con flechas intermitentes se señala la dirección del flujo de carbono y con globos naranjas se indican las especies inhibitoras de la β -cetotiolasa (CoA) y de las GltA e IcdA (NAD(P)H).

En contraste, bajo condiciones de limitación de oxígeno y exceso de carbono, el crecimiento se detiene e incrementan los niveles de NAD(P)H. Los altos niveles de poder reductor inhiben a la citrato sintetasa (GltA) e isocitrato deshidrogenasa (IcdA) arrojando el CAT (13), lo que eleva la poza de acetil-CoA y disminuyen la de CoA permitiendo a la β -cetotiolasa superar la

inhibición y proceder a la síntesis del polímero (Figura 1.4B) (14). Si bien, aunque se conocen los genes involucrados en síntesis de P3HB en *A. vinelandii*, no se han generado a la fecha estrategias para la producción heteróloga del polímero con estos genes ya sea en *E. coli* o levaduras.

1.2 PRODUCCIÓN DE P3HB Y METABOLISMO DE *E. coli*

1.2.1 Producción heteróloga de P3HB en *E. coli*

Hasta hace casi dos décadas, resultaba poco rentable el mercado del P3HB debido al alto costo de producción \$15 EUA dólares por kg, el cual resultaba un orden de magnitud más alto que el de los plásticos no bio-degradables (10). La producción de P3HB en *E. coli* es atractivo por numerosas razones, entre otras: es posible alcanzar títulos altos (70%-80% g_{P3HB}/g_{DCW}); la purificación del polímero es fácil y no posee depolimerasas que degraden el polímero (41). Por otro lado, *E. coli* tiene un rápido crecimiento que puede llegar a altas densidades y posee la ventaja que puede utilizar diversas fuentes de carbono baratas (46). Además, a diferencia de las bacterias fijadoras de nitrógeno como el caso del género *Azotobacter*, *E. coli* posee una tasa de respiración 10 veces menor (47–49), lo que facilita las condiciones de cultivo. Así mismo, aunque *E. coli* no cuenta con las enzimas para sintetizar P3HB, su fácil manipulación genética permite expresarlas de forma heteróloga, siendo los genes de *Ralstonia eutropha* y *Alcaligenes latus* los más empleados a la fecha (8, 50). De hecho, hasta hoy en día la vía *phbBAC* de *Azotobacter vinelandii* no ha sido utilizada para la producción heteróloga de P3HB en *E. coli*.

1.2.2 Proceso de producción de P3HB en *E. coli*

Generalmente la producción de P3HB en *E. coli* se realiza siguiendo un perfil de dos etapas: la primer etapa se caracteriza por una rápida proliferación celular y muy poca producción del polímero y en la segunda etapa ocurre una alta acumulación de P3HB con poca proliferación celular (10, 11). Los estudios de producción que incluyen cultivos en lote y quimiostato, indican que la mayor acumulación de P3HB se da bajo condiciones de oxígeno o nitrógeno limitantes (10–12). Según los análisis de flujo realizados por Wegen en 2001, durante la fase de crecimiento exponencial, bajo condiciones no limitadas de oxígeno, el 55% de la glucosa que es consumida es dirigida al CAT, lo cual disminuye la disponibilidad de acetyl-CoA

y aumenta los niveles de CoA que inhiben a la β -cetotiolasa (45). Por otro lado, en las primeras horas de limitación de oxígeno y exceso de carbono, ocurre un aumento en la relación NADPH/NADP⁺, lo que inhibe a la isocitrato deshidrogenasa (IcdA) y disminuye el flujo de carbono hacia CAT (51). Gracias a los altos niveles de NADPH y al arresto del CAT, ocurre una disminución del crecimiento pero un incremento en la disponibilidad de acetyl-CoA, lo que junto con la sobreexpresión de los genes de la vía de síntesis de P3HB resulta en un incremento en la producción del polímero. Este hecho es similar a la cascada de regulación enzimática que sucede en las cepas que naturalmente producen P3HB (14). Sin embargo, después de 2 horas de limitación de oxígeno, los niveles de NADPH disminuyen ya que son consumidos para proceder a la etapa de síntesis de P3HB, esto elimina la represión de TCA y detiene la síntesis del polímero (10). Lo anterior sugiere que para tener una buena producción de P3HB en *E. coli* una vez detenido el crecimiento, es necesario mantener altos niveles del cofactor NADPH y una alta disponibilidad de acetyl-CoA, sumada a una buena expresión de las enzimas heterólogas (10, 12). Sin embargo, como se describe enseguida, dado el metabolismo de *E. coli*, resulta difícil mantener una alta poza del cofactor NADPH y una buena disponibilidad de acetyl-CoA.

1.2.3 Metabolismo y poder reductor

Para mantener un gran número de reacciones, ya sean catabólicas o anabólicas durante el metabolismo celular, dos co-factores redox son altamente empleados en *E. coli*: nicotinamida adenina dinucleótido NAD(H) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato NADP(H). La regeneración de NADH se lleva a cabo principalmente por dos rutas (Figura 1.5):

La vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) que produce 4 moles de NADH por cada mol de glucosa mediante la actividad de las enzimas gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GapA) y piruvato deshidrogenasa (Pdh). Dado que el 80% del carbono se asimila por esta ruta (52, 53), la glucólisis resulta la principal vía de formación de NADH.

Durante el CAT, el NADH es regenerado por la catálisis de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa (SucAB) y por la malato deshidrogenasa (Mdh) para formar succinil-CoA y oxalacetato respectivamente.

En condiciones aerobias, el papel principal del cofactor NADH es la generación de ATP mediante la fosforilación oxidativa a través del transporte de electrones de la cadena respiratoria (Figura 1.6), así mismo, es requerido para más de 300 reacciones de oxido-reducción (54). Por otro lado, durante el crecimiento anaerobio, el NADH es utilizado principalmente para llevar a

cabo reacciones de fermentación y de esta forma mantener el balance redox, utilizando moléculas orgánicas como aceptor final de electrones (55).

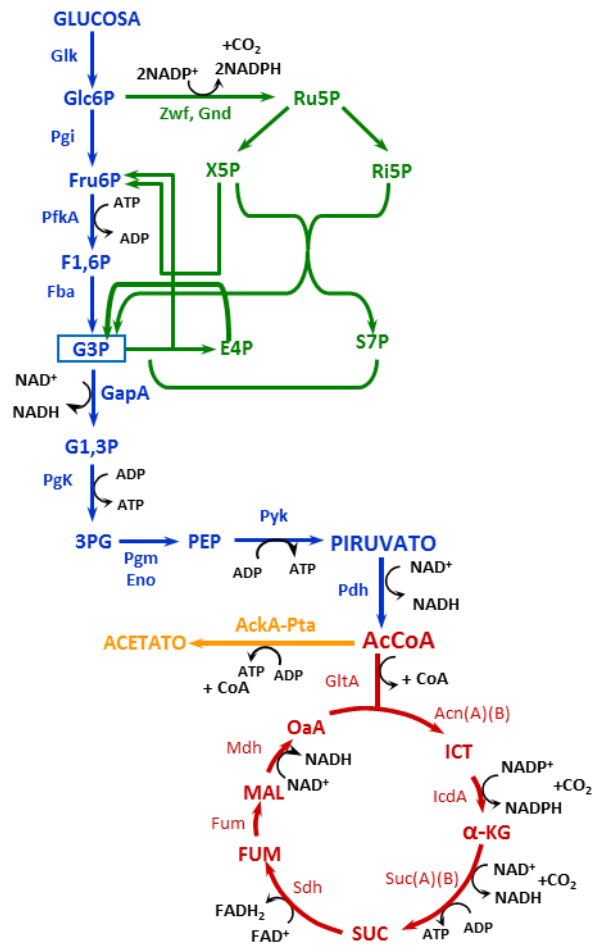


Figura 1.5. Esquema del metabolismo central de *E. coli*. Ruta EMP o glucólisis (flechas azules); Ruta de las Pentosas Fosfato (PF; flechas verdes); Ciclo de Krebs (CAT; flechas rojas) y vía de síntesis de ácido acético (AckA-Pta; flechas amarillas).

Contrario al NADH, el cofactor NADPH conduce a reducciones anabólicas principalmente para la generación de precursores biosintéticos tales como ácidos grasos, aminoácidos y nucleótidos (54). Durante el crecimiento en glucosa existen 3 vías que llevan a la regeneración de NADPH (53, 55) (Figura 1.5):

La vía oxidativa de las pentosas fosfato (PF) por medio de la catálisis de las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Zwf) y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (Gnd).

El paso de la isocitrato deshidrogenasa (IcdA) en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

El llevado a cabo por la transhidrogenasa soluble (UdhA) y la unida a membrana (PntAB) que interconvierten NADH-NADPH.

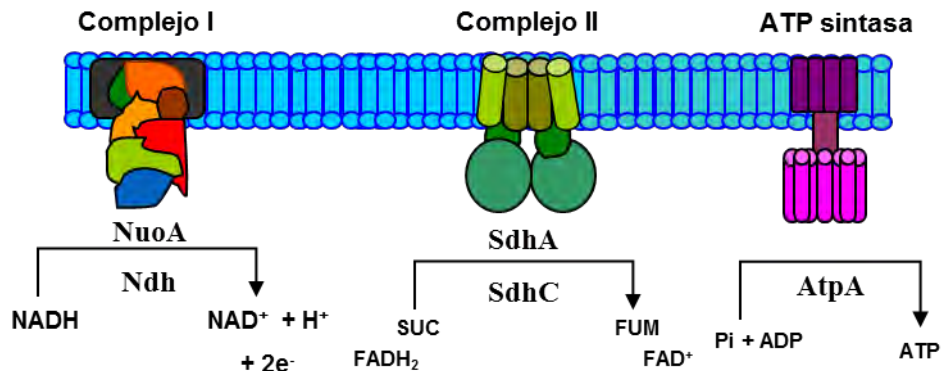


Figura 1.6 Representación gráfica de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa. Complejo I encabezado por la NADH: ubiquinona oxidoreductasa (NuoA); Complejo II con la succinato deshidrogenasa (SdhA); ATP sintetasa (AtpA).

Lo anterior implica que la tasa de formación de NADPH depende del flujo de carbono a través de las vías catabólicas que lo producen y de su inter-conversión por medio de las transhidrogenasas. Se sabe, que durante el crecimiento de *E. coli* en glucosa, ~25% del flujo del carbono se dirige hacia la vía de las Pentosas Fosfato (52, 53); esto proporciona ~35% del NADPH requerido para la biosíntesis, mientras que el paso de la isocitrato deshidrogenasa del CAT proporciona otro ~25%, por lo que estas dos vías generan aproximadamente dos tercios de la demanda de NADPH requerido para el crecimiento (16). Los datos anteriores indican que la producción catabólica de NADPH en *E. coli* resulta insuficiente para sustentar la demanda anabólica (17). Para obtener el otro tercio de NADPH necesario para soportar los requerimientos biosintéticos, *E. coli* utiliza el sistema de transhidrogenasas soluble y unida a la membrana, las cuales inter convierten NAD(H) :

NADP(H) (Figura 1.7) (16, 55, 56). Esta insuficiencia puede limitar la producción heteróloga de metabolitos de interés industrial tales como el licopeno, flavonoides y polihidroxitbutirato, ya que dependen de una alta disponibilidad de NADPH y resulta difícil su producción sin comprometer el crecimiento del hospedero (19, 57, 58). Esto genera rendimientos bajos y productividades limitadas.

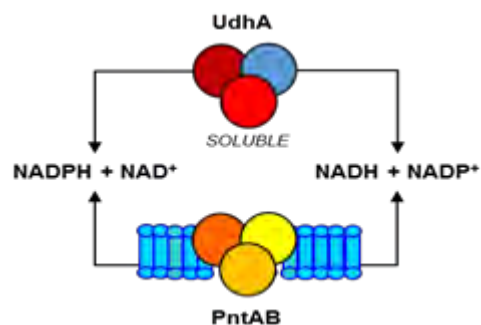


Figura 1.7 Sistema de transhidrogenasas: PntAB unida a membrana y UdhA soluble.

1.2.5 Estrategias para aumentar la disponibilidad de NADPH para la producción de P3HB

Debido a la limitada disponibilidad de NADPH en *E. coli* para la producción de metabolitos de interés industrial (70), diversos grupos de investigación han desarrollado propuestas de manipulaciones metabólicas para mejorar la disponibilidad del cofactor y con ello aumentar la producción de P3HB.

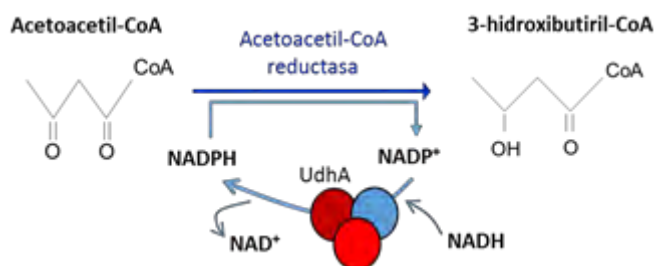


Figura 1.9 Estrategia para incrementar los niveles de NADPH mediante la expresión del gen que codifica para la enzima UdhA durante la producción de P3HB.

Una de las estrategias que se han probado es sobre-expresar el gen que codifica para la transhidrogenasa soluble UdhA para favorecer la interconversión de NADH a NADPH (Figura 1.9). Gracias a esta estrategia, fue posible incrementar el rendimiento de P3HB en glucosa un 15% con respecto a la cepa parental en cultivos lote. Sin embargo, dada la

reversibilidad de la catálisis, cuando los niveles de NADH disminuyen por su consumo, la enzima UdhA deja de producir NADPH limitando el tiempo de máxima producción (55, 56). Otra estrategia que ha sido de las más empleadas, es favorecer el flujo de carbono hacia la rama oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato (PF), ya que es una de las principales vías productoras de NADPH. Como parte de esta estrategia, la eliminación de los genes que codifican para la fosfoglucosa isomerasa (Pgi) o fosfofructocinasa (PfkA) permite el bloqueo de la glucólisis, obligando el paso del carbono a través de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Zwf) (Figura 1.5), lo que incrementa el rendimiento neto de NADPH en glucosa (73, 74). Estas mutantes *pgi*⁻ pueden acumular más P3HB (g/L) que las cepas parentales en cultivos alimentados (18, 20, 23). Un camino similar ha sido la sobre-expresión de los genes de la propia *zwf* y de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (*gnd*) (Figura 1.5). La sobreexpresión de ambos genes incrementa un 35% (g_{P3HB}/g_{DCW}) la acumulación de P3HB con respecto a la cepa parental en cultivos en matraz (22). Así mismo, Jung y colaboradores (21) probaron aumentando los niveles de expresión de la transcetolasa (*tktA*), la cual promueve el flujo de carbono hacia la vía de PF. La mutante generada incrementa del 25% al 35% el rendimiento de P3HB en células (g_{P3HB}/g_{DCW}) en cultivos en matraz. Sin embargo, aunque estas estrategias han proporcionado cepas con mejor capacidad en la acumulación del polímero, la estimulación de la vía de las PF como principal vía catabólica trae como resultado la represión de la glucólisis, ya que se

estimula la función de la enzima RNAasaE que media la degradación del transcrito *ptsG* (transportador de glucosa perteneciente al sistema PTS) (23), genera bajas tasas de crecimiento y una disminución en la tasa de consumo de glucosa, lo que lleva a largos períodos de producción (22, 23).

1.2.6 Estrategias para incrementar la disponibilidad de acetil-CoA para la producción de P3HB

Con respecto al aumento en la disponibilidad de acetil-CoA, la estrategia más empleada es evitar la acumulación de ácidos orgánicos. En *E. coli* la síntesis de ácido acético puede darse tanto en la fase de crecimiento exponencial como en la fase estacionaria, en el primer caso a través del intermediario metabólico acetil-CoA, catalizado por la enzima fosfotransacetilasa (Pta) y acetato cinasa (AckA) y en el segundo caso a partir de piruvato por medio de la piruvato oxidasa (PoxB) (75). En el trabajo reportado por Jian y colaboradores (15), se eliminaron ambas vías dado que la producción de co-polímeros de P3HB se realiza cuando se arresta el crecimiento. Así mismo y debido a que utilizan un proceso limitado en oxígeno, eliminaron también la producción de ácido láctico, etanol y ácido fórmico mediante la interrupción de los respectivos genes (*ldhA*, *adhE* y piruvato formato liasa codificada por *pflB*). Las mutantes mostraron una efectiva disminución en la acumulación de sub-productos con respecto a la(s) vía(s) fermentativa(s) bloqueada(s). Sin embargo, resultó poco exitosa la síntesis del co-polímero P(3HB-co-3HV) ya que más del 95% de la mezcla fue solo de la forma 3HB, lo que puede explicarse porque el ácido acético estimula la vía de síntesis de propionil-CoA (como se cita arriba las vías de síntesis de ácido acético fueron eliminadas en la cepa), la cual es necesaria para la incorporación eficiente de 3-hidroxivalerato (3-HV) al co-polímero (40). Por otro lado, la evaluación del cultivo en lote aireado indicó que si bien la mutante defectiva en *pta-ackA*, *poxB*, *ldhA*, *adhE* y *pflB* presentó un aumento de 4.7 veces en el rendimiento de P3HB (g_{P3HB}/g_{DCW}), gracias a la mayor disponibilidad de acetil-CoA, el consumo de glucosa disminuyó un 40%. Así mismo, en condiciones micro-aerobias la misma mutante produce 1.7 veces más PHB que la silvestre. Sin embargo, la acumulación de biomasa y el consumo de glucosa disminuyen tres veces con respecto a la cepa silvestre. Es probable, dadas las condiciones de limitación de oxígeno, que en esta mutante la eliminación de las vías fermentativas haya generado una excesiva acumulación de NADH proveniente de la glucólisis, el cual no fue posible canalizar a la cadena respiratoria, lo que causó un des-balance redox (15). Así mismo, no hay que dejar de lado que el principal precursor para la síntesis de P3HB es el

acetil-CoA y que la síntesis es altamente dependiente de NADPH. En el sistema propuesto por Jian, la anaerobiosis limita la disponibilidad tanto de NADPH como de acetil-CoA ya que la enzima eliminada PflB, una enzima homóloga a Pdh (Figura 1.5), es la principal enzima que proporciona acetil-CoA y permite el paso hacia CAT cuando el oxígeno está limitado. Otros trabajos basados en ensayos proteómicos, proponen estimular el flujo glucolítico en el nodo fructosa-1,6-bi-fosfato (Fba)/Triosa-fosfato isomerasa (Tpi). Los autores aseguran que esto estimula la glucólisis y disminuye PF, enviando más carbono hacia la poza de acetil-CoA y con ello logran incrementar 4 veces la producción de P3HB (76). Por otro lado, en *Saccharomyces cerevisiae*, una levadura hiperproductora de etanol, se ha diseñado una estrategia para regresar el carbono del etanol, triacil-glicerol y ácido acético producidos hacia acetil-CoA mediante la sobre-producción de las enzimas alcohol deshidrogenasa (ADH2), acetaldehído deshidrogenasa (ALD6), acetil-CoA acetiltransferasa (ERG10) y una variante de la enzima acetil-CoA sintetasa de *Salmonella enterica* (acsL641P insensible a inhibición por acetilación). Esta redistribución del carbono, permitió favorecer la producción volumétrica de P3HB 16.5 veces con respecto a la cepa parental (77).

1.2.7 Producción de NADPH mediante la ruta Embden-Meyerhof-Parnas

La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) dependiente de NAD^+ (GAPDH- NAD^+) (E.C. 1.2.1.12) (24) codificada por *gapA* (25), es una enzima de la ruta Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) clave para sostener la función glucolítica y generar el cofactor NADH (Figura 1.5 y 10A).

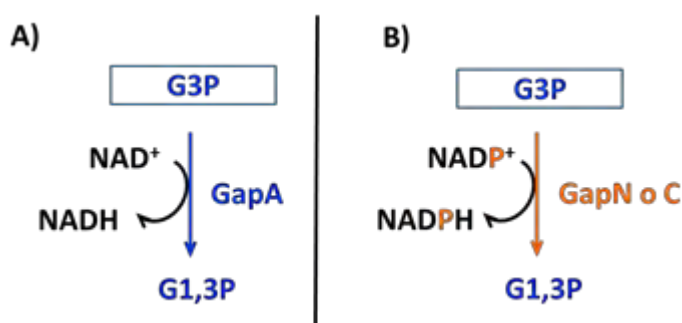


Figura 1.10 Nodo gliceraldehído-3-fosfato de la ruta EMP. **A)** En *E. coli* catalizado por la enzima GAPDH- NAD^+ (GapA) y **B)** en otros microorganismos por la enzima GAPDH- NADP^+ (GapN o GapC).

Las mutantes carentes de la actividad GAPDH- NAD^+ son incapaces de crecer en presencia de hexosas, posiblemente por la acumulación de intermediarios tóxicos (27, 28). En *E. coli*, la función de GAPDH- NAD^+ es esencial para el crecimiento y es reconocida por tener una actividad relativamente alta con respecto a

otras enzimas de la ruta EMP (25, 26). A diferencia de *E. coli*, diversos microorganismos producen NADPH por la vía de EMP utilizando una gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

no fosforilada dependiente de NADP⁺ (GAPDH-NADP⁺) (E.C. 1.2.1.9) (Figura 1.10B). En contraste con GAPDH-NAD⁺, la GAPDH-NADP⁺ no requiere fosforo inorgánico y su reacción es cooperativa e irreversible (78). Esta iso-enzima ha sido encontrada principalmente en bacterias Gram (+) de los géneros *Bacillus* (*gapB*), *Streptococcus* (*gapN*) y *Clostridium* (*gapC*) (29) y algunas de ellas han sido aisladas y expresadas en *E. coli* (30–32). Se sabe que el papel de GAPDH-NADP⁺ es generar el NADPH necesario para la demanda anabólica y en algunas especies del género *Streptococcus* su expresión es consecuencia de la ausencia de la rama oxidativa de las pentosas fosfato permitiendo un mecanismo alternativo para generar NADPH (79). Así mismo, la enzima GAPDH-NADP⁺ se ha encontrado en bacterias Gram (-) como *Azotobacter sp.* en la que posiblemente juega un papel importante para la acumulación de P3HB (9).

Por otro lado, la sustitución de GAPDH-NAD⁺ por GAPDH-NADP⁺ ha sido explorada en *E. coli* (Figura 1.10B) y se ha demostrado que es capaz de complementar y restaurar la función glucolítica en ausencia de GAPDH-NAD⁺. Dichas mutantes son capaces de crecer en condiciones aerobias a pesar de la disminución del NADH necesario para generar energía, pero no así en anaerobiosis, posiblemente por la incapacidad de la célula por mantener un balance redox eficiente (33). De hecho, la sustitución de la GAPDH-NAD⁺ nativa de *E. coli* por una GAPDH-NADP⁺ de *Clostridium* o *Bacillus* ha sido propuesta para incrementar el rendimiento NADPH en glucosa (19, 34). Dicho incremento, favorece la producción de metabolitos dependientes de NADPH tales como licopeno y ϵ -caprolactona, aunque la síntesis de estos compuestos solo se han logrado en medio rico (19). Según el análisis de flujo de carbono, la sustitución permitió incrementar un 35% el flujo de carbono a través de la ruta EMP (Figura 1.10). Sin embargo, para evitar la sobreproducción de NADPH durante el paso del carbono a través de IcdA o Zwf (figura 1.5), el flujo de carbono hacia el CAT y la ruta de las pentosas fosfato, disminuyó 34 y 80% respectivamente. Así mismo, el arresto de CAT trajo como consecuencia una alta producción de ácido acético, lo que limita la disponibilidad de carbono para la producción del metabolito de interés. Esto indica, que más allá de la distribución de carbono, es probable que las alteraciones en el balance redox conlleven a otras implicaciones metabólicas y resulten en estas consecuencias negativas para la productividad de metabolitos dependientes de NADPH. Sin embargo, a pesar de que el reemplazo GAPDH-NAD⁺ nativa por GAPDH-NADP⁺ heteróloga es útil para incrementar los niveles de NADPH durante el consumo de glucosa, poco se sabe acerca de los efectos fisiológicos relacionados con el reemplazo y con la alteración del recambio del cofactor NAD(P)H en *E. coli*.

Las referencias anteriores indican que la producción de P3HB en *E. coli* requiere una estrategia

que permita elevar los niveles de NADPH y aumentar la disponibilidad de acetyl-CoA sin afectar el crecimiento y la tasa de consumo de glucosa. Con respecto a los niveles de NADPH, la sustitución de la enzima GAPDH-NAD⁺ nativa de *E. coli* por una GAPDH-NADP⁺ heteróloga, puede generar 2 moles de NADPH en el nodo G3P que estarían disponibles para la producción de P3HB. Sin embargo, es necesario un análisis metabólico acerca de la respuesta fisiológica del reemplazo para generar alternativas que eviten los efectos negativos relacionados con la sustitución de la enzima y el recambio del cofactor NAD(P)H y con ello favorecer la producción de P3HB. A esta estrategia, resulta deseable agregar la eliminación de aquellas vías que durante la producción de P3HB limitan la disponibilidad de la poza de acetyl-CoA. Finalmente, explorar la expresión del operón *phbBAC* de *A. vinelandii* para la producción del polímero en *E. coli* podría contribuir como una propuesta alternativa a las fuentes heterólogas convencionales.

1.3 HIPÓTESIS

Utilizando la vía de Embden-Meyerhoff-Parnas como proveedora de NADPH, interrumpiendo la vía de síntesis de ácido acético y sobre-expresando el operón *phbBAC* de *A. vinelandii*, será posible desarrollar una cepa de *E. coli* con altos niveles intracelulares de NADPH y con una mejor disponibilidad de acetil-CoA para incrementar la producción de P3HB.

OBJETIVO GENERAL

Incrementar el rendimiento de producción de P3HB en *E. coli* mediante la producción de NADPH por la ruta EMP, el aumento de la disponibilidad de acetil-CoA y la sobre-expresión de la vía *phbBAC* de *A. vinelandii*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

Sustituir el gen *gapA* de *E. coli* por el gen *gapN* de *S. mutans*.

Realizar un perfil cinético (parámetros de crecimiento, tasa de respiración, actividad GAPDH), metabólico (niveles de ATP/ADP y niveles de NAD(P)⁺/NAD(P)H) y niveles de transcrito de la cepa *gapN*⁺.

Determinar en la cepa *gapN*⁺ la capacidad de acumulación de P3HB, crecimiento y formación de sub-productos durante la producción del polímero.

Una vez realizado el análisis de sub-productos, eliminar en la cepa *gapN*⁺ algunas de las rutas que compiten por el acetil-CoA y evaluar su capacidad de producción de P3HB.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 PROCEDIMIENTOS MOLECULARES, PLÁSMIDOS Y CEPAS

Se utilizó como cepa parental la cepa silvestre de *Escherichia coli* MG1655 (GenBank NC_000913). La cepa de *Streptococcus mutans* fue donada por la Facultad de Química de la UNAM. El ADN cromosomal de la cepa de *A. vinelandii* fue donado generosamente por el Gpo. De la Dra. Guadalupe Espín del Instituto de Biotecnología de UNAM. Todos los plásmidos utilizados en este trabajo se encuentran listados en la Tabla 2. La preparación de plásmidos, digestión con enzimas de restricción, procedimientos de transformación de cepas y visualización de ADN fueron llevados a cabo utilizando procedimientos de rutina (80). La construcción de cada plásmido y de cada mutante fue verificada por patrón de restricción y por secuenciación. El ADN cromosomal fue aislado con el kit de purificación “Ultra Clean Microbial DNA Isolation” (MO BIO laboratories, Inc, USA). La amplificación de genes fue llevada a cabo por PCR ("polymerase chain reaction") utilizando la polimerasa “Expand High Fidelity” (Roche Diagnostics GmbH, Germany) en un termociclador C1000 “Touch Thermal Cycler Manual” (Bio-Rad Laboratories, Inc. USA). Los fragmentos de ADN fueron aislados y purificados a partir de geles de agarosa con el kit de purificación “Roche Pure PCR Product Purification” (Roche Diagnostics GmbH, Germany).

Tabla 2. Plásmido y oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Descripción	Referencia
pTrc99A	Diseñado para expresión de proteínas inducible por IPTG bajo el control del promotor híbrido <i>trp/lac</i> . Amp ^r	(81)
pACYC184	Diseñado con un origen de replicación p15A para coexistir en células con plásmido tipo ColE1 (e.g., pBR322, pUC19). Tc ^r and Cm ^r	(82)
pTgapN/cat- <i>frt</i>	Derivado de pTrc99A con <i>gapN</i> fusionado con el casete <i>cat-<i>frt</i></i>	Este estudio
pGapN	Derivado de pTrc99A conteniendo <i>gapN</i>	Este estudio
pTrcgapN	Derivado de pACYC184 con el promotor <i>trc</i> y <i>gapN</i>	Este estudio
pKD46	Diseñado para inactivar genes a través del sistema de recombinasas λ Red	(83)
pPHBAv	Diseñado para la expresión inducible por IPTG del operón <i>phbBAC</i> de <i>A.</i>	Este estudio

<i>vinelandii</i>		
pKD3	FRT-cloranfenicol	(83)
pCP20	Diseñado para remover sitios FRT	(84)
Oligonucleótido	Secuencia ^a	
gapN1	5' CATGCCATGGCAATGACAAAACAATATAAAAAATTA 3'	
gapN2	5' CGGGGTACCCCGTTATTTGATATCAAATACGACGG 3'	
Trc1	5' GCCGACATCATAACGGTTCTGG 3'	
cm1	5' CGGGGTACCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG 3'	
cm2	5' TCCCCCGGG CATATGAATATCCTCCTTA 3'	
D1 ^b	5' GTAATTTTACAGGCAACCTTTTATTCACTAACAAATAGCTGGTGGAATAT ATG ACAAACAATATAAAAAATTATG 3'	
D2 ^b	5' AAAAAAGAGCGACCGAAGTCGCTCTTTTTAGATCACAGTGTCATCTCA ACCATATGAATATCCTCCTTAGTTCCT 3'	
phb1	5' GGAATTC CGGATGAGCAATCAACGAATTGCAT 3'	
phb2	5' CCCAAGCTT GGGTCAGCCTTTCACGTAACGGCCT 3'	
ackAF ^b	5' GGTACTTCCATGTTCGAGTAAGTTAGTACTGGTTCTGAACTGCGGTGTGT AGGCTGGAGCTGCTTCG 3'	
ptaR ^b	5' CTGCGGATGATGACGAGATTACTGCTGCTGTGCAGACTGAATCGCCATA TGAATATCCTCCTTAG 3'	
p1	5' GCAGCCTGAAGGCCTAAGTAG 3'	
p2	5' CGGGCATTGCCATCTTCTTG 3'	
S1	5' TAACGAATGGATTCTTCACTTACCGGTTTCG 3'	
S2	5' TATGCAGGGCAGAGGTGGTTTCAAATTCGC 3'	

^a El sitio de restricción es subrayado

^b Secuencias que flanquean el sitio blanco es señalado en negritas

2.1.1 Reemplazo del gen *gapA* por el gen *gapN*

El gen *gapA* (GenBank gene ID947679) de *E. coli* MG1655 fue reemplazado por el gen *gapN* de *S. mutans* (GenBank Accession No. L38521). La cepa mutante MG1655 Δ *gapA::gapN* fue construida utilizando el sistema de recombinasas reportado por Datsenko and Wanner (83) mediante el uso de un casete de cloranfenicol fusionado al gen *gapN*. Utilizando como templado el ADN cromosomal de *S. mutans*, el gen *gapN* fue amplificado por PCR con los oligonucleótidos gapN1 y gapN2 que agregan los sitios de restricción NcoI y KpnI en los

extremos 5' y 3' del fragmento *gapN*. El casete de resistencia a cloranfenicol que contiene los sitios de recombinación FRT (fragmento *cat-*frt**) fue amplificado por PCR con los oligonucleótidos cm1 y cm2, utilizando como templado el plásmido pKD3 (83), de esta forma, el fragmento *cat-*frt** contiene los sitios de restricción KpnI y XmaI en los extremos 5' y 3' respectivamente. Posteriormente, el casete *gapN-*cat-*frt*** fue construido mediante la fusión del sitio KpnI de los extremos 3' del gen *gapN* y 5' del fragmento *cat-*frt**. El casete *gapN-*cat-*frt*** fue insertado en el vector pTrc99A (81) utilizando los sitios NcoI y XmaI para generar el plásmido pTgapN/*cat-*frt**. Para eliminar a *gapA* y permitir que la transcripción de *gapN* fuera controlado por la región promotora de *gapA*, se integró el casete *gapN-*cat-*frt*** en el mismo locus de *gapA* dentro del cromosoma de *E. coli* MG1655. Lo anterior fue logrado mediante la amplificación del casete *gapN-*cat-*frt*** a partir del plásmido pTgapN/*cat-*frt**, utilizando los oligonucleótidos D1 y D2 que poseen 50 nucleótidos idénticos a la secuencia que flanquea al gen *gapA*. *E. coli* MG1655 fue transformada con el plásmido pKD46 (83), el cual promueve la recombinación homóloga de los extremos diseñados en el casete *gapN-*cat-*frt***. La cepa recombinante fue seleccionada en placas de agar Luria-Bertani (LB) suplementadas con 10 µg/mL de cloranfenicol. La cepa mutante seleccionada MG1655Δ*gapA*::*gapN* fue verificada por secuenciación con los oligonucleótidos S1 y S2, los cuales hibridan ~580 nucleótidos de los flancos de gen *gapA*. El marcador de cloranfenicol fue removido de la cepa MG1655Δ*gapA*::*gapN* utilizando el plásmido pCP20 (84).

2.1.2 Construcción del plásmido pTrcgapN

El plásmido pTrcgapN fue construido para sobre-expresar al gen *gapN* mediante el promotor constitutivo *trc*. Primero, el gen *gapN* fue amplificado con los oligonucleótidos gapN1 y gapN2 para ligarlo al vector pTrc99A mediante los sitios NcoI y KpnI. Así, se obtuvo el plásmido pGapN. Posteriormente, utilizado como templado el plásmido pGapN, se amplificó el promotor *trc* junto con el gen *gapN* con los oligonucleótidos Trc1 y gapN2 para obtener el fragmento *trcgapN*. Finalmente el vector pACYC184 (82) fue digerido con ScaI y ligado al fragmento *trcgapN* mediante extremos romos para obtener el plásmido pTrcgapN (Tabla 2).

2.1.3 Construcción del plásmido pPHB_{Av}

El plásmido pPHB_{Av} fue construido por el Dr. Gerardo Huerta-Beristain para sobre-expresar el operón *phbBAC* de *A. vinelandii*. A partir del ADN cromosomal de *A. vinelandii*, el operón *phbBAC* fue amplificado con los oligonucleótidos *phb1* y *phb2*, los cuales introducen en los extremos 5' y 3' los sitios EcoRI y HindIII para facilitar la clonación en el plásmido pTrec99A y generar el plásmido pPHB_{Av}.

2.1.4 Eliminación del operón *ackA-pta*

La eliminación del operón *ackA-pta* fue llevada a cabo utilizando el método de inactivación de genes previamente descrito (83). Los oligonucleótidos *ackAF* y *ptaR* fueron diseñados para amplificar el casete de resistencia a kanamicina flanqueado por sitios FRT a partir del plásmido pKD4, los cuales poseen 50 pares de bases idénticas a la secuencia que flanquea el operón *ackA-pta* en el cromosoma de *E. coli* MG1655. La cepa mutante MG1655 Δ *ackA-pta* fue seleccionada en placas de agar LB suplementadas con 30 μ g/mL de kanamicina. La interrupción del operón fue verificada utilizando los oligonucleótidos *p1* y *p2* (Tabla 2), los cuales hibridan ~230 nucleótidos de los extremos del operón *ackA-pta*.

2.2 CONDICIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

Los cultivos de rutina y manipulación genética de la cepa *E. coli* MG1655 y sus mutantes fueron llevados a cabo en medio Luria Bertani (triptona 10 g L⁻¹, extracto de levadura 5g L⁻¹, y NaCl 10 g L⁻¹, pH 7.2) suplementados con el antibiótico apropiado. La cepa de *S. mutans* fue cultivada en placas de agar sangre (Merk KGaA, Darmstadt Germany) a 37°C. Con el objetivo de extraer el ADN cromosomal, las células de *S. mutans* fueron cosechadas en una solución salina (NaCl 0.9%). Para la caracterización de las cepas que contienen el (los) plásmido(s) pTregapN y/o pPHB_{Av}, la cepa silvestre *E. coli* MG1655, la cepa mutante MG1655 Δ *gapA::gapN* y la cepa mutante MG1655 Δ *ackA-pta* fueron transformadas con el plásmido vacío pACYC184. El inóculo fue preparado en matraces tipo Fermbach de 2.8 L con 500 mL de medio M9, (por litro): 6 g Na₂HPO₄; 3 g KH₂PO₄; 0.5 g NaCl; 1 g NH₄Cl; 2 mM MgSO₄; 0.1 mM CaCl₂; 0.01 g Vit B1, suplementado con 5 g/L de glucosa a 37°C y 300 rpm. De estos matraces, 350 mL de células fueron cosechadas por centrifugación cuando alcanzaron 1 unidad de densidad óptica

(DO_{600nm}). Las células fueron resuspendidas en 10 mL de medio M9 fresco para utilizarlas inmediatamente como inóculo. Las fermentaciones se llevaron a cabo en un biorreactor de 1-L (Applikon Biotechnology, Netherlands) con un volumen de trabajo de 0.7 L, 600 rpm, pH controlado a 7 con NaOH (2N) y un flujo de aire de 0.84 L min^{-1} . Las muestras fueron colectadas durante la fase de crecimiento exponencial a 3 DO_{600nm} para determinar: cofactores (NAD(H), NADP(H), actividad enzimática GAPDH, y extracción de ARN para el análisis transcripcional. En el caso de los ensayos de producción de P3HB, se ajustó una relación de carbono:nitrógeno de 18.5 que en el medio M9 corresponde a 0.0186 moles de nitrógeno (1 g/L de NH_4Cl) y 0.47 moles de carbono (Glucosa 10 g/L). En estos cultivos, las células fueron cosechas al final de la acumulación del polímero para realizar la extracción y cuantificación de P3HB.

2.3 ANÁLISIS DE METABOLITOS, PARÁMETROS CINÉTICOS Y ESTEQUIOMÉTRICOS

Las células cosechadas durante la fase de crecimiento exponencial fueron centrifugadas y el sobrenadante libre de células fue congelado para análisis subsecuentes. La concentración de ácidos orgánicos y glucosa fue cuantificada utilizando un HPLC (“High Pressure Liquid Chromatography”) (1200, Agilent, CA, USA) equipado con detectores de UV e índice de refracción y una columna de intercambio iónico (300 x 78 mm; Aminex HPX-87H; BioRad, USA) a 50°C . Se utilizó una fase móvil de H_2SO_4 (0.005 mol L^{-1}) y un flujo de elución de 0.5 mL min^{-1} . La composición de los gases a la salida del fermentador fueron medidos mediante sensores de O_2 - y CO_2 -gas (BlueSens, gas sensor GmbH, Herten, Germany) los cuales miden, en el caso de O_2 , la variación de voltaje mediante la reacción con zirconio y en el caso de CO_2 posee un detector infrarrojo. Dichos detectores tienen un rango de medición de 0.1-25 (% Vol) y 0-10 (% Vol) respectivamente y una precisión $> 0.2\%$ sobre el porcentaje máximo de medición por el respectivo sensor. Para el balance de masas se calcularon el OTR ($\text{mmolO}_2/\text{L}\cdot\text{min}$) y CTR ($\text{mmolCO}_2/\text{L}\cdot\text{min}$) con base en la fracción molar de O_2 y CO_2 en aire (20.9% y 0.038% respectivamente) y con el flujo de gas utilizado para airear el fermentador, 0.84 L min^{-1} . La concentración molar total de (C) O_2 se obtuvo mediante la integración de los valores de O(C)TR con respecto al tiempo en minutos. Así, las tasas de respiración (q_{O_2}) y producción de CO_2 (q_{CO_2}) fueron calculadas con la relación μ a Y_{x/O_2} y Y_{x/CO_2} .

Los datos y las figuras en las tablas son el promedio de tres cultivos diferentes. El crecimiento celular fue monitoreado mediante densidad óptica a 600nm (DO_{600}) en un espectrofotómetro

(DU-70, Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA). La DO_{600} fue convertida a peso seco celular (concentración de células) utilizando una curva de calibración ($1 DO_{600} = 0.43 \text{ g/L}$ de peso seco) realizada específicamente en este proyecto de doctorado para la cepa de *E. coli* MG1655 y derivadas.

Las tasas específicas de crecimiento (μ) fueron determinadas por el ajuste de la regresión exponencial de los datos de la biomasa con respecto al tiempo. Los rendimientos de biomasa ($Y_{X/GLC}$), acetato ($Y_{ACE/GLC}$), CO_2 ($Y_{CO_2/GLC}$) y O_2 ($Y_{O_2/GLC}$) en glucosa fueron estimados por el coeficiente de la regresión lineal de la concentración del metabolito con respecto a la concentración de glucosa consumida durante la fase de crecimiento exponencial, en gramos de biomasa/ $mmol_{GLC}$ o $mmol_{PRODUCT}/mmol_{GLC}$. La tasa específica de consumo de glucosa (q_{GLC}) fue determinada con la relación de μ a $Y_{x/s}$.

2.4 DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS Y DE COFADORES

2.4.1 Mediciones Enzimáticas

Las mediciones enzimáticas se hicieron tomando muestras a $3DO_{600nm}$ durante la fase de crecimiento exponencial. El equivalente a 6.3 mg de células se cosecharon por centrifugación a $4,000 \times g$ (10 min a $4^\circ C$) y se lavaron una vez con amortiguador A (amortiguador Tricina 20 mM, pH 8.5, suplementado con 2-mercapto-etanol 3 mM). Las células fueron resuspendidas en $500 \mu L$ del mismo amortiguador y sonicadas con 3 pulsos de 45 s y pausas de 30 s a $4^\circ C$ usando un sonicador “Soniprep” (150 ultrasonic disintegrator, MSE Ltd, London, U.K.), usando un baño de hielo con etanol. Los restos celulares fueron removidos por centrifugación ($4,000 \times g$ 3 min, $4^\circ C$). El sobrenadante fue utilizado para las mediciones enzimáticas. La actividad GAPDH fue determinada como se describe en Iddar y col. (31). La reacción $NADP^+$ -GAPDH fue iniciada por la adición del extracto celular en una mezcla de reacción que contenía la solución amortiguadora A: $NADP^+$ 1 mM y D-Gliceraldehido-3-Fosfato (G-3-P) 1 mM a $25^\circ C$. La reacción NAD^+ -GAPDH se midió utilizando el mismo procedimiento con NAD^+ 1 mM y 10 mM AsO_4^{3-} . La variación de la absorbancia a 340 nm fue monitoreada en un espectrofotómetro DU-70 (Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA). Una unidad de actividad específica se definió como 1 μmol de NAD(P)H formado por min por mg de proteína (IU/ mg_{PROT}). La concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford (85) utilizando el reactivo Bio-Rad y albúmina bovina como proteína de referencia.

2.4.2 Medición de cofactores

Las mediciones de cofactores se hicieron tomando muestras a $3\text{DO}_{600\text{nm}}$ durante la fase de crecimiento exponencial. Los cofactores intracelulares tales como, NAD^+ , NADP^+ , NADH y NADPH , fueron extraídos y ensayados utilizando el kit de extracción EnzyChrom™ (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) siguiendo las indicaciones del proveedor. Para una rápida inactivación del metabolismo celular, el equivalente a tres muestras de 12.6 mg cada una de células de cada cultivo fueron inmediatamente recibidas en metanol al 70% (v/v) a -50°C (86). La pastilla celular fue lavada en frío con PBS y resuspendida en amortiguador ácido o básico (BioAssay Systems, Hayward, CA, EUA) para extraer los pirimidin nucleótidos reducidos u oxidados (87). La concentración relativa de NAD^+ , NADH , NADP^+ , y NADPH fue cuantificada por métodos enzimáticos (87), utilizando NADP^+ -glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y NAD^+ -lactato deshidrogenasa (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA).

Para medir la relación $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$, tres muestras de aproximadamente 5 mg de células fueron recibidas en 2 mL de fenol (equilibrado con 10 mM Tris-1 mM EDTA a pH 8) a 80°C y las muestras fueron tratadas como reporta Koebmann (88). La concentración de ATP fue medida con el kit “luciferin-luciferase” (ENLITEN® ATP Assay System Bioluminescence Detection kit; Promega Corporation, EUA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Enseguida, el ADP fue convertido a ATP adicionando una unidad enzimática de piruvato cinasa y 1 mM de fosfoenolpiruvato, así, el total de ATP fue determinado como se describe arriba y la concentración de ADP fue calculada por la diferencia de ambas mediciones.

2.5 ANÁLISIS RT-qPCR

2.5.1 Extracción de ARN

El ARN total fue aislado y purificado utilizando la metodología reportada previamente por nuestro grupo de investigación (Aguilar y col (2012) (89)), con el equivalente a 11.1 mg de células colectadas del fermentador en fase de crecimiento exponencial a $3\text{DO}_{600\text{nm}}$. Las muestras fueron resuspendidas en 300 μl de “DNasa y RNasa-water free” (Ambion Inc, EUA) con inhibidor de RNasa (Fermentas Life Sciences, EUA). El ARN fue analizado en un gel de

agarosa-formaldehído. La concentración de ARN fue cuantificado usando un Nanodrop 2000c (Thermo Scientific); las relaciones 260/280 y 260/230 fueron examinadas para descartar contaminación por proteína y solventes. Las muestras de ARN fueron almacenadas a -70°C . Los procedimientos utilizados en la presente tesis para obtener el cADN y realizar los análisis de RT-qPCR de este trabajo han sido reportados previamente a detalle por nuestro grupo de investigación (Aguilar y col (2012) (89).

2.5.2 Síntesis de cADN para el Análisis RT-qPCR

El cADN fue sintetizado mediante el kit RevertAidTM H minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas LifeSciences, USA), siguiendo las instrucciones del proveedor. El TR-qPCR fue llevado a cabo en un ABI Prism 7000 Sequence Detection System y un 7300 Real Time PCR System (Perkin Elmer/Applied Biosystems, USA) utilizando MaximaR SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) kit (Fermentas LifeSciences, USA). La técnica de cuantificación utilizada para analizar los datos fue el método $2^{-\Delta\Delta C_q}$ reportado por Livak y Shmittgen (90). Para cada análisis, los niveles de transcrito de los genes que corresponden a MG1655 fueron considerados iguales a 1 y usados como control para normalizar los datos.

2.6 DETERMINACIÓN DE P3HB

Para determinar el contenido de P3HB las células fueron cosechadas por centrifugación a 4,000 x g, 30 min a 4°C , se lavaron dos veces con agua destilada y se liofilizaron. 10 mg de las células liofilizadas conteniendo P3HB fueron pesados en un vial de vidrio con tapa de teflón y mezcladas con 3mL de una solución de hipoclorito de sodio (2% vol/vol). El siguiente procedimiento se llevó a cabo utilizando el mismo vial de principio a fin para cada muestra. Los gránulos de P3HB fueron separados de la fracción acuosa mediante centrifugación (3000 x g 10 min). El P3HB fue recuperado y lavado dos veces con agua destilada. Los gránulos del polímero fueron resuspendidos totalmente en 3mL de cloroformo grado reactivo. El P3HB seco fue obtenido mediante la total evaporación del cloroformo durante su exposición en una campana de extracción. Para la cuantificación, el P3HB seco se resuspendió en 75 μL de mezcla A (H_2SO_4 : metanol (10% vol/vol) 50 μL + ácido benzoico : metanol (4% wt/vol) 25 μL). La mezcla fue calentada a 95°C hasta la total disolución del polímero (mezcla translúcida), entonces 0.75 mL de la mezcla B (cloroformo 0.5 mL + H_2O 0.25 mL) fue adicionada y

vigorosamente mezclada por un minuto 5 veces con espacios de 1 min en reposo. Las fases fueron separadas por centrifugación a 3000 x g por 2 min. La fase orgánica fue recuperada y cuantificada utilizando un Cromatógrafo de Gases (6850, Agilent, CA, EUA) equipado con una columna INNOWax(30m x 0.25mm, 0.25 μ m) con una fase móvil de Helio a un flujo de 0.1 mL/min. La temperatura de inicio fue de 50°C y se aumentó con un gradiente escalonado de 20°C hasta llegar a 260°C. La mezcla A contiene ácido benzoico como estándar interno.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 RESPUESTA METABÓLICA Y TRANSCRIPCIONAL DE *E. coli* CON UNA GLICERALDEHÍDO-3-FOSFATO DESHIDROGENASA DE *Streptococcus mutans*¹

3.1.1 Reemplazo de la enzima GAPDH-NAD⁺ nativa por la enzima GAPDH-NADP⁺ de *S. mutans*¹

Con el objetivo de estudiar los efectos metabólicos relacionados con el reemplazo de la GAPDH-NAD⁺ de *E. coli* por la GAPDH-NADP⁺ de *S. mutans*, se generaron dos cepas a partir de la cepa silvestre *E. coli* MG1655. Utilizando el sistema de recombinasa λ red (83), se construyó la cepa MG1655 Δ gapA::gapN por la inserción en el cromosoma del gen gapN en el mismo locus del gen gapA (Figura 2.1A). Por lo tanto, en esta cepa, la expresión de gapN fue controlada por la misma región promotora y traduccional del gen nativo gapA (25, 26). Por otro lado, para incrementar el nivel de expresión del gen gapN, la propia cepa MG1655 Δ gapA::gapN fue transformada con el plásmido pTrcgapN, el cual promueve la expresión de gapN por el promotor constitutivo trc (81) (Figura 2.1B) y se obtuvo la cepa MG1655 Δ gapA::gapN/pTrcgapN.

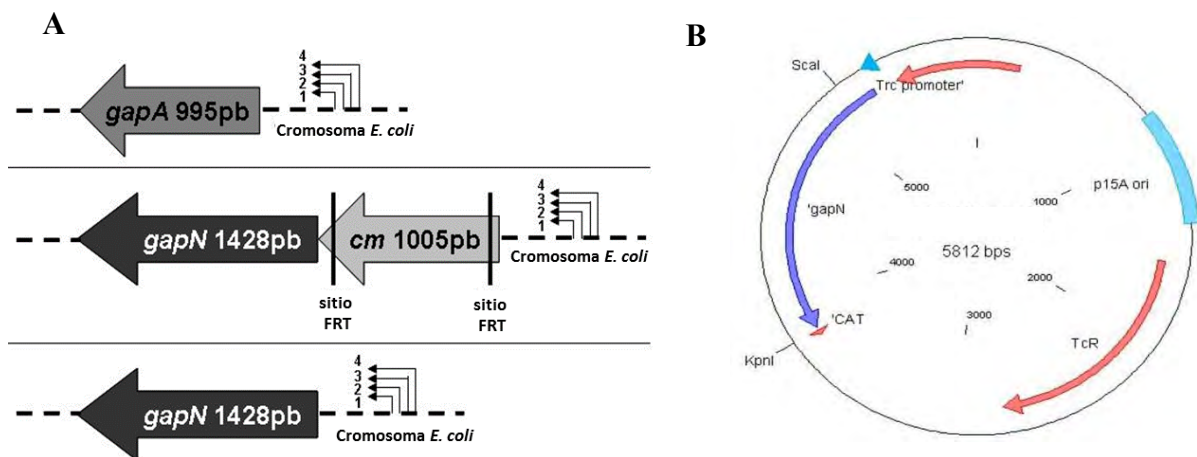


Figura 2.1 A) Estrategia de reemplazo del gen *gapA* por el gen *gapN* basado en el sistema λ red. B) Plásmido pTrcgapN

¹Los resultados de esta sección fueron publicados en la siguiente referencia que se muestra en el Anexo I: Centeno-Leija S, Utrilla J, Flores N, Rodríguez A, Gosset G, Martínez A. 2013. Metabolic and Transcriptional Response of *Escherichia coli* with a NADP⁺-dependent Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Antonie van Leeuwenhoek*. DOI 10.1007/s10482-013-0010-6 (Agosto de 2013).

La caracterización cinética, se llevó a cabo en cultivos lote aireados en fermentador con medio mineral suplementado con 8 g/L de glucosa. Los datos cinéticos mostrados en la Tabla 3 indican que en comparación con la cepa silvestre MG1655, las tasas de crecimiento y consumo de glucosa en la cepa MG1655 $\Delta gapA::gapN$ disminuyeron 5 y 3.4 veces, respectivamente (Tabla 3, Figuras 2.2A y 2.2B). De acuerdo con esto, la actividad específica de la enzima GAPDH-NADP⁺ en la cepa MG1655 $\Delta gapA::gapN$ fue 2.6 veces menor que la actividad GAPDH-NAD⁺ de la cepa silvestre (Tabla 3). Es de resaltarse las diferencias en los niveles de actividad GAPDH de ambas cepas, ya que la expresión del gen *gapN* fue controlado por el mismo promotor nativo *gapA*. Lo anterior puede ser explicado por las inherentes diferencias de las propiedades catalíticas de cada enzima ya que a diferencia de GAPDH-NAD⁺, la GAPDH-NADP⁺ no requiere fosforo inorgánico y su reacción es cooperativa e irreversible, así mismo es inhibida tanto por G3P como por NADPH (24, 97). El análisis comparativo de la cepa MG1655 $\Delta gapA::gapN/pTrcgapN$ indicó que la μ y q_{GLC} fueron 15% y 25% menores que en la cepa silvestre, respectivamente (Tabla 3, Figuras 2.2A y 2.2B). En contraste, la actividad GAPDH-NADP⁺ fue 1.8 veces mayor que la actividad GAPDH-NAD⁺ de la cepa silvestre (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros cinéticos de crecimiento y actividad GAPDH de las cepas MG1655 $\Delta gapA::gapN$, MG1655 $\Delta gapA::gapN/pTrcgapN$ y MG1655 de cultivos lote en medio mineral con glucosa.

CEPA	μ (h ⁻¹)	q_{GLC} (mmol _{GLC} /g _{DCW} h)	(mol _{ACE} / mol _{GLC})	GAPDH-NAD ⁺ (U/mg _{PROT})	GAPDH-NADP ⁺ (U/mg _{PROT})
MG1655	0.52 (0.01)	7.04 (0.05)	0.61 (0.07)	0.522 (0.21)	---
MG1655$\Delta gapA::gapN$	0.11 (0.03)	2.06 (0.17)	0.04 (0.00)	---	0.201 (0.13)
MG1655$\Delta gapA::gapN/pTrcgapN$	0.44 (0.01)	5.24 (0.13)	0.78 (0.02)	---	0.937 (0.04)

Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar

Por otro lado, la cepa MG1655 $\Delta gapA::gapN$ tuvo una tasa de crecimiento específica (μ) de 0.11 \pm 0.03 h⁻¹ y una tasa de consumo de glucosa (q_{GLC}) de 2.06 \pm 0.17 mmol_{GLC} g_{DCW}⁻¹h⁻¹. Mientras que la μ y q_{GLC} de la cepa MG1655 $\Delta gapA::gapN/pTrcgapN$ fueron 4 y 2.5 veces mayores que en la cepa MG1655 $\Delta gapA::gapN$, respectivamente (Tabla 2, Figuras 2.2A y 2.2B). Así mismo, la actividad específica de la enzima GAPDH-NADP⁺ en la cepa MG1655 $\Delta gapA::gapN$ fue 4.6 veces menor que en la cepa MG1655 $\Delta gapA::gapN/pTrcgapN$ y no fue detectada actividad GAPDH-NAD⁺ en ninguno de estas dos cepas (Tabla 3). Dado que las mutantes de *E. coli* carentes de la actividad GAPDH-NAD⁺ son incapaces de crecer en hexosas como fuente de carbono (27, 28, 91), lo anterior indica que la expresión de *gapN* de *S. mutans* puede reemplazar

la función nativa de *gapA*. Por otro lado, los niveles de actividad específica de la enzima GAPDH-NADP⁺ revelan que las diferencias en las tasas de crecimiento y consumo de glucosa son atribuibles a los distintos niveles de expresión de *gapN*. En efecto, se ha demostrado en *E. coli* que el flujo de carbono a través de la vía EMP puede ser controlado mediante el nodo gliceraldehído 3-fosfato modulando la fuerza de expresión de *gapA* (92) y los resultados sugieren que la fuerza de expresión de *gapN* puede también ejercer una respuesta similar.

El análisis de ácido orgánicos indicó que la cepa MG1655 Δ *gapA::gapN* produce una cantidad despreciable de ácido acético (0.04 ± 0.00 mol_{ACE}/mol_{GLC}) (Figura 2.2C), lo cual se esperaba dado que el bajo flujo de glucosa a través de la vía EMP reduce la síntesis de ácido acético (61, 62). Más aún, esta característica es deseable para mejorar la producción de proteínas recombinante e incrementar la disponibilidad de carbono para producir diversos metabolitos de interés industrial (93–95). En contraste, la cepa MG1655 Δ *gapA::gapN*/pTrc*gapN* dirige ~40% del sustrato hacia la producción de ácido acético (0.78 ± 0.02 mol_{ACE}/mol_{GLC}) (Tabla 3, Figura 2.2C). Se ha reportado que se obtienen altos niveles de ácido acético cuando la GAPDH-NADP⁺ de *C. acetobuyiricum* (GapC) fue utilizada para reemplazar la GAPDH-NAD⁺ de *E. coli* para producir licopeno (19), lo cual reduce el carbono disponible para la síntesis de licopeno. Sin embargo, la disminución de la síntesis de ácido acético es posible mediante la eliminación de la vía AckA-Pta (96) o utilizando una cepa con bajo flujo glucolítico (61, 62), como el que presenta la cepa MG1655 Δ *gapA::gapN*. Estos resultados muestran que la enzima GAPDH-NADP⁺ de *S. mutans* no sólo reemplaza la función nativa de la enzima GAPDH-NAD⁺, también, como es citado arriba, el flujo de carbono a través de la vía EMP puede ser controlado por los niveles de expresión de *gapN* y a su vez la entrada de glucosa y producción de ácido acético.

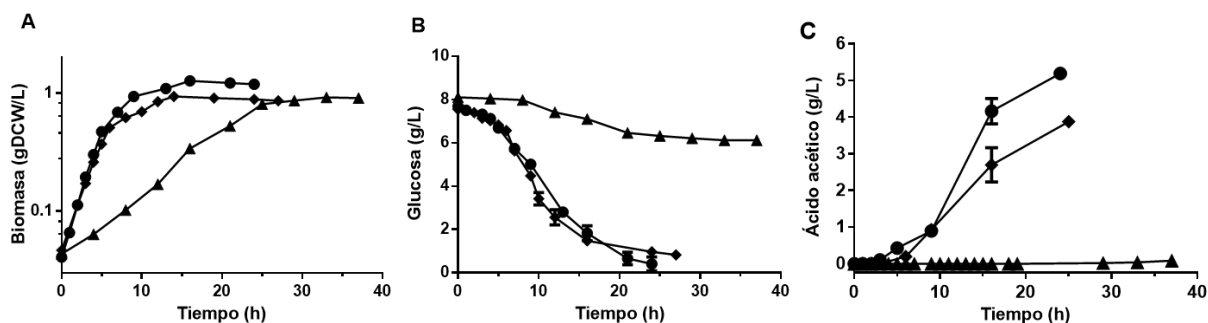


Figura 2.2 Perfil de crecimiento (a), consumo de glucosa (b) y producción de ácido acético (c) de las cepas y la silvestre MG1655 (círculos), MG1655 Δ *gapA::gapN* (triángulos) y MG1655 Δ *gapA::gapN*/pTrc*gapN* (rombos).

Los resultados anteriores indican que el incremento de la actividad heteróloga GAPDH-NADP⁺ puede restaurar parcialmente el crecimiento y entrada de glucosa de la cepa silvestre MG1655. Es probable que la producción de NADPH en lugar de NADH durante la oxidación del gliceraldehído 3-fosfato conlleve efectos metabólicos que afecten el crecimiento y consumo de glucosa. En la siguiente sección, se describe un análisis metabólico más profundo de la cepa MG1655Δ*gapA*::*gapN*/pTregapN ya que fue la que presentó un mejor perfil cinético con respecto a la cepa silvestre.

3.1.2 Respuesta Metabólica al reemplazo de GAPDH-NAD⁺ por GAPDH-NADP⁺

Con el objetivo de estudiar las alteraciones en el balance redox y en los niveles energéticos, se determinaron los niveles de los cofactores NAD(P)(H) y de ATP/ADP durante la fase de crecimiento exponencial de la cepa MG1655Δ*gapA*::*gapN*/pTregapN. Como se muestra en la Figura 2.3, la relación intracelular de NADH/NAD⁺ disminuyó un 25% cuando es comparada con la cepa silvestre. En contraste, la relación intracelular de NADPH/NADP⁺ incrementó 2 veces indicando que las alteraciones en el recambio del cofactor NAD(P)H mediante la oxidación del gliceraldehído 3-fosfato permitieron aumentar 3 veces la relación NADPH/NADH.

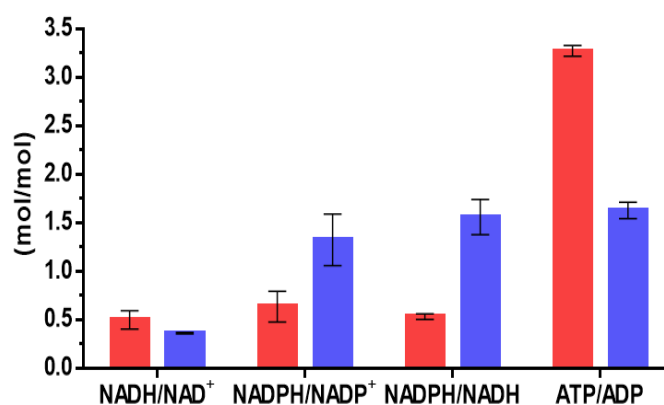


Figura 2.3 Relaciones molares de los cofactores de las cepas MG1655 (rojo) y MG1655Δ*gapA*::*gapN*/pTregapN (azul).

Lo anterior revela que la sobre-expresión de la enzima GAPDH-NADP⁺ en una cepa carente de la actividad GAPDH-NAD⁺ modifica los niveles intracelulares redox favoreciendo la presencia del cofactor NADPH y disminuyendo la de NADH. Conjuntamente, la relación intracelular de ATP/ADP disminuyó 2 veces al compararse con la cepa silvestre (Figura 2.3). Así mismo, la tasa específica de respiración (q_{O_2}) y el rendimiento de consumo de oxígeno en glucosa ($Y_{O_2/GLC}$)

disminuyeron cerca del 20% y 40%, respectivamente al compararlos con la cepa silvestre (Tabla 4) (VER MATERIAL COMPLEMENTARIO).

Tabla 4. Parámetros cinéticos de las cepas MG1655 y MG1655 Δ gapA::gapN/pTrcgapN de cultivos lote en medio mineral con glucosa.

CEPA	qO ₂ (mmolO ₂ / g _{DCW} h)	qCO ₂ (mmolCO ₂ / g _{DCW} h)	q _{ACE} (mmol _{ACE} / g _{DCW} h)	Y _{CO₂/GLC} (mol/ mol)	Y _{O₂/GLC} (mol/ mol)	Y _{ACE/GLC} (mol _{ACE} / mol _{GLC})
MG1655	16.98 (0.35)	16.84 (0.25)	4.97 (0.32)	0.88 (0.02)	0.92 (0.03)	0.61 (0.07)
MG1655 Δ gapA::gapN/pTrcgapN	14.01 (0.26)	13.89 (0.16)	4.85 (0.45)	0.54 (0.03)	0.55 (0.03)	0.78 (0.02)

Valores en paréntesis indican la desviación estándar

Dado que la producción de NADH está acoplada a la cadena respiratoria para proveer ATP a través de la fosforilación oxidativa (62, 88, 98, 99), estos datos sugieren que la disminución de la capacidad respiratoria y de los niveles energéticos de la cepa MG1655 Δ gapA::gapN/pTrcgapN fueron causados por la disminución en los niveles de NADH por la pérdida de GapA. De hecho, el análisis transcriptómico reveló que los niveles de expresión de genes relacionados con la cadena respiratoria (CR) y fosforilación oxidativa (FO) tales como *nuo* (NADH:ubiquinona oxidoreductasa I), *ndh* (ubiquinona oxidoreductasa II), *cydA* (citocromo *bd* oxidasa subunidad I), *cyoB* (citocromo *bo* oxidasa subunidad I) y *atpA* (ATP sintetasa F₁ complejo de subunidad I) disminuyeron cerca del 50% con relación a la expresión de los mismos genes de la cepa silvestre (Figura 2.4). De acuerdo con lo anterior, diversos estudios han demostrado que las alteraciones en los niveles de energía afectan la expresión de genes involucrados en la CR y FO (100, 101).

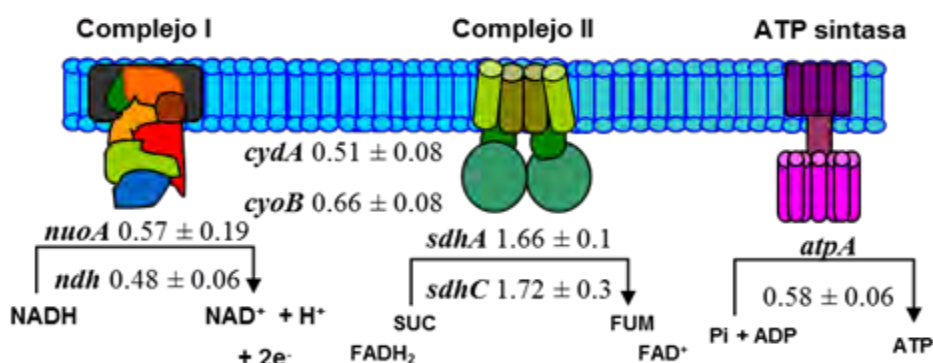


Figura 2.4. Expresión relativa de los genes involucrados en la cadena respiratoria de la cepa MG1655 Δ gapA::gapN/pTrcgapN. Valores relativos a la cepa silvestre MG1655. Criterio de significancia: transcripción relativa ≥ 0.5 (sobre-expresión) o ≤ 0.5 (sub-expresión).

Por otro lado, se observó que el nivel de expresión de los genes que codifican para las succinato deshidrogenasas A y C (*sdhA* y *sdhC* respectivamente) y fumarasas A y B (*fumA* y *fumB*) incrementaron más de 60% comparado con la cepa control (Figura 2.4). Se sabe, que la SdhA y SdhB están involucradas en el complejo II de la CR y utilizan FADH₂ como donador de electrones (102), mientras que FumA y FumB producen NADH a través de la membrana citoplasmática (103). La expresión de ambos sistemas depende del estado intracelular de NADH, el cual está determinado generalmente por el tipo de fuente de carbono o por la presencia de oxígeno (104, 105). En este caso, dado que los niveles intracelulares de NADH fueron alterados por la sobre-expresión de la enzima GAPDH-NADP⁺, es posible que la sobre-expresión de dichas oxidoreductasas son una respuesta a los bajos niveles de NADH.

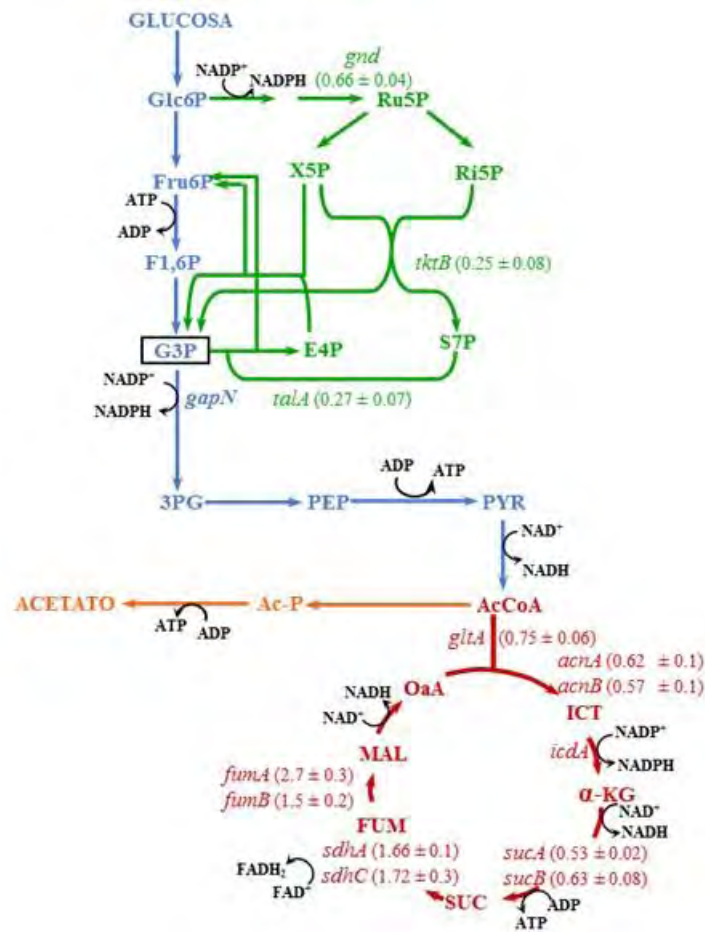


Figura 2.5. Expresión relativa de los genes involucrados en el metabolismo central de la cepa MG1655Δ*gapA*::*gapN*/pTregapN. Valores relativos a la cepa silvestre MG1655. Criterio de significancia: transcripción relativa ≥ 0.5 (sobre-expresión) o ≤ 0.5 (sub-expresión). Vía Embden-Meyerhof-Parnas (azul), Pentosas Fosfato (verde), Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos (rojo) y Ruta de ácido acético (naranja)

Por otro lado, el análisis transcriptómico indicó que la expresión de genes de la ruta EMP no presentó un cambio significativo (> 0.5 relativo a la cepa parental) (Figura 2.5). Lo anterior es coherente con el hecho de que la expresión de los genes glucolíticos depende de reguladores transcripcionales globales tales como Crp, el cual responde a los niveles de AMPc cuando la entrada de carbono está limitada (106). Sin embargo, este no es el caso de la cepa MG1655 $\Delta gapA::gapN/pTrc_{gapN}$.

En contraste, la expresión del gen *udhA* que codifica para la transhidrogenasa UdhA, incrementó 2.4 veces (Figura 2.6) probablemente para generar NADH a partir del exceso de NADPH (16, 98, 107, 108). Así mismo, la expresión de genes clave de la rama oxidativa de la vía de las PF, tales como *gnd* (6-fosfogluconato deshidrogenasa), *tktB* (transcetolasa II) y *talA* (transaldolasa A) disminuyeron alrededor de 34% y 75% relativos a la expresión de la cepa parental (Figura 2.5), lo cual sugiere que existe una baja actividad de la rama oxidativa de las PF. Dado que la vía de las PF es una de las rutas más importantes

para producir NADPH (17, 55), estos datos coinciden con observaciones previas que demuestran que altos niveles de NADPH disminuyen el flujo a través de PF (18, 19).

Finalmente, se observó que las moles de CO₂ producidos por mol de glucosa consumida, disminuyeron cerca del 40% (Tabla 4) y el rendimiento de ácido acético en glucosa ($Y_{ACE/GLC}$) incrementó un 22% cuando se compara con la cepa silvestre. Dado que el CAT es la principal vía productora de CO₂, lo anterior sugiere que en la cepa MG1655 $\Delta gapA::gapN/pTrc_{gapN}$ una mayor cantidad de acetyl-CoA fue dirigida a la síntesis de ácido acético en lugar de al CAT (Tabla 4). En concordancia con esto, la expresión de genes involucrados en canalizar el acetyl-CoA a través del CAT, tales como *gltA* (citrato sintasa), *acnA* (aconitato hidratasa 1), *acnB* (aconitato hidratasa bifuncional 2 and 2-metilisocitrato deshidratasa), *sucA* (2-oxoglutarato decarboxilasa) y *sucB* (dihidrolipoiltranssuccinilasa) estuvieron 50% sub-expresados (Figura 2.5), lo cual sugiere que el CAT tuvo menor actividad que la cepa parental. El fenómeno anterior podría ser una respuesta para aumentar los niveles de ATP vía Acka-Pta y reducir la producción de NADPH por la isocitrato deshidrogenasa del CAT. Una observación similar fue reportada

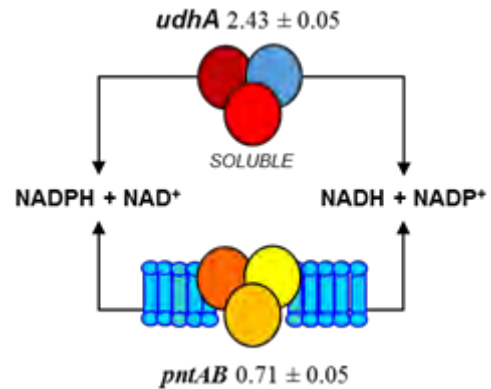


Figura 2.6 Expresión relativa de los genes involucrados en el sistema de transhidrogenasas de la cepa MG1655 $\Delta gapA::gapN/pTrc_{gapN}$. Valores relativos a la cepa silvestre MG1655. Criterio de significancia: transcripción relativa ≥ 0.5 (sobre-expresión) o ≤ 0.5 (sub-expresión).

por Martínez en 2008 mediante análisis de flujo de carbono, mostrando que la cepa *E. coli* $\Delta gapA::gapC$ exhibe un bajo flujo a través del nodo de acetyl-CoA y una mayor producción de ácido acético (19).

3.1.3 Conclusiones de esta sección

La GAPDH-NADP⁺ de *S. mutans* reemplaza la función nativa de GAPDH-NAD⁺ en *E. coli* y genera NADPH durante la vía de Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP), aumentando los niveles intracelulares de NADPH. Además, el crecimiento, la entrada de glucosa y la producción de ácido acético pueden ser controlados por los niveles de la actividad heteróloga de GAPDH-NADP⁺. Si bien, la sobre-expresión del gen *gapN* puede incrementar el crecimiento y la velocidad de consumo de sustrato de la mutante MGI655 $\Delta gapA::gapN$, no es posible restaurar totalmente los valores de crecimiento y consumo de glucosa como en la cepa silvestre ya que el reemplazo disminuyó los niveles de NADH, generando perturbaciones redox que limitaron las capacidades respiratorias y disminuyeron los niveles energéticos.

3.2 INCREMENTO EN LA PRODUCCIÓN DE POLI-3-HIDROXIBUTIRATO EN *E. coli* POR EL AUMENTO DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE NADPH Y DE LA POZA DE ACETIL-CoA¹

3.2.1 Generación de NADPH mediante la vía de EMP y su efecto sobre la síntesis de P3HB

Con el objetivo de investigar los efectos sobre la síntesis de P3HB al aumentar los niveles de NADPH mediante la vía EMP (Figura 2.7A), se utilizó como modelo a la cepa MG1655 $\Delta gapA::gapN/pTrcgapN$. Además, para evitar los efectos metabólicos negativos relacionados con el reemplazo de *gapA*, se incluyó a la cepa silvestre MG1655 transformada con plásmido pTrcgapN (MG1655/pTrcgapN), de esta forma se pretende generar una libre competencia entre la enzima nativa GAPDH-NAD⁺ y la enzima heteróloga GAPDH-NADP⁺ y evitar un desbalance drástico en el recambio de NAD(P)H durante el consumo de glucosa (Figura 2.7B).

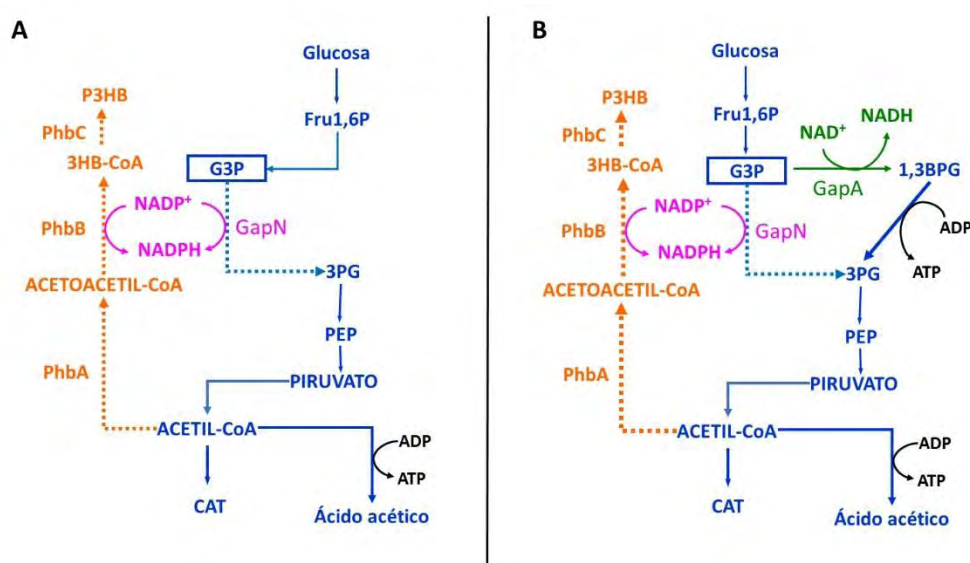


Figura 2.7. A) Esquema del metabolismo central de la cepa MG1655 $\Delta gapA::gapN/pTrcgapN$ acoplado a la síntesis de P3HB (vías heterólogas flechas punteadas). En él se ejemplifica la producción de NADPH durante la vía EMP por la enzima GapN. **B)** Esquema del metabolismo central de la cepa MG1655/pTrcgapN en la que coexisten tanto la enzima nativa GapA y la enzima de *S. mutans* GapN.

¹Los resultados de esta sección forman parte de un manuscrito en preparación para su publicación que se muestra en el Anexo II: Centeno-Leija S, Huerta-Beristain G, Giles-Gomez M, Gosset G, Martinez A. 2013. Improving Polyhydroxybutyrate Production in *E. coli* by Increasing the NADPH Pool and Acetyl-CoA Availability. Antonie van Leeuwenhoek (en preparación)

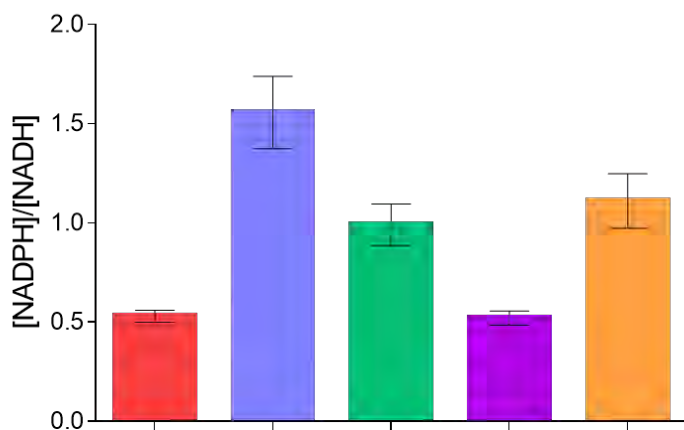


Figura 2.8 Relación molar de los niveles intracelulares de NADPH/NADH de la cepa silvestre MG1655 (rojo); MG1655Δ*gapA::gapN*/pTrcgapN (azul); MG1655/pTrcgapN (verde); MG1655Δ*ackA-pta* (morado); MG1655Δ*ackA-pta*/pTrcgapN (naranja)

La cepa MG1655/pTrcgapN fue caracterizada para investigar su perfil cinético. Los datos obtenidos indicaron que las μ , q_{GLC} y producción de ácido acético de la cepa MG1655/pTrcgapN fueron similares a los de la cepa silvestre (Tabla 5). Así mismo, fue notable la presencia tanto de la actividad GAPDH-NAD⁺ nativa como de la actividad GAPDH-NADP⁺ en los extractos celulares de MG1655/pTrcgapN (Tabla 5), lo que concuerda con el incremento de 1.8 veces en la relación NADPH/NADH con respecto a la cepa silvestre (Figura 2.8). Dichos resultados demuestran que la coexistencia de ambas actividades permite incrementar los niveles intracelulares de NADPH sin afectar las capacidades de crecimiento, posiblemente porque los niveles de NADH no se alteran drásticamente. Sin embargo, la cepa MG1655Δ*gapA::gapN*/pTrcgapN posee 3 veces más de la relación intracelular de NADPH/NADH que la cepa silvestre, lo que es 1.7 veces más que en la cepa que coexisten ambas enzimas (Figura 2.8). Este hecho se debe a que en el caso de MG1655 Δ*gapA::gapN*/pTrcgapN por cada mol de glucosa que pasa por la vía EMP se producen 2 moles de NADPH a través de GapN (Figura 2.7A) y en el caso de la cepa MG1655/pTrcgapN existe una competencia por el sustrato entre GapN y GapA (Figura 2.7B) lo que permite la generación tanto de NADPH como de NADH, aunque no necesariamente en igual proporción, ya que como se describe anteriormente, ambas enzimas poseen diferencias catalíticas (24, 97).

Tabla 5. Parámetros cinéticos de las cepas MG1655 y sus derivadas de cultivos lote en medio mineral con glucosa.

CEPA	μ (h ⁻¹)	q_{GLC} (mmol _{GLC} /g _{DCW} h)	$Y_{ACE/s}$ (mol _{ACE} /mol _{GLC})	NAD ⁺ -GAPDH (U/mg)	NADP ⁺ -GAPDH (U/mg)
MG1655	0.52 (0.01)	7.04 (0.05)	0.61 (0.07)	0.522 (0.21)	---
MG1655/pTrcgapN	0.50 (0.01)	7.57 (0.03)	0.63 (0.05)	0.531 (0.14)	0.788 (0.07)
MG1655Δ <i>ackA-pta</i>	0.45 (0.01)	6.63 (0.02)	0.16 (0.00)	0.562 (0.07)	---
MG1655Δ <i>ackA-pta</i> /pTrcgapN	0.43 (0.01)	6.72 (0.00)	0.08 (0.00)	0.545 (0.03)	0.866 (0.11)

Los valores en paréntesis indican la desviación estándar

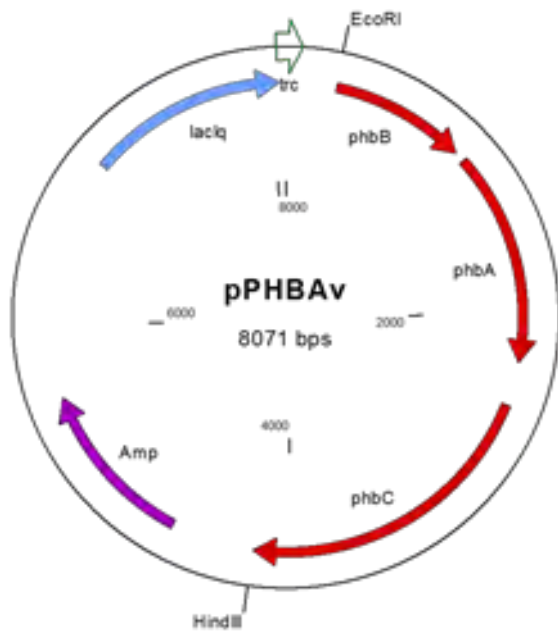


Figura 2.9 Plásmido pPHBAv que contiene el operón *phbBAC* de *A. vinelandii*

Con el objetivo de estudiar si las altas concentraciones de NADPH favorecen la acumulación de P3HB, tanto la cepa MG1655 Δ *gapA::gapN*/pTrcgapN como la cepa MG1655/pTrcgapN fueron transformadas con el plásmido pPHBAv el cual contiene un origen de replicación compatible con pTrcgapN, un promotor *trc* inducible por IPTG y el operón *phbBAC* de *A. vinelandii* (Figura 2.9). Para hacer el análisis comparativo, la cepa silvestre MG1655 fue transformada con el plásmido pAcyc vacío y con el plásmido pPHBAv (MG1655/pACYC vacío /pPHBAv).

La producción se llevó a cabo en cultivos lote en fermentador con medio mineral suplementado con 10 g/L de glucosa y la síntesis del polímero se indujo con IPTG cuando la masa celular alcanzó 0.42 g_{DCW}/L. Las cinéticas de aumento de biomasa (células + P3HB), que son mostrados en las Figuras 2.10, indican que las cepas MG1655 Δ *gapA::gapN*/pTrcgapN/pPHBAv y MG1655/pTrcgapN/pPHBAv acumularon cerca de 1.4 y 2 veces más polímero intracelular (g_{PHB}/g_{DCW}) que la cepa silvestre (Figuras 2.11) y la cantidad de glucosa que es canalizada hacia la síntesis de P3HB (g_{PHB}/g_{GLC}) aumentó 1.2 y 1.4 veces en comparación con la cepa silvestre, respectivamente (Figura 2.12). De acuerdo con esto y con base en el rendimiento teórico máximo (0.48 g_{PHB}/g_{GLC}), el aumento en los niveles de NADPH permite que ambas cepas aprovechen el 55 % y 65 % del sustrato para la acumulación de P3HB, respectivamente. Mientras que en la cepa silvestre solo se aprovecha el 48% (Figura 2.12). Por otro lado, a pesar de que la cepa MG1655 Δ *gapA::gapN*/pTrcgapN posee los más altos niveles intracelulares de NADPH (Figura 2.8), su derivada MG1655 Δ *gapA::gapN*/pTrcgapN/pPHBAv acumula 30% menos polímero que la cepa en la que coexisten tanto GapA como GapN: MG1655/pTrcgapN/pPHBAv (Figuras 2.10 y 2.11). Esto puede deberse a que la pérdida de carbono dada por la síntesis de ácido acético es 2 veces mayor en la cepa MG1655 Δ *gapA::gapN*/pTrcgapN/pPHBAv que en la cepa MG1655/pTrcgapN/pPHBAv (Figura 2.10). En este sentido, la alta producción de ácido acético de la cepa MG1655 Δ *gapA::gapN*/pTrcgapN/pPHBAv podría ser explicada porque durante la expresión de proteína recombinante a través de plásmidos existe una alta demanda de ATP y

poder reductor (109). Dicha demanda, puede ser mitigada mediante la formación de ácido acético ya que esta ruta proporciona poder reductor mediante PoxB y ATP mediante AckA-Pta (62, 110, 111). Bajo este criterio, es probable que la expresión heteróloga de proteínas en la cepa *MG1655ΔgapA::gapN/pTrcgapN/pPHBA_v* resulta en una carga metabólica tal que necesita producir ácido acético para contender con el estrés energético y redox. Sin embargo, la producción de ácido acético a su vez, restringe la disponibilidad de acetil-CoA y la CoA liberada podría inhibir a la β-cetotilasa, lo que a su vez limita la producción de P3HB. Esto hace que a pesar de que la cepa *MG1655ΔgapA::gapN/pTrcgapN/pPHBA_v* posee los más altos niveles intracelulares de NADPH produzca menos polímero que las otras derivadas.

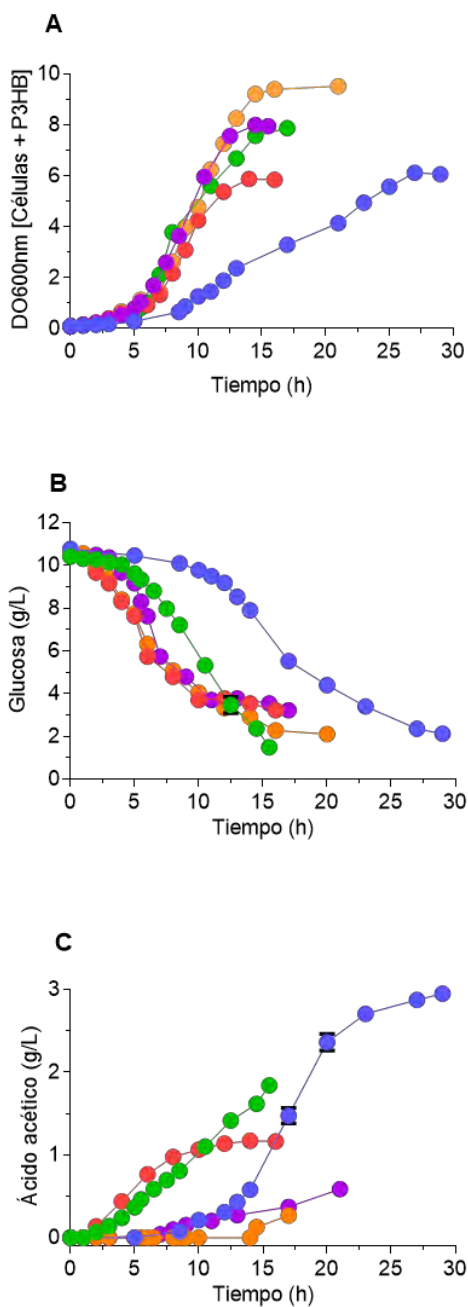


Figura 2.10 Cinéticas de crecimiento durante la acumulación de P3HB (A); consumo de glucosa (B) y producción de ácido acético (C) de las cepas *MG1655/pAcyc vacío/pPHBA_v* (círculos rojos); *MG1655ΔgapA::gapN/pTrcgapN/pPHBA_v* (círculos azules); *MG1655/pTrcgapN/pPHBA_v* (círculos verdes); *MG1655ΔackA-pta/pAcyc vacío/pPHBA_v* (círculos morados) y *MG1655ΔackA-pta/pTrcgapN/pPHBA_v* (círculos naranjas).

3.2.2 Incremento en la poza de acetil-CoA sumada a los altos niveles de NADPH y su efecto sobre la síntesis de P3HB

Para evitar la pérdida de carbono y aumentar la poza de acetil-CoA, fue eliminada la vía principal de producción de ácido acético mediante la interrupción del operón *ackA-pta* en el cromosoma de la cepa MG1655. La caracterización de la cepa MG1655 Δ *ackA-pta* indicó que la velocidad específica de crecimiento y consumo de glucosa disminuyeron un 10% con respecto a la cepa parental MG1655 (Tablas 4 y 5). Así mismo, observamos que esta cepa destina solo el 8% de la glucosa a la producción de ácido acético, mientras que en la cepa silvestre ocupa el 30%. Dicho perfil, es común en las cepas carentes del operón *ackA-pta* y es

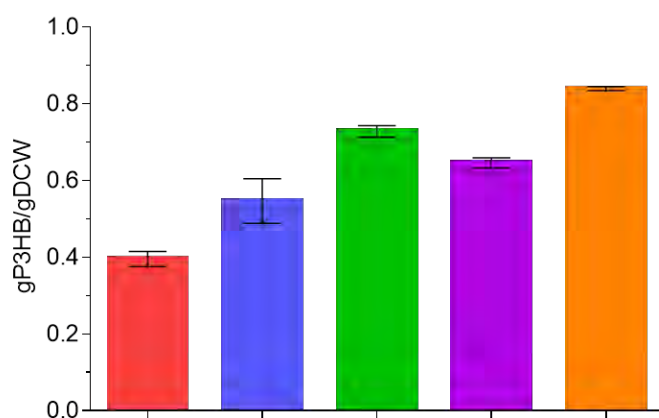


Figura 2.11 Rendimiento de acumulación intracelular de P3HB (g_{PHB}/g_{DCW}) de las cepas silvestre MG1655 (barras rojas); MG1655 Δ *gapA::gapN*/pTrcgapN (barras azules); MG1655/pTrcgapN (barras verdes); MG1655 Δ *ackA-pta* (barras moradas); MG1655 Δ *ackA-pta*/pTrcgapN (barras naranjas)

útil para mejorar la disponibilidad de acetil-CoA (96).

Por otro lado, para combinar el aumento en la disponibilidad de acetil-CoA con el incremento en los niveles de NADPH, la cepa MG1655 Δ *ackA-pta* fue transformada con el plásmido pTrcgapN y fue caracterizada. El perfil cinético mostró que la cepa MG1655 Δ *ackA-pta*/pTrcgapN solo produce 0.04 moles de acético por cada mol de glucosa y que la velocidad específica de crecimiento y consumo de

glucosa son similares a su parental MG1655 Δ *ackA-pta* (Tabla 5). Así mismo, se encontró que los niveles de NADPH/NADH de la cepa MG1655 Δ *ackA-pta*/pTrcgapN son 2 veces más altos que la cepa silvestre MG1655 y que la cepa parental MG1655 Δ *ackA-pta* (Figura 2.8), lo que coincide con la coexistencia de las actividades GAPDH-NAD⁺ y GAPDH-NADP⁺ (Tabla 5). Lo anterior muestra por un lado, que la cepa MG1655 Δ *ackA-pta*/pTrcgapN solo ocupó el 4% de la glucosa para producir ácido acético, lo que puede favorecer la disponibilidad de acetil-CoA y gracias a la sobre-expresión de *gapN* tiene altos niveles de NADPH, características deseables para la producción de P3HB.

Para realizar los ensayos de acumulación del polímero la cepa MG1655 Δ *ackA-pta*/pTrcgapN fue transformada con el plásmido pPHB_{Av} (MG1655 Δ *ackA-pta*/pTrcgapN/pPHB_{Av}) y para hacer el análisis comparativo, la cepa MG1655 Δ *ackA-pta* fue transformada con los plásmidos

pAcyc vacío y pPHBAv (MG1655 Δ ackA-pta/pAcyc vacío/pPHBAv). Las cinéticas de acumulación de biomasa (células + P3HB) de la figura 2.10 y los datos de rendimiento de producción en glucosa de la figura 2.12 indican que en la cepa MG1655 Δ ackA-pta/pPHBAv el rendimiento de la síntesis de P3HB relativo al máximo teórico aumentó cerca del 48% ($g_{\text{PHB}}/g_{\text{GLC}}$) con respecto a la cepa silvestre, logrando que la

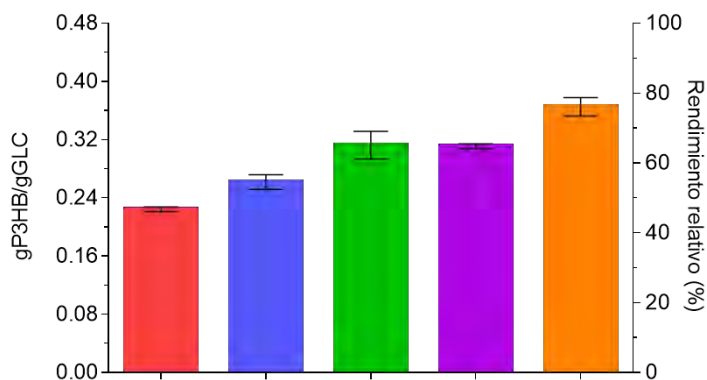


Figura 2.12 Rendimiento de producción de P3HB ($g_{\text{PHB}}/g_{\text{GLC}}$) y porcentaje relativo al máximo teórico de las cepas silvestre MG1655 (barras rojas); MG1655 Δ gapA::gapN/pTrcgapN (barras azules); MG1655/pTrcgapN (barras verdes); MG1655 Δ ackA-pta (barras moradas); MG1655 Δ ackA-pta/pTrcgapN (barras naranjas)

célula acumulara hasta el 64% de su peso seco como P3HB ($g_{\text{PHB}}/g_{\text{DCW}}$) (Figura 2.11). Esto indica que al evitar la síntesis de ácido acético, fue posible mejorar el aprovechamiento de carbono para la producción de P3HB de forma similar que cuando sólo aumentamos los niveles de NADPH en la cepa MG1655/pTrcgapN/pPHBAv (Figuras 2.10 y 2.12). Con respecto a la cepa derivada MG1655 Δ ackA-pta/pTrcgapN/pPHBAv, observamos que el rendimiento de síntesis relativo al máximo teórico ($g_{\text{PHB}}/g_{\text{GLC}}$) aumentó cerca del 63% con respecto a la cepa silvestre y 12% con respecto a la cepa parental MG1655 Δ ackA-pta/pPHBAv (Figura 2.12), logrando que la célula acumulara hasta el 84% de su peso seco como polímero ($g_{\text{PHB}}/g_{\text{DCW}}$) (Figura 2.11) y que alcanzara un aprovechamiento del sustrato cercano al 73% con respecto al rendimiento máximo teórico (Figura 2.11). Dichos resultados demuestran, que los altos niveles de NADPH producidos por la sobreexpresión de gapN en conjunto con la eliminación de la vía de síntesis de ácido acético (AckA-Pta), incrementó un 40% el aprovechamiento del carbono para la síntesis de P3HB. Si bien, los rendimientos ($g_{\text{PHB}}/g_{\text{GLC}}$) alcanzados por la cepa MG1655 Δ ackA-pta/pTrcgapN/pPHBAv son comparables con otras estrategias en las que se alcanzan valores de cercanos al 80% (3, 11), este es el primer reporte en el que se demuestra que la producción de NADPH durante la ruta EMP favorece la producción de P3HB en *E. coli*. De hecho, existe una gran interés por encontrar alternativas metabólicas que permitan incrementar la producción de metabolitos de interés industrial cuya síntesis es dependiente de NADPH (19, 34, 77, 112). La estrategia generada en este trabajo favorece la producción de NADPH durante la vía de EMP en medio mínimo, lo que podría implementarse para la producción de otros metabolitos dependientes de NADPH.

3.2.3 Conclusiones de esta sección

La co-existencia tanto de la actividad heteróloga de la GAPDH-NADP⁺ como de la actividad nativa GAPDH-NAD⁺ en *E. coli*, promueve la producción de NADPH y NADH durante la vía de Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) aumentando los niveles intracelulares de NADPH sin disminuir drásticamente los de NADH. Los altos niveles de NADPH generados durante la vía EMP ya sea por la estrategia de sustitución de *gapA* por *gapN* o por la estrategia de la coexistencia de ambos genes, permitieron mejorar el rendimiento de producción de P3HB en glucosa. Sin embargo, a pesar de que con la primera estrategia se obtienen los más altos niveles intracelulares de NADPH, la acumulación intracelular de P3HB fue 30% menor que la acumulación obtenida con la segunda estrategia, posiblemente debido a las limitaciones energéticas y la intensa producción de ácido acético. Finalmente, la eliminación de la vía de síntesis de ácido acético sumada a la sobre producción de NADPH proporciona un mejor aprovechamiento del carbono y una mayor disponibilidad de acetyl-CoA, que se ve reflejado en una mayor producción del polímero P3HB. Éste es el primer reporte en el que se demuestra que la producción de NADPH durante la ruta EMP favorece la producción de P3HB en *E. coli*.

3.3 CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados reportados demuestran que la producción de NADPH durante la vía de Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) puede estimular la síntesis de poli-3-hidroxi-butirato y que aunada a la eliminación de la vía de síntesis de ácido acético proporciona un mejor aprovechamiento del carbono que se ve reflejado en una mayor producción del polímero PHB.

PERPECTIVAS

1. Estudiar aspectos de las condiciones de producción para alcanzar altas rendimientos de P3HB con fuentes de carbono baratas:

Las condiciones de producción de P3HB estudiadas en este trabajo fueron diseñadas con fines de caracterización del sistema. Sin embargo, existen diversas estrategias de máxima producción que han sido empleadas para alcanzar altas productividades de P3HB, entre las cuales se encuentran la limitación de oxígeno y cultivos de altas densidades (11). Así mismo, resulta interesante investigar estas mismas condiciones utilizando fuentes de carbono baratas como los que se pueden obtener de los residuos lignocelulósicos.

2. Modular la expresión de GapN en la cepa MG1655/pTrcgapN para estudiar los mejores niveles de actividad NADP⁺-GAPDH que proporcionen las mayores producciones de P3HB.

3. Optimizar el uso de codones de los genes heterólogos ya que pueden ser una causa de la baja expresión en cromosoma y realizar una multi-integración en tándem de *gapN* en el mismo locus de *gapA* y de la vía PHB_{AV} en el locus de *ackA-pta*:

Como hemos visto, para demostrar que el sistema redox generado en este trabajo es útil para mejorar la síntesis de P3HB, fue necesario co-utilizar dos vectores multicopia. Sin embargo, se sabe que utilizar plásmidos para la expresión de proteínas genera una carga metabólica que limita la síntesis de los productos de interés (109, 113). La integración de genes en cromosoma ha sido ampliamente estudiada en *E. coli* y es una herramienta útil para contrarrestar las desventajas de acarrear plásmidos durante la producción de metabolitos deseados (83, 114–116). De hecho, se ha demostrado que la multi-integración en tándem de los genes de la vía de síntesis de P3HB en el cromosoma de *E. coli* promueven la síntesis exitosa del polímero (117). Así mismo, la integración de genes en tándem bajo promotores fuertes y la optimización del uso de codones, favorece su expresión incrementando su actividad *in vivo* (117–120). Otra alternativa es utilizar vectores de expresión que permitan la multi-expresión sin generar carga metabólica.

4. Explorar el sistema desarrollado en este trabajo para acoplarlo con rutas metabólicas que dependan de NADPH como cofactor (19, 34, 77, 112):

Por ejemplo, el xilitol, utilizado como edulcorante, es producido a partir de xilosa por una xilosa reductasa (121). Su producción en *E. coli* ha sido probada y se sabe que los niveles de NADPH juegan un papel importante para su síntesis (122). Recientemente se ha desarrollado una variante de la enzima xilosa reductasa que utiliza como cofactor únicamente NADPH (123). Así mismo, los alcoholes quirales son ampliamente utilizados para generar compuestos de interés farmacéutico (124) y dado que muchas de las rutas de producción involucran una carbonil-reductasa dependiente de NADPH se ha sugerido que dentro de las estrategias metabólicas para su producción en *E. coli* se debe incrementar los niveles de NADPH (124, 125)

BIBLIOGRAFÍA

1. **Shahid S, Mosrati R, Ledauphin J, Amiel C, Fontaine P, Gaillard J-L, Corroler D.** 2013. Impact of carbon source and variable nitrogen conditions on bacterial biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: Evidence of an atypical metabolism in *Bacillus megaterium* DSM 509. *J. Biosci. Bioeng.* **116**:302–8.
2. **Boyandin a. N, Prudnikova S V., Filipenko ML, Khrapov E a., Vasil'ev a. D, Volova TG.** 2011. Biodegradation of polyhydroxyalkanoates by soil microbial communities of different structures and detection of PHA degrading microorganisms. *Appl. Biochem. Microbiol.* **48**:28–36.
3. **Harding KG, Dennis JS, von Blottnitz H, Harrison STL.** 2007. Environmental analysis of plastic production processes: comparing petroleum-based polypropylene and polyethylene with biologically-based poly-beta-hydroxybutyric acid using life cycle analysis. *J. Biotechnol.* **130**:57–66.
4. **Reinecke F, Steinbüchel A.** 2009. *Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **16**:91–108.
5. **Pettinari MJ, Vázquez GJ, Silberschmidt D, Rehm B, Steinbüchel A, Méndez BS.** 2001. Poly (3-Hydroxybutyrate) Synthesis Genes in *Azotobacter sp* . Strain FA8. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5331–5334.
6. **Lütke-Eversloh T, Steinbüchel A.** 2004. Microbial polythioesters. *Macromol. Biosci.* **4**:166–74.
7. **Madison LL, Huisman GW.** 1999. Metabolic Engineering of Poly (3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**:21–53.
8. **Schubert P, Steinbüchel A, Schlegel HG.** 1988. Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly-beta-hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**:5837–47.
9. **Senior P, Dawes E.** 1961. The Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase of *Azotobacter beijerinckii* and its possible significance in Poly-beta-hydroxy-butyrates biosynthesis. *Biochem J* **119**:38.
10. **Van Wegen RJ, Lee SY, Middelberg a P.** 2001. Metabolic and kinetic analysis of poly(3-hydroxybutyrate) production by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **74**:70–80.
11. **Wang F, Lee SY.** 1997. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of filamentation-suppressed recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4765–9.

12. **Tyo KEJ, Fischer CR, Simeon F, Stephanopoulos G.** 2010. Analysis of polyhydroxybutyrate flux limitations by systematic genetic and metabolic perturbations. *Metab. Eng.* **12**:187–95.
13. **Henderson R a, Jones CW.** 1997. Poly-3-hydroxybutyrate production by washed cells of *Alcaligenes eutrophus*; purification, characterisation and potential regulatory role of citrate synthase. *Arch. Microbiol.* **168**:486–92.
14. **Kessler B, Witholt B.** 2001. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *J. Biotechnol.* **86**:97–104.
15. **Jian J, Zhang S-Q, Shi Z-Y, Wang W, Chen G-Q, Wu Q.** 2010. Production of polyhydroxyalkanoates by *Escherichia coli* mutants with defected mixed acid fermentation pathways. *Appl. Environ. Microbiol.* **87**:2247–56.
16. **Sauer U, Canonaco F, Heri S, Perrenoud A, Fischer E.** 2004. The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **279**:6613–9.
17. **Fuhrer T, Sauer U.** 2009. Different biochemical mechanisms ensure network-wide balancing of reducing equivalents in microbial metabolism. *J. Bacteriol.* **191**:2112–21.
18. **Kabir MM, Shimizu K.** 2003. Fermentation characteristics and protein expression patterns in a recombinant *Escherichia coli* mutant lacking phosphoglucose isomerase for poly(3-hydroxybutyrate) production. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:244–55.
19. **Martínez I, Zhu J, Lin H, Bennett GN, San K-Y.** 2008. Replacing *Escherichia coli* NAD-dependent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) with a NADP-dependent enzyme from *Clostridium acetobutylicum* facilitates NADPH dependent pathways. *Metab. Eng.* **10**:352–359.
20. **Shi H, Nikawa J, Shimizu K.** 1999. Effect of modifying metabolic network on poly-3-hydroxybutyrate biosynthesis in recombinant *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.* **87**:666–77.
21. **Jung Y-M, Lee J-N, Shin H-D, Lee Y-H.** 2004. Role of tktA gene in pentose phosphate pathway on odd-ball biosynthesis of poly-beta-hydroxybutyrate in transformant *Escherichia coli* harboring *phbCAB* operon. *J. Biosci. Bioeng.* **98**:224–7.
22. **Lim S-J, Jung Y-M, Shin H-D, Lee Y-H.** 2002. Amplification of the NADPH-related genes *zwf* and *gnd* for the oddball biosynthesis of PHB in an *E. coli* transformant harboring a cloned *phbCAB* operon. *J. Biosci. Bioeng.* **93**:543–9.
23. **Kabir M, Shimizu K.** 2003. Gene expression patterns for metabolic pathway in *pgi* knockout *Escherichia coli* with and without *phb* genes based on RT-PCR. *J. Biotechnol.* **105**:11–31.
24. **D'Alessio G, Josse J.** 1971. Glyceraldehyde Phosphate Dehydrogenase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **246**:4326–4333.

25. **Charpentier B, Branlant C.** 1994. The *Escherichia coli gapA* Gene Is Transcribed by the Vegetative RNA Polymerase Holoenzyme E σ 70 and by the Heat Shock RNA Polymerase E σ 32. *J. Bacteriol.* **176**:830–839.
26. **Thouvenot B, Charpentier B, Branlant C.** 2004. The strong efficiency of the *Escherichia coli gapA* P1 promoter depends on a complex combination of functional determinants. *Biochem J* **382**:371–382.
27. **Hillman JD, Fraenkel DG.** 1975. Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase Mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **122**:1175–1179.
28. **Irani MH, Maitra PK.** 1977. Properties of *Escherichia coli* Mutants Deficient in Enzymes of Glycolysis. *J. Bacteriol.* **132**:398–410.
29. **Iddar A, Valverde F, Assobhei O, Serrano A, A S.** 2005. Widespread occurrence of non-phosphorylating dehydrogenase among gram-positive bacteria. *Int. Microbiol.* **8**:251–258.
30. **Fillinger S, Boschi-Muller S, Azza S, Dervyn E, Branlant G, Aymerich S.** 2000. Two Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenases with Opposite Physiological Roles in a Nonphotosynthetic Bacterium. *J. Biol. Chem.* **275**:14031–14037.
31. **Iddar A, Valverde F, Serrano A, Soukri A.** 2003. Purification of recombinant non-phosphorylating NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus pyogenes* expressed in *E. coli*. *Mol. Cell. Biochem.* **247**:195–203.
32. **Iddar A, Valverde F, Serrano A, Soukri A.** 2002. Expression , purification , and characterization of recombinant nonphosphorylating NAP-dependent glycerladehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum*. *Protein. Expr. Purif.* **25**:519–526.
33. **Valverde F, Losada M, Serrano A.** 1999. Engineering a central metabolic pathway : glycolysis with no net phosphorylation in an *Escherichia coli gap* mutant complemented with a plant *gapN* gene. *FEBS Lett.* **449**:153–158.
34. **Kim S, Lee CH, Nam SW, Kim P.** 2011. Alteration of reducing powers in an isogenic phosphoglucose isomerase (*pgi*) -disrupted *Escherichia coli* expressing NAD(P) -dependent malic enzymes and NADP- dependent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *Lett. Appl. Microbiol.* **52**:433–440.
35. **Verlinden R a J, Hill DJ, Kenward M a, Williams CD, Radecka I.** 2007. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J. Appl. Microbiol.* **102**:1437–49.
36. **Shishatskaya EI, Volova TG, Gordeev S a, Puzyr a P.** 2005. Degradation of P(3HB) and P(3HB-co-3HV) in biological media. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **16**:643–57.
37. **Feng L, Yoshie N, Asakawa N, Inoue Y.** 2004. Comonomer-unit compositions, physical properties and biodegradability of bacterial copolyhydroxyalkanoates. *Macromol. Biosci.* **4**:186–98.
38. **Chen G-Q.** 2009. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chem. Soc. Rev.* **38**:2434–46.

39. **Zhang X, Luo R, Wang Z, Deng Y, Chen G-Q.** 2009. Application of (R)-3-hydroxyalkanoate methyl esters derived from microbial polyhydroxyalkanoates as novel biofuels. *Biomacromolecules* **10**:707–11.
40. **Slater S, Gallaher T, Dennis D.** 1992. Production of poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in a recombinant *Escherichia coli* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1089–94.
41. **Li R, Zhang H, Qi Q.** 2007. The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*. *Bioresour. Technol.* **98**:2313–20.
42. **Galindo E, Peña C, Núñez C, Segura D, Espín G.** 2007. Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microb. Cell Fact.* **6**:7.
43. **Peralta-gil M, Segura D, Guzmán J, Servi L.** 2002. Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly- β -Hydroxybutyrate biosynthetic *phbBAC* operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR expression of the *Azotobacter vinelandii* poly- β -hydroxybutyrate. *J. Bacteriol.* **184**:5672–5677.
44. **Neumann L, Spinozzi F, Sinibaldi R, Rustichelli F, Pötter M, Steinbüchel A.** 2008. Binding of the major phasin, PhaP1, from *Ralstonia eutropha* H16 to poly(3-hydroxybutyrate) granules. *J. Bacteriol.* **190**:2911–9.
45. **Haywood G.** 1988. Characterization of two 3-ketothiolases possessing differing substrate specificities in the polyhydroxyalkanoate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **52**:91–96.
46. **Wang Q, Zhuang Q, Liang Q, Qi Q.** 2013. Polyhydroxyalkanoic acids from structurally-unrelated carbon sources in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**:3301–7.
47. **Sabra W, Zeng A, Lünsdorf H, Deckwer W.** 2000. Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4037–4044.
48. **Paalme T, Elken R, Kahru a, Vanatalu K, Vilu R.** 1997. The growth rate control in *Escherichia coli* at near to maximum growth rates: the A-stat approach. *Antonie Van Leeuwenhoek* **71**:217–30.
49. **Oelze J.** 2000. Respiratory protection of nitrogenase in *Azotobacter* species: is a widely held hypothesis unequivocally supported by experimental evidence? *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:321–33.
50. **Slater SC, Voige WH, Dennis DE.** 1988. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic pathway. *J. Bacteriol.* **170**:4431–6.
51. **Dean a M, Koshland DE.** 1993. Kinetic mechanism of *Escherichia coli* isocitrate dehydrogenase. *Biochemistry* **32**:9302–9.

52. **Flores S, Gosset G, Flores N, de Graaf a a, Bolívar F.** 2002. Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by (13)C labeling and NMR spectroscopy. *Metab. Eng.* **4**:124–37.
53. **Fuhrer T, Fischer E, Sauer U.** 2005. Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. *J. Bacteriol.* **187**.
54. **Foster JW, Park YK, Penfound T, Fenger T, Spector MP.** 1990. Regulation of NAD metabolism in *Salmonella typhimurium* : molecular sequence analysis of the bifunctional *nadR* regulator and the *nadA-pnuC* operon. *J. Bacteriol.* **172**:4187–4196.
55. **Csonka LN, Fraenkel DG.** 1977. Pathways of NADPH Formation in *Escherichia*. *J. Biol. Chem.* **252**:3382–3391.
56. **Bizouarn T, Fjellstro O, Meuller J, Axelsson M, Bergkvist A, Johansson C, Go B, Rydstro J.** 2000. Proton translocating nicotinamide nucleotide transhydrogenase from *E. coli*. Mechanism of action deduced from its structural and catalytic properties. *Biochim. Biophys. Acta* **1457**:211–228.
57. **Lee IY, Kim MK, Park YH, Lee- SY.** 1996. Regulatory effects of cellular nicotinamide nucleotides and activities on poly(3-Hydroxybutyrate) synthesis in recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **52**:707–712.
58. **Chemler J a, Fowler ZL, McHugh KP, Koffas M a G.** 2010. Improving NADPH availability for natural product biosynthesis in *Escherichia coli* by metabolic engineering. *Metab. Eng.* **12**:96–104.
59. **Chohnan S, Furukawa H, Fujio T, Nishihara H, Takamura Y.** 1997. Changes in the size and composition of intracellular pools of nonesterified coenzyme A and coenzyme A thioesters in aerobic and facultatively anaerobic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:553–60.
60. **Vadali R V, Bennett GN, San K-Y.** 2004. Cofactor engineering of intracellular CoA/acetyl-CoA and its effect on metabolic flux redistribution in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* **6**:133–9.
61. **Hollywood N, Doelle H.** 1976. Effect of specific growth rate and glucose concentration on growth and glucose metabolism of *Escherichia coli* K-12. *Microbios* **17**:23–33.
62. **Andersen KB, von Meyenburg K.** 1980. Are growth rates of *Escherichia coli* in batch cultures limited by respiration? *J. Bacteriol.* **144**:114–23.
63. **Binstock JF, Schulz H.** 1981. Fatty acid oxidation complex from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **71**:403–4011.
64. **Neidhardt F., Bender R.** 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology, 3a ed. Washington DC.
65. **Warnecke T, Gill RT.** 2005. Organic acid toxicity, tolerance, and production in *Escherichia coli* biorefining applications. *Microb. Cell Fact.* **4**:25.

66. **Zhou L, Zuo Z-R, Chen X-Z, Niu D-D, Tian K-M, Prior B a, Shen W, Shi G-Y, Singh S, Wang Z-X.** 2011. Evaluation of genetic manipulation strategies on D-lactate production by *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* **62**:981–9.
67. **Fernández-Sandoval MT, Huerta-Beristain G, Trujillo-Martinez B, Bustos P, González V, Bolivar F, Gosset G, Martinez A.** 2012. Laboratory metabolic evolution improves acetate tolerance and growth on acetate of ethanologenic *Escherichia coli* under non-aerated conditions in glucose-mineral medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **96**:1291–300.
68. **Leonard E, Lim K-H, Saw P-N, Koffas M a G.** 2007. Engineering central metabolic pathways for high-level flavonoid production in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:3877–86.
69. **Zhu H, Gonzalez R, Bobik T a.** 2011. Coproduction of acetaldehyde and hydrogen during glucose fermentation by *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**:6441–50.
70. **Lee W-H, Kim M-D, Jin Y-S, Seo J-H.** 2013. Engineering of NADPH regenerators in *Escherichia coli* for enhanced biotransformation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**:2761–72.
71. **Li Z, Cai L, Wu Q, Chen G.** 2009. Overexpression of NAD kinase in recombinant *Escherichia coli* harboring the *phbCAB* operon improves poly (3-hydroxybutyrate) production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **83**:939–947.
72. **Sanchez AM, Andrews J, Hussein I, Bennett GN, San K-Y.** 2006. Effect of overexpression of a soluble pyridine nucleotide transhydrogenase (UdhA) on the production of poly(3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* **22**:420–5.
73. **Fraenkel DG.** 1986. Mutants in glucose metabolism. *Ann. Rev. Biochem.* **55**:317–337.
74. **Wang Y, San K-Y, Bennett GN.** 2013. Improvement of NADPH bioavailability in *Escherichia coli* through the use of phosphofructokinase deficient strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**:6883–93.
75. **Dittrich CR, Bennett GN, San K-Y.** 2005. Characterization of the acetate-producing pathways in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* **21**:1062–7.
76. **Lee SH, Kang K-H, Kim EY, Chae TU, Oh YH, Hong SH, Song BK, Jegals J, Park SJ, Lee SY.** 2013. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for enhanced biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) based on proteome analysis. *Biotechnol. Lett.* DOI 10.1007/s10529-013-1246-y.
77. **Kocharin K, Chen Y, Siewers V, Nielsen J.** 2012. Engineering of acetyl-CoA metabolism for the improved production of polyhydroxybutyrate in *Saccharomyces cerevisiae*. *AMB Express* **2**:52.
78. **Marchal S, Branlant G.** 2002. Characterization of the amino acids involved in substrate specificity of nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *J. Biol. Chem.* **277**:39235–42.

79. **Brown AT, Wittenberger CL.** 1971. Mechanism for regulating the distribution of glucose carbon between the Embden-Meyerhof and hexose-monophosphate pathways in *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **106**:456–467.
80. **Sambrook J, Rusell D.** 2001. *Molecular cloning a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
81. **Amann E, Ochs B, Abel K.** 1988. Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* **69**:301–315.
82. **Chang ACY, Cohen SN.** 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* **134**:1141–1156.
83. **Datsenko K a, Wanner BL.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**:6640–5.
84. **Cherepanov PP, Wackernagel W.** 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**:9–14.
85. **Bradford M.** 1976. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248–254.
86. **Lee HC, Kim JS, Jang W, Kim SY.** 2010. High NADPH/NADP⁺ ratio improves thymidine production by a metabolically engineered *Escherichia coli* strain. *J. Biotechnol.* **149**:24–32.
87. **Bergmeyer H.** 1985. *Methods of Enzymatic Analysis*, 3th ed. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Federal Republic of Germany.
88. **Koebmann BJ, Westerhoff H V, Snoep JL, Nilsson D, Jensen PR.** 2002. The glycolytic flux in *Escherichia coli* is controlled by the demand for ATP. *J. Bacteriol.* **184**:3909–3916.
89. **Aguilar C, Escalante A, Flores N, de Anda R, Riveros-McKay F, Gosset G, Morett E, Bolívar F.** 2012. Genetic changes during a laboratory adaptive evolution process that allowed fast growth in glucose to an *Escherichia coli* strain lacking the major glucose transport system. *BMC Genomics* **13**:385.
90. **Livak KJ, Schmittgen TD.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* **25**:402–8.
91. **Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko K a, Tomita M, Wanner BL, Mori H.** 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**:2006.0008.
92. **Cho H-S, Seo SW, Kim YM, Jung GY, Park JM.** 2012. Engineering glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase for switching control of glycolysis in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **109**:2612–9.

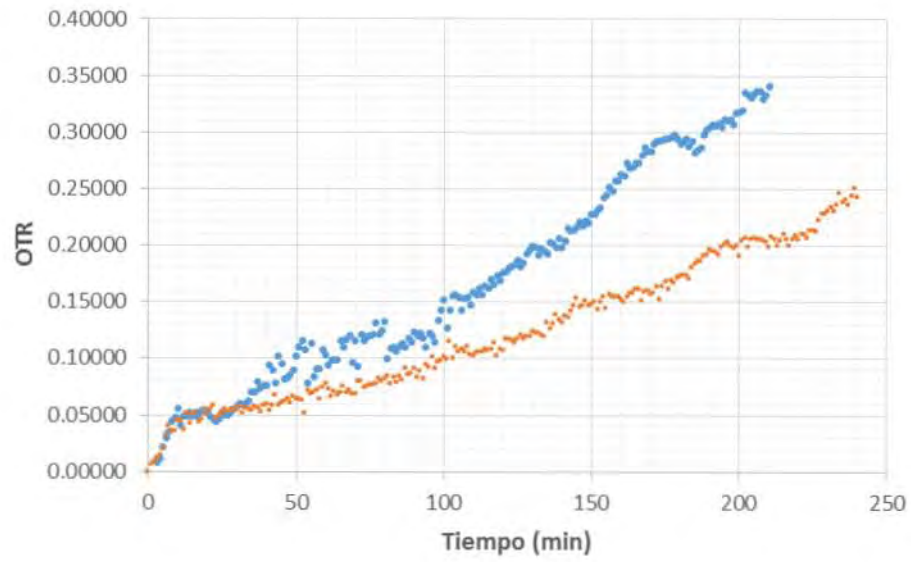
93. **Dittrich CR, Vadali R V, Bennett GN, San K.** 2005. Redistribution of metabolic fluxes in the central aerobic metabolic pathway of *E. coli* mutant strains with deletion of the *ackA-pta* and *poxB* pathways for the synthesis of isoamyl acetate. *Biotechnol. Prog.* **21**:627–631.
94. **Kern A, Tilley E, Hunter IS, Legisa M, Glieder A.** 2007. Engineering primary metabolic pathways of industrial micro-organisms. *J. Biotechnol.* **129**:6–29.
95. **Waegeman H, De Lausnay S, Beauprez J, Maertens J, De Mey M, Soetaert W.** 2013. Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* K12 through metabolic engineering. *N. Biotechnol.* **30**:255–61.
96. **Phue J-N, Lee SJ, Kaufman JB, Negrete A, Shiloach J.** 2010. Acetate accumulation through alternative metabolic pathways in *ackA* (-) *pta* (-) *poxB* (-) triple mutant in *E. coli* B (BL21). *Biotechnol. Lett.* **32**:1897–903.
97. **Crow L, Wittenberg CL.** 1979. Separation and Properties of NAD⁺ - and NADP⁺ -dependent Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenases from *Streptococcus mutans**. *J. Biol. Chem.* **254**:1134–1142.
98. **Holm AK, Blank LM, Oldiges M, Schmid A, Solem C, Jensen PR, Vemuri GN.** 2010. Metabolic and transcriptional response to cofactor perturbations in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **285**:17498–506.
99. **Vemuri GN, Altman E, Sangurdekar DP, Khodursky AB, Eiteman MA.** 2006. Overflow metabolism in *Escherichia coli* during steady-state growth : transcriptional regulation and effect of the redox ratio. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:3653–3661.
100. **Noda S, Takezawa Y, Mizutani T, Asakura T, Nishiumi E, Onoe K, Wada M, Tomita F, Matsushita K, Yokota A.** 2006. Alterations of cellular physiology in *Escherichia coli* in response to oxidative phosphorylation impaired by defective F1-ATPase. *J. Bacteriol.* **188**:6869–76.
101. **Jensen PR, Michelsen OLE.** 1992. Carbon and energy metabolism of *atp* mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**:7635–7641.
102. **Brandsch R.** 1989. Covalent cofactor binding to flavoenzymes requires specific effectors. *Eur. J. Biochem.* **182**:125–128.
103. **Yagi T, Matsuno-yagi A.** 2003. The proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase in the respiratory chain: The secret unlocked. *Biochemistry* **42**:2266–2274.
104. **Bogaerts J, Zoske S, Weidner U, Linden G.** 1995. Transcriptional regulation of the proton translocating NADH dehydrogenase (*nuoA-N*) of *Escherichia coli* by electron acceptors, electron donors and gene regulators. *Mol. Microbiol.* **16**:521–534.
105. **Kalman L V, Gunsalus RP.** 1988. The *frdR* gene of *Escherichia coli* globally regulates several operons involved in anaerobic growth in response to nitrate. *J. Bacteriol.* **170**:623–629.

106. **Takahashi H, Inada T, Postma P, Aiba H.** 1998. CRP down-regulates adenylate cyclase activity by reducing the level of phosphorylated IIA(Glc), the glucose-specific phosphotransferase protein, in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **259**:317–326.
107. **Canonaco F, Hess TA, Heri S, Wang T, Szyperski T, Sauer U.** 2001. Metabolic flux response to phosphoglucose isomerase knock-out in *Escherichia coli* and impact of overexpression of the soluble transhydrogenase UdhA. *FEMS Microbiol. Lett.* **204**:247–252.
108. **Charusanti P, Conrad TM, Knight EM, Venkataraman K, Fong NL, Xie B, Gao Y, Palsson BØ.** 2010. Genetic basis of growth adaptation of *Escherichia coli* after deletion of *pgi*, a major metabolic gene. *PLoS Genet.* **6**:e1001186.
109. **Diaz Ricci JC, Hernández ME.** 2000. Plasmid effects on *Escherichia coli* metabolism. *Crit. Rev. Biotechnol.* **20**:79–108.
110. **Majewski R a, Domach MM.** 1990. Simple constrained-optimization view of acetate overflow in *E. coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **35**:732–8.
111. **Veit A, Polen T, Wendisch VF.** 2007. Global gene expression analysis of glucose overflow metabolism in *Escherichia coli* and reduction of aerobic acetate formation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**:406–21.
112. **Takeno S, Murata R, Kobayashi R, Mitsuhashi S, Ikeda M.** 2010. Engineering of *Corynebacterium glutamicum* with an NADPH-generating glycolytic pathway for L-lysine production. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:7154–60.
113. **Bentley WE, Mirjalili N, Andersen DC, Davis RH, Kompala DS.** 1990. Plasmid-encoded protein: the principal factor in the “metabolic burden” associated with recombinant bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* **35**:668–81.
114. **Sharan SK, Thomason LC, Kuznetsov SG, Court DL.** 2009. Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering. *Nat. Protoc.* **4**:206–23.
115. **Thomason LC, Costantino N, Court DL.** 2007. *E. coli* genome manipulation by P1 transduction. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **Chapter 1**:Unit 1.17.
116. **Sabido A, Martínez LM, de Anda R, Martínez A, Bolívar F, Gosset G.** 2013. A novel plasmid vector designed for chromosomal gene integration and expression: use for developing a genetically stable *Escherichia coli* melanin production strain. *Plasmid* **69**:16–23.
117. **Li M, Wang J, Geng Y, Li Y, Wang Q, Liang Q, Qi Q.** 2012. A strategy of gene overexpression based on tandem repetitive promoters in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* **11**:19.
118. **Song H, Li G, Mai W, Huang G, Chen K, Zhou Y, Chen H.** 2013. Codon optimization enhances protein expression of Bombyx mori Nucleopolyhedrovirus DNA polymerase in *E. coli*. *Curr. Microbiol.* DOI 10.1007/s00284–013–0476–5.

119. **Liu Y, Wu C, Wang J, Mo W, Yu M.** 2013. Codon optimization, expression, purification, and functional characterization of recombinant human IL-25 in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* DOI 10.1007/s00253-013-5264-4.
120. **Keasling JD.** 1999. Gene-expression tools for the metabolic engineering of bacteria. *Trends Biotechnol* **17**:452–460.
121. **Karhumaa K, Garcia Sanchez R, Hahn-Hägerdal B, Gorwa-Grauslund M-F.** 2007. Comparison of the xylose reductase-xylitol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* **6**:5.
122. **Chin JW, Khankal R, Monroe C a, Maranas CD, Cirino PC.** 2009. Analysis of NADPH supply during xylitol production by engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **102**:209–20.
123. **Khatab SMR, Watanabe S, Saimura M, Kodaki T.** 2011. A novel strictly NADPH-dependent *Pichia stipitis* xylose reductase constructed by site-directed mutagenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **404**:634–7.
124. **Kataoka M, Kita K, Wada M, Yasohara Y, Hasegawa J, Shimizu S.** 2003. Novel bioreduction system for the production of chiral alcohols. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**:437–45.
125. **Kataoka M, Sri Rohani L, Wada M, Kita K, Yanase H, Urabe I, Shimizu S.** 1998. *Escherichia coli* transformant expressing the glucose dehydrogenase gene from *Bacillus megaterium* as a cofactor regenerator in a chiral alcohol production system. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**:167–169.

MATERIAL COMPLEMENTARIO

PERFIL DE OTR DURANTE LA FASE DE CRECIMIENTO EXPONENCIAL DE LA CEPA SILVESTRE MG1655 (azul) Y LA CEPA MG1655 Δ gapA::*gapN*/pTregapN (rojo).



ANEXO 1

En el presente anexo se muestra el manuscrito publicado con la información obtenida en el Capítulo 3.1.

Antonie van Leeuwenhoek. (2013). DOI 10.1007/s10482-013-0010-6

Metabolic and transcriptional response of *Escherichia coli* with a NADP⁺-dependent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*.

Sara Centeno-Leija, José Utrilla, Noemí Flores, Alberto Rodríguez, Guillermo Gosset, Alfredo Martínez

ANEXO 2

En el presente anexo se muestra el manuscrito en preparación con la información obtenida en el Capítulo 3.2.

Antonie van Leeuwenhoek. (2013)

Improving Polyhydroxybutyrate Production in *E. coli* by Increasing the NADPH Pool and Acetyl-CoA Availability

Sara Centeno-Leija, Gerardo Huerta-Beristain, Martha Giles-Gómez, Guillermo Gosset, and Alfredo Martinez*.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

**Improving poly-3-hydroxybutyrate production in *Escherichia coli* by
increasing the NADPH pool and acetyl-CoA availability**

Running Title: Metabolic Engineering of Cofactor and Central Metabolism

Sara Centeno-Leija · Gerardo Huerta-Beristain · Martha Giles-Gómez · Francisco Bolívar ·
Guillermo Gosset · Alfredo Martinez

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad
Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, 62250, México.

Corresponding author
Alfredo Martinez
Tel: (52+777) 329 1601
Fax: (52+777) 317 2388
E-mail: alfredo@ibt.unam.mx

1 **Abstract** The biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate (P3HB), a biodegradable bio-plastic,
2 requires acetyl-CoA as precursor and NADPH as cofactor. *Escherichia coli* had been used as a
3 heterologous production model for P3HB, but metabolic pathway analysis shows a deficiency to
4 sustain high levels of NADPH and the acetyl-CoA is mainly converted to acetic acid by native
5 pathways. In this work the pool of NADPH was increased 1.7 times in *E. coli* MG1655 through
6 the plasmid overexpression of the NADP⁺-dependent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
7 gene (*gapN*) from *Streptococcus mutans* (pTrc_{gapN}). Additionally, by deleting the main acetate
8 production pathway (*ackA-pta*), the acetic acid production was abolished increasing the acetyl-
9 CoA pool. The synthesis of the P3HB pathway was heterologous expressed in the strain MG1655
10 Δ *ackA-pta*/pTrc_{gapN}, using an IPTG inducible vector with the P3HB operon from *A. vinelandii*
11 (pPHB_{Av}). Cultures were performed in controlled fermentors using mineral medium with glucose
12 as the carbon source. Accordingly, the mass yield of P3HB on glucose increased to 77 % of the
13 maximum theoretical and was 30 % higher when compared to the progenitor strain
14 (MG1655/pPHB_{Av}). In comparison with the wild type strain expressing pPHB_{Av}, the specific
15 accumulation of PHB (g_{PHB}/g_{DCW}) in MG1655 Δ *ack-pta*/pTrc_{gapN}/ pPHB_{Av} increased 2-fold,
16 which indicates that increasing the availability of NADPH and abolishing the production of acetate
17 allows increasing the intracellular accumulation of P3HB up to 84% of the *E. coli* dry weight.

18

19 **Key words** *Escherichia coli*, NAD(P)⁺-dependent glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase,
20 NAD(P)H, Acetic acid, Acetyl-CoA pool, Poly-3-hydroxybutyrate.

21

1 INTRODUCTION

2

3 The poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) is a biodegradable bio-plastic that has similar physiochemical
4 properties to petro-plastics (1, 2), and had been produced at industrial scale since almost 30 years
5 ago (3). The P3HB is produced by different microorganism's, including the genera *Ralstonia*,
6 *Azotobacter*, *Pseudomonas* and *Bacillus* (4-6). These microorganisms accumulate the polymer as
7 intracellular granules - storage material of carbon and energy under conditions of stress and/or
8 nutrient limitation (7). The biosynthesis of P3HB is performed by the concerted catalysis of three
9 enzymes; which begins with the condensation of two molecules of acetyl-CoA by a β -ketothiolase
10 (PhbA), forming acetoacetyl-CoA; the acetoacetyl-CoA is subsequently reduced to 3-
11 hydroxybutyryl-CoA (3HB-CoA), through a NADPH-dependent reductase (PhbB); and finally
12 each 3HB-CoA monomer is polymerized by a PHB synthase (PhbC) to form P3HB (8). The three
13 enzymes are found within an operon in *Azotobacter vinelandii* called *phbBAC* (5).

14 The control of the pathway is given by the β -ketothiolase, because high levels of CoA inhibit the
15 activity of this enzyme, *i.e.* when glucose is being metabolized at a high rate and there is enough
16 oxygen to maintain fully aerobic growth; these conditions generates an intense dissimilation of
17 acetyl-CoA through the tricarboxylic acid cycle (TAC) and raise the pool of CoA (9). Due to this
18 enzymatic regulation, the heterologous production of P3HB in *E. coli* is carried out in two stages
19 (10-12): the first stage for cellular proliferation and a second stage with low levels of oxygen
20 and/or nitrogen depleted to promote the accumulation of P3HB. Under such conditions, the TCA
21 cycle activity decreases, allowing to increase the levels of the acetyl-CoA pool, reduce the pool of
22 CoA and increases the synthesis of P3HB (13, 14). Hence the challenges to improve the production
23 of P3HB with recombinant *E. coli* is to increase the availability of the precursor acetyl-CoA and

1 the cofactor NADPH. The increase of the availability of acetyl-CoA under oxygen limiting
2 conditions, through the deletion of the acetic acid (*ackA-pta*), lactate dehydrogenase (*ldhA*) and
3 ethanol (*adhE*) pathways in strains of *E. coli* had generated up to 4.7-fold better efficiency in the
4 accumulation of PHB; however, such strains had a limited P3HB production because the NADPH
5 availability was low (15). On the other hand, since the production of NADPH in *E. coli* is catabolic
6 insufficient to sustain the anabolic demand (16, 17), the production of metabolites whose synthesis
7 depends on this cofactor is very difficult (18, 19). One of the strategies most studied to increase
8 the levels of NADPH had been the metabolic manipulation to stimulate the flow of carbon into the
9 oxidative branch of the pentose phosphate pathway (PPP) (20-22). Although the deletion of the
10 phosphoglucose isomerase (*pgi*) results in the increase of NADPH and the over-flow of carbon
11 into the PPP, this metabolic manipulation generates a reduction in the total carbon flux and the rate
12 of glucose consumption with a concomitant decrease in the specific growth rate, generating low
13 volumetric productivities (18, 23).

14 During the metabolism of glucose, the NADH generation in *E. coli* is conducted through the
15 Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway by the NAD⁺-dependent glyceraldehyde-3-phosphate-
16 dehydrogenase (NAD⁺-GAPDH) (E.C. 1.2.1.12) (24) encoded by *gapA* (Fig. 1) (25). However,
17 several microorganisms such as *Bacillus*, *Streptococcus* and *Clostridium* have a NADP⁺-dependent
18 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (NADP⁺-GAPDH) (E.C. 1.2.1.9) (26). Specifically, it
19 had been shown that the NADP⁺-GAPDH enzyme from *Streptococcus mutans*, coded by *gapN*
20 (27), has 10 times higher affinity by the G3P than GapA (28, 29). Furthermore, Martinez et al.
21 (2008) reported the replacement of *gapA* in *E. coli* with *gapC* that codes for a NADP⁺-GAPDH
22 enzyme from *Clostridium acetobutyricum*, increasing about 2-fold the NADPH yield on glucose
23 and as a consequence the heterologous lycopene production, a NADPH-dependent metabolite,

1 increased 2.5-fold in rich medium (19). In the present work a study was conducted to boost the
2 pool of NADPH, abolish the production of acetate and increase the production of P3HB in *E. coli*,
3 through: the heterologous expression of the NADP⁺-dependent glyceraldehyde 3-phosphate
4 dehydrogenase (NADP⁺GAPDH) gene (*gapN*) from *Streptococcus mutans*; the deletion of the
5 main acetate production pathway (*ackA-pta*); and the overexpression of the P3HB synthesis
6 pathway from *A. vinelandii* (*phbBAC*).

7

8

9 **MATERIALS AND METHODS**

10

11 **Bacterial strains and plasmids**

12

13 The wild-type *E. coli* strain MG1655 (GenBank NC_000913) was used as the parental strain.

14 Chromosomal DNA of *A. vinelandii* was generously donated by the Molecular Microbiology

15 Department of Instituto de Biotecnología - Universidad Nacional Autónoma de México. Plasmids

16 and primers used in this work are listed in Table 1. Standard procedures were employed for plasmid

17 preparations, restriction-enzyme digestions, transformations and gel electrophoresis (Sambrook

18 and Russell 2001). Each plasmid construction and mutants were verified by its restriction pattern

19 in an agarose gel and by sequencing. Gene amplifications were carried out by PCR on a C1000

20 Touch Thermal Cycler Manual (Bio-Rad Laboratories, Inc. USA) using Pfu DNA polymerase

21 (Thermo Fisher Scientific Inc.). DNA fragments were isolated from agarose gels with the Roche

22 Pure PCR Product Purification kit (Roche Diagnostics GmbH, Germany) according to the

23 manufacturer's instructions. The construction of the recombinant strain MG1655 Δ *gapA::gapN*, the

1 strain MG1655 Δ gapA::gapN/pTrcgapN and the plasmid pTrcgapN are reported elsewhere (32).

2 The chromosomal DNA from *A. vinelandii* was isolated with the Ultra Clean Microbial DNA
3 Isolation kit (MO BIO laboratories, Inc, USA). Plasmid pPHB_{Av} was used to overexpress the
4 *phbBAC* operon from *Azotobacter vinelandii*. First, this operon was amplified, from *A. vinelandii*
5 chromosomal DNA, by PCR with oligonucleotides phb1 and phb2, which introduce EcoRI and
6 HindIII flanking sites to facilitate cloning into plasmid pTrc99A. The fragment *phbBAC* was
7 ligated into pTrc99A, previously digested with EcoRI and HindIII, to generate plasmid pPHB_{Av}
8 (Table 1). The construction was verified by digestion with EcoRI and HindIII and visualized by
9 agarose gel electrophoresis.

10 The Deletion of the *ackA-pta* operon was made using the chromosomal gene inactivation method
11 using PCR products (Datsenko and Wanner 2000). The primers ackAF and ptaR were designed to
12 amplify FRT-Kan-FRT from pKD4 with ~50 nucleotides of homology to the chromosome
13 sequence to inactivate the target operon. The Δ *ackA-pta* mutant selected strain was verified by
14 DNA sequencing with primers p1 and p2, which hybridize at ~230 nucleotides upstream and
15 downstream, respectively, of the *ackA-pta* operon.

16

17 Medium and growth conditions

18

19 The routine cultivation and genetic manipulations of *E. coli* MG1655 and its mutant were
20 performed in Luria Bertani medium (10 g L⁻¹ tryptone, 5 g L⁻¹ yeast extract, and 10 g L⁻¹ NaCl,
21 pH 7.2) supplemented with the appropriated antibiotics when was necessary.

22 To characterize the strains, *E. coli* MG1655 Δ gapA::gapN/pTrcgapN was compared with *E. coli*
23 MG1655 and MG1655 Δ gapA::gapN carrying an empty pACYC184 plasmid. Cultures were

1 performed in pH controlled fermenters. Seed cells were prepared in a 2.8 L Fermbach flask
2 containing 0.5 L⁻¹ of M9 medium with 5 g L⁻¹ glucose. M9 medium contains, per liter: 6 g
3 Na₂HPO₄; 3 g KH₂PO₄; 0.5 g NaCl; 1 g NH₄Cl; 2 mM MgSO₄; 0.1 mM CaCl₂; and 0.01 g Vitamin
4 B1. The cells from 350 mL of culture were harvested by centrifugation at an OD₆₀₀ of 1 and
5 resuspended with 10 mL of fresh M9 medium; these cells were used as inoculum for the bioreactor.
6 Cultures were conducted with mineral M9 medium supplemented with Glucose (10 g L⁻¹) in a 1-
7 L bioreactor (Applikon Biotechnology, Netherlands), a working volume of 0.7 L, pH controlled at
8 7 with NaOH (2 N), an air flow rate of 0.84 L min⁻¹, and 600 rpm. The samples were collected in
9 the mid-log phase at an OD₆₀₀ of 3 to determinate cofactors and GAPDH enzymatic activities. All
10 experiments and analysis were performed in triplicates, figures and tables show averages and
11 standard deviations.

12

13 Metabolite analysis and kinetic and stoichiometric parameters

14

15 The samples from cultures were centrifuged (4,000 x g, 4°C, 10 min), and the cell-free culture
16 broth was frozen for subsequent analysis. The concentration of glucose and organic acids in the
17 culture broths were determined by HPLC, as previously reported (32).

18 The cell growth for cells without the plasmid pPHB_{Av} was measured by monitoring the optical
19 density at 600 nm (OD₆₀₀) in a spectrophotometer DU-70 (Beckman Instruments, Inc. Fullerton,
20 CA). OD₆₀₀ was converted into dry cellular weight (cell concentration) using a calibration standard
21 curve (1 OD₆₀₀ = 0.42 g/L of dry cellular weight: DCW). The specific growth rates (μ) were
22 determined by fitting the biomass data versus time to exponential regressions. The cell mass yield
23 on glucose ($Y_{X/GLC}$) and the yield of acetate on glucose ($Y_{ACE/GLC}$), were estimated as the

1 coefficient of the linear regression of acetate or cell mass concentration versus the concentration
2 of glucose consumed during the exponential growth phase, in $g_{DCW} \text{ mmol}_{GLC}^{-1}$ and mmol_{ACE}
3 mmol_{GLC}^{-1} . The specific glucose consumption rate (q_s) was determined as the ratio of μ to $Y_{X/GLC}$.
4 For cells producing P3HB the optical density at 600 nm (OD_{600}) is used in graphs only as an
5 indicative of cell growth with intracellular accumulation of P3HB.

6

7 Measurements of the intracellular cofactors concentrations

8

9 The $NADP^+$ -GAPDH and NAD^+ -GAPDH enzymatic activities and the intracellular cofactors,
10 NAD^+ , $NADH$, $NADP^+$ and $NADPH$ and, were assayed as reported elsewhere (32). One unit of
11 activity is defined as 1 μmol of $NAD(P)H$ formed per min.

12

13 Measurements of P3HB

14

15 To determinate the P3HB content, the cells were harvested by centrifugation (4,000 x g, 30 min,
16 4°C) at the onset of glucose depletion, washed twice with distilled water and then freeze dried.
17 The resulting cell powders were stored at 25°C until they were processed. Ten mg of freeze-dried
18 cell powder with P3HB-containing biomass was weighted, processed in glass vials (with Teflon
19 caps), and mixed with a hypochlorite solution (2% vol/vol). The granules containing P3HB were
20 separated from the aqueous fraction (containing the cell debris) by centrifugation. The recovered
21 solids were rinsed twice with distilled water. The granules of P3HB were resuspended with 3
22 volumes of chloroform and the polymer was dried allowing the total evaporation of chloroform.
23 After drying with chloroform, the P3HB was mixed with 75 μL of solution A (5 mL of H_2SO_4 :

1 methanol (10% vol/vol) + 25 mL of benzoic acid : methanol (4% wt/vol)). The mixture was heated
2 at 95°C until total dissolution was observed, then 0.75 mL of solution B (0.5 mL of chloroform +
3 0.25 mL di-H₂O) was added and vigorously mixed for 1 minute five times. The phases were
4 separated by centrifugation at (3,000 x g, 2 min, and room temperature). The organic phase was
5 recovered and quantified using a gas chromatograph (Model 6850, Agilent, CA, USA), equipped
6 with an INNOWax column (initial temperature 50°C, final temperature 260°C, increase 20°C min⁻¹)
7 (30 m x 0.25 mm, 0.25 μm), and a flame ionization detector with helium as the mobile phase at
8 0.1 mL/min. Commercial P3HB was used as standard and benzoic acid (contained in solution A)
9 as internal standard.

10

11

12 **RESULTS AND DISCUSSION**

13

14 Increasing the NADPH pool

15

16 In order to increase the NADPH levels in *E. coli*, the NAD⁺-GAPDH gene (*gapA*) was replaced
17 with the NADP⁺-GAPDH gene from *S. mutans* (*gapN*). Since *E. coli* mutants in the *gapA* gene are
18 unable to grow with hexoses as carbon source (8–10), the strain MG1655Δ*gapA*::*gapN*/pTrc*gapN*
19 was constructed, as previously described (32), in one step by inserting the *gapN* gene at the same
20 locus as the native *gapA* gene and subsequently it was transformed with the plasmid pTrc*gapN*,
21 which overexpresses *gapN* from the *trc* promoter (32). Also, the wild-type strain MG1655, which
22 keeps the *gapA* gene into the chromosome was transformed with the plasmid pTrc*gapN*, resulting
23 MG1655/pTrc*gapN*, thus NAD⁺-GAPDH activity was produced at the same time that heterologous
24 NADP⁺-GAPDH activity (Fig. 1).

1 Fermenter batch cultures with mineral medium and 10 g/l of glucose were performed under
2 aerobic conditions. Kinetic data showed that strain MG1655 Δ *gapA::gapN*/pTrc*gapN* had a
3 specific growth (μ) and glucose consumption (q_{GLC}) rates about 15 and 26 % lower when compare
4 to wild-type strain (Table 2), attributable to redox and energetics perturbations when the turnover
5 of NAD(P)H via glyceraldehyde 3-phosphate oxidation is altered (19, 32). In contrast, the μ and
6 q_{GLC} values for MG1655/pTrc*gapN* were similar to those found with the wild-type strain (Table
7 2), suggesting that the co-expression of *gapN* along with *gapA* didn't significantly affect the
8 growth and glucose uptake capabilities. Furthermore, it was possible to observe that the acetic acid
9 was the main sub-product in all strains (Table 2). The acetic acid production was expected, since
10 acetate is generated in *E. coli* cultures under aerobic conditions with high glucose concentrations
11 and high rates of substrate consumption (30, 31).

12 On the other hand, the specific NADP⁺-GAPDH activity of the strain
13 MG1655 Δ *gapA::gapN*/pTrc*gapN* was 0.937 ± 0.04 IU/mg_{PROT} and no NAD⁺-GAPDH activity
14 was detected. In agreement, the NADPH/NADH ratio increased 3-fold in comparison with the
15 wild-type strain (Fig. 2). Likewise, MG1655/pTrc*gapN* had a specific NADP⁺-GAPDH activity of
16 0.788 ± 0.07 IU/mg_{PROT} and a similar specific NAD⁺-GAPDH activity to the wild-type strain
17 (Table 2), demonstrating that strain MG1655/pTrc*gapN* had both GAPDH activities. Accordingly,
18 the intracellular NADPH/NADH ratio increased 1.8-fold as compared with the wild-type strain
19 (Fig. 2). This indicates that the activity of the enzyme NADP⁺-GAPDH was able to increase the
20 intracellular levels of NADPH in both strains. However, the full replacement of the native NAD⁺-
21 GAPDH activity by the heterologous NADP⁺-GAPDH activity increased the NADPH/NADH
22 ratio 1.7-fold more than when both enzymes coexist (Fig. 2).

23

1 P3HB production with *ackA-pta*⁺ strains

2

3 To test whether the increased levels of NADPH improved the P3HB production, the strains
4 MG1655Δ*gapA::gapN*/pTrc*gapN* and MG1655/pTrc*gapN* were transformed with plasmid
5 pPHB_{Av}. The strains were characterized in fermenter batch cultures with mineral medium
6 supplemented with 10 g L⁻¹ of glucose. The PHB synthesis was induced with 10 μM IPTG when
7 the cultures reached a cell mass of 0.42 g/L (1 OD₆₀₀).

8 As shown in Figures 3 and 4, the specific accumulation of P3HB (g_{PHB}/g_{DCW}) in strains
9 MG1655Δ*gapA::gapN*/pTrc*gapN*/pPHB_{Av} and MG1655/pTrc*gapN*/pPHB_{Av} was 1.38 and 1.84-
10 fold, respectively, than the wild type strain; also resulting in the increase of the P3HB yield on
11 glucose (g_{PHB}/g_{GLC}), 1.17 and 1.39-fold, respectively, (Fig. 4). According to this values and based
12 on the theoretical maximum yield of P3HB on glucose (0.48 g_{PHB}/g_{GLC}), increased levels of
13 NADPH allowed to channel 55 and 68 % of the carbon to P3HB, respectively, which are 17 and
14 39 % higher than values attained with the wild type strain (Fig. 4). These results indicate that the
15 production of NADPH using the Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) stimulates the synthesis of
16 P3HB in *E. coli*.

17 Despite measured intracellular levels of NADPH were higher for strain
18 MG1655Δ*gapA::gapN*/pTrc*gapN*/pPHB_{Av} this strain accumulates 30% less polymer than strain
19 MG1655/pTrc*gapN*/pPHB_{Av}. This behavior correlates with the loss of carbon due to the acetic acid
20 synthesis, which is 2 times higher in strain MG1655Δ*gapA::gapN*/pTrc*gapN*/pPHB_{Av} than in
21 strain MG1655/pTrc*gapN*/pPHB_{Av} (Fig. 3). Previously we demonstrated that cells from strain
22 MG1655Δ*gapA::gapN*/pTrc*gapN* has low NADH and ATP levels (32), this energy deficiency can
23 be accentuated by expressing plasmids for the production of heterologous protein (Diaz- Ricci and

1 Hernandez 2000), and it is likely that the increased synthesis of acetic acid by the AckA–Pta
2 pathway could mitigate part of the ATP deficiency in this strain.

3

4 P3HB production with *ackA-pta*⁻ strains

5

6 To prevent carbon loss and increase the pool of acetyl-CoA, we decided to eliminate the
7 production of acetic acid by disrupting the *ackA-pta* operon into the chromosome of strains
8 MG1655Δ*gapA::gapN* and MG1655. The mutants MG1655Δ*gapA::gapN* Δ*ackA-pta* and
9 MG1655Δ*ackA-pta* were transformed with plasmids pTregapN and pPHBA_v. However, the mutant
10 MG1655Δ*gapA::gapN* Δ*ackA-pta* was unable to grow in the presence of one or both plasmids, it
11 is suggested that the high energy demand cannot be mitigated in the absence of a functional AckA-
12 Pta pathway. Moreover, it has been demonstrated that in *E. coli* Δ*pta* mutants the pyruvate
13 dehydrogenase complex is inhibited, this is one of the most important routes to generate NADH,
14 which is necessary to produce ATP (33). Consequently the mutant MG1655Δ*gapA::gapN* Δ*ackA-*
15 *pta* was discarded to test the production of P3HB.

16 Kinetic data of the strain MG1655Δ*ackA-pta* are shown in Table 2, this data indicate that, in
17 comparison with the wild type strain, there is a small decrease in μ and q_{GLC} , but the synthesis of
18 acetic acid was virtually eliminated. When the MG1655Δ*ackA-pta* mutant was transformed with
19 the plasmid pPHB_{Av} (MG1655Δ*ackA-pta*/pPHB_{Av}), the P3HB yield on glucose increased about 48
20 % compared to the wild strain (Fig. 4), and the cells accumulated up to 64 % of its dry weight as
21 P3HB (Figures 3 and 4). This facts indicates that by preventing the synthesis of acetic acid the
22 production of P3HB is improved to similar levels obtained with the strain MG1655/pTregapN,
23 which has increased levels of NADPH (Figures 3 and 4). Similar results were found in an *E. coli*

1 mutant with several deletions in the mixed acid pathways (15).

2 With the aim of combining the effects of increasing the intracellular levels (pools) of acetyl CoA
3 and NADPH, the strain MG1655 Δ *ackA-pta* was transformed with the plasmid pTregapN. The
4 strain MG1655 Δ *ackA-pta*/pTregapN showed a similar profile for growth, glucose consumption
5 and production of acetic acid to the parent strain MG1655 Δ *ackA-pta* (Table 2). Furthermore, the
6 strain MG1655 Δ *ackA-pta*/pTregapN possess both NAD⁺-GAPDH and NADP⁺-GAPDH
7 enzymatic activities (Table 2), which increases the NADPH/NADH ratio about 2-fold when
8 compared to the parent strain (Fig. 2). When the strain MG1655 Δ *ackA-pta*/pTregapN was
9 transformed with the plasmid pPHB_{Av} (MG1655 Δ *ackA-pta*/pTregapN/pPHB_{Av}) the P3HB yield
10 on glucose increased about 63 % relative to values obtained with the wild strain (and 12 % with
11 respect to the isogenic strain (Fig. 4), making the cells to t accumulate 84 % of its dry weight as
12 P3HB and reaching a conversion yield of P3HB on glucose of 73 % of the maximum theoretical
13 (Figures 3 and 4).

14

15 CONCLUSIONS

16 The results reported in this work, demonstrate that the production of NADPH using the Embden-
17 Meyerhoff-Parnas (EMP) stimulates the synthesis of Poly-3-hydroxybutyrate. Although the full
18 replacement of the native NAD⁺-GAPDH activity by the heterologous NADP⁺-GAPDH activity
19 increased the NADPH/NADH ratio 1.7-fold more than that levels in the strain with both enzymes,
20 the high acetic acid synthesis and probably the high energy demand limited the P3HB production.
21 However, the simultaneous production of NADPH and NADH during glycolysis and the removal
22 of the main acetic acid synthesis pathway increased the NADPH/NADH ratio and the acetyl-CoA
23 pool, improving 30 % the yield of the production of P3HB on glucose using minimal medium and

1 reaching a conversion yield of the carbon source into P3HB of 73 % of the maximum theoretical.

2

3 **Acknowledgements** We gratefully acknowledge Andrea del Carmen Díaz -Marcelín, María Jose
4 Alvarado, Mercedes Enzaldo, Ramón de Anda, Georgina Hernández-Chávez, Luz María Martínez,
5 José Utrilla and Adriana Longoria for their technical support during the process of the work. We
6 thank Daniel Segura for providing us with the Chromosomal DNA of *A. vinelandii*. This project
7 was supported by DGAPA/PAPIIT/UNAM Grant IT201414 and UC MEXUS-CONACYT
8 Collaborative Grant CN-12-581. SC-L held a scholarship from CONACyT.

9

10 **Competing interests** The authors declare that they have no conflict of interests.

11

12

13 **References**

- 14 1. **Shishatskaya EI, Volova TG, Gordeev S a, Puzyr a P.** 2005. Degradation of P(3HB) and
15 P(3HB-co-3HV) in biological media. Journal of biomaterials science. Polymer edition
16 **16:643–57.**
- 17 2. **Harding KG, Dennis JS, Von Blottnitz H, Harrison STL.** 2007. Environmental analysis
18 of plastic production processes: comparing petroleum-based polypropylene and
19 polyethylene with biologically-based poly-beta-hydroxybutyric acid using life cycle
20 analysis. Journal of biotechnology **130:57–66.**
- 21 3. **Chen G-Q.** 2009. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials
22 industry. Chemical Society reviews **38:2434–46.**
- 23 4. **Reinecke F, Steinbüchel A.** 2009. Ralstonia eutropha strain H16 as model organism for
24 PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting
25 biopolymers. Journal of molecular microbiology and biotechnology **16:91–108.**
- 26 5. **Pettinari MJ, Vázquez GJ, Silberschmidt D, Rehm B, Steinbüchel A, Méndez BS, Me**
27 **BS.** 2001. Poly (3-Hydroxybutyrate) Synthesis Genes in Azotobacter sp . Strain FA8 Poly
28 (3-Hydroxybutyrate) Synthesis Genes in Azotobacter sp . Strain FA8 **67.**
- 29 6. **Lütke-Eversloh T, Steinbüchel A.** 2004. Microbial polythioesters. Macromolecular
30 bioscience **4:166–74.**
- 31 7. **Madison LL, Huisman GW.** 1999. Metabolic Engineering of Poly (3-Hydroxyalkanoates
32): From DNA to Plastic Metabolic Engineering of Poly (3-Hydroxyalkanoates): From DNA
33 to Plastic **63.**

- 1 8. **Schubert P, Steinbüchel a, Schlegel HG.** 1988. Cloning of the *Alcaligenes eutrophus*
2 genes for synthesis of poly-beta-hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in
3 *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **170**:5837–47.
- 4 9. **Senior PJ DE.** 1961. *Proceedings of. Biochem J* **119**:38.
- 5 10. **Van Wegen RJ, Lee SY, Middelberg a P.** 2001. Metabolic and kinetic analysis of poly(3-
6 hydroxybutyrate) production by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and*
7 *bioengineering* **74**:70–80.
- 8 11. **Wang F, Lee SY.** 1997. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of
9 filamentation-suppressed recombinant *Escherichia coli*. *Applied and environmental*
10 *microbiology* **63**:4765–9.
- 11 12. **Tyo KEJ, Fischer CR, Simeon F, Stephanopoulos G.** 2010. Analysis of
12 polyhydroxybutyrate flux limitations by systematic genetic and metabolic perturbations.
13 *Metabolic engineering* **12**:187–95.
- 14 13. **Henderson R a, Jones CW.** 1997. Poly-3-hydroxybutyrate production by washed cells of
15 *Alcaligenes eutrophus*; purification, characterisation and potential regulatory role of citrate
16 synthase. *Archives of microbiology* **168**:486–92.
- 17 14. **Kessler B, Witholt B.** 2001. Factors involved in the regulatory network of
18 polyhydroxyalkanoate metabolism. *Journal of biotechnology* **86**:97–104.
- 19 15. **Jian J, Zhang S-Q, Shi Z-Y, Wang W, Chen G-Q, Wu Q.** 2010. Production of
20 polyhydroxyalkanoates by *Escherichia coli* mutants with defected mixed acid fermentation
21 pathways. *Applied microbiology and biotechnology* **87**:2247–56.
- 22 16. **Sauer U, Canonaco F, Heri S, Perrenoud A, Fischer E.** 2004. The soluble and membrane-
23 bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH
24 metabolism of *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* **279**:6613–9.
- 25 17. **Fuhrer T, Sauer U.** 2009. Different biochemical mechanisms ensure network-wide
26 balancing of reducing equivalents in microbial metabolism. *Journal of bacteriology*
27 **191**:2112–21.
- 28 18. **Kabir MM, Shimizu K.** 2003. Fermentation characteristics and protein expression patterns
29 in a recombinant *Escherichia coli* mutant lacking phosphoglucose isomerase for poly (3-
30 hydroxybutyrate) production. *Applied Microbiology and Biotechnology* **62**:244–55.
- 31 19. **Martínez I, Zhu J, Lin H, Bennett GN, San K-Y.** 2008. Replacing *Escherichia coli* NAD-
32 dependent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) with a NADP-dependent
33 enzyme from *Clostridium acetobutylicum* facilitates NADPH dependent pathways.
34 *Metabolic Engineering* **10**:352–359.
- 35 20. **Shi H, Nikawa J, Shimizu K.** 1999. Effect of modifying metabolic network on poly-3-
36 hydroxybutyrate biosynthesis in recombinant *Escherichia coli*. *Journal of bioscience and*
37 *bioengineering* **87**:666–77.
- 38 21. **Jung Y-M, Lee J-N, Shin H-D, Lee Y-H.** 2004. Role of *tktA* gene in pentose phosphate
39 pathway on odd-ball biosynthesis of poly-beta-hydroxybutyrate in transformant *Escherichia*
40 *coli* harboring *phbCAB* operon. *Journal of bioscience and bioengineering* **98**:224–7.
- 41 22. **Lim S-J, Jung Y-M, Shin H-D, Lee Y-H.** 2002. Amplification of the NADPH-related
42 genes *zwf* and *gnd* for the oddball biosynthesis of PHB in an *E. coli* transformant harboring
43 a cloned *phbCAB* operon. *Journal of bioscience and bioengineering* **93**:543–9.
- 44 23. **Kabir M. Shimizu K.** 2003. Gene expression patterns for metabolic pathway in *pgi*
45 knockout *Escherichia coli* with and without *phb* genes based on RT-PCR. *Journal of*
46 *Biotechnology* **105**:11–31.

- 1 24. **Sites JBCA**. 1971. Glyceraldehyde Phosphate Dehydrogenase of *Escherichia coli* :
2 STRUCTURAL AND CATALYTIC PROPERTIES Giuseppe D ' Alessio and John Josse
3 Phosphate Dehydrogenase of *Escherichia coli*.
- 4 25. **Eu RNAP, Charpentier B, Branlant C, I UDN, Les V, Cedex N**. 1994. The *Escherichia*
5 *coli* gapA Gene Is Transcribed by the Vegetative RNA Polymerase Holoenzyme Eur70 and
6 by the Heat Shock **176**:830–839.
- 7 26. **Iddar A, Valverde F, Assobhei O, Serrano A, The S**. 2005. Widespread occurrence of
8 non-phosphorylating dehydrogenase among gram-positive bacteria 251–258.
- 9 27. **Boyd DA, Cvitkovitch DG, Hamilton IANR**. 1995. Sequence , Expression , and Function
10 of the Gene for the Phosphate Dehydrogenase of *Streptococcus mutans* **177**:2622–2627.
- 11 28. **Nagradova NK**. 2001. Study of the properties of phosphorylating D-glyceraldehyde-3-
12 phosphate dehydrogenase. *Biochemistry. Biokhimiia* **66**:1067–76.
- 13 29. **Marchal S, Branlant G**. 2002. Characterization of the amino acids involved in substrate
14 specificity of nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from
15 *Streptococcus mutans*. *The Journal of biological chemistry* **277**:39235–42.
- 16 30. **Andersen KB, Von Meyenburg K**. 1980. Are growth rates of *Escherichia coli* in batch
17 cultures limited by respiration? *Journal of bacteriology* **144**:114–23.
- 18 31. **Vemuri GN, Altman E, Sangurdekar DP, Khodursky AB, Eiteman MA**. 2006.
19 Overflow Metabolism in *Escherichia coli* during Steady-State Growth : Transcriptional
20 Regulation and Effect of the Redox Ratio. *Applied and Environmental Microbiology*. **72**
21 (5):3653–3661.
- 22 32 **Centeno-Leija S, et al**. 2013. Metabolic and transcriptional response of *Escherichia coli*
23 with a NADP⁺-dependent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*.
24 *Antonie van Leeuwenhoek*. 104(6): 913-924. 2013..
- 25 33 **Castaño-Cerezo, et al**. 2009. An insight into the role of phosphotransacetylase (*pta*) and the
26 acetate/acetyl-CoA node in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*. 8(54)1-19
27

28

1 **FIGURE LEGENDS**

2 **Fig. 1.** Glycolysis pathway in wild type *E. coli* (solid arrows) and heterologous expression of
3 NADP⁺-dependent glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (*gapN*) and polyhydroxybutyrate
4 pathway (pointed arrow). Genes encoding enzymes are indicated by italics. *gapA*: NAD⁺-
5 dependent glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase; *pdh*: pyruvate dehydrogenase; *phbA*: β-
6 ketothiolase; *phbB*: NADPH-dependent reductase; *phbC*: PHB synthase. F1,6P: Fructose 1,6-
7 diphosphate; G1,3: Glyceraldehyde 3-phosphate; G3P: Glyceraldehyde 3-phosphate; PEP:
8 Phosphoenolpyruvate; TCA: Tricarboxylic acid cycle.

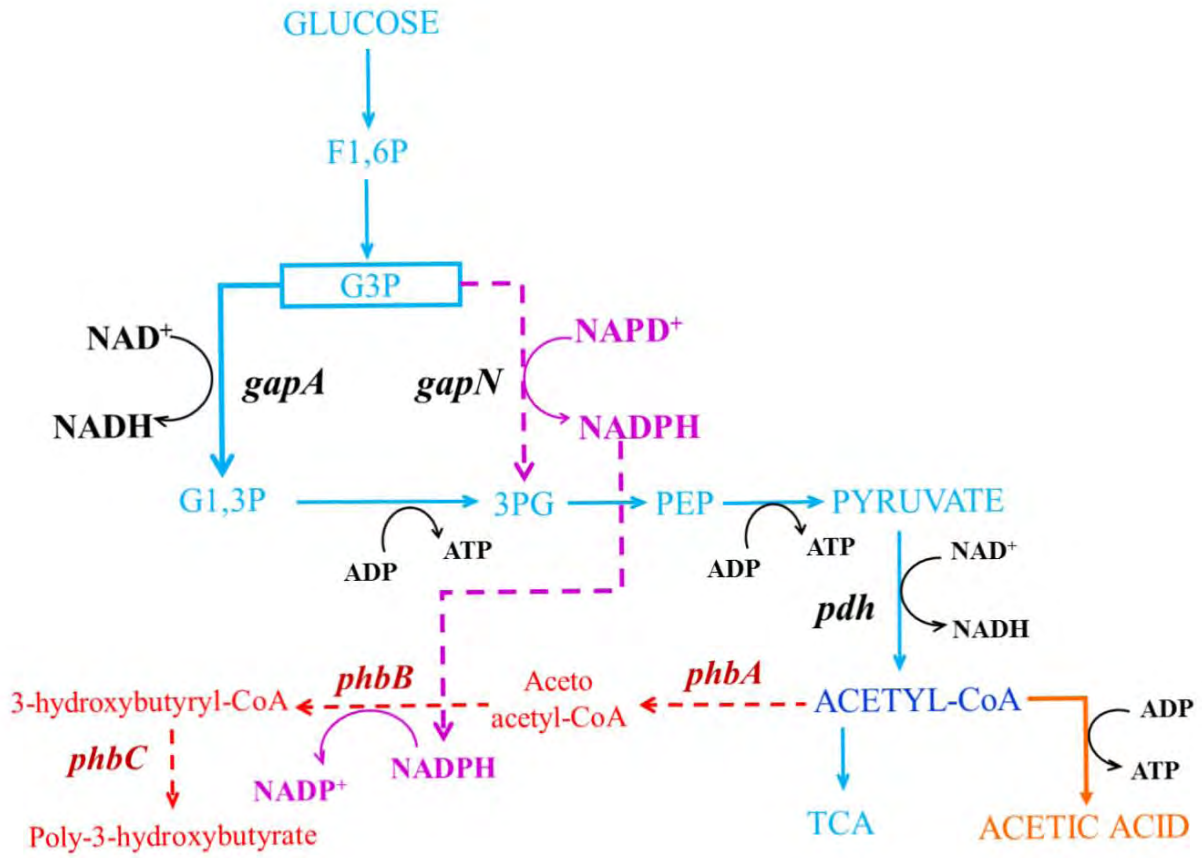
9 **Fig. 2.** NADPH/NADH ratios (mol/mol) of the strains MG1655/pPHB_{Av} (a),
10 MG1655Δ*gapA*::*gapN*/pTrc*gapN*/pPHB_{Av} (b), MG1655/pTrc*gapN*/pPHB_{Av} (c), MG1655Δ*ackA*-
11 *pta*/pPHB_{Av} (d) and MG1655Δ*ackA-pta*/pTrc*gapN*/pPHB_{Av} (e).

12 **Fig. 3.** Kinetic of biomass accumulation (a), glucose consumption (b) and acetic acid production
13 (c) during P3HB production of the strains MG1655/pPHB_{Av} (circles),
14 MG1655Δ*gapA*::*gapN*/pTrc*gapN*/pPHB_{Av} (squares), MG1655/pTrc*gapN*/pPHB_{Av} (triangles),
15 MG1655Δ*ackA-pta*/pPHB_{Av} (inverted triangles) and MG1655Δ*ackA-pta*/pTrc*gapN*/pPHB_{Av}
16 (diamonds).

17 **Fig. 4.** Yield of P3HB on cells (g_{P3HB}/g_{DCW}) and yield of P3HB on glucose (g_{P3HB}/g_{GLC}) of the
18 strains MG1655/pPHB_{Av} (a), MG1655Δ*gapA*::*gapN*/pTrc*gapN*/pPHB_{Av} (b),
19 MG1655/pTrc*gapN*/pPHB_{Av} (c), MG1655Δ*ackA-pta*/pPHB_{Av} (d) and MG1655Δ*ackA*-
20 *pta*/pTrc*gapN*/pPHB_{Av} (e).

21

1 Fig 1

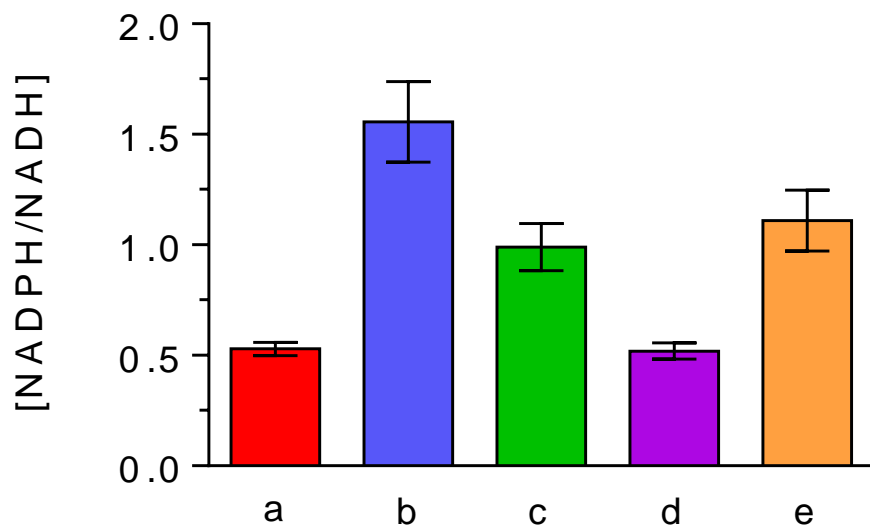


2

3

1 **Fig 2**

2



3

4

5

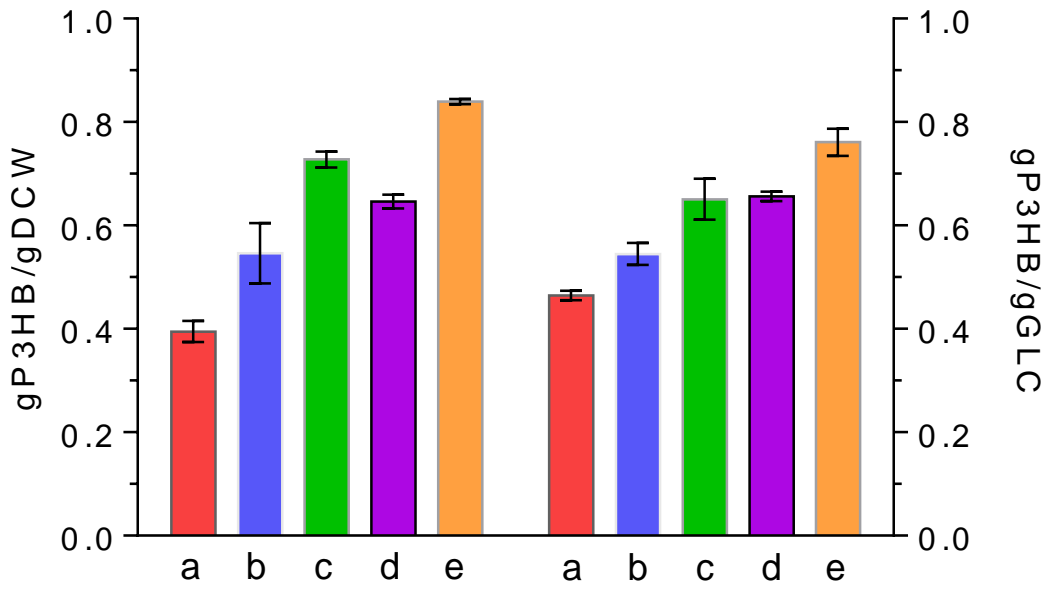
1 **Fig 3**

2

3

1 **Fig 4**

2



3

4

1 **Table 1.** Plasmids and primers used in this work. Restriction sites employed during plasmid
 2 construction are underlined. Sequences that flank the *ackA-pta* operon are indicated in bold case.
 3

Plasmid	Description	Source
pTrc99A	Designed for IPTG-inducible expression of proteins under hybrid <i>trp/lac</i> promoter. Amp ^r	(Amann et al. 1988)
pACYC184	Designed with p15A origin of replication to coexist in cells with plasmids of the ColE1 compatibility group (e.g., pBR322, pUC19). Tc ^r and Cm ^r	(Chang and Cohen 1978)
pTrcgapN	pAcyc184 derivative with a constitutive <i>trc</i> promoter and <i>gapN</i> gene	(Centeno-Leija et al. 2013)
pPHB _{Av}	Designed for IPTG-inducible expression of <i>phbBAC</i> operon from <i>A. vinelandii</i>	This study

Primer	Sequence ^a
phb1	5'GGAATTCCGGATGAGCAATCAACGAATTGCAT 3'
phb2	5'CCCAAGCTTGGGTCAGCCTTTCACGTAACGGCCT 3'
ackAF ^b	5'GGTACTTCCATGTCGAGTAAGTTAGTACTGGTTCTG AACTGCGGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG 3'
ptaR ^b	5'CTGCGGATGATGACGAGATTACTGCTGCTGTGCAGA CTGAATCGCCATATGAATATCCTCCTTAG 3'
p1	5'GCAGCCTGAAGGCCTAAGTAG 3'
p2	5'CGGGCATTGCCCATCTTCTTG 3'

4 ^a Restriction sites employed during plasmid construction are underlined.

5 ^b Sequences that flank ~50pb upstream and downstream of *ackA* and *pta* gen are indicated in bold

6
7

Table 2 Growth parameters of glucose fermenter batch cultures in mineral medium of the strains MG1655, MG1655 Δ gapA::gapN/pTregapN, MG1655/pTregapN, MG1655 Δ ackA-pta and MG1655 Δ ackA-pta/pTregapN.

Strain	μ (h ⁻¹)	q_s	$Y_{ACE/GLC}$	NAD ⁺ -GAPDH	NADP ⁺ -GAPDH
		(mmol _{Glc} g _{DCW} ⁻¹ h ⁻¹)	(mol _{ACE} mol _{GLC} ⁻¹)	Activity (IU/mg _{PROT})	Activity (IU/mg _{PROT})
MG1655	0.52 ± 0.01	7.04 ± 0.05	0.61 ± 0.07	0.522 ± 0.21	ND ^a
MG1655 Δ gapA::gapN/pTregapN	0.44 ± 0.01	5.24 ± 0.13	0.78 ± 0.02	ND ^a	0.937 ± 0.04
MG1655/pTregapN	0.50 ± 0.01	7.57 ± 0.03	0.63 ± 0.05	0.531 ± 0.14	0.788 ± 0.07
MG1655 Δ gapA::gapN Δ ackA-pta /pTregapN	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b
MG1655 Δ ackA-pta	0.45 ± 0.01	6.63 ± 0.02	0.16 ± 0.00	0.562 ± 0.07	ND ^a
MG1655 Δ ackA-pta/pTregapN	0.43 ± 0.01	6.72 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.545 ± 0.03	0.866 ± 0.11

^aActivity not detected

^bNot determined

ANEXO 3

En el presente anexo se muestra el resumen de la participación en el “113th General Meeting of American Society of Microbiology” realizado en “Denver, Colorado, USA” del 18 al 22 de Mayo del 2013.

METABOLIC RESPONSE IN *Escherichia coli* TO REPLACING NAD⁺-DEPENDENT GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE WITH A NADP⁺-DEPENDENT ENZYME FROM *Streptococcus mutans*.

Sara Centeno-Leija, José Utrilla, Noemí Flores, Guillermo Gosset and Alfredo Martínez*.

Background: Although the absence of NAD⁺-dependent Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase activity (GAPDH) is lethal to *E. coli* growth, NAD⁺-GAPDH function can be restored through NADP⁺-dependent GAPDH heterologous overexpression. Here, is reported the metabolic effects when NAD⁺-GAPDH gene (*gapA*) is replaced with NADP⁺-GAPDH gene from *Streptococcus mutans* (*gapN*) in *E. coli* chromosome. **Methods:** *E. coli* MG1655 and MG1655 Δ *gapA::gapN* derivative (MG Δ *gapA::gapN*) were kinetically, metabolically and transcriptionally characterized from cells grown in fermentors containing 700 mL mineral medium-glucose (10g/L, 37°C, pH 7, 250 rpm, 1 vvm) equipped with dissolved oxygen control and measurement of CO₂ and O₂ in the exit gas stream. The same were analyzed by qPCR, Flux Balance Analysis (COBRA Toolbox v 2.0) and intracellular cofactors were enzymatically assayed. **Results:** The specific GAPDH activity from MG Δ *gapA::gapN* strain was 2.6 times lower than GAPDH activity from parental strain. Kinetic data indicated that the specific growth and glucose consumption rates decreased 5 times in comparison with parental strain. Likewise, acetic acid was the main product in parental strain while in MG Δ *gapA::gapN* strain was null, indicating a lower glycolytic flux. The relative carbon flux into the TCA increases 250% and in agree with that, CO₂ yield increased 1.7 times and key genes of TCA were overexpressed. NADPH levels increased 300% while NADH levels decreased 25%. In order to avoid NADPH excess, the carbon flux distribution through PPP decreased and transhydrogenase UdhA was overexpressed substantially. Low NADH levels had negative effect over growth and since the NADH is coupled to the respiratory chain to provide ATP, key genes expression of the respiratory chain and oxidative phosphorylation (*ndh*, *cydA*, *cyoB*, and *atpA*) was seriously affected. Accordingly, the specific oxygen uptake rate and the ATP/ADP ratio decreased 4.7 and 3.5-fold respectively. **Conclusion:** This work realised a quantitative analysis about the metabolic response to replacement both of one of the key enzyme of central metabolism and the NAD(P)H turnover alterations.

ANEXO 4

En el presente anexo se muestra el resumen de la participación en el “12th International Symposium on Genetics of Industrial realizado en “Cancún, Quintana Roo, México” del 23 al 28 de Junio del 2013.

THE PRODUCTION OF IMPROVING POLYHYDROXYBUTYRATE IN *E. coli* BY INCREASING THE NADPH POOL AND ACETYL-CoA AVAILABILITY

Sara Centeno-Leija, José Utrilla-Carreri, Alberto Rodríguez, Guillermo Gosset and Alfredo Martínez

ANEXO 5

En el presente anexo se muestra el resumen de la participación en el “XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería” realizado en Querétaro, Querétaro, México. Del 19 al 24 de Junio de 2011.

PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE POLIHIDROXIBUTIRATO EN *Escherichia coli*

Centeno-Leija Sara, Huerta-Beristain Gerardo, Alvarado-López María José, Gosset-Lagarda Guillermo, Martínez -Jiménez Alfredo.