



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

EFFECTO DE LA COUTILIZACIÓN DE GLUCOSA Y ACETATO EN LA PRODUCCIÓN DE POLI-3-HIDROXIBUTIRATO EN CEPAS DE *Escherichia coli* PTS⁻ MODIFICADAS EN EL NODO PEP-PYR

T E S I S

QUE PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

CHRISTIAN HANNALI CUEVAS SOLIS

TUTOR PRINCIPAL:

DR. FRANCISCO G. BOLIVAR ZAPATA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

INTEGRANTES DE COMITÉ TUTORAL:

DRA. ELDA GUADALUPE ESPIN OCAMPO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

DR. VICTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLAN
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

CUERNAVACA, MORELOS 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

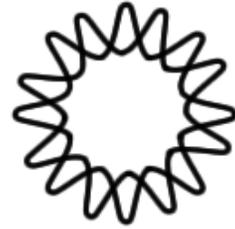


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Instituto de Biotecnología

EL presente trabajo se realizó en el departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Francisco G. Bolívar Zapata.

Para la realización del mismo se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de su Programa de Becas para Estudios de Posgrado.



Miembros del Jurado

Presidente: Dr. Edmundo Calva Mercado

Secretario: Dr. Daniel Genaro Segura González

Vocal: Dr. Alfredo Martínez Jiménez

Vocal: Dr. Carlos Peña Malacara

Vocal: Dr. Juan Carlos Sigala Alanis

Señor, haz de mi un instrumento de tu paz.

Porque la crisis en la vida no siempre es mala, son pruebas que hay que saber superar y seguir adelante, luchar por lo que se ama.

Dedicada con amor:

A mis mejores maestros, mis padres.

Pues educar no es dar carrera para vivir, sino temprar el alma para las dificultades de la vida...

A mi gran artista.

Por pintar escenas extraordinarias en mi vida. Gracias hermanito.

A la familia Cuevas-Solís.

Son mi ejemplo de fortaleza y lucha.

A la memoria de mis abuelos Alejandro y Cecilia... La muerte no nos roba a los seres amados.

Al contrario, nos los guarda y nos los inmortaliza en el recuerdo.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, el Dr. Francisco G. Bolívar Zapata por darme la oportunidad de ser parte de su grupo.

A los miembros del comité tutorial por sus valiosos comentarios y aportaciones al proyecto.

- Dra. E. Guadalupe Espín Ocampo
- Dr. Víctor H. Bustamante Santillán

Por su asesoría para llevar a cabo este proyecto de la mejor manera y por sus invaluable consejos como amigos:

- Dr. Juan Carlos Sigala Alanis
- M. en C. Andrea Sabido Ramos
- M. en C. César A. Aguilar Martínez

Por el apoyo técnico y metodológico:

- Dr. Adelfo Escalante Lozada
- M. en C. Georgina Hernández Chávez
- M. en C. Ramón de Anda Herrera
- Q.I. Luz María Martínez Mejía
- C. D. Mercedes Enzaldo Cruz
- Sra. Aurelia González Guzmán

A la Dra. Adriana Longoria Hernández y Dra. Sara G. Centeno Leija por su colaboración para el desarrollo del método de cuantificación del polímero y asesoría durante la realización del proyecto.

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

Contenido

Introducción	1
Antecedentes	3
Sistema de fosfotransferasas (PTS)	3
Generación y características de las cepas PTS ⁻ (PB11 y PB12)	5
Caracterización de las cepas PTS ⁻ bloqueadas en la interconversión de PEP-PYR durante la cointilización de glucosa y acetato	8
Polihidroxialcanoatos (PHA's)	12
Estructura	12
Clasificación	13
Propiedades	13
Poli-3-hidroxi-butirato (P3HB)	14
Biosíntesis y regulación de P3HB en <i>Azotobacter vinelandii</i>	15
Producción de PHA's por fermentación bacteriana	17
Ingeniería de vías metabólicas para la producción de P3HB en <i>E. coli</i>	19
Justificación	21
Hipótesis	22
Objetivo general	23
Objetivos específicos	23
Materiales y métodos	24
Trasformación de <i>E. coli</i> por electroporación	25
Condiciones de cultivo	26
Estrategia de cultivo	26
Determinación de glucosa y acetato	28
Determinación de la biomasa celular	28
Determinación del contenido de P3HB	28

Resultados y discusión	31
Estrategia de cultivo	31
Evaluación de las cepas PB11 sobre su capacidad de producción de P3HB bajo diferentes condiciones de cultivo.....	35
Condición de producción: Lavado y resuspensión de las células en medio M9 con glucosa y acetato.....	35
Condición de producción: Lavado y resuspensión de las células en medio M9 con glucosa	39
Condición de producción: Lavado y resuspensión de las células en medio M9 con acetato de sodio.....	41
Evaluación de las cepas PB12 sobre su capacidad de producción de P3HB bajo diferentes condiciones de cultivo.....	45
Condición de producción: Lavado y resuspensión de las células en medio M9 con glucosa y acetato.....	47
Condición de producción: Lavado y resuspensión de las células en medio M9 con glucosa	51
Condición de producción: Lavado y resuspensión de las células en medio M9 con acetato	54
Efecto del crecimiento sobre la producción de P3HB.....	57
Conclusiones	58
Perspectivas	60
Bibliografía	62
Anexos	71
Anexo 1: Estandarización del protocolo para la extracción, metanólisis y derivatización del P3HB	71
Anexo 2: Producción científica.....	79

Índice de figuras

Figura 1. Componentes del sistema PTS. Descripción de la cascada de fosforilación para el transporte e internalización de glucosa en <i>E. coli</i> .	3
Figura 2. Mecanismos de represión catabólica.	5
Figura 3. Representación de las vías metabólicas involucradas en el nodo PEP-PYR-OAA.	9
Figura 4. Estructura química de los PHA's.	12
Figura 5. Organización y modelo de regulación del operón <i>phbBAC</i> de <i>A. vinelandii</i> .	17
Figura 6. Metabolismo central de carbono de las cepas de <i>E. coli</i> PTS ⁻ <i>pykAF-ppsA-</i> y vía heteróloga de biosíntesis de P3HB de <i>A. vinelandii</i> expresada en plásmido.	22
Figura 7. Cinética de crecimiento de las cepas PB11 y derivadas.	34
Figura 8. Gráficas de aumento de biomasa, consumo de glucosa-acetato y porcentaje de acumulación de P3HB de las cepas PB11 y derivadas.	37
Figura 9. Biomasa residual generada por las cepas PB11 y derivadas durante la coutilización de glucosa y acetato.	38
Figura 10. Gráficas de aumento de biomasa, consumo de glucosa y porcentaje de acumulación de P3HB de las cepas PB11 y derivadas.	40
Figura 11. Biomasa residual generada por las cepas PB11 y derivadas durante la utilización de glucosa como única fuente de carbono.	41
Figura 12. Gráficas de aumento de biomasa, consumo de acetato y porcentaje de acumulación de P3HB de las cepas PB11 y derivadas.	43
Figura 13. Biomasa residual generada por las cepas PB11 y derivadas durante la utilización de acetato como única fuente de carbono.	44
Figura 14. Cinética de crecimiento de las cepas derivadas de PB12.	47
Figura 15. Biomasa residual generada por las cepas derivadas de PB12 durante la coutilización glucosa-acetato.	49

Figura 16. Gráficas de aumento de biomasa, consumo de glucosa-acetato y porcentaje de acumulación de P3HB de las cepas derivadas de PB12.	50
Figura 17. Biomasa residual generada por las cepas derivadas de PB12 durante la utilización de glucosa como única fuente de carbono.	52
Figura 18. Gráficas de aumento de biomasa, consumo de glucosa y porcentaje de acumulación de P3HB de las cepas derivadas de PB12.	53
Figura 19. Biomasa residual generada por las cepas derivadas de PB12 durante la utilización de acetato como única fuente de carbono.	54
Figura 20. Gráficas de aumento de biomasa, consumo de acetato y porcentaje de acumulación de P3HB de las cepas derivadas de PB12.	56
Figura 21. Depolimerización del P3HB.	72
Figura 22. Cromatogramas de antes y después de realizar las modificaciones al protocolo para la extracción, metanólisis y derivatización del P3HB.	76
Figura 23. Curva de calibración para la cuantificación de P3HB en cromatógrafo de gases.	78

Índice de tablas

Tabla 1. Propiedades generales de diferentes PHA's.	14
Tabla 2. Propiedades de los PHA's comparadas con Polipropileno.	15
Tabla 3. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio.	24
Tabla 4. Vectores utilizados en este estudio.	25
Tabla 5. Horas de cultivo en la adaptación de las cepas PB11 y derivadas.	26
Tabla 6. Horas de cultivo en la que se agregó IPTG a las cepas PB11 y derivadas.	27
Tabla 7. Velocidades específicas de crecimiento de las cepas PB11 y derivadas.	32
Tabla 8. Comparación de la acumulación de P3HB de las cepas PB11 y derivadas utilizando glucosa-acetato.	36
Tabla 9. Comparación de la acumulación de P3HB de las cepas PB11 y respectivas derivadas utilizando glucosa como única fuente de carbono.	39
Tabla 10. Comparación de la acumulación de P3HB de las cepas PB11 y derivadas utilizando acetato de sodio como única fuente de carbono.	42
Tabla 11. Velocidades específicas de crecimiento de las cepas PB12 y derivadas.	46
Tabla 12. Comparación de la acumulación de P3HB de las cepas derivadas de PB12 utilizando glucosa-acetato.	48
Tabla 13. Comparación de la acumulación de P3HB de las cepas derivadas de PB12 utilizando glucosa como única fuente de carbono.	51
Tabla 14. Tratamientos para la extracción de P3HB.	54

Resumen

El nodo Fosfoenolpiruvato (PEP) – Piruvato (PYR) – Oxaloacetato (OAA) ha sido blanco para realizar estrategias de ingeniería de vías metabólicas. En este sentido, nuestro grupo ha desarrollado cepas de *E. coli* que carecen del sistema PTS (PB11 y PB12) y derivadas que tienen un bloqueo en la interconversión de PEP-PYR tras realizar inactivaciones en los genes *pykAF - ppsA*. En estas cepas no existe represión catabólica ejercida por la glucosa, por lo que son capaces de cointilizar diferentes sustratos aun en presencia de dicho carbohidrato. Se ha demostrado que el uso de glucosa y acetato como fuentes de carbono aumenta la disponibilidad de PEP en estas derivadas. Por tanto, es probable que exista también un aumento en la disponibilidad de Acetil-CoA. Para demostrar esta hipótesis, se expresó la vía de síntesis de poli-3-hidroxi-butirato (P3HB) de *A. vinelandii* en las cepas PB11, PB12 y derivadas con inactivaciones en los genes *pykAF - ppsA*. El P3HB es un plástico biodegradable cuya ruta de biosíntesis está regulada por la disponibilidad de Acetil-CoA y NADPH. Así, el consumo de glucosa permitiría la generación de NADPH y el consumo de acetato generaría el Acetil-CoA.

Se realizaron cultivos en matraces en dos etapas: primero, las cepas se crecieron en medio mínimo con la mezcla glucosa-acetato sin la expresión del operón *phbBAC*. Esto, para favorecer la generación de biomasa. Posteriormente, en la segunda etapa, se realizó la inducción del operón y las cepas se lavaron y reinocularon en medio con: 1) glucosa-acetato, 2) glucosa y 3) acetato. Se determinó el peso seco celular, el contenido de P3HB y consumo de sustratos. Paralelamente se adecuó el método de cuantificación del biopolímero por cromatografía de gases. A partir de los resultados obtenidos, se encontró que las cepas que presentan modificaciones en el nodo PEP-PYR, no son aptas para la producción del biopolímero, pues los porcentajes de acumulación fueron bajos o nulos (>10%). Sin embargo, la cointilización de sustratos si mejoró la producción de P3HB, ya que el porcentaje de acumulación más alto (28%), se obtuvo en la cepa PB11 (PTS⁻) durante el cultivo en ambas fuentes de carbono.

Introducción

La ingeniería de vías metabólicas (IVM) tiene como objetivo la modificación de microorganismos que se puedan utilizar como biocatalizadores para la producción rentable de moléculas de interés industrial, además se tiene el potencial para producir dichos metabolitos a partir de materiales de bajo costo que se encuentran fácilmente disponibles. Por tanto, teniendo como meta la sobreproducción de una molécula específica, el primer paso a resolver es conocer qué vías se pueden utilizar para producir el compuesto requerido. Una vez que las posibles vías se han establecido habrá que analizar la forma en que operan las rutas metabólicas, su topografía, la cinética de las reacciones que la componen, la forma en que se regulan e identificar los cuellos de botella, para así poder realizar modificaciones racionales que nos permitan alcanzar el objetivo deseado (Keasling, 2010; Woolston *et al.*, 2013).

En nuestro laboratorio se trabaja en la modificación y caracterización del metabolismo central de carbono de *Escherichia coli*, de manera que el conocimiento derivado de estos estudios nos permita redirigir dicho metabolismo hacia la biosíntesis de compuestos de interés. Ejemplo de ello son los compuestos aromáticos; por lo tanto, con el objetivo de incrementar la disponibilidad de Fosfoenolpiruvato (PEP), uno de los precursores de esta vía, se han desarrollado cepas de *E. coli* carentes del sistema de fosfotransferasas (PTS). Dichas cepas denominadas PB11 y PB12 son capaces de coutilizar diferentes sustratos en presencia de glucosa (Flores N *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 2008; Sabido *et al.*, 2013) debido a la ausencia del fenómeno de represión catabólica que ejerce dicho carbohidrato (Postma *et al.*, 1993). Bajo esta premisa, en el grupo de trabajo, se han realizado estudios de coutilización de sustratos, observando que la mezcla glucosa-glicerol en cepas derivadas de PB12, incrementan el rendimiento total de aromáticos con respecto a los sustratos sencillos (Martínez *et al.*, 2008).

Posteriormente, se generaron cepas derivadas de PB11 y PB12 con inactivaciones en los genes *pykA* (piruvato cinasa II), *pykF* (piruvato cinasa I) y *ppsA* (fosfoenolpiruvato sintetasa),

con el objetivo de entender los cambios en la fisiología celular durante la cointilización de glucosa y acetato (Sabido *et al.*, 2013). Dichas enzimas (PykA, PykF y PpsA) están involucradas en el nodo PEP - PYR – OAA. Este nodo es importante para la aplicación de IVM, ya que sirve como punto de control para la distribución de flujo de carbono en el metabolismo central (Sauer y Eikmanns, 2005). Finalmente, se determinó el efecto de las modificaciones en el nodo PEP-PYR-OAA sobre la disponibilidad de PEP, evaluando la capacidad de las cepas PTS⁻ (PB11 Y PB12) y derivadas para producir compuestos aromáticos durante la cointilización de sustratos.

Debido al bloqueo que existe en la interconversión de PEP – PYR en las derivadas PTS⁻ *pykAF ppsA⁻*, se evaluó la posible acumulación de Acetil-CoA (AcCoA) al cointilizar glucosa y acetato. Esto mediante la producción de un compuesto modelo, el Poli-3-hidroxi-butirato (P3HB). Ya que su biosíntesis está regulada principalmente por las concentraciones de NADPH y AcCoA, intermediarios que pueden obtenerse del metabolismo central de carbono de *E.coli*. De tal manera que la glucosa se utilice para la generación de ATP y poder reductor [NAD(P)H] y parte del acetato se metabolice directamente al P3HB.

Antecedentes

Sistema de fosfotransferasas (PTS)

El sistema de fosfotransferasas para el transporte de carbohidratos dependiente de PEP, es el sistema más importante para el transporte de azúcares en muchas bacterias. Este sistema es responsable de la internalización de distintos carbohidratos (glucosa, manosa, fructosa, entre otros) (Plumbridge, 2002). Está involucrado tanto en el transporte, como en la fosforilación de dichos azúcares, así como en la regulación de diversas vías metabólicas (Postma *et al.*, 1993).

La composición básica del sistema PTS es similar en muchas especies. Está formado por dos componentes citoplásmicos generales, EI y HPr, los cuales son comunes a todos los carbohidratos. La especificidad a la internalización de carbohidratos está dada por el componente EII, por lo que las bacterias poseen diferentes componentes EII. *E. coli* posee al menos 15 diferentes complejos. EL complejo EII específico para glucosa, consiste de dos proteínas distintas $EIIA^{Glc}$ y $EIIBC^{Glc}$ (Figura 1), este último posee un dominio hidrofílico en contacto con el citoplasma y uno hidrofóbico integral de membrana (Deutscher *et al.*, 2006).

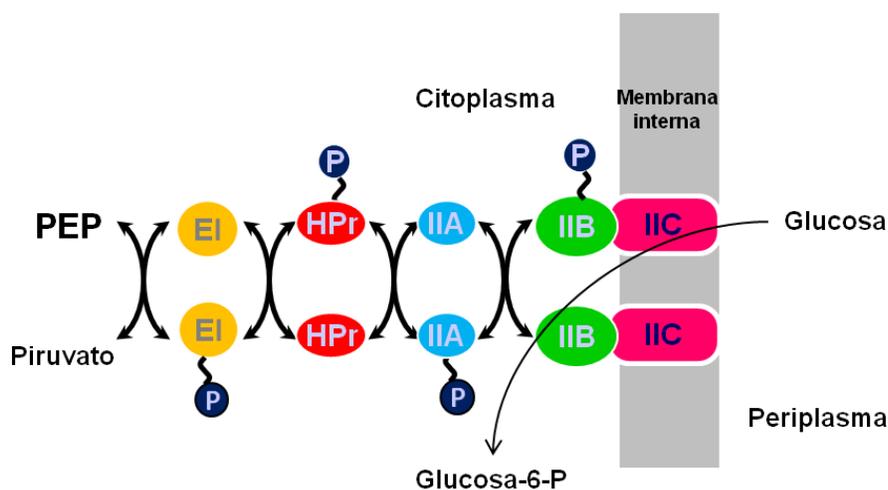


Figura 1. Componentes del sistema PTS. Descripción de la cascada de fosforilación para el transporte e internalización de glucosa en *E. coli* (Modificado de Deutscher *et al.*, 2006).

Los componentes de PTS están codificados por el operón *ptsHlcr* y *ptsG*. El primero codifica para las dos proteínas comunes en PTS, EI (*ptsI*) y HPr (*ptsH*); y para el componente EIIGlc (*crr*); mientras que el segundo codifica para el componente EIIGlc (*ptsG*).

Este sistema desempeña un papel importante de regulación genética y enzimática en cuanto a la utilización de otros azúcares (Plumbridge, 2002). En *E. coli*, la glucosa es la fuente de carbono preferida, y mientras ésta se encuentre presente en cantidades suficientes en el medio de cultivo, reprimirá la síntesis de las enzimas necesarias para el transporte y metabolismo de azúcares menos favorables energéticamente. Dicho fenómeno se conoce como represión catabólica, sin embargo el término puede ser ampliado al definir represión catabólica como el efecto inhibitorio que producen ciertas fuentes de carbono sobre la expresión genética y/o la actividad de las enzimas involucradas en el catabolismo de otras fuentes de carbono (Deutscher *et al.*, 2006).

En particular EIIGlc, es responsable de numerosas funciones de regulación, ya sea modulando la actividad de la enzima Adenilato Ciclasa (Cya) o por exclusión del inductor.

En ausencia de glucosa EIIGlc se encuentra en su forma fosforilada, ésta activa a la enzima Cya favoreciendo así la síntesis de cAMP, este último se une a la proteína CRP formando un complejo que es responsable de regular una gran cantidad de genes catabólicos. En contraparte, si EIIGlc se encuentra desfosforilada evita la internalización o metabolismo de otros azúcares inhibiendo la función de sus respectivos transportadores o permeasas cuando se une a estos. En consecuencia, las bacterias carecen del inductor para los operones correspondientes, por lo que dicho fenómeno fue llamado exclusión del inductor (Deutscher *et al.*, 2006) (Figura 2).

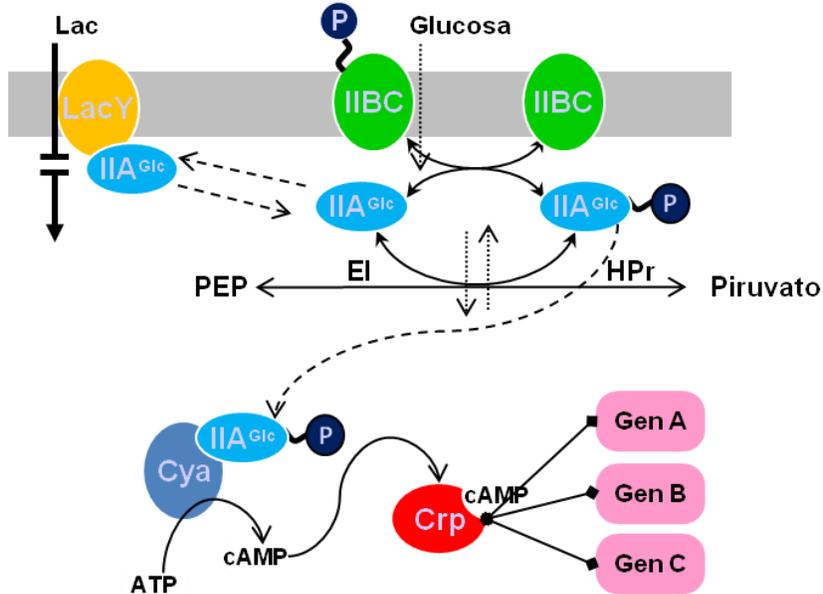


Figura 2. Mecanismos de represión catabólica. La figura muestra que cuando $EIIA^{Glc}$ no se encuentra fosforilado, este bloquea la internalización de lactosa, uniéndose a su respectivo transportador (LacY). En la ausencia de glucosa, y presencia de PEP, las proteínas de PTS se encuentran principalmente fosforiladas, por lo que el componente $EIIA^{Glc} \sim P$ activa a la adenilato ciclasa (Cya), favoreciendo la síntesis de cAMP, el cual se une a CRP, dicho complejo ejerce control transcripcional sobre ciertos genes (Modificado de Deutcher *et al*, 2006).

Generación y características de las cepas PTS^- (PB11 y PB12)

Con el fin de obtener cepas capaces de incrementar la disponibilidad de PEP intracelular y redirigir el flujo de carbono hacia la producción de compuestos aromáticos, se generó a partir de una cepa silvestre de *E. coli* (JM101) una cepa carente del sistema PTS: a la que se denominó PB11 ($\mu = 0.1 \text{ h}^{-1}$). Ésta no fue adecuada para los propósitos iniciales de producción de aromáticos debido a que su velocidad específica de crecimiento (μ) disminuyó un 86% respecto a su cepa parental al crecerla en glucosa como única fuente de carbono (Flores N *et al.*, 1996). La nueva cepa (PB11) a su vez, se sometió a un proceso de presión selectiva por crecimiento rápido en glucosa, dicho proceso se llevó a cabo en dos fases: Un cultivo en lote, seguido de un cultivo continuo. La cepa PB11 se creció en un reactor de 1 L con medio M9 con glucosa a 2 g / L durante 100 horas; lo que permitió la selección de mutantes espontáneas, las cuales se sometieron posteriormente a un cultivo

continuo aumentando gradualmente la tasa de dilución del quimiostatato de 0.4 h^{-1} a 0.8 h^{-1} , durante este proceso se aislaron cepas con diferentes velocidades específicas de crecimiento. De estas mutantes se obtuvo la cepa PB12 ($\mu = 0.42 \text{ h}^{-1}$) (Flores N *et al.*, 1996) la cual recuperó su velocidad específica de crecimiento en un 60% respecto a la cepa silvestre. A esta cepa se le realizaron varios estudios de caracterización debido a sus altos rendimientos en la producción de aromáticos (Báez *et al.*, 2004).

Los estudios de caracterización de las cepas PTS⁻ muestran que la cepa PB12 utiliza una permeasa de galactosa (GalP) para internalizar glucosa y una glucocinasa (Glk) para fosforilar el carbohidrato una vez dentro de la célula. Adicionalmente, se demostró que ambos genes se encuentran sobreexpresados en dicha cepa (Flores N *et al.*, 2005).

Mediante un análisis de resonancia magnética nuclear utilizando glucosa marcada radiactivamente, se demostró que en la cepa PB12 existe un incremento en el flujo de carbono hacia la vía glicolítica y una disminución en el flujo hacia la ruta de las pentosas fosfato (Flores S *et al.*, 2002). Por su parte, la cepa PB11 dirige mayor flujo hacia la ruta de pentosas fosfato y ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). Asimismo, el flujo de piruvato a AcCoA se duplicó en ambas cepas PTS⁻ respecto a la cepa silvestre (Flores S *et al.*, 2002).

Los análisis transcriptómicos por RT-PCR realizados al crecer las cepas PTS⁻ en glucosa como única fuente de carbono muestran que la cepa PB12 presenta la mayor parte de los genes glicolíticos sobreexpresados, a diferencia de la cepa parental JM101 y PB11. Tal es el caso de *glk*, *pgi*, *gapA*. Además, genes involucrados en la vía gluconeogénica como *acs*, *actP*, *sfcA*, *ppsA*, *fbp*, *pfkB*, etc., se sobreexpresan, tanto en PB11 como PB12, en comparación con la cepa silvestre. Esto sugiere que los metabolismos glicolítico y gluconeogénico coexisten en las cepas PB11 y PB12 (Flores N. *et al.*, 2005).

En otro análisis transcriptómico realizado a las cepas PTS⁻, pero ahora al crecer en acetato como única fuente de carbono, se observó que las cepas PB12 y PB11 expresan a un nivel

menor ciertos genes gluconeogénicos (*acs*, *actP*, *maeB* y *pckA*) con respecto a la cepa silvestre. Esto podría explicarse debido a que ambas derivadas PTS⁻ al crecer en acetato como única fuente de carbono, presentan menores niveles de AMPc y se sabe que la expresión de los genes *actP*, *acs* y *maeB* depende de la activación del complejo CRP-AMPc. Dichos resultados sugieren que la disminución de la μ de las cepas PB11 ($\mu=0.21 \text{ h}^{-1}$) y PB12 ($\mu=0.13 \text{ h}^{-1}$) respecto a la cepa silvestre ($\mu=0.28 \text{ h}^{-1}$) al crecer en acetato como única fuente de carbono, se debe a la menor expresión de estos genes (Sigala *et al.*, 2009). Sin embargo, el nivel de AMPc presente en la cepa PB11 parece ser suficiente para expresar los genes gluconeogénicos y crecer mejor que PB12 en acetato (Sigala *et al.*, 2009).

Debido a la eliminación del componente EIIA^{Glc} del operón PTS, el cual es el principal responsable de la represión catabólica por glucosa, las derivadas PTS⁻ pueden utilizar simultáneamente fuentes de carbono secundarias en presencia de glucosa, como es el caso de acetato en las cepas PB11 y PB12 (Flores N. *et al.*, 2005; Sabido *et al.*, 2013) y arabinosa, gluconato y glicerol en la cepa PB12 (Martínez *et al.*, 2008).

Los análisis de secuenciación del genoma completo de la cepa PB12 muestran que posee 23 mutaciones puntuales no sinónimas y 16 mutaciones sinónimas; además existe una deleción cromosomal de 10, 328 pares de bases que comprende 12 genes contiguos (*rppH*, *ygdT*, *mutH*, *ygdQ*, *ygdR*, *tas*, *lplT*, *aas*, *omrA*, *omrB*, *ptsP* y *galR*) (Aguilar *et al.*, 2012).

Se ha propuesto que la razón de la recuperación del crecimiento rápido en glucosa que muestra la cepa PB12 respecto a su cepa parental PB11, se debe principalmente a la deleción de los genes *rppH*, *galR* y *mutH* (localizados en el fragmento perdido) y probablemente a la mutación puntual en el gen *arcB* (Aguilar *et al.*, 2012).

El gen *galR* codifica para la proteína represora del regulón gal, donde se encuentra la permeasa de galactosa (GalP), principal sistema de transporte de glucosa en las derivadas PTS⁻. Por tanto, la falta del represor favorece la expresión de GalP, lo que implica una mejor

capacidad de transporte de dicho carbohidrato en la cepa PB12. Por otro lado, el gen *mutH* codifica para una endonucleasa que forma parte del complejo MutHLS el cual es un sistema de reparación “mismatch” del ADN; su ausencia es probablemente responsable de una alta tasa de mutagénesis, por lo que la falta de este gen pudo generar varias mutaciones que resultaran en la selección de cepas con un mejor crecimiento en glucosa como lo es la PB12. Finalmente, el gen *rppH* codifica para una pirofosfohidrolasa que inicia la degradación de los ARNm hidrolizando su extremo 5'-trifosfato, preparándolos para su posterior degradación por la RNAsa E. Esto provoca un aumento en los niveles de transcritos consecuencia del incremento de la vida media de los ARNm's, resultando en un mejoramiento de los flujos glicolítico y de TCA, así como una mejor capacidad respiratoria con respecto a la cepa parental (Aguilar *et al.*, 2012).

En cuanto al gen *arcB*, que codifica para la proteína sensora cinasa del sistema de dos componentes ArcA/B, se propone que la mutación ocurrida disminuye su actividad defosforilante sobre ArcA-P, por lo tanto existe un incremento en la actividad represora de dicha proteína sobre los genes que regula, los cuales están relacionados a metabolismo respiratorio, reduciendo los niveles de transcripción de este grupo de genes así como la carga metabólica que esto implica en la cepa PB12, favoreciendo el crecimiento de esta derivada (Aguilar *et al.*, 2012).

Caracterización de las cepas PTS- bloqueadas en la interconversión de PEP-PYR durante la coutilización de glucosa y acetato

El nodo PEP-PYR-OAA es un blanco de importancia para aplicar estrategias de IVM, ya que éste representa la conexión entre glicólisis, gluconeogénesis y TCA. Éste comprende una serie de reacciones (Figura 3) que sirven como punto de control para la distribución de flujo de carbono en el metabolismo central (Sauer y Eikmanns, 2005). Por tanto, con el objetivo de comprender los cambios en la fisiología celular en respuesta a inactivaciones en dicho nodo, se han generado diversas mutantes afectadas en genes implicados ya sea en el metabolismo glicolítico (*pykA*, *pykF* y *ppc*) o en el metabolismo gluconeogénico (*pckA*, *ppsA*, *maeB* y *sfcA*).

Estos análisis investigan los efectos provocados en el metabolismo glicolítico o los efectos generados en el ciclo de TCA de manera independiente durante el crecimiento en una sola fuente de carbono. En consecuencia en el trabajo de Sabido-Ramos y colaboradores (2013) se propuso un estudio donde se evaluó la viabilidad del funcionamiento de los metabolismos glicolítico y gluconeogénico en cepas PTS⁻ (PB11 Y PB12) que presentan un bloqueo en la interconversión de PEP-PYR tras realizar deleciones en los genes *pykA*, *pykF* y *ppsA*. En dicho trabajo se estudiaron los efectos fisiológicos que ocurren en respuesta a dichas modificaciones, analizando las vías y genes involucrados en el consumo de glucosa y acetato.

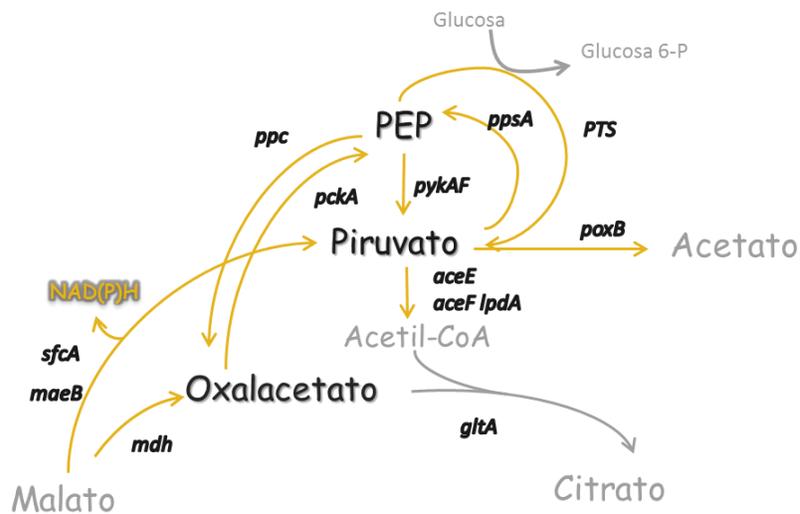


Figura 3. Representación de las vías metabólicas involucradas en el nodo PEP-PYR-OAA.

Los estudios de caracterización realizados por Sabido-Ramos (2013) mostraron que la cepa PB11 *pykAF ppsA*⁻ fue incapaz de crecer en glucosa o acetato como única fuente de carbono. En relación al crecimiento en glucosa se propone que la enzima Ppc (PEP carboxilasa) no dirige suficiente flujo de PEP a OAA, el cual no puede condensarse con AcCoA. Este último metabolito también estaría limitado, pues no existiría flujo de PYR a AcCoA y en consecuencia el ciclo de TCA estaría disminuido o nulificado. Por otro lado, la incapacidad de crecer en acetato se debe probablemente a los bajos niveles de PEP. El cual no se estaría generando a través de PpsA, que en conjunto con las enzimas málicas conforman la principal

vía gluconeogénica. Esto aunado a la incapacidad de PckA de producir dicho metabolito a partir de OAA.

El análisis de transcripción por RT-qPCR de la cepa PB11 *pykAF ppsA⁻* en comparación a su cepa parental PB11, evidenció una disminución en los niveles transcripcionales de genes glicolíticos como *pfkB*, *fbaB*, *gapC-2*, *pgk*, así como los genes del complejo de la Piruvato deshidrogenasa (*pdh*). Esto correlaciona con una disminución en la tasa de consumo de glucosa de la cepa mutante respecto a la cepa parental. En relación al metabolismo de acetato, los perfiles transcriptómicos señalaron que genes gluconeogénicos como *actP*, *acs*, *maeB*, *sfcA* y *pckA* y genes del *shunt* de glioxalato: *aceA*, *aceB* y *aceK* presentan niveles de expresión menor. De igual manera la mayoría de los genes de TCA disminuyeron su nivel de expresión en esta cepa, esto como consecuencia de una expresión menor del gen *crp* que actúa como regulador positivo de estos genes través del complejo CRP-AMPc, impidiendo la activación de los mismos.

En cuanto a la cepa PB12 *pykAF ppsA⁻* se refiere, ésta fue capaz de crecer en glucosa o acetato como únicos sustratos. El aumento en la capacidad de consumo de glucosa que muestra la cepa PB12 en comparación a PB11 ayuda a elucidar el por qué las inactivaciones en los genes *pykAF-ppsA* no afectó el crecimiento de esta mutante con respecto a su cepa parental PB12 al crecerla en este carbohidrato. Los datos sugieren que la enzima Ppc se encuentra activa y es necesaria para el crecimiento de la mutante, mientras que el *shunt* de glioxalato y las enzimas málicas son relevantes para producir PYR. Finalmente el AcCoA estaría siendo generado a través de la ruta PoxB-AckA-Pta-Acs. Respecto al uso de acetato como única fuente de carbono, la inactivación de *pykAF* y *ppsA* no afecta su μ en comparación con la cepa parental ($\mu = 0.15 \text{ h}^{-1}$). Se propone que la eliminación de la actividad de las piruvato cinasas, eliminó un ciclo futil de carbono detectado previamente en la cepa parental PB12 al crecerse en acetato, resultando en una mejor adaptación en este sustrato. Además, el PEP necesario para el crecimiento se estaría generando a partir de la descarboxilación del OAA a través de la enzima PckA.

En los análisis de los niveles de expresión por RT-qPCR realizados a la cepa PB12 *pykAF ppsA⁻* respecto a la cepa PB12, se observó que la expresión del gen *ppc* se mantuvo sin cambios en la cepa mutante en comparación con su cepa parental, sugiriendo que Ppc aún conecta glicólisis y TCA. Por otra parte, existe una sobreexpresión de los genes del operón *aceBAK, glcB, poxB* y *sfcA*. La sobreexpresión del *shunt* de glioxalato y de la enzima málica *sfcA* sugiere un redireccionamiento del flujo de carbono hacia la síntesis de PYR, el cual es drenado por PoxB que genera acetato y posteriormente AcCoA. Por último, el nivel de transcrito de *pckA* no cambia en la mutante respecto a la PB12, por lo tanto es probable que exista flujo de carbono entre glicólisis y TCA.

Adicionalmente para comprobar si existía un incremento en la disponibilidad de PEP en las derivadas *ptsHIcrr⁻ pykAF ppsA⁻* se evaluó su capacidad para producir aromáticos en la mezcla glucosa – acetato. Para ello se integró una enzima evolucionada corismato mutasa preferato deshidratasa resistente a inhibición alostérica, interrumpiendo a la vez el gen *tyrR* (regulador dual involucrado en la represión genes presentes en la vía común de síntesis de aromáticos y tirosina).

Las cepas resultantes fueron transformadas con un plásmido que contiene el gen *aroG^{fbr}*, que codifica para una versión insensible a inhibición alostérica de la DAHP sintasa, primera enzima de la vía de síntesis de aromáticos y el gen *tktA*, que codifica para una transaldolasa que participa en la vía de las pentosas fosfato, con la finalidad de evitar una limitación por eritrosa-4-fosfato (E4P) (Balderas- Hernández *et al.*, 2009). Los resultados indicaron que la mejor cepa fue la PB12 *pykAF ppsA⁻ tyrR⁻ pheA^{ev2+}/pJLBaroG^{fbr}tktA*, la cual incrementó su rendimiento total de aromáticos 4 veces comparada con su control (PB12), representando un 65% con respecto al máximo rendimiento total y alcanzando un título de aromáticos de 8 g/L.

Polihidroxicanoatos (PHA's)

Estructura

Los PHA's son polímeros lineales compuestos de (R)-3-hidroxiácidos en los cuales el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace tipo éster con el grupo hidroxilo del monómero siguiente (Figura 4). El grupo R puede variar desde un grupo metil (C1) hasta un tridecil (C13). Otros hidroxiácidos pueden ser incorporados, como lo son hidroxicanoatos halogenados o aromáticos (Thakor *et al.*, 2006).

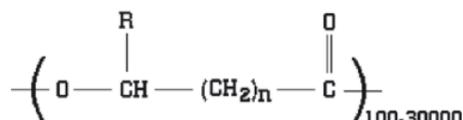


Figura 4. Estructura química de los PHA's (Tomado de L.R. Castilho *et al.*, 2009).

Los PHA's son producidos por diversos géneros de eubacterias y archa (Li R *et al.*, 2007 [b]; Zinn *et al.*, 2001). Este biopolímero es utilizado como material de reserva nutricional (fuente de carbono) y energética (fuente de equivalentes de reducción), llegando a representar más del 90% del peso seco celular (Anderson y Dawes, 1990; Madison y Huisman, 1999). En la mayoría de los casos, su biosíntesis tiene lugar en condiciones de desbalance nutricional o estrés ambiental, aunado a un exceso de fuente de carbono (Senior y Dawes, 1973). Cuando el nutriente limitante es restablecido o desaparece la condición de estrés, el PHA puede ser degradado por depolimerasas intracelulares y subsecuentemente los monómeros pueden metabolizarse como fuente de carbono y energía (Zinn *et al.*, 2001).

Dichos biopolímeros se almacenan en forma de gránulos localizados en el citoplasma (Khanna y Srivastava, 2005). La estructura, propiedades fisicoquímicas, composición monomérica y el número y tamaño de gránulos varían dependiendo del organismo productor (Suriyamongkol *et al.*, 2007).

Clasificación

Estructuralmente los PHA pueden dividirse de acuerdo al número de carbonos y el tipo de unidades presentes en cada monómero (Keshavarz y Roy, 2010). Por su número de carbonos se clasifican en:

- PHA'S de cadena corta (SCL) que tienen de 3 a 5 átomos de carbono; estos poseen propiedades cercanas a los plásticos convencionales y algunos ejemplos son Poli(3-hidroxi-butirato) (P3HB) y Poli(4-hidroxi-butirato) (P4HB).
- PHA'S de cadena media (MCL), cuyos monómeros tienen de 6 a 14 átomos de carbono. Entre estos se encuentran el poli(3-hidroxi-hexanoato) (PHH) y poli(3-hidroxi-octanoato) (PHO).

También pueden existir copolímeros formados por la polimerización de más de un tipo de monómero, estos pueden contener 3-hidroxi-butirato (HB), 3-hidroxi-valerato (HV), 3-hidroxi-hexanoato (HH) o 4-hidroxi-butirato (4HB). La mayoría de los microorganismos sintetizan SCL-PHA'S formados principalmente por unidades de 3HB o MCL-PHA'S formados por unidades de 3-hidroxi-octanoato (HO) y 3-hidroxi-decanoato (HD). Dada la amplia variedad de microorganismos productores, se han identificado aproximadamente 150 constituyentes diferentes de los PHA's (Suriyamongkol *et al.*, 2007).

Propiedades

Las propiedades de los PHA's varían considerablemente según el tipo y contenido de monómeros presentes en el biopolímero. Algunas propiedades de diferentes PHA's se enlistan en la siguiente tabla:

Tabla 1. Propiedades generales de diferentes PHA's.

Polímero	Temperatura de fusión (°C)	Módulo de Young (Gpa)	Elongación al quiebre (%)
P(3HB)	175 - 180	3.5 - 4	3 - 8
P(3HB-co-3HV) 20% mol HV	145	1.2	50 – 100
P(3HB-co-4HV) 10% mol HV	159	n.a.	242
P(3HO)	61	n.a.	300 – 450

Fuente: (Castilho *et al.*, 2009)

El Poli-3-hidroxibutirato tiene un elevado potencial para reemplazar la producción de plásticos a base de petroquímicos debido a que es biodegradable, biocompatible y la materia prima para su producción proviene de recursos renovables. Este biopolímero es inerte, insoluble en agua, no se ve afectado por la humedad y es indefinidamente estable en el aire (Ojumu *et al.*, 2004). Sin embargo, estos pueden ser degradados a dióxido de carbono y agua en sistemas aerobios o metano en sistemas anaerobios (Castilho *et al.*, 2009). El tiempo de degradación puede variar desde unos meses hasta años, lo cual dependerá de su cristalinidad, composición y accesibilidad de las enzimas depolimerizantes de los microorganismos. Así mismo, depende de las condiciones ambientales tales como temperatura, nivel de humedad, pH y disponibilidad de nutrientes (Madison y Huisman, 1999; Castilho *et al.*, 2009; Suriyamongkol *et al.*, 2007).

Poli-3-hidroxibutirato (P3HB)

El primer tipo de PHA descrito fue el P3HB poli(β -hidroxibutirato) o poli(3-hidroxibutirato). Maurice Lemoigne, director del Laboratorio de Fermentación del Instituto Pasteur (Lille, Francia), aisló y caracterizó por primera vez entre 1923 y 1927 las inclusiones de P3HB presentes en *Bacillus megaterium* (Suriyamongkol *et al.*, 2007).

Dentro de la célula, el P3HB se encuentra en un estado semilíquido amorfo. Después de ser extraído utilizando solventes orgánicos, el polímero adquiere un aspecto cristalino,

rígido y algo quebradizo, teniendo pobres cualidades elásticas (Madison y Huisman, 1999; Agus *et al.*, 2006).

El poli-3-hidroxi-butirato pertenece al grupo de los polímeros de cadena corta. Entre sus características se destaca su regular cristalinidad (70%), lo que lo vuelve duro y quebradizo. Es importante mencionar que sus propiedades físicas están fuertemente influenciadas por el peso molecular del mismo, en general éstas son similares a las del polipropileno (Tabla 2). Además destaca su biodegradabilidad sin producir desechos tóxicos y su biocompatibilidad (Madison y Huisman, 1999; Ahmann y Dorgan, 2007).

Tabla 2. Propiedades de los PHA's comparadas con Polipropileno

Parámetro	P3HB	P(HB-co-HV)	Polipropileno
T m* (°C)	179	150	170
T g** (°C)	2	-2	-10
Cristalinidad (%)	70	56	60

Los polímeros son P3HB [poli(3-hidroxi-butirato)] y P(HB-co-HV) poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato). Fuente: (Thakor *et al.*, 2006). * Temperatura de fusión ** Temperatura de transición vítrea.

El P3HB tiene diversas aplicaciones, en la industria del embalaje para la fabricación de empaques. En el área médica como material para implantes y matriz para la liberación de fármacos. Por otro lado, el P3HB hidrolizado en su forma de metil-éster puede mezclarse un 10% con el etanol para aumentar su poder calorífico. Mientras que en la industria química sus monómeros se pueden utilizar como precursores para la síntesis de antibióticos y otros productos (Khanna y Srivastava, 2005; Chen GQ, 2009).

Biosíntesis y regulación de P3HB en *Azotobacter vinelandii*

Azotobacter vinelandii es una bacteria Gram negativa, aerobia obligada, presente en el suelo capaz de fijar nitrógeno. Dicha bacteria experimenta un proceso de diferenciación morfológica para formar quistes resistentes a la desecación y producir un poliéster

intracelular denominado Poli-3-hidroxi-butirato (Segura y Espín, 1998). La biosíntesis de P3HB en especies de *Azotobacter* comienza con la condensación de dos moléculas de AcCoA para formar acetoacetyl-CoA, reacción catalizada por una β -cetotiolasa; después una Acetoacetyl-CoA reductasa dependiente de NADPH reduce el Acetoacetyl-CoA a β -hidroxi-butiril-CoA, el cual es polimerizado por una P3HB sintasa para generar el poliéster Poli-3-hidroxi-butirato (Manchak y Page, 1994; Segura *et al.*, 2000).

Los genes que codifican para las enzimas involucradas en la vía de síntesis de P3HB están organizados en el operón *phbBAC* que incluye: la β -cetotiolasa (*phbA*), la Acetoacetyl-CoA reductasa (*phbB*) y una PHB sintasa (*phbC*) (Peralta-Gil *et al.*, 2002).

La biosíntesis de P3HB en *Azotobacter* se encuentra regulada transcripcional y post-traduccionalmente. La regulación se ve reflejada principalmente a nivel enzimático, en donde se presenta un control alostérico por la enzima β -cetotoliasa. Durante el crecimiento bajo condiciones no limitantes, el AcCoA se dirige principalmente al ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) generando altas concentraciones de Coenzima A (CoASH), la cual inhibe la actividad de la β -cetotiolasa y por consiguiente la biosíntesis del polímero. Esta inhibición se elimina cuando la bacteria se encuentra en condiciones de limitación de oxígeno y en presencia de un exceso de fuente de carbono, ya que existe un incremento en los niveles de NAD(P)H que inhiben la actividad de las enzimas citrato sintasa e isocitrato deshidrogenasa, lo que provoca una disminución en el flujo de carbono hacia TCA y por tanto un aumento en la relación Acetyl-CoA/CoASH que permite dar inicio a la síntesis de P3HB (Senior y Dawes, 1973; Manchak y Page, 1994).

Además del control alostérico antes mencionado, otros sistemas de regulación están involucrados. La transcripción del operón *phbBAC* es iniciada por dos promotores superpuestos pB1 y pB2. La proteína PhbR activa la transcripción del operón a través del promotor pB1. Mientras que la transcripción usando el promotor pB2 es dependiente del factor RpoS. Incluso la transcripción misma de *phbR* inicia de dos promotores pR1 y pR2, este

último dependiente de RpoS también. Por tanto se ha propuesto el siguiente modelo de regulación: durante el crecimiento exponencial existe una baja transcripción del operón *phbBAC* debido a la ausencia de RpoS, que interacciona directamente con el operón, y por las bajas concentraciones del activador PhbR, cuya transcripción también depende parcialmente de este factor sigma. Una vez en fase estacionaria, el incremento en los niveles de RpoS y por lo tanto en los niveles de P3HBR estimulan la transcripción del operón *phbBAC* (Figura 5) (Peralta-Gil M *et al.*, 2002; Galindo *et al.*, 2007).

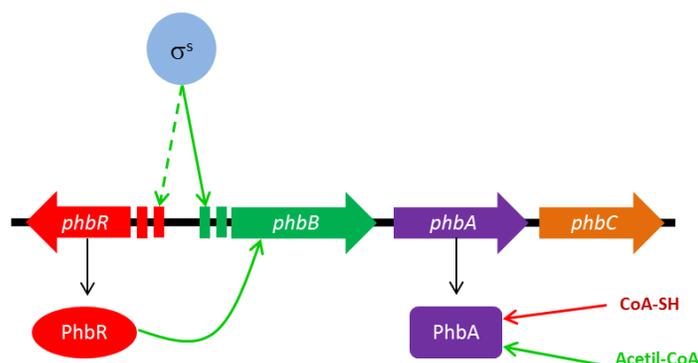


Figura 5. Organización y modelo de regulación del operón *phbBAC* de *A. vinelandii*. Las flechas verdes indican regulación positiva, las flechas rojas representan regulación negativa, mientras que las líneas punteadas significan mecanismos de regulación desconocidos (Modificado de Galindo *et al.*, 2007).

Producción de PHA's por fermentación bacteriana

Entre los más de 300 microorganismos que se conoce sintetizan PHA's, solo unos cuantos han sido empleados para la producción. Estos incluyen a *Alcaligenes eutrophus* (*Cupriavidus necator*) *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans* y algunos metilotrofos. Éstos han sido seleccionados, principalmente, porque pueden cultivarse a altas densidades celulares con un alto porcentaje de acumulación en períodos de tiempo relativamente cortos (Lee SY, 1996; Madison y Huisman, 1999; Thakor *et al.*, 2006).

Las bacterias usadas para la producción de PHA's pueden dividirse en dos grupos de acuerdo a las condiciones de cultivo necesarias para iniciar su biosíntesis:

- El primer grupo requiere la limitación de algún nutriente, como lo son N, P, K, O, Mg o S para la biosíntesis eficiente del PHA en presencia de un exceso de fuente de carbono. Algunos ejemplos son *Cupriavidus necator* y *P. oleovorans*.
- El segundo grupo no requiere la limitación de algún nutriente y pueden acumular polímero durante el crecimiento, entre éstos se encuentra *A. latus*, *A. vinelandii* UWD, *A. vinelandii* OP, *A. vinelandii* OPN, *A. vinelandii* OPNA y algunas cepas recombinantes de *E. coli*. (Manchak y William, 1994; Lee SY, 1996; Wang y Lee, 1997[a]; Khanna y Srivastava, 2005; García *et al.*, 2014).

La estrategia de fermentación más utilizada para la producción de PHA's es el cultivo en lote alimentado (Fed-Batch). Para el caso de las bacterias pertenecientes al primer grupo, a menudo se realiza un cultivo en dos etapas; una primera fase de generación de biomasa donde no existe limitación de nutrientes y una segunda fase donde se realiza la limitación para permitir una síntesis eficiente del polímero. La concentración celular a la cual se lleva a cabo la limitación es fundamental para lograr una acumulación adecuada, ya que si ésta se lleva a cabo demasiado tarde, pese a que la concentración celular sea alta, el porcentaje de acumulación puede ser bajo, por tanto la concentración final del biopolímero será baja. Por otro lado si ésta se aplica muy "temprano" puede existir una baja concentración celular que, pese a que el porcentaje de acumulación sea alto, la concentración del biopolímero se verá disminuida debido a la poca concentración celular (Lee SY, 1996; Keshavarz y Roy, 2010).

Referente a las bacterias pertenecientes al segundo grupo, el elemento más importante a considerar para lograr un proceso adecuado para la biosíntesis de PHA's es la composición del medio de alimentación y la forma en que éste se adicionará al cultivo. Fuentes complejas de nitrógeno pueden añadirse para incrementar la concentración celular así como la acumulación del biopolímero. Es esencial tener en cuenta que el crecimiento y la acumulación deben estar balanceados para evitar una incompleta acumulación o una finalización prematura del cultivo con una baja densidad celular (Lee SY, 1996).

Ingeniería de vías metabólicas para la producción de P3HB en *E. coli*

Cepas de *E. coli* se han considerado fuertes candidatas para la producción de P3HB debido a que poseen varias ventajas sobre los productores naturales, entre ellas: i) que su fisiología, bioquímica y genética estén bien estudiados; ii) la existencia de diferentes plásmidos y mutantes disponibles para la manipulación genética; iii) las estrategias de cultivos de alta densidad y metodologías recombinantes están bien establecidos; iv) su rápido crecimiento en diversos medios de cultivo y el uso de diferentes fuentes de carbono; v) se facilita el proceso de purificación y vi) debido a que naturalmente no producen P3HB, no contienen vías de degradación del mismo (Lee *et al.*, 1994; Madison y Huisman, 1999; Jung IL *et al.*, 2005; Khanna y Srivastava, 2005; Tyo *et al.*, 2010).

La primera vía metabólica para la producción de SCL-PHA's en *E. coli* se estableció clonando y expresando el operón *phb*. Algunos microorganismos utilizados como donadores de los genes necesarios para la biosíntesis de P3HB incluyen a *Cupriavidus necator* (Kim *et al.*, 1992), *Alcaligenes latus* (Choi *et al.*, 1998), *Streptomyces aureofaciens* (Mahishi *et al.*, 2003), *Azotobacter sp.* FA8 (Nikel *et al.*, 2005) y *Cupriavidus taiwanensis* (Chien *et al.*, 2010) por mencionar algunos.

La biosíntesis de P3HB en *E. coli* no requiere la limitación de un nutriente en específico, pero si es dependiente en gran medida de la cantidad disponible de AcCoA, metabolito esencial para el crecimiento y precursor para iniciar la formación del biopolímero. Algunas estrategias utilizadas para manipular la poza de dicho metabolito incluyen la eliminación de algunas vías que compiten por éste de manera directa o indirecta, como lo es la conformada por los genes *pta-ackA* (Miyake *et al.*, 2000) o *poxB* (Kang *et al.*, 2010), ambas vías se utilizan para la generación de acetato.

Por otro lado el cofactor NADPH es crucial para la biosíntesis de P3HB, ya que esta vía es dependiente del mismo. Entre las estrategias implementadas para suplir eficientemente este cofactor, están la adición de aminoácidos o ácido oleico cuando la fermentación se lleva a

cabo en un medio de cultivo definido, ya que la biosíntesis de éstos consume “altas cantidades de NADPH (Lee SY *et al.*, 1995). En *E. coli* el NADPH puede ser generado por la vía de las Pentosas Fosfato en las reacciones catalizadas por la Glucosa-6P-deshidrogenasa, codificada por el gen *zwf* y 6-Fosfogluconato deshidrogenasa, codificada por el gen *gnd*. Se ha estudiado que la sobreexpresión de estos genes, promueve la producción de P3HB (Lim *et al.*, 2002). Por otro lado, la sobreexpresión de la transcetolasa (codificada por *tktA*) y la transaldolasa (*talA*), presentes en la vía no oxidativa de las PP, favorece el incremento en la acumulación del biopolímero (Jung YM *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2006). Finalmente se ha observado que la sobreexpresión de la NAD cinasa (*yjfB*), la cual cataliza la fosforilación de NAD a NADP (Li ZJ *et al.*, 2009), así como la sobreexpresión de la transhidrogenasa (*udhA*) que cataliza transferencia reversible entre NAD y NADP (Sánchez *et al.*, 2010), favorecen el incremento en la formación de P3HB.

Recientemente en nuestro grupo de trabajo, en el estudio realizado por Centeno-Leija, 2014, se generó una cepa de *E. coli* donde se mejoraron los niveles intracelulares de NADPH y la disponibilidad de AcCoA para incrementar la producción de P3HB. Esta cepa produce NADPH en la vía de Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) a través de la sobreexpresión de una enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP^+ perteneciente a *Streptococcus mutans*. A la par, se eliminó la vía de síntesis de ácido acético (*ackA-pta*). Se observó que el rendimiento de síntesis relativo al máximo teórico ($\text{g}_{\text{P3HB}}/\text{g}_{\text{GLC}}$) aumentó cerca del 63% con respecto a la cepa silvestre logrando que la célula acumulara hasta el 84% de su peso seco como polímero ($\text{g}_{\text{P3HB}}/\text{g}_{\text{DCW}}$).

Justificación

Ha sido reportado que la cointilización de fuentes de carbono es una estrategia útil para mejorar la biosíntesis de metabolitos de interés. Por tal motivo, cepas de *E. coli* carentes del sistema PTS, que no presentan represión catabólica por glucosa, permitirán evaluar el efecto del consumo simultáneo de sustratos sobre la producción de P3HB. El cual es un polímero biodegradable, biocompatible, con potencial para sustituir a los petroplásticos. Por otro lado, el nodo PEP-PYR-OAA es clave en la distribución del flujo de carbono hacia las diferentes rutas del metabolismo central, convirtiéndolo en un punto estratégico para realizar ingeniería de vías metabólicas con el fin de mejorar los procesos de producción biotecnológicos. Por tanto, cepas que tienen modificaciones genéticas a nivel de este nodo, pueden ser una plataforma útil para la producción de este biopolímero durante la cointilización de glucosa y acetato. Esto, partiendo de la idea de que el AcCoA derivado del metabolismo del acetato, se utilice en su mayor parte para la formación del biopolímero. Mientras que la glucosa se metabolice principalmente por la vía de las pentosas fosfato para obtener el NADPH usado para la biosíntesis de P3HB.

Hipótesis

Cepas de *E. coli* PTS⁻ (PB11 y PB12) *pykAF ppsA*⁻ que sobreexpresan el operón *phbBAC* de *A. vinelandii*, incrementarán el flujo de carbono hacia la síntesis de P3HB durante la cointilización de glucosa y acetato respecto a sus cepas parentales que no poseen dichas modificaciones. Al tener un bloqueo en la interconversión de PEP-PYR se espera que el AcCoA derivado del metabolismo del acetato se utilice en su mayor parte para la formación del biopolímero. Mientras que la glucosa, potencialmente se utilizará para obtener el NADPH requerido para la biosíntesis de P3HB. (Figura 6).

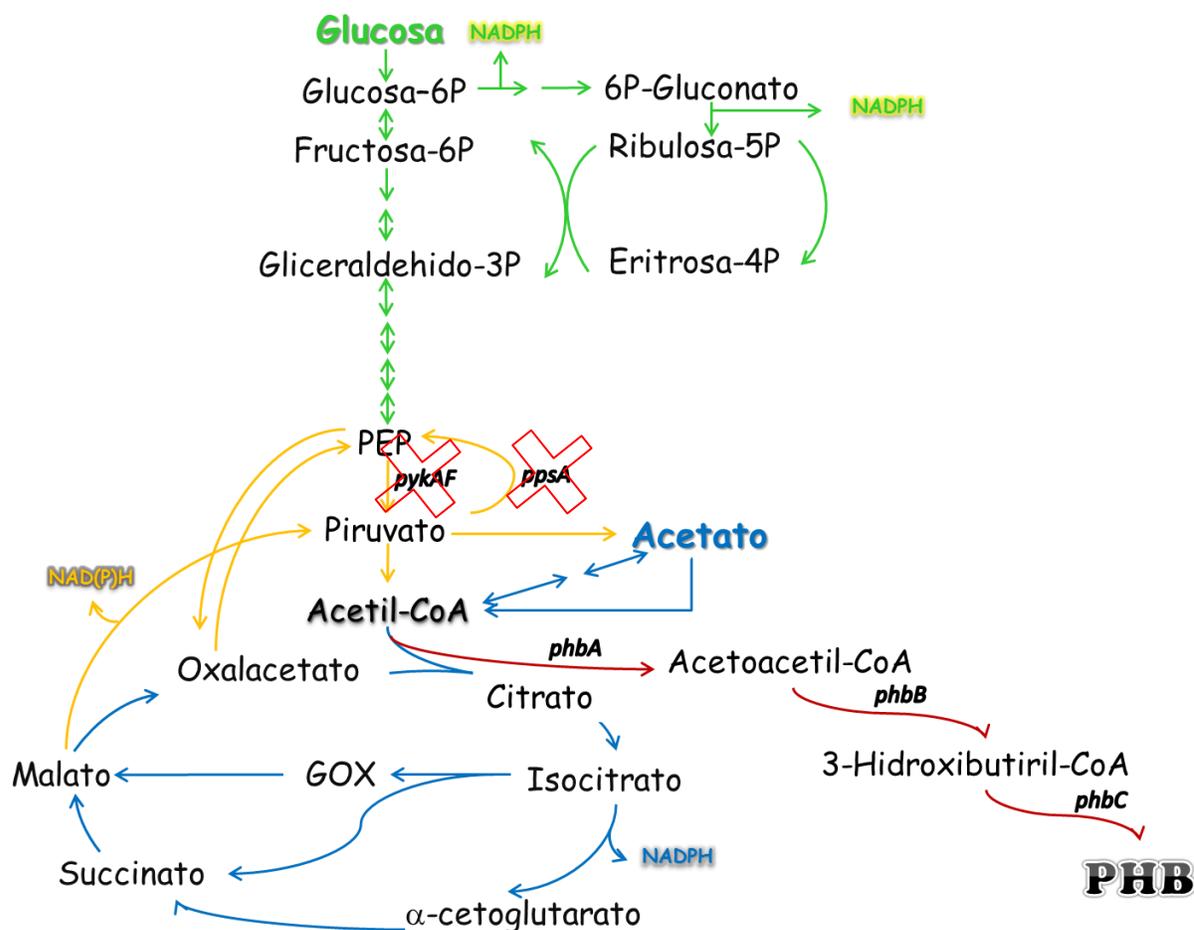


Figura 6. Metabolismo central de carbono de las cepas de *E. coli* PTS⁻ *pykAF ppsA*⁻ y vía heteróloga de biosíntesis de P3HB de *A. vinelandii* expresada en plásmido.

Objetivo general

Evaluar la capacidad de cepas de *E. coli* PTS⁻ que presentan un bloqueo en la interconversión de PEP-PYR y que sobreexpresan los genes *phbBAC* de *A. vinelandii.*, sobre su capacidad de producir P3HB durante la coutilización de glucosa y acetato como fuentes de carbono.

Objetivos específicos

a) Analizar el efecto de la coutilización de sustratos en cultivos en dos etapas de las cepas PB11 y PB12 y sus respectivas derivadas:

- La primera etapa (generación de biomasa) en medio mínimo M9 con glucosa y acetato como fuentes de carbono, sin inducir la expresión de los genes de síntesis de P3HB.
- La segunda etapa (producción) con tres variantes e induciendo la expresión de los genes de síntesis de P3HB:
 - i) medio mínimo M9 con glucosa y acetato como fuentes de carbono
 - ii) medio mínimo M9 con glucosa como única fuente de carbono
 - iii) medio mínimo M9 con acetato como única fuente de carbono

b) Evaluar la capacidad de producción de P3HB de las cepas PB11 y PB12 y sus respectivas derivadas determinando:

- Porcentaje de acumulación del polímero
- Consumo de sustratos
- Título de P3HB obtenido en los cultivos.

Materiales y métodos

En la tabla 3 se presentan las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo y en la tabla 4 se muestran los vectores.

Tabla 3. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio.

Cepa	Genotipo	Fuente
PB11	JM101 $\Delta(ptsH, ptsI, crr)::kan$	Flores <i>et al.</i> 1996
PB11/pTrc99A	PB11 + pTrc99A	Este trabajo
PB11/pPHB _{AV}	PB11+ pPHB _{AV}	Este trabajo
PB11 $\Delta pykAF$	PB11 <i>pykA::LoxP, pykF::LoxP</i>	Sabido-Ramos, Tesis de doctorado
PB11 $\Delta pykAF/ pPHB_{AV}$	PB11 $\Delta pykAF + pPHB_{AV}$	Este trabajo
PB11 $\Delta pykAF \Delta ppsA$	PB11 <i>pykA::LoxP, pykF::LoxP, ppsA::frt-cat-frt</i>	Sabido <i>et al.</i> 2013 [b]
PB11 $\Delta pykAF \Delta ppsA/ pPHB_{AV}$	PB11 $\Delta pykAF \Delta ppsA + pPHB_{AV}$	Este trabajo
PB12	PB11 evolucionada con 23 mutaciones puntuales no sinónimas 16 mutaciones puntuales sinónimas y una delección cromosomal de 10328 pb	Flores <i>et al.</i> 1996 Aguilar <i>et al.</i> 2012
PB12/pTrc99A	PB12 + pTrc99A	Este trabajo
PB12/ pPHB _{AV}	PB12 + pPHB _{AV}	Este trabajo
PB12 $\Delta pykAF$	PB12 <i>pykA::LoxP, pykF::LoxP</i>	Sabido – Ramos Tesis de doctorado
PB12 $\Delta pykAF/ pPHB_{AV}$	PB12 $\Delta pykAF + pPHB_{AV}$	Este trabajo
PB12 $\Delta pykAF \Delta ppsA$	PB12 <i>pykA::Lox P, pykF::LoxP, ppsA::frt-cat-frt + pPHB_{AV}</i>	Sabido <i>et al.</i> 2013 [b]
PB12 $\Delta pykAF \Delta ppsA/ pPHB_{AV}$	PB12 $\Delta pykAF \Delta ppsA + pPHB_{AV}$	Este trabajo

Tabla 4. Vectores utilizados en este estudio.

Vector	Característica	Fuente
pPHB _{Av}	Derivado del pTrc99A + operón <i>phbBAC</i> _{A.vinelandii}	Centeno-Leija, 2014
pTrc99A	Derivado del pKK233-2 Promotor Trc + Amp ^R Inducible por IPTG	Pharmacia Biotech

Trasformación de *E. coli* por electroporación

A partir de las cepas conservadas en glicerol a -72°C, se colocó una azada en 3mL de medio LB con Kanamicina (Km) [30 µg/ml]. Después de un periodo de incubación de 10 a 12 horas aproximadamente, se transfirieron 500 µl de cultivo a 50 ml de medio YENB con Km [15 µg/ml]. Una vez que las células alcanzaron una DO_{600nm} de 0.6, se pusieron en hielo por 15 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y el pellet se lavó tres veces con agua fría, centrifugando a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C por cada lavado. Al final, el pellet obtenido se resuspendió en agua.

Las células electrocompetentes se colocaron en celdas para electroporar, enfriadas previamente en hielo, 50 µl de células y 2 µl de plásmido. Se usó un electroporador marca eppendorf 2510. Las condiciones de operación fueron:

Voltaje = 2.5 kV

Capacitancia = 25 µF

Resistencia = 200 Ω

Duración del pulso = 4-5 ms

Las células se dejaron recuperar una hora en medio YT2X. Posteriormente se sembraron en cajas de LB-agar con Carbenicilina (Cb) [50 µg/ml] y Km [30µg/ml]. Una vez obtenidas colonias en las cajas de LB-agar se seleccionaron aquellas que estuvieran más aisladas y presentaran una morfología típica de *E. coli*. Dichas colonias se resembraron en LB líquido con Cb [100 µg/ml] y Km [30 µg/ml], a partir de este cultivo se conservaron las células en glicerol a -72°C, para realizar la caracterización de las cepas.

Condiciones de cultivo

Los cultivos se realizaron a 37°C y 300 rpm en matraces bafleados de 250 ml, con un volumen de trabajo de 50 ml de medio M9 con sus respectivas fuentes de carbono según el experimento a realizar.

Estrategia de cultivo

Pre-inóculos:

A partir de las cepas conservadas en glicerol a -72°C, se colocó una azada en 3mL de medio LB con su respectivo antibiótico de selección. Después de un periodo de incubación de 10 a 12 horas aproximadamente, se transfirieron las células a 50 ml de medio M9 con glucosa [4g/l] y acetato de sodio [6g/l] en matraces bafleados de 250 ml. Los cultivos se monitorearon midiendo la densidad óptica por espectrofotometría, con un espectrofotómetro marca Beckman DU-70, hasta alcanzar la fase estacionaria. A su vez, se monitoreó el consumo de sustratos cuantificando la concentración de glucosa y acetato presentes en el medio de cultivo.

Una vez analizadas las gráficas de todas las cepas, se decidió tomar el inóculo para iniciar la etapa de generación de biomasa en el tiempo en que cada cepa estuviera en fase exponencial de crecimiento y se observara una cointilización de ambos sustratos, esto con la finalidad de que las células se encuentren en un mismo estado fisiológico (Tabla 5).

Tabla 5. Horas de cultivo en la adaptación de las cepas PB11. PB12 y derivadas.

CEPA	TIEMPO (h)
PB11/pPHB _{AV}	12 a 14
PB11ΔpykAF/pPHB _{AV}	16 a 20
PB11ΔpykAFppsA/ pPHB _{AV}	16 a 20
PB12ΔpykAF/pPHB _{AV}	10 a 12
PB12ΔpykAFppsA/ pPHB _{AV}	10 a 12

Fase de generación de biomasa:

Las cepas se inocularon en matraces bafleados de 250 ml conteniendo 50 ml de medio mínimo M9 con glucosa [4g/l] y acetato de sodio [6g/l] para iniciar la fase de generación de biomasa a 0.1 DO_{600nm}. Se caracterizó de la cinética de crecimiento de cada cepa midiendo la densidad óptica usando un espectrofotómetro Beckman DU-70. Así mismo, se cuantificó la concentración de glucosa y acetato presentes en el medio de cultivo durante la fermentación.

Tabla 6. Hora de cultivo en la que se agregó IPTG a las cepas PB11, PB12 y derivadas.

CEPA	TIEMPO (h)
PB11/pPHB_{AV}	18
PB11ΔpykAF/pPHB_{AV}	24
PB11ΔpykAFppsA/ pPHB_{AV}	20
PB12ΔpykAF/pPHB_{AV}	8
PB12ΔpykAFppsA/ pPHB_{AV}	6

Fase de producción de P3HB:

Resultado de la caracterización de las cinéticas de crecimiento (etapa de generación de biomasa) de cada cepa, se realizó la inducción de los genes de biosíntesis de P3HB adicionando al medio 0.1mM de IPTG (Tabla 6). Pasadas cuatro horas después de la inducción, las cepas fueron re-inoculadas centrifugando (4000 rpm, 10 minutos y temperatura ambiente) la cantidad total del cultivo y resuspendiéndolas en 50 ml del medio respectivo:

- i) medio mínimo M9 con glucosa [4g/l] y acetato de sodio [6g/l],
- ii) medio mínimo M9 con glucosa [4g/l] como única fuente de carbono
- iii) medio mínimo M9 con acetato de sodio [6g/l] como púnica fuente de carbono

adicionando nuevamente 0.1mM de IPTG. De igual forma se monitoreó la concentración de sustratos a lo largo del cultivo. Debido a que las células aumentan su densidad óptica por crecimiento o por acumulación del biopolímero, una vez que no se observaba aumento en

dicho parámetro, los cultivos se centrifugaron 8 minutos a 10,000 rpm para eliminar el sobrenadante y liofilizar las células.

Determinación de glucosa y acetato

Se tomó 1 ml de muestra de cultivo durante las fermentaciones, dichas muestras se centrifugaron (5 min, 8000 rpm) y se recuperó el sobrenadante, el cual se sometió a un análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en un sistema Waters, Miliford, MA, el cual cuenta con una bomba 600E, inyector automático 717, detector de índice de refracción 2410 y un detector de arreglo de diodos 996. La determinación de glucosa y acetato se llevó a cabo utilizando una columna Aminex HPX-87H (300x 7.8mm; 9µM) Bio Rad, usando una fase móvil 5mM de H₂SO₄, un flujo de 0.5 mL/min y una temperatura de 50°C.

Determinación de la biomasa celular

La concentración de biomasa total fue determinada pesando la masa celular obtenida después de cada cultivo tras realizar un proceso de liofilizado, la cual se definió en unidad de peso (miligramos) por unidad de volumen (mililitros). Mientras que la biomasa residual hace referencia al peso seco celular (biomasa total) menos el contenido de P3HB.

Determinación del contenido de P3HB

La cuantificación del P3HB se llevó a cabo utilizando cromatografía de gases, dicho método detecta el metil-éster de hidroxibutirato, el cual es un derivado del P3HB. Las muestras se tratan según se describe a continuación:

Etapas de extracción:

1. Pesar 10 mg de células liofilizadas en viales de vidrio con tapa de teflón (de 4 mL).
2. Adicionar 1 ml de NaClO al 2% (v/v) y calentar a 30°C por una hora.

3. Realizar 3 lavados agregando 1ml de agua milliQ y resuspender el polímero para eliminar posibles restos de NaClO. Posteriormente centrifugar la muestra (8 min, 8000rpm, temperatura ambiente) para eliminar el agua.
4. Agregar 500 μ l de acetona y dejar secar las muestras una noche a 42°C

Etapas de metanólisis y derivatización:

5. Agregar 0.5 ml de H₂SO₄ al 10% v/v en MeOH y 25 μ l de ácido benzóico (40 mg/ml en MeOH).
6. Calentar la muestra (el vial cerrado perfectamente) 95°C durante 4 a 5 horas (el tiempo depende de cada muestra, el calentamiento se detiene hasta que el líquido se observe transparente).
7. Esperar que la muestra adquiera la temperatura ambiente y agregar 0.5 ml de cloroformo y 0.25 ml de agua milli Q. Agitar vigorosamente durante 5 ciclos de 1 min c/u.
8. Centrifugar a 3000 rpm durante 2 min para separar las fases.
9. Tomar la fase orgánica (la más densa) y colocarla en viales para CG y analizar las muestras en el equipo.

Se utilizó un cromatógrafo de gases marca Agilent modelo 6850 con una columna INNOWax de 30 metros de longitud, un diámetro de 250 μ m y un grosor de película de 0.25 μ m. Una vez que las muestras fueron inyectadas la temperatura del inyector y detector fueron mantenidas a 265°C y 275°C respectivamente. La temperatura del horno se mantuvo a 50°C al inicio y posteriormente se incrementó a una tasa de 20°C por minuto hasta alcanzar una temperatura máxima de 260°C la cual fue mantenida por 5 minutos.

El contenido de P3HB en las células está expresado como porcentaje del polímero presente en la biomasa total (P3HB + células), mientras que la concentración está expresada en miligramos de P3HB por mililitro de cultivo.

Resultados y discusión

Estrategia de cultivo

Como se ha descrito en secciones anteriores, la biosíntesis de P3HB es dependiente de la cantidad de NADPH y AcCoA, por lo que la suplementación adecuada de estos precursores se considera un factor crítico para la sobreproducción del biopolímero. Si bien se ha observado que la biosíntesis puede darse durante la etapa de crecimiento (Lee SY, 1996; Khanna y Srivastava, 2005; Tyo *et al.*, 2010), la fase más activa de acumulación se da cuando las células muestran una desaceleración en dicho crecimiento y entran a fase estacionaria (Lee SY *et al.*, 1994 [a]; Wang y Lee, 1997[a]). Esto se debe a que cuando el microorganismo se encuentra en fase exponencial, el AcCoA se utiliza principalmente para generar energía y otros metabolitos esenciales para el crecimiento producidos a través de TCA; por lo que al entrar a fase estacionaria este metabolito se encuentra más disponible para su redirección hacia la formación de P3HB, ya que las células requieren una menor cantidad de energía y precursores (Lee SY *et al.*, 1994 [a]). Por esta razón se decidió utilizar un cultivo en dos etapas, una primera etapa de generación de biomasa, donde no estuvieran expresándose los genes de biosíntesis de P3HB. Esto con el objetivo de aumentar la concentración celular, para posteriormente, en una segunda etapa (producción), se favoreciera la acumulación del polímero con la inducción de los genes *phbBAC*. Para esto, las cepas se crecieron en mínimo M9 con glucosa 4g/l (133.33 mmolC) y acetato de sodio 6g/l (146.34mmolC), durante la primera etapa. Posteriormente, para la etapa de producción, los cultivos se lavaron y reinocularon en medio mínimo M9 con glucosa 4g/l y acetato de sodio 6g/l. Además, para evaluar el efecto de la coutilización de sustratos sobre la biosíntesis de P3HB, las cepas se lavaron y reinocularon en cada sustrato por separado. Por tanto en este trabajo se evaluaron las siguientes condiciones de producción:

Producción de PHB lavando y resuspendiendo la biomasa total obtenida en la primera etapa del cultivo (mezcla glucosa-acetato) en medio M9 suplementado con:

1. La mezcla glucosa-acetato
2. Glucosa como única fuente de carbono
3. Acetato como única fuente de carbono

Se realizaron caracterizaciones previas sin agregar inductor con el objetivo de determinar el momento de la fermentación en el cual las células mostraran una desaceleración en su crecimiento y en este punto llevar a cabo la inducción de los genes del operón *phbBAC*. Lo anterior con el propósito de obtener la mayor cantidad de biomasa de cada cepa de estudio (Figura 7). Ya que el P3HB se acumula en el citoplasma, la concentración celular residual tendrá un papel importante en la cantidad de P3HB obtenido en el cultivo, dependiendo también del porcentaje de acumulación que presente cada cepa.

Tabla 7. Velocidades específicas de crecimiento de las cepas PB11 y derivadas.

CEPA	μ (h^{-1})
PB11	0.21 \pm 0.01
PB11/pTrcC99A	0.19 \pm 0.00
PB11/pPHB_{AV}	0.21 \pm 0.00
PB11ΔpykAF/ pPHB_{AV}	0.10 \pm 0.00
PB11ΔpykAF-ppsA/ pPHB_{AV}	0.17 \pm 0.00
PB11ΔpykAF	0.14 \pm 0.01
PB11ΔpykAF-ppsA	0.16 \pm 0.00

Con respecto a las velocidades específicas de crecimiento (μ) se observa que la cepa PB11/pPHB_{AV} tiene una μ de 0.21 \pm 0.00 h^{-1} que es muy similar a la cepa con plásmido vacío y la cepa que no tiene plásmido (Tabla 7) por lo que se puede inferir que el vector no está causando una carga metabólica que se viera reflejada en una disminución de la μ .

Para las cepas mutantes se observa que la PB11 Δ *pykAF*/pPHB_{AV} hay una reducción de la μ de un 29%, ésta pasa de $0.14 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ (Sabido-Ramos, comunicación personal) a $0.10 \pm 0.00 \text{ h}^{-1}$, por lo que es probable que exista algún efecto de carga metabólica debido a la presencia del vector. Finalmente la cepa PB11 Δ *pykAF-ppsA*/pPHB_{AV} presenta una μ similar a la reportada por Sabido-Ramos $0.17 \pm 0.00 \text{ h}^{-1}$ vs $0.16 \pm 0.00 \text{ h}^{-1}$, lo que nos permite inferir que no existe un efecto marcado de carga metabólica por presencia del plásmido.

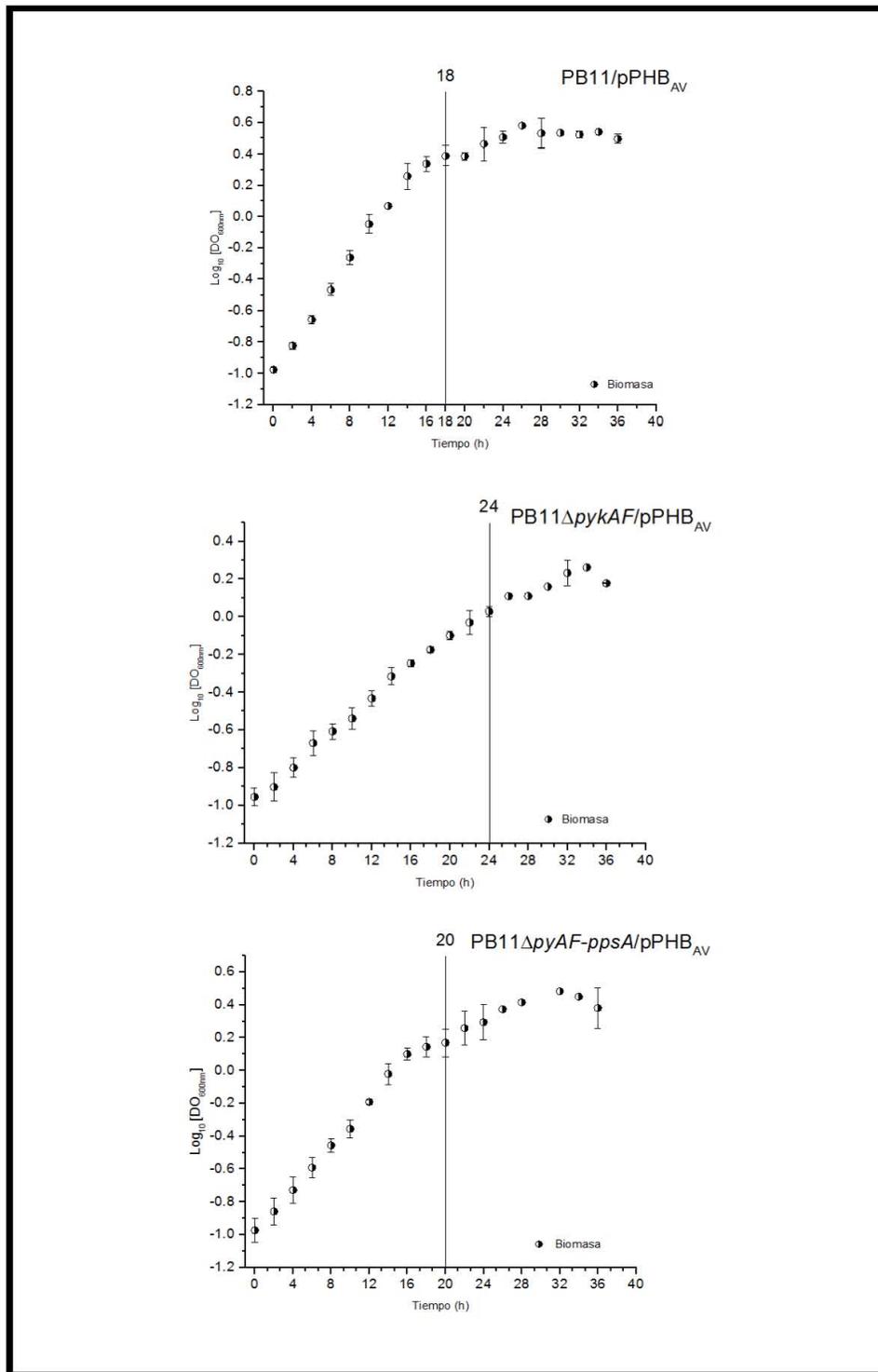


Figura 7. Cinética de crecimiento de las cepas PB11 y derivadas. La gráfica de crecimiento es resultado de tres experimentos independientes realizados en medio mínimo M9 con glucosa 4g/l (133.33 mmolC) y acetato de sodio 6g/l (146.34mmolC). La línea representa la hora a la cual se agregó el inductor (0.1mM IPTG).

Evaluación de las cepas PB11 sobre su capacidad de producción de P3HB bajo diferentes condiciones de cultivo

Condición de producción: Lavado y resuspensión de las células en medio M9 con glucosa y acetato

La primera condición que se evaluó la biosíntesis de P3HB consistió en lavar el total de biomasa obtenida en la primera etapa de cultivo y re-suspenderla en medio mineral fresco suplementado con glucosa y acetato como fuentes de carbono, así como inductor.

En estos experimentos las cepas mutantes presentaron un porcentaje de acumulación de P3HB bajo o nulo (Tabla 8); siendo la cepa PB11/pPHB_{AV} la única con un porcentaje de acumulación significativo, un 28 % (el más alto de todas las cepas y condiciones evaluadas), siendo evidente la cointilización de ambos sustratos (Figura 8a). Pese a que existe un ligero aumento en la cantidad de biomasa entre el punto en el que se favorece la inducción de los genes *phbBAC* y el punto final de la fermentación (Figura 9, Tabla 8), este es menor en comparación a las mutantes, lo que implica una desaceleración del crecimiento y por tanto una disminución en TCA, que a su vez favorecería el aumento de la disponibilidad de AcCoA para su posterior redirección hacia la biosíntesis de P3HB. Por otro lado existe cointilización de ambos sustratos (Figura 8a), por lo que es probable que la glucosa genere el NADPH requerido para promover la biosíntesis del P3HB, mientras que el acetato, el cual se metaboliza directamente a AcCoA, se utilizaría principalmente para la formación del biopolímero, sin dejar de generar los demás intermediarios de TCA necesarios para la generación de energía. Sin embargo los sustratos no son consumidos completamente, resultando en un porcentaje de acumulación menor respecto al que pudiera obtenerse si se presupone que exista un consumo total de las fuentes de carbono y estos se utilicen para la formación de P3HB.

Tabla 8. Comparación de la acumulación de P3HB de las cepas PB11 y derivadas utilizando glucosa-acetato.

Cepa	Acumulación (%)	[P3HB] (mg/ml)	Duración del cultivo (h)
PB11/pPHB_{AV}	27.95 ± 2.91	0.56 ± 0.09	23
PB11ΔpykAF/pPHB_{AV}	2.32 ± 0.85	0.02 ± 0.03	27
PB11ΔpykAF-ppsA/ pPHB_{AV}	ND	ND	23

La biomasa residual está expresada en peso seco celular menos el contenido de P3HB al final del cultivo. ND: No Detectado. Los resultados representan el valor promedio ± la desviación estándar de las determinaciones realizadas por duplicado de tres cultivos independientes.

Respecto a las cepas PB11ΔpykAF/pPHB_{AV} y PB11ΔpykAF-ppsA/ pPHB_{AV}, en las figuras 8b y 8c se muestra que el consumo de glucosa fue bajo y lento, consecuencia de las inactivaciones presentes en las cepas ya que, como se ha reportado, la eliminación del operón PTS (Flores N *et al.*, 1996) así como la inactivación de los genes *pykAF* (Ponce *et al.*, 1995; Escalante *et al.*, 2010; Meza *et al.*, 2012) resultan en una disminución en la velocidad específica de consumo de glucosa cuando ésta se utiliza como única fuente de carbono. El mismo efecto de retraso en el consumo de dicho carbohidrato es observado cuando las cepas mutantes se crecen en un medio con la mezcla glucosa-acetato en comparación con su cepa parental PB11 (Sabido *et al.*, 2013).

Respecto al acetato, éste fue consumido hasta casi terminarse del medio de cultivo y esto podría favorecer la disponibilidad de AcCoA para utilizarse en la biosíntesis de P3HB. Sin embargo, es probable que este metabolito se utilice en TCA, pues existe un aumento del triple y doble en la cantidad de biomasa residual en las cepas PB11ΔpykAF/pPHB_{AV} y PB11ΔpykAF-ppsA/ pPHB_{AV} respectivamente (Figura 9), indicando que aún existe un flujo de carbono importante hacia este ciclo. Donde el AcCoA utilizado, generaría un aumento de los niveles de CoASH; esto provocaría una baja relación AcCoA/CoASH, la cual es perjudicial para la biosíntesis del polímero, ya que la CoASH inhibe la actividad de la β-cetotiolasa, primera enzima de la ruta (Senior y Dawes, 1973; Manchak y Page, 1994), por lo tanto la vía de producción de P3HB no se estaría favoreciendo.

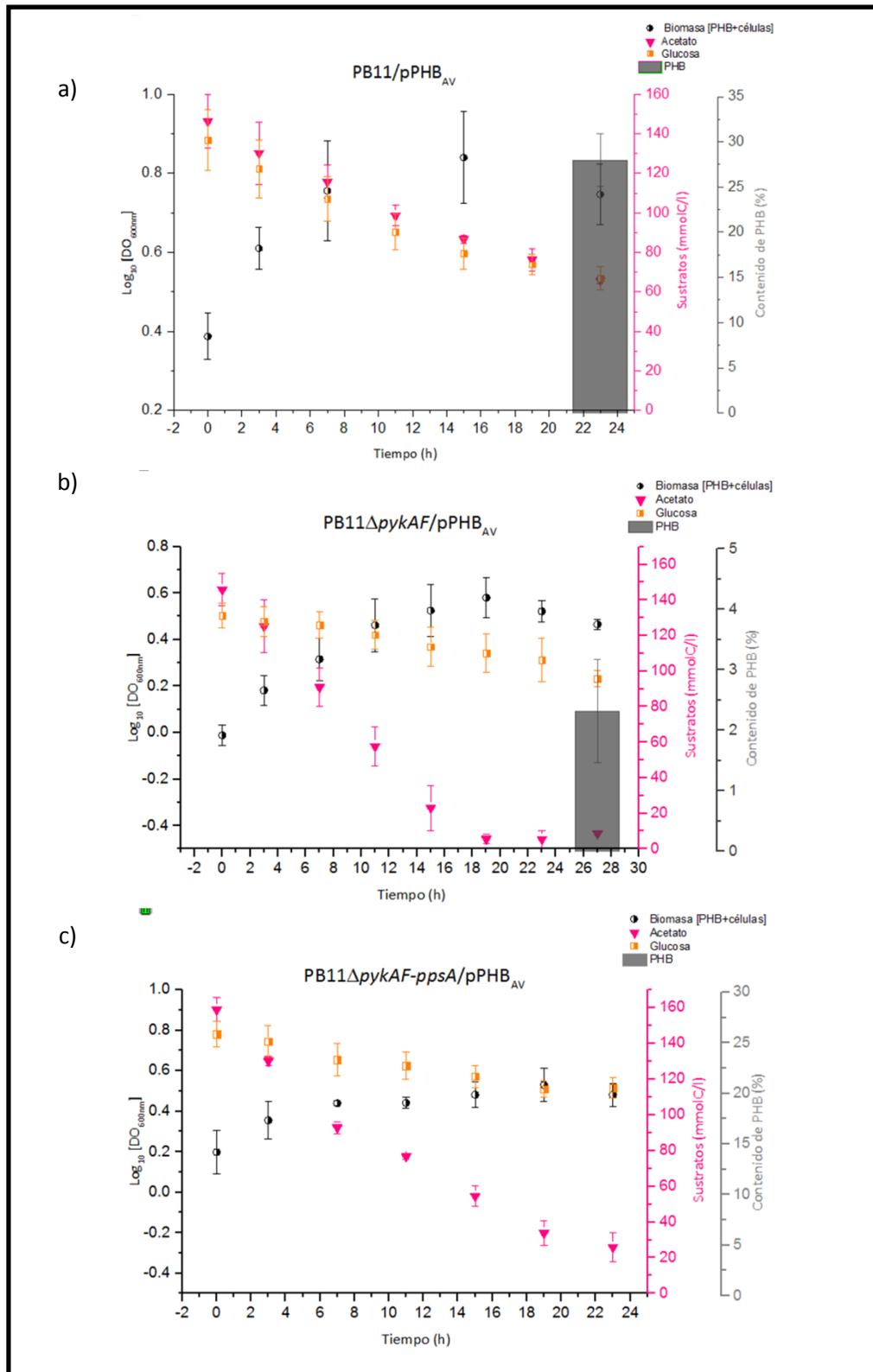


Figura 8. Gráficas de aumento de biomasa, consumo de glucosa-acetato y porcentaje de acumulación de P3HB de las cepas PB11 y derivadas. Experimentos realizados en matraces bafleados de 250 ml en medio mínimo M9 con glucosa 4g/l (133.33 mmolC), acetato de sodio 6g/l (146.34mmolC) e IPTG 0.1mM.

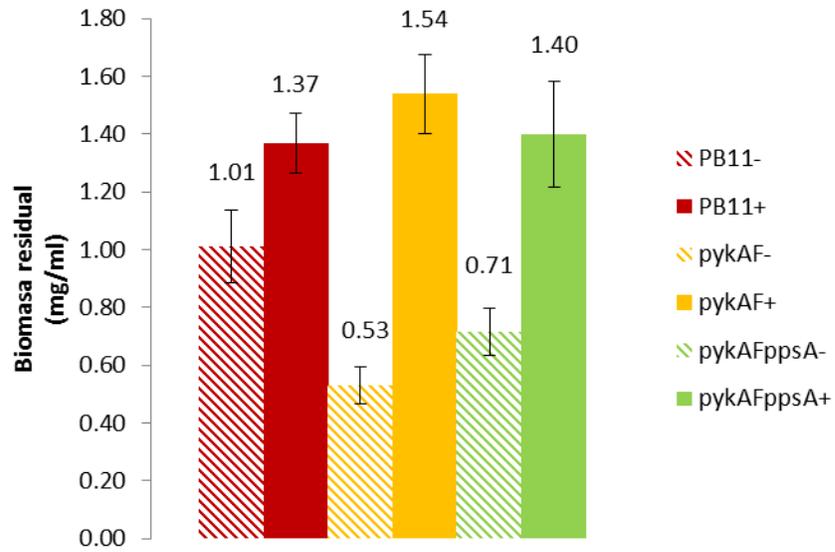


Figura 9. Biomasa residual generada por las cepas PB11/pPHB_{AV} (rojo); PB11ΔpykAF/ pPHB_{AV} (amarillo) y PB11ΔpykAF-ppsA/ pPHB_{AV} (verde), durante la cointilización de glucosa y acetato. Las barras rayadas, así como el símbolo (-) indican la biomasa producida hasta el tiempo en el que se agregó el inductor. Los colores oscuros y el símbolo (+) representan la biomasa residual al final del cultivo.

Condición de producción: Lavado y resuspensión de las células en medio M9 con glucosa

En este caso se observó que las cepas PB11 Δ pykAF/pPHB_{AV} y PB11 Δ pykAF-ppsA/pPHB_{AV} no crecieron ni acumularon P3HB en la etapa de producción (Figura 10b y 10c) debido a su incapacidad de consumir glucosa y dirigir el flujo de carbono hacia TCA y otras vías que utilicen AcCoA, consecuencia de las inactivaciones en las isoenzimas piruvato cinasas. Bajo este esquema, la concentración de biomasa mostrada en la Figura 11 es el resultado del crecimiento de las cepas en ambas fuentes de carbono, previo al cambio de medio de cultivo con un solo sustrato.

Tabla 9. Comparación de la acumulación de P3HB de las cepas PB11 y derivadas utilizando glucosa como única fuente de carbono.

Cepa	Acumulación (%)	[P3HB] (mg/ml)	Duración del Cultivo (h)
PB11/pPHB _{AV}	2.16 ± 0.71	0.03 ± 0.01	23
PB11 Δ pykAF/pPHB _{AV}	0.57 ± 0.03	0.003 ± 0.00	31
PB11 Δ pykAF-ppsA/pPHB _{AV}	ND	ND	27

La biomasa residual está expresada en peso seco celular menos el contenido de P3HB al final del cultivo. ND: No Detectado. Los resultados representan el valor promedio \pm la desviación estándar de las determinaciones realizadas por duplicado de tres cultivos independientes.

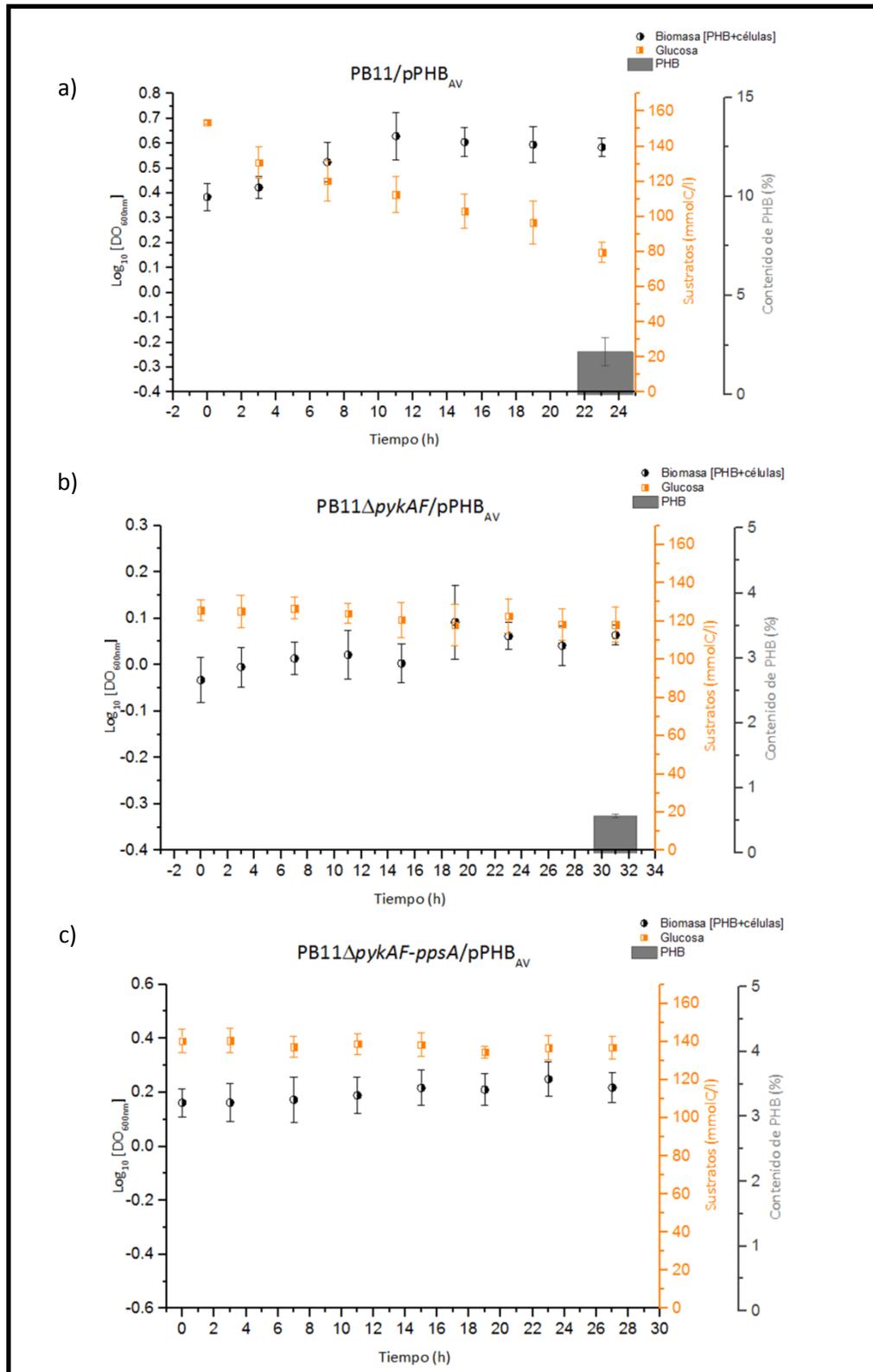


Figura 10. Gráficas de aumento de biomasa, consumo de glucosa y porcentaje de acumulación de P3HB de las cepas PB11 y derivadas. Experimentos realizados en matraces bafleados de 250 ml en medio mínimo M9 con glucosa 4g/l (133.33 mmolC) e IPTG 0.1mM.

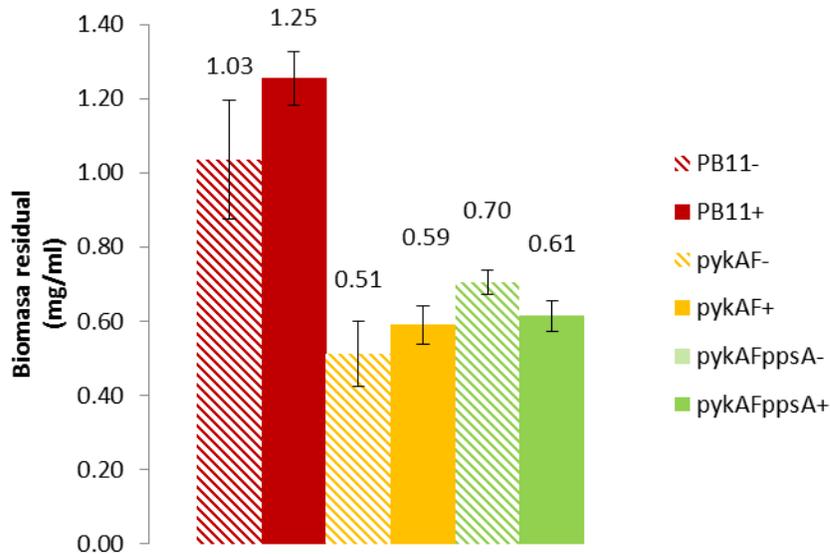


Figura 11. Biomasa residual generada por las cepas PB11/pPHB_{AV} (rojo); PB11ΔpykAF/pPHB_{AV} (amarillo) y PB11ΔpykAF-ppsA/pPHB_{AV} (verde) durante la utilización de glucosa como única fuente de carbono. Las barras rayadas, así como el símbolo (-) indican la biomasa producida hasta el tiempo en el que se agregó el inductor. Los colores oscuros y el símbolo (+) representan la biomasa residual al final del cultivo.

Referente a la cepa PB11/pPHB_{AV} se observó que si consume la glucosa en esta etapa (Figura 10a), sin embargo este consumo es lento, resultado de la inactivación de su principal sistema de transporte de carbohidratos, por lo que el sustrato consumido debe ser utilizado de manera eficiente de tal manera que este estaría siendo utilizado principalmente para el mantenimiento celular, lo cual limita la acumulación de P3HB, siendo este de apenas un 2%.

Condición de producción: Lavado y resuspensión de las células en medio M9 con acetato de sodio

En la última condición evaluada, la etapa de producción de P3HB se realizó en acetato como única fuente de carbono. La cepa PB11/pPHB_{AV} es la que presentó el porcentaje de acumulación mayor en esta condición (Tabla 10), no observándose crecimiento (Figura 13); por lo que el acetato consumido se estaría utilizando principalmente a la acumulación del polímero. En lo respecta a las mutantes, se observó que la cepa PB11ΔpykAF/pPHB_{AV} usó el acetato consumido principalmente para crecimiento, pues como se muestra en la figura 13,

la biomasa en el punto final del cultivo es casi 3 veces mayor a la que había en el momento en que se agregó el inductor, por lo tanto menos P3HB se sintetizará si el Acetil- CoA y NADPH son dirigidos a otras rutas metabólicas. Finalmente, en la cepa PB11 Δ pykAF-ppsA/pPHB_{AV} no hubo aumento de biomasa en esta etapa (Figura 13) debido probablemente, a la falta del gen *ppsA*, que en conjunto con las enzimas málicas forman la principal ruta gluconeogénica en cepas PTS⁻ (Sigala *et al.*, 2008). Por lo tanto existen deficiencias en la producción de PEP y de igual forma de los intermediarios biosintéticos de la parte alta del metabolismo gluconeogénico, de esta manera se limitaría el crecimiento. Es importante resaltar que existe un consumo considerable del acetato que no se está utilizando ni en crecimiento ni en producción de P3HB (Gráfica 4, Tabla 10), por lo que probablemente sea utilizado para el mantenimiento celular.

Tabla 10. Comparación de la acumulación de P3HB de las cepas PB11 y derivadas utilizando acetato de sodio como única fuente de carbono.

Cepa	Acumulación (%)	[P3HB] (mg/ml)	Duración del cultivo (h)
PB11/pPHB _{AV}	16.93 ± 3.76	0.22 ± 0.05	23
PB11 Δ pykAF/pPHB _{AV}	1.28 ± 0.17	0.01 ± 0.00	27
PB11 Δ pykAF-ppsA/pPHB _{AV}	ND	ND	27

La biomasa residual está expresada en peso seco celular menos el contenido de P3HB al final del cultivo. ND: No Detectado. Los resultados representan el valor promedio \pm la desviación estándar de las determinaciones realizadas por duplicado de tres cultivos independientes.

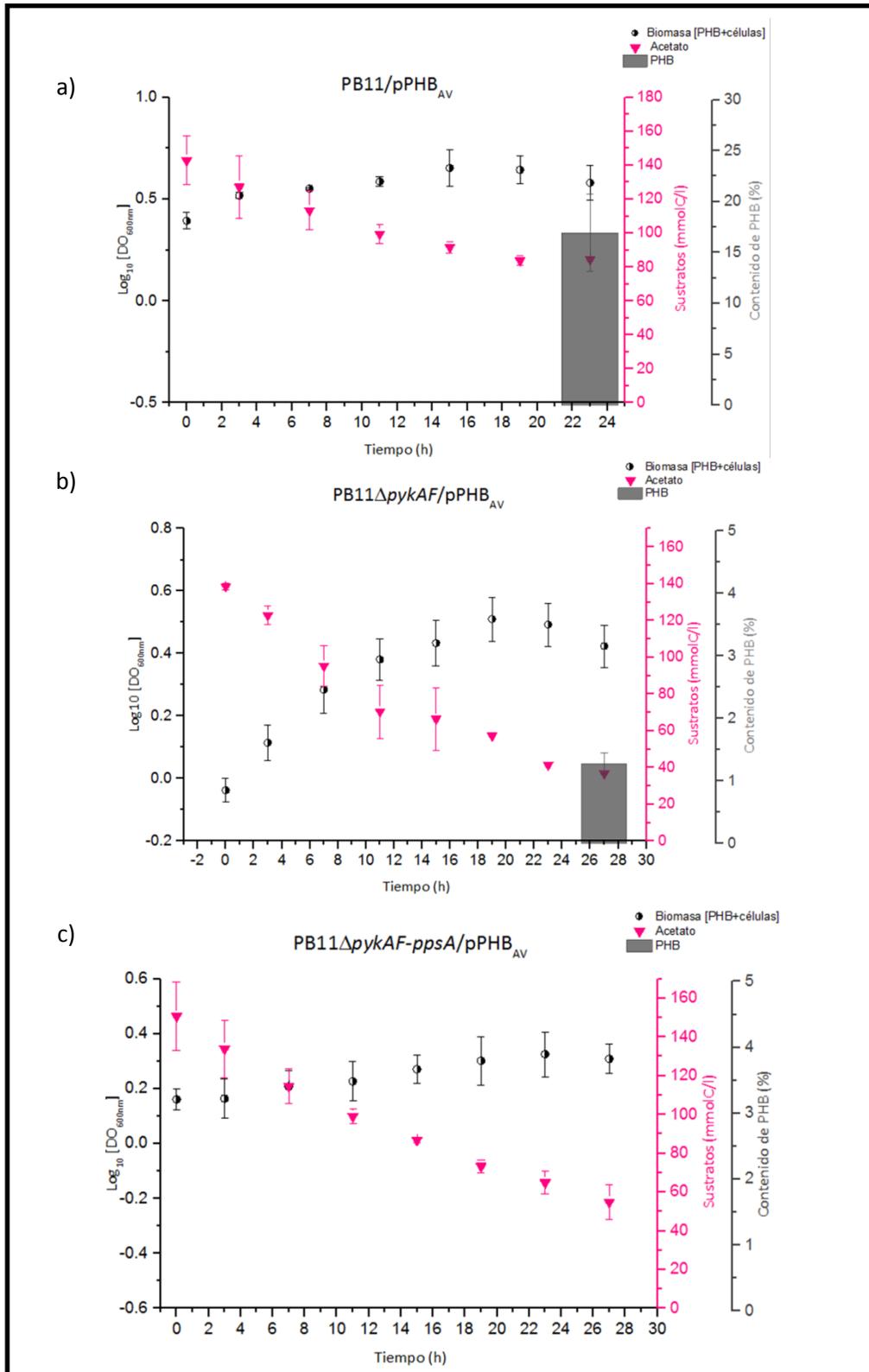


Figura 12. Gráficas de aumento de biomasa, consumo de acetato y porcentaje de acumulación de P3HB de las cepas PB11 y derivadas. Experimentos realizados en matraces bafleados de 250 ml en medio mínimo M9 con acetato de sodio 6g/l (146.34mmolC) e IPTG 0.1mM.

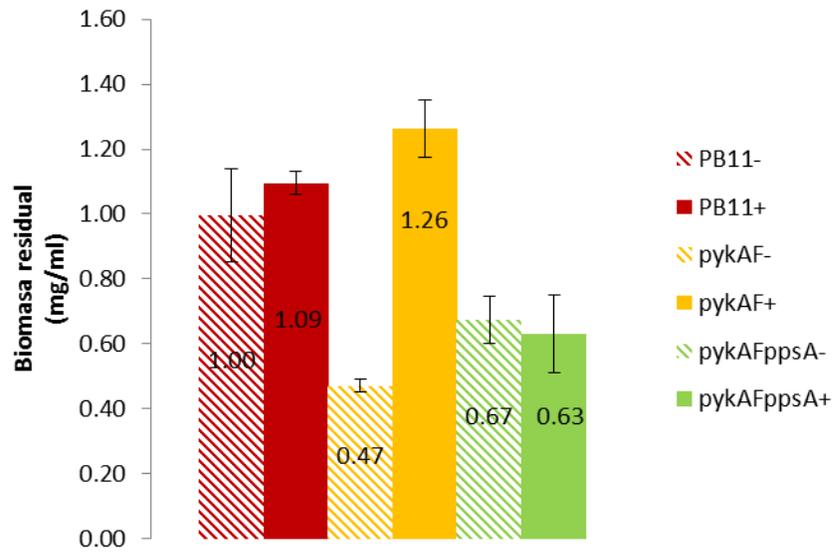


Figura 13. Biomasa residual generada por las cepas PB11/pPHB_{AV} (rojo); PB11 Δ pykAF/pPHB_{AV} (amarillo) y PB11 Δ pykAF-ppsA/pPHB_{AV} (verde) durante la utilización de acetato como única fuente de carbono. Las barras rayadas, así como el símbolo (-) indican la biomasa producida hasta el tiempo en el que se agregó el inductor. Los colores oscuros y el símbolo (+) representan la biomasa residual al final del cultivo.

Evaluación de las cepas PB12 sobre su capacidad de producción de P3HB bajo diferentes condiciones de cultivo

La cepa PB11 presenta una respuesta de estrés por limitación de carbono debido a la eliminación de PTS. Tiene una $\mu = 0.1 \text{ h}^{-1}$ vs 0.7 h^{-1} en comparación con la cepa parental JM101. Como estrategia de ingeniería metabólica se realizó un proceso de evolución adaptativa para la selección de derivadas con mejor capacidad de crecimiento en glucosa. La cepa resultante, PB12, alcanzó una $\mu = 0.44 \text{ h}^{-1}$ (Flores N *et al.*, 1996). Para conocer las razones por la cual esta cepa mejoró su crecimiento en glucosa, se han comparado sus niveles de transcripción con los de la cepa parental PB11. Estos estudios muestran que todos los genes glucolíticos, así como otros del metabolismo central de carbono que incluyen los que codifican para TCA, se sobreexpresan. Lo que sugiere una utilización de carbono más eficiente para esta cepa evolucionada (Flores N *et al.*, 1996; Flores S *et al.*, 2002; Flores N *et al.*, 2005; Flores S *et al.*, 2005). Se ha probado que la cepa PB12 es una plataforma útil para la sobreproducción de compuestos de interés (Flores N *et al.*, 1996; Báez *et al.*, 2004; Escalante *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2013; Sabido *et al.*, 2013), por lo que resulta interesante evaluar su capacidad para producir P3HB.

Siguiendo la misma estrategia de cultivo descrita anteriormente, se realizaron fermentaciones en dos etapas, una de generación de biomasa y otra de producción. Las cepas PB12 y derivadas fueron caracterizadas en su crecimiento en ausencia del inductor, esto para determinar el punto en el cuál se adicionaría el IPTG al medio de cultivo para obtener la mayor concentración celular de las cepas y posteriormente iniciar la etapa de biosíntesis de P3HB (Figura 14).

Es importante señalar que la cepa PB12/pPHB_{AV} no presentó crecimiento al realizar la primera etapa de generación de biomasa en el medio de cultivo con la mezcla glucosa-acetato. Esto puede ser consecuencia de dos fenómenos: Un efecto de carga metabólica generada por el plásmido y un efecto tóxico por la concentración de acetato.

Se sugiere que existe un efecto de carga metabólica pues la velocidad específica de crecimiento disminuye debido a la presencia del vector (Tabla 11). Se ha estudiado que la presencia de plásmidos estimula un incremento en la demanda de precursores biosintéticos, cofactores y energía para mantener la replicación y segregación adecuada del mismo (Glick, 1995; Ow *et al*, 2006; Cunningham *et al*, 2009). Por otro, lado hay que remarcar que la μ de la cepa PB12 sin plásmido, es 35% menor a la reportada en estudios previos donde se creció a esta misma cepa en medio mínimo M9 con 2 g/l de glucosa y 3 g/l de acetato (la mitad de lo que se utilizó en este estudio). Bajo estas mismas condiciones la cepa PB12/pPHB_{AV} si fue capaz de crecer (Tabla 11) lo que nos sugiere que un segundo factor que influye en el crecimiento de esta cepa son probablemente las concentraciones de dichas fuentes de carbono.

Tabla 11. Velocidades específicas de crecimiento de las cepas PB12 y derivadas.

Cepa	Condición de cultivo	μ h ⁻¹
PB12		0.25 ± 0.01
PB12pTrC99A		0.15 ± 0.01
PB12/pPHB _{AV}	4g/l Glu + 6 g/l Ace	No detectado
PB12 Δ pykAF/pPHB _{AV}		0.24 ± 0.014
PB12 Δ pykAF-ppsA/pPHB _{AV}		0.27 ± 0.002
PB12		0.41 ± 0.02
PB12/pPHB _{AV}	2g/l Glu + 3g/l Ace	0.27 ± 0.02
PB12 Δ pykAF		0.32 ± 0.02
PB12 Δ pykAF-ppsA		0.33 ± 0.02

Estudios previos (Sigala *et al*, 2009) muestran que la cepa PB12 ($\mu = 0.13$ h⁻¹) se encuentra más afectada en su crecimiento en acetato en comparación con su cepa parental PB11 ($\mu = 0.21$ h⁻¹) e incluso la cepa silvestre JM101 ($\mu = 0.28$ h⁻¹), por lo que es probable que el consumo de este sustrato no se favorezca. Por tanto, la concentración de acetato en el medio disminuye muy poco en las primeras horas de cultivo, por lo que dicha concentración (aproximadamente 6g/l) estaría resultando en un efecto negativo para el crecimiento de estas cepas. Se ha reportado que el acetato tiene efectos deletéreos en el crecimiento de

cepas de *Escherichia coli* ya que éste actúa como agente desacoplante del gradiente de pH transmembranal (Axe y Bailey, 1995) lo cual podría estar sucediendo en esta cepa. Por lo que sólo se caracterizó a las cepas que presentaron crecimiento, aquellas con las inactivaciones en los genes *pykA*, *pykF* y *ppsA*.

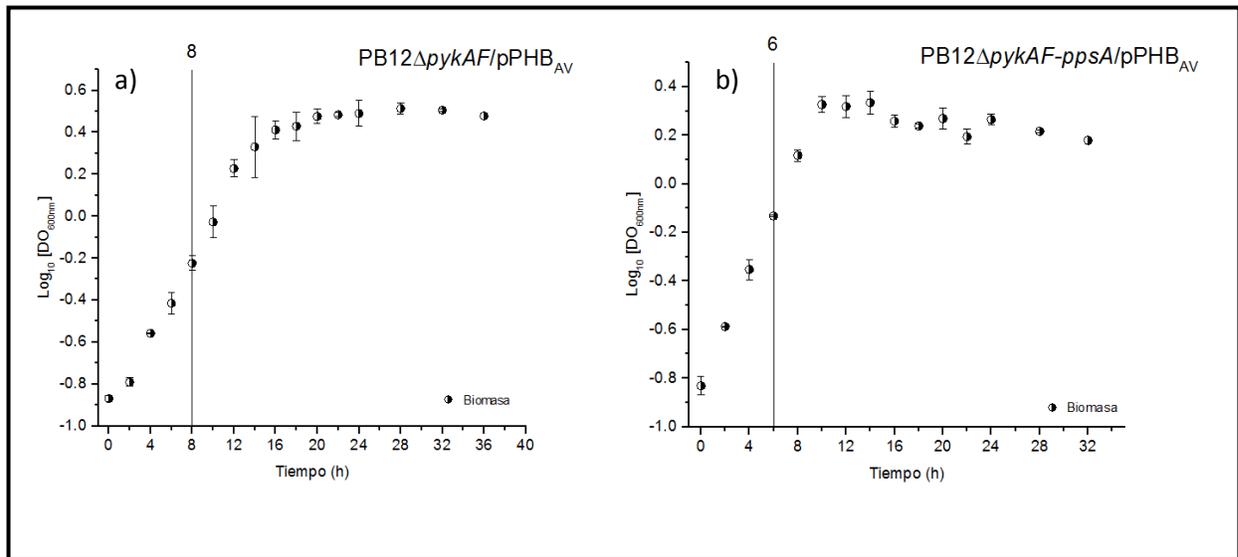


Figura 14. Cinética de crecimiento de las cepas derivadas de PB12. La gráfica de crecimiento es resultado de tres experimentos independientes realizados en medio mínimo M9 con glucosa 4g/l (133.33 mmolC) y acetato de sodio 6g/l (146.34mmolC). La línea representa la hora a la cual se agregó el inductor (0.1mM IPTG).

Condicion de producción: Lavado y resuspensión de las células en medio M9 con glucosa y acetato

La figura 16 muestra el curso de la etapa de producción de P3HB una vez que la biomasa generada en la primera etapa se lavó y reinoculó en medio mineral con ambas fuentes de carbono. Aquí se observó que las cepas son capaces de consumir ambos sustratos, siendo la glucosa la que se agota primero del medio de cultivo.

Para el caso de la cepa PB12ΔpykAF/pPHB_AV la generación de biomasa total es sustentada principalmente por la glucosa, ya que cuando ésta se agota del medio de cultivo no se observó un aumento de la misma (Figura 16a). Mientras que el acetato se utilizaría mayormente para procesos relacionados al mantenimiento celular; ya que el mayor consumo

de este sustrato se observa cuando la glucosa se ha agotado del medio de cultivo y las células se encuentran en fase estacionaria.

Para el caso de la mutante *PB12ΔpykAF-ppsA/pPHB_{AV}* agota la glucosa en un tiempo similar al de la doble mutante. Sin embargo, deja un remanente de acetato al final cultivo (Figura 16b). Es importante señalar que este se detuvo a las 15 horas por que ya no se observó un aumento de biomasa total, medido indirectamente por DO_{600nm} , el cuál fue el criterio elegido para finalizar la fermentación, pues el consumo de sustratos no estaría directamente relacionado al crecimiento o acumulación de P3HB.

Tabla 12. Comparación de la acumulación de P3HB de las cepas derivadas de PB12 utilizando glucosa-acetato.

Cepa	Acumulación (%)	[P3HB] (mg/ml)	Duración del cultivo (h)
<i>PB12ΔpykAF/pPHB_{AV}</i>	1.75 ± 0.27	0.023 ± 0.005	31
<i>PB12ΔpykAF-ppsA/pPHB_{AV}</i>	6.58 ± 0.89	0.103 ± 0.005	15

Ambas cepas presentan un aumento de biomasa residual de 9 y 8 veces al final del cultivo respecto al punto donde se agrega el inductor, lo cual nos indica que aún existe una competencia entre dirigir el AcCoA para generar P3HB y aquel utilizado por TCA para generar energía y otros precursores biosintéticos que sustentan el crecimiento celular. Por tanto, los porcentajes de acumulación se mantienen por debajo de un 10%. Aun así, la cepa *PB12ΔpykAF-ppsA/pPHB_{AV}* presenta un porcentaje de acumulación mayor al de la doble mutante (Tabla 12). Los análisis transcriptómicos realizados a la cepa *PB12ΔpykAF-ppsA* con respecto a su parental PB12 durante la coutilización glucosa – acetato, mostraron una sobreexpresión en los genes *aceBAK* (Operón del shunt de glioxalato), *glcB* (Malato sintasa), *scfA* (Malato deshidrogenasa), *poxB* (Piruvato oxidasa). Esto muestra que la generación de piruvato en esta cepa es a través del ciclo del glioxalato y las enzimas málicas. Al no tener PpsA se evitaría el uso del acetato para abastecer la parte alta del metabolismo central,

además de que el nivel de transcripción de *pckA* no cambia. Por tanto, se propone que el AcCoA de esta derivada se forma principalmente de la activación del acetato, aquel que se produce directamente al internalizarse y metabolizarse vía ActP (Acetato permeasa) Acs (AcCoA sintetasa), así como del producido por PoxB. Esta condición metabólica en la cepa PB12 Δ *pykAF-ppsA*/pPHB_{AV} resultaría favorable para la acumulación de P3HB respecto a la cepa PB12 Δ *pykAF*/pPHB_{AV}, donde ésta última, al tener la enzima PpsA podría dirigir flujo de carbono hacia la síntesis de compuestos de 6 carbonos

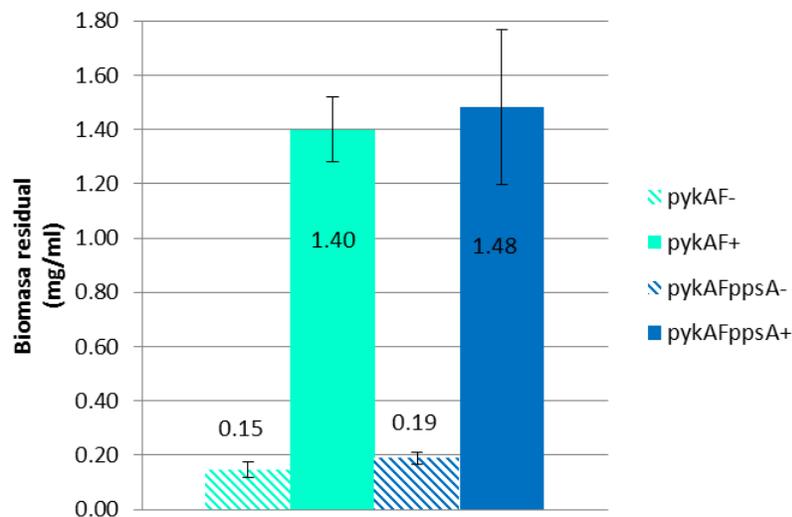


Figura 15. Biomasa residual generada por las cepas PB12 Δ *pykAF*/pPHB_{AV} (verde) y PB12 Δ *pykAF-ppsA*/pPHB_{AV} (azul) durante la cointilización glucosa-acetato. Las barras rayadas, así como el símbolo (-) indican la biomasa producida hasta el tiempo en el que se agregó el inductor. Los colores oscuros y el símbolo (+) representan la biomasa residual al final del cultivo.

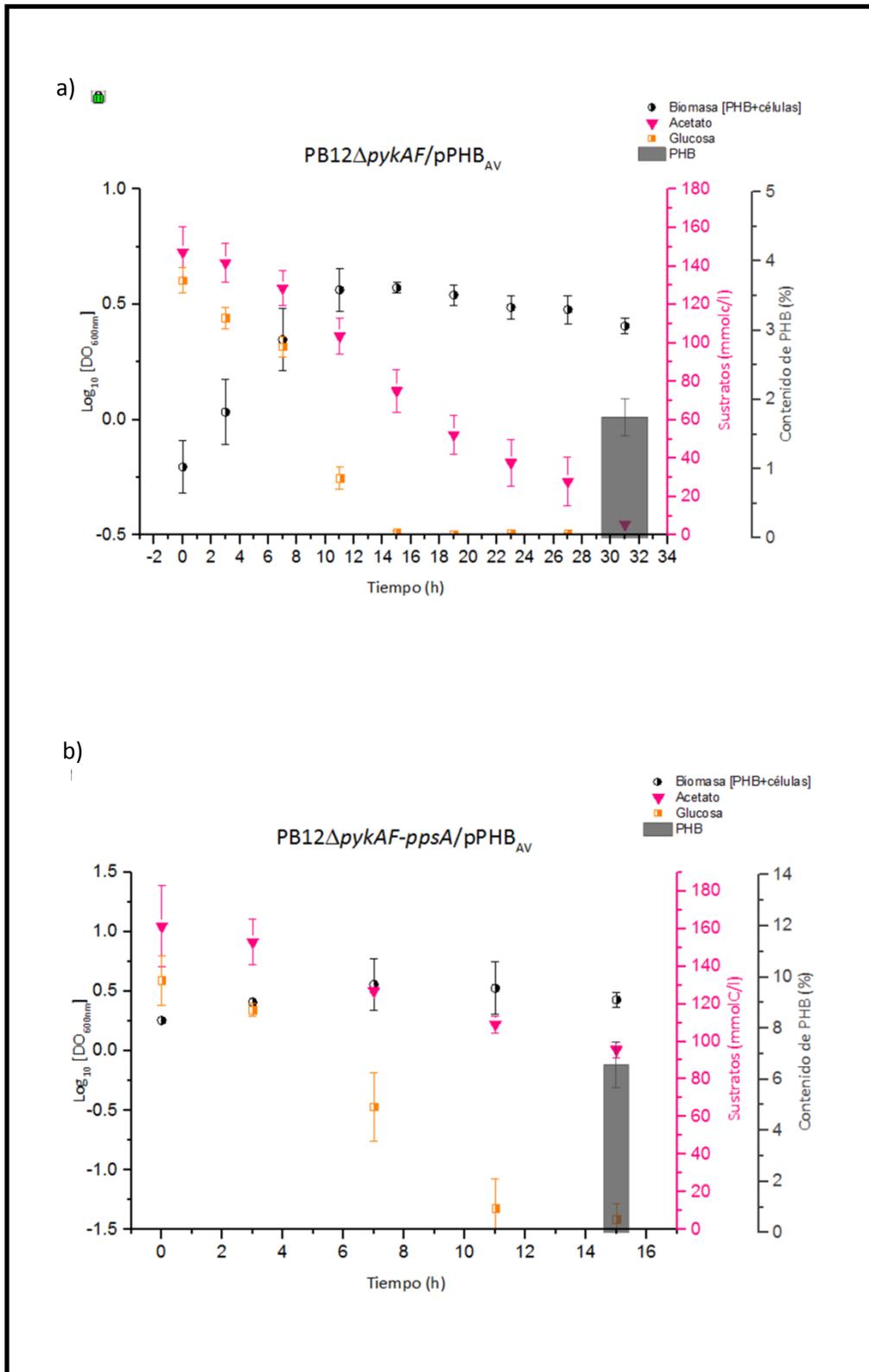


Figura 16. Gráficas de aumento de biomasa, consumo de glucosa-acetato y porcentaje de acumulación de P3HB de las cepas derivadas de PB12. Experimentos realizados en matraces bafleados de 250 ml en medio mínimo M9 con glucosa 4g/l (133.33 mmolC), acetato de sodio 6g/l (146.34mmolC) e IPTG 0.1mM.

Condición de producción: Lavado y resuspensión de las células en medio M9 con glucosa

Es bajo esta condición de producción donde se presenta el porcentaje de acumulación más bajo de los 4 tratamientos a los que fueron sometidas las derivadas PB12, ya que como puede observarse en la figura 18 a-b el consumo de glucosa es lento, prolongándose más allá de las 40 horas aproximadamente. Estudios previos demuestran que cepas PTS⁻ presentan una disminución en el consumo de este carbohidrato tras la inactivación de las piruvato cinasas (*pykAF*), además de que dicha fuente de carbono no se agota del medio de cultivo (Escalante *et al.*, 2010; Meza *et al.*, 2012). Sin embargo el consumo es suficiente para sustentar crecimiento (Figura 17). Análisis de flujos de carbono realizados en condiciones de limitación de glucosa en una cepa con inactivaciones en ambas isoenzimas piruvato cinasas, muestran un aumento en el flujo de carbono de PEP a OAA, a través de la enzima Ppc y de malato a PYR mediante las enzimas málicas, compensando en cierta medida la inactivación de los genes *pykAF* (Emmerling *et al.*, 2002) Por lo tanto, el probable aumento en el flujo de carbono a través de Ppc hacia TCA, podría estar generando los intermediarios biosintéticos y energía que permitan el crecimiento celular en glucosa de las cepas derivadas de la PB12.

Tabla 13. Comparación de la acumulación de P3HB de las cepas derivadas de PB12 utilizando glucosa como única fuente de carbono.

Cepa	Acumulación (%)	[P3HB] (mg/ml)	Duración del cultivo (h)
PB12 Δ <i>pykAF</i> /pPHB _{AV}	0.85 ± 0.20	0.010 ± 0.000	45
PB12 Δ <i>pykAF-ppsA</i> /pPHB _{AV}	4.06 ± 0.71	0.031 ± 0.002	35

En cuanto a la biomasa residual alcanzada al final del cultivo, la cepa PB12 Δ *pykAF*/pPHB_{AV} muestra un aumento de 6 veces respecto al punto donde se agregó el inductor en la primera etapa, mientras que la cepa PB12 Δ *pykAF-ppsA*/pPHB_{AV} aumenta 4 veces. Esta pequeña diferencia entre ambas cepas puede resultar significativa en el porcentaje de acumulación. Ya que la cepa triple mutante tuvo un aumento de biomasa menor (Figura 17), alcanzó un mayor porcentaje de acumulación de P3HB, mientras que la doble mutante estaría

dirigiendo, principalmente, flujo de carbono hacia otros procesos celulares que sustenten el crecimiento en lugar de la formación de P3HB.

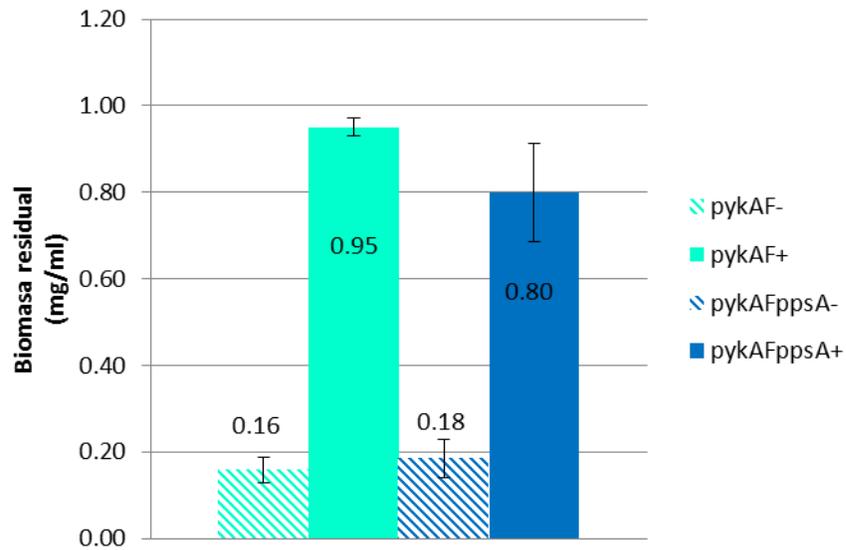


Figura 17. Biomasa residual generada por las cepas PB12 Δ pykAF/pPHB_{AV} (verde) y PB12 Δ pykAF-ppsA/pPHB_{AV} (azul) durante la utilización de glucosa como única fuente de carbono. Las barras rayadas, así como el símbolo (-) indican la biomasa producida hasta el tiempo en el que se agregó el inductor. Los colores oscuros y el símbolo (+) representan la biomasa residual al final del cultivo.

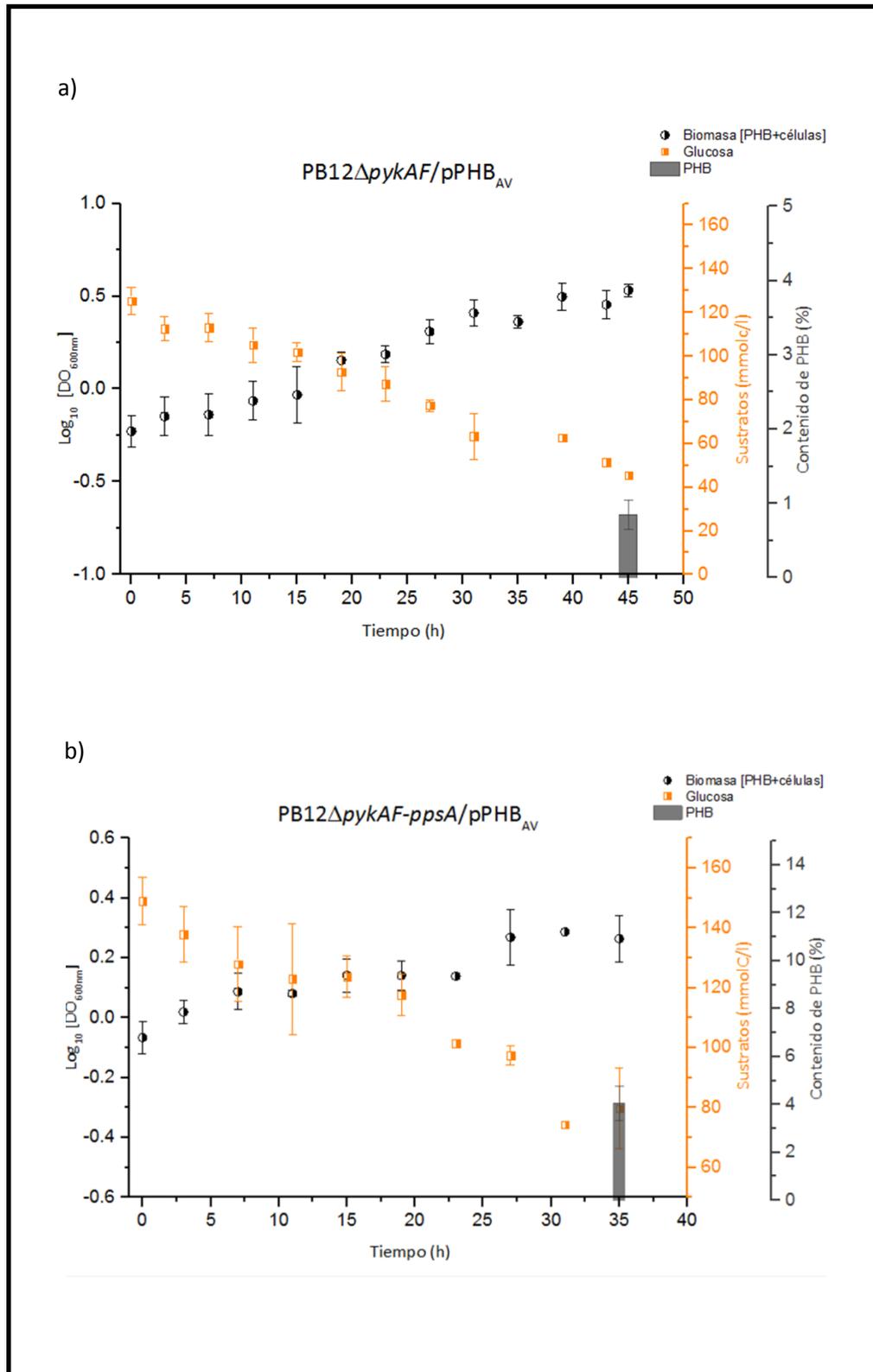


Figura 18. Gráficas de aumento de biomasa, consumo de glucosa y porcentaje de acumulación de P3HB de las cepas derivadas de PB12. Experimentos realizados en matraces bafleados de 250 ml en medio mínimo M9 con glucosa 4g/l (133.33 mmolC) e IPTG 0.1mM.

Condición de producción: Lavado y resuspensión de las células en medio M9 con acetato

Finalmente, las cepas derivadas de PB12 fueron cultivadas en acetato como única fuente de carbono para la producción de P3HB. En la figura 20a se observa que la cepa PB12 Δ pykAF/pPHB_{AV} consume casi totalmente el acetato. Sin embargo, se puede inferir, dados los resultados mostrados en la figura 19, que el sustrato se utiliza principalmente para el crecimiento celular, pues la biomasa residual aumenta seis veces respecto al punto donde se añade el inductor para iniciar la biosíntesis del biopolímero. Así, la cepa muestra una preferencia por crecer y no por producir P3HB, pues el porcentaje de acumulación es de apenas un 1%.

Tabla 14. Comparación de la acumulación de P3HB de las cepas derivadas de PB12 utilizando acetato de sodio como única fuente de carbono.

Cepa	Acumulación (%)	[PHB] (mg/ml)	Duración del cultivo (h)
PB12 Δ pykAF/pPHB _{AV}	0.91 ± 0.38	0.01 ± 0.00	45
PB12 Δ pykAF-ppsA/pPHB _{AV}	9.06 ± 2.15	0.053 ± 0.021	35

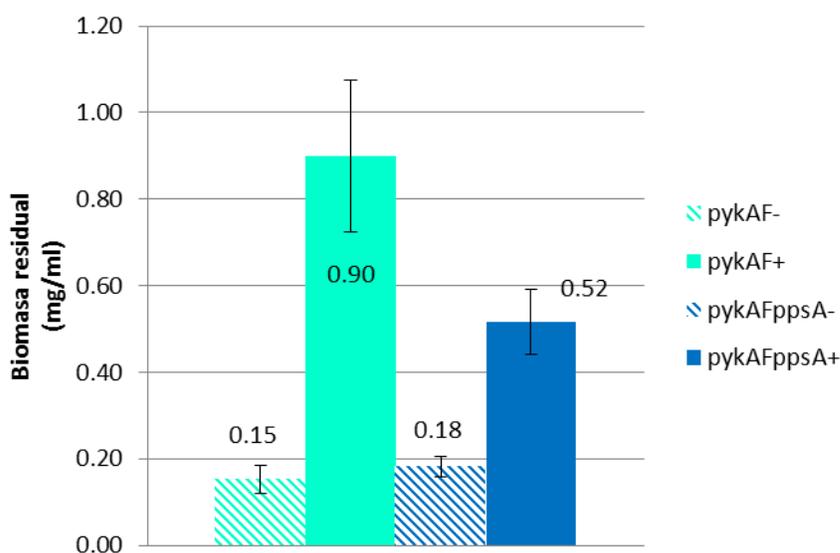


Figura 19. Biomasa residual generada por las cepas PB12 Δ pykAF/pPHB_{AV} (verde) y PB12 Δ pykAF-ppsA/pPHB_{AV} (azul) durante la utilización de acetato como única fuente de carbono. Las barras rayadas, así como el símbolo (-) indican la biomasa producida hasta el tiempo en el que se agregó el inductor. Los colores oscuros y el símbolo (+) representan la biomasa residual al final del cultivo.

En cuanto a la cepa triple mutante, ésta mostró un consumo más lento del acetato (Figura 20b) y un menor aumento de biomasa, 3 veces respecto al inicio de la inducción, en comparación con la cepa PB12 Δ pykAF/pPHB_{AV}; sin embargo, acumula más P3HB que la doble mutante, pues es evidente que la doble mutante muestra una preferencia por crecer y utilizar el sustrato para generar un aumento de biomasa, mientras que la PB12 Δ pykAF-ppsA/pPHB_{AV} aunque consume menos acetato es probable que al no tener una enzima clave que conforma su principal ruta gluconeogénica, PpsA, no puede redirigir más carbono hacia la parte alta del metabolismo y por tanto su crecimiento es menor y debido a eso su acumulación es mayor. Como se ha explicado en secciones anteriores es preferible evitar la competencia entre el AcCoA que se dirige a crecimiento *versus* el que se dirigirá a la biosíntesis del P3HB.

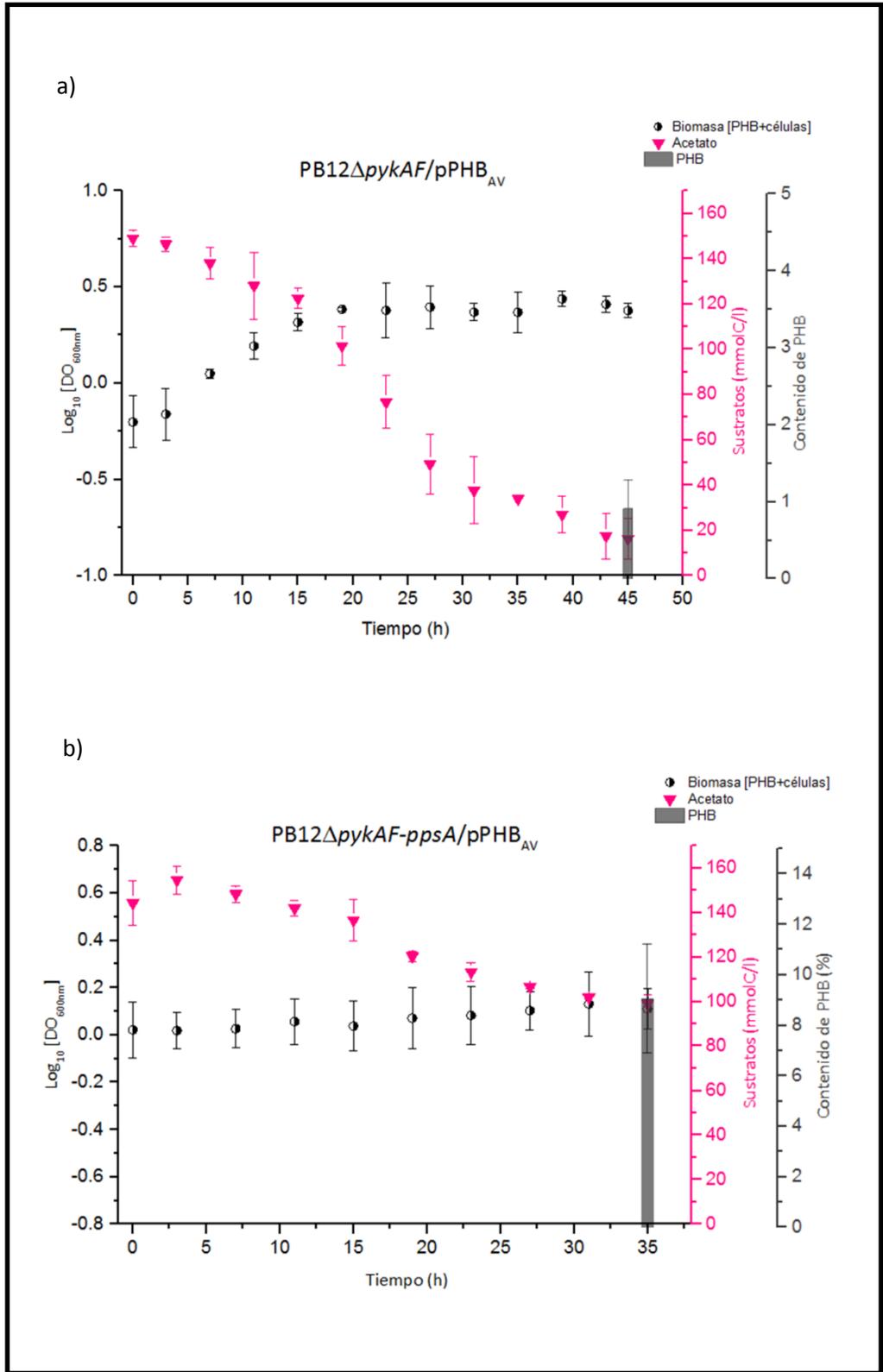


Figura 20. Gráficas de aumento de biomasa, consumo de acetato y porcentaje de acumulación de P3HB de las cepas derivadas de PB12. Experimentos realizados en matraces bafleados de 250 ml en medio mínimo M9 con acetato de sodio 6g/l (146.34mmolC) e IPTG 0.1mM.

Efecto del crecimiento sobre la producción de P3HB.

Este análisis sugiere que una de las limitantes para la producción de P3HB en estas cepas, fue el crecimiento celular. Por tanto, la formación de biomasa compite con la formación del biopolímero por el uso de la fuente de carbono, limitando así, el flujo hacia la vía de síntesis del P3HB.

A pesar de que la producción de P3HB puede estar asociada a crecimiento (Manchak y William, 1994; Lee SY, 1996; Wang y Lee, 1997[a]; Khanna y Srivastava, 2005; García *et al.*, 2014), ésta requiere un delicado equilibrio entre la formación de producto y la formación de biomasa. Por lo que se requiere una modulación del metabolismo que nos permita mantener una relación PHB/biomasa que maximice la productividad total. Estudios previos muestran que la producción de P3HB en *E. coli* tiene un perfil en dos etapas: una de rápido crecimiento celular con baja producción del biopolímero; seguida de una etapa de acumulación donde hay poca proliferación celular y alta generación de P3HB (Wang y Lee, 1997[b]; Van Wegen, 2001; Tyo *et al.*, 2010). En este estudio, se les permitió a las cepas crecer hasta su máxima velocidad específica, realizando la inducción de los genes de biosíntesis de P3HB en punto cercano a la fase estacionaria, esperando que la sobreexpresión del operón *phbBAC* incrementara el flujo de carbono hacia la formación de P3HB y eventualmente se disminuyera o se inhibiera el crecimiento por el uso del AcCoA y NADPH para la síntesis del polímero en lugar de usarse para la proliferación celular (Hong *et al.*, 2003; Tyo *et al.*, 2009). Sin embargo, las cepas continuaron con una fase activa de crecimiento. Así, una de las estrategias que se han utilizado para maximizar la producción, ha sido el uso de cultivos bajo condiciones de oxígeno o nitrógeno limitantes (Wang y Lee, 1997 [b]; Tyo *et al.*, 2010). Por tanto, durante la segunda etapa evaluada en este estudio, una manera de detener el crecimiento, sería limitar a las cepas en alguno de estos compuestos.

Conclusiones

Los resultados obtenidos mostraron que, en estas condiciones de estudio, las cepas que presentan modificaciones en el nodo PEP-PYR, no son aptas para la producción del biopolímero, pues los porcentajes de acumulación fueron bajos o nulos (>10%).

Cepas PB11 y derivadas:

- ❖ La evaluación de las diferentes condiciones para la síntesis de P3HB realizadas en este estudio, mostraron que las cepas que presentan modificaciones en el nodo PEP-PYR, no son aptas para la producción del biopolímero, posiblemente debido a la limitación de precursores.
- ❖ La cointilización de sustratos durante la segunda etapa del cultivo (lavado y resuspensión) mejora la acumulación de P3HB, ya que presentan el porcentaje más alto de acumulación, respecto a la producción con un solo sustrato.

Cepas PB12 y derivadas:

- ❖ La cepa PB12/pPHB_{AV} es incapaz de crecer bajo estas condiciones de cultivo (medio mínimo con 4g/l de glucosa y 6 g/l de acetato de sodio). Ésto, debido a un efecto de carga metabólica por la presencia del plásmido, aunado a un posible efecto tóxico de la concentración de acetato presente en el medio.
- ❖ Las modificaciones realizadas en el nodo PEP-PYR mejoran la acumulación de P3HB respecto a la cepa parental PB12, pues la cepa PB12*pykAF ppsA*/pPHB_{AV} presenta los porcentajes de acumulación mayores en las condiciones evaluadas respecto a la cepa PB12*pykAF*-/pPHB_{AV}, ya que ésta última cepa está dirigiendo el carbono hacia otros procesos metabólicos.

Método de cuantificación de P3HB

Se obtuvo un proceso adecuado para la extracción, metanólisis y derivatización del P3HB para las cepas PB11, PB12 y sus respectivas derivadas, lo que permitió realizar la

cuantificación de la concentración de polímero presente en las células en comparación al método previamente generado.

Perspectivas

Evaluar otras condiciones de fermentación

Este trabajo fue un primer acercamiento para evaluar la viabilidad del sistema sobre la producción de P3HB, habiendo realizado las caracterizaciones en cultivos en matraz. Sin embargo, es conveniente realizar experimentos en reactores para tener una idea de las capacidades de producción de las cepas. Ya que el crecimiento resultó ser un factor que afecta el porcentaje de acumulación del P3HB en estas cepas, se pueden utilizar cultivos donde se disminuya o inhiba el crecimiento mediante la limitación de oxígeno (Wang y Lee, 1997 [a]; Van Wegen *et al.* 2001) o la modificación de la relación C:N en el medio de cultivo (Tyo *et al.*, 2009; Centeno *et al.*, 2014). Diversos estudios se han llevado a cabo para desarrollar fermentaciones eficientes para la producción del PHA deseado, siendo el más utilizado el cultivo en lote alimentado. Por lo tanto resultaría interesante probar esta estrategia en nuestra cepa (Kim *et al.*, 1992; Ahn *et al.*, 2000; Nikel *et al.*, 2006)

Modificar el sistema de expresión

De acuerdo con algunas observaciones microscópicas realizadas casi al final de los cultivos, una parte de las células no poseían gránulos de P3HB. Una probable explicación a esto podría ser la inestabilidad del plásmido. Los plásmidos presentan inestabilidad genética debido a tres procesos: 1) inestabilidad segregacional, en donde la distribución desigual de plásmido a las células hijas da como resultado células libres de vector; 2) inestabilidad estructural, en la que algunos plásmidos contienen una secuencia de DNA alterada que causa una expresión incorrecta de las proteínas; y 3) segregación alélica, en el que plásmidos no productivos desplazan a los productivos. Este fenómeno se da debido a que la expresión heteróloga de vías suele provocar carga metabólica, además de que los productos pueden ser citotóxicos, causando así, una disminución de la viabilidad celular. Por tanto, el desplazamiento de plásmidos productivos por mutantes no productivos, confiere ventajas de crecimiento que impulsa la selección de este tipo de vectores (Tyo *et al.*, 2009). Para contender con esto se pueden construir derivados del vector pPHB_{AV} agregando el locus *parB*, lo cual se ha probado

anteriormente en producción de P3HB resultando en un aumento de la acumulación del biopolímero tal como lo reporta Lee y colaboradores (1993). Otra alternativa sería integrar en cromosoma el operón *phbBAC*. Actualmente existen diferentes estrategias de integración cromosomal que han sido probadas en la producción de diferentes metabolitos, obteniendo resultados exitosos (Horng *et al.*, 2011; Li M *et al.*, 2012; Sabido *et al.*, 2013[a]). Entre éstas se encuentran la producción de P3HB (Li M *et al.*, 2012), donde el operón *phbCAB* se encuentra bajo la regulación de repeticiones en tándem del promotor *tac*. Otro ejemplo es la generación de cepas cuyo cromosoma tiene repeticiones en tándem del operón *phb* (40 copias aproximadamente (Tyo *et al.* 2009).

Utilizar otras fuentes de carbono

La elección del medio de cultivo es importante no sólo para proveer las condiciones óptimas para la producción de un PHA, sino también para hacerlo con alta productividad, de tal forma que el producto final pueda ser económicamente competitivo con los plásticos tradicionales. En la biosíntesis de P3HB alrededor del 40% del costo total de producción pertenece a materias primas (Van Wegen *et al.*, 1998; Chanprateep S, 2010) por lo tanto el uso de fuentes de carbono baratas es necesario con la finalidad de reducir el alto costo (Kim, 2000). La agricultura y sus industrias asociadas pueden proveer estas fuentes de carbono, ya que producen una variedad de subproductos de bajo costo y renovables. La mayoría de estos sustratos son una mezcla de azúcares y/o ácidos grasos, por lo que si consideramos que en nuestras cepas no existe el fenómeno de represión catabólica que ejerce la glucosa, sería interesante evaluar la producción de bioplásticos usando dichas fuentes de carbono, donde además se tiene el potencial para generar copolímeros (Li R *et al.*, 2007 [a]).

Bibliografía

1. Aguilar C, Escalante A, Flores N, de Anda R, Riveros-McKay F, Gosset G, Morett E, Bolívar F. **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. Aug 2012; 10: 13:385.
2. Agus J, Kahar P, Abe H, Doi Y, Tsuge T. **Molecular weight characterization of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] synthesized by genetically engineered strains of *Escherichia coli*.** Polymer Degradation and Stability. May 2006; 91: 1138–1146
3. Ahmann Dianne y Dorgan John R. **Bioengineering for Pollution Prevention. Through Development of Biobased Materials and Energy.** U.S. Environmental Protection Agency, 2007.
4. Ahn WS, Park SJ, Lee SY. **Production of Poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution.** Appl Environ Microbiol. Aug 2000; 66: 3624-7.
5. Anderson AJ, Dawes EA. **Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates.** Microbiol Rev. 1990 Dec; 54:450-72.
6. Axe DD, Bailey JE. **Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*.** Biotechnol Bioeng. Jul 1995; 47: 8-19.
7. Báez-Viveros JL, Osuna J, Hernández-Chávez G, Soberón X, Bolívar F, Gosset G. **Metabolic engineering and protein directed evolution increase the yield of L-phenylalanine synthesized from glucose in *Escherichia coli*.** Biotechnol Bioeng. Aug 2004; 87: 516-524.
8. Balderas-Hernández VE, Sabido-Ramos A, Silva P, Cabrera-Valladares N, Hernández-Chávez G, Báez-Viveros JL, Martínez A, Bolívar F, Gosset G. **Metabolic engineering for improving anthranilate synthesis from glucose in *Escherichia coli*.** Microb Cell Fact. Apr 2009; 8: 19.
9. Betancourt A, Yezza A, Halasz A, Van Tra H, Hawari J. **Rapid microwave assisted esterification method for the analysis of poly-3-hydroxybutyrate in *Alcaligenes latus* by gas chromatography.** J Chromatogr A. Jun 2007; 1154: 473-6.
10. Braunegg G, Sonnleitner B, Lafferty RM. **A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass.** Appl Microbiol Biotechnol; 6: 29-37.

11. Castilho LR, Mitchell DA, Freire DM. **Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation.** *Bioresour Technol.* Dec 2009; 100: 5996-6009.
12. Centeno-Leija S, Huerta-Beristain G, Giles-Gómez M, Bolivar F, Gosset G, Martinez A. **Improving poly-3-hydroxybutyrate production in *Escherichia coli* by combining the increase in the NADPH pool and acetyl-CoA availability.** *Antonie Van Leeuwenhoek.* Apr 2014; 105: 687-96.
13. Chanprateep S. **Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates.** *J Biosci Bioeng.* Dec 2010; 110: 621-32.
14. Chen GQ. **A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) bio-based materials industry.** *Chem Soc Rev.* Aug 2009; 38: 2434-46.
15. Chien CC, Hong CC, Soo PC, Wei YH, Chen SY, Cheng ML, Sun YM. **Functional expression of *phaCAB* genes from *Cupriavidus taiwanensis* strain 184 in *Escherichia coli* for polyhydroxybutyrate production.** *Appl Biochem Biotechnol.* Dec 2010; 162: 2355-64.
16. Choi J, Les SY, Han K. **Cloning of the *Alcaligenes latus* Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Genes and Use of These Genes for Enhanced Production of Poly(3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*.** *Appl Environ Microbiol.* Dec 1998; 64: 4897–4903.
17. Cunningham DS, Koepsel RR, Ataai MM, Domach MM. **Factors affecting plasmid production in *Escherichia coli* from a resource allocation standpoint.** *Microb Cell Fact.* May 2009; 22; 8: 27
18. Deutscher J, Francke C, Postma PW: **How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria.** *Microbiol Mol Biol Rev.* Dec 2006; 70: 939-1031.
19. Emmerling M, Dauner M, Ponti A, Fiaux J, Hochuli M, Szyperski T, Wüthrich K, Bailey JE, Sauer U. **Metabolic flux responses to pyruvate kinase knockout in *Escherichia coli*.** *J Bacteriol.* Jan 2002; 184: 152-64.
20. Escalante A, Calderón R, Valdivia A, de Anda R, Hernández G, Ramírez OT, Gosset G, Bolívar F. **Metabolic engineering for the production of shikimic acid in an evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system.** *Microb Cell Fact.* Apr 2010 12; 9: 21.
21. Flores N, Flores S, Escalante A, de Anda R, Leal L, Malpica R, Georgellis D, Gosset G, Bolívar F. **Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central**

- carbon metabolism and gal regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: phosphotransferase system.** Metab Eng. Mar 2005; 7:70-87.
22. Flores N, Xiao J, Berry A, Bolivar F, Valle F. **Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*.** Nat Biotechnol. May 1996; 14: 620-3.
23. Flores S, Flores N, de Anda R, González A, Escalante A, Sigala JC, Gosset G, Bolívar F. **Nutrient-scavenging stress response in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system, as explored by gene expression profile analysis.** J Mol Microbiol Biotechnol. 2005; 10: 51-63.
24. Flores S, Gosset G, Flores N, de Graaf AA, Bolívar F. **Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by (13)C labeling and NMR spectroscopy.** Metab Eng. Apr 2002; 4: 124-37.
25. Galindo E, Peña C, Núñez C, Segura D, Espín G. **Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*.** Microb Cell Fact. Feb 2007 16; 6:7.
26. Gao X, Yuan XX, Shi ZY, Guo YY, Shen XW, Chen JC, Wu Q, Chen GQ. **Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates by *E. coli* containing an optimized PHA synthase gene.** Microb Cell Fact. Sep 2012; 11: 130
27. Garcia,A. Segura,D. Espin,G. Galindo,E. Castillo,T. Pena,C. **High production of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) by an *Azotobacter vinelandii* mutant altered in PHB regulation using a fed-batch fermentation process.** Biochemical Engineering Journal. 2014; 82: 117-123.
28. Glick BR. **Metabolic load and heterologous gene expression.** Biotechnol Adv. 1995; 13: 247-61.
29. Hahn SK, Chang YK, Kim BS, Chang HN. **Optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recover using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform.** Biotechnol Bioeng. Jun 1994; 44: 256-61.
30. Hong SH, Park SJ, Moon SY, Park JP, Lee SY. **In silico prediction and validation of the importance of the Entner-Doudoroff pathway in poly(3-hydroxybutyrate) production by metabolically engineered *Escherichia coli*.** Biotechnol Bioeng. Sep 2003 30; 83: 854-63.
31. Horng YT, Chien CC, Wei YH, Chen SY, Lan JC, Sun YM, Soo PC. **Functional cis-expression of *phaCAB* genes for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Escherichia coli*.** Lett Appl Microbiol. May 2011; 52: 475-83.

32. Jung IL, Phyo KH, Kim KC, Park HK, Kim IG. **Spontaneous liberation of intracellular polyhydroxybutyrate granules in *Escherichia coli***. Res Microbiol 156: 865-873.
33. Jung YM, Lee JN, Shin HD, Lee YH. **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. 2004; 98: 224-7.
34. Kang Z, Gao C, Wang Q, Liu H, Qi Q. **A novel strategy for succinate and polyhydroxybutyrate co-production in *Escherichia coli***. Bioresour Technol. Oct 2010; 101: 7675-8.
35. Kansiz M, Billman-Jacobe H, McNaughton D. **Quantitative determination of the biodegradable polymer Poly(beta-hydroxybutyrate) in a recombinant *Escherichia coli* strain by use of mid-infrared spectroscopy and multivariate statistics**. Appl Environ Microbiol. Aug 2000; 6: 3415-20.
36. Keasling JD. **Manufacturing molecules through metabolic engineering**. Science. Dec 2010; 330: 1355-8.
37. Keshavarz T, Roy I. **Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda**. Curr Opin Microbiol. Jun 2010; 13: 321-6.
38. Khanna S, Srivastava AK. **Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates** Process Biochemistry. Feb 2005; 40: 607-619.
39. Kidwell J, Valentin HE, Dennis D. **Regulated expression of the *Alcaligenes eutrophus pha* biosynthesis genes in *Escherichia coli***. Appl Environ Microbiol. Apr 1995; 61: 1391-8.
40. Kim BS, Lee SY, Chang HN. **Production of poly-β-hydroxybutyrate by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli***. Biotechnology Letters. Sep 1992; 4: 811-816.
41. Kim BS. **Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates**. Enzyme Microb Technol. Dec 2000; 27: 774-777.
42. Lee IY, Kim MK, Park YH, Lee SY. **Regulatory effects of cellular nicotinamide nucleotides and enzyme activities on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in recombinant *Escherichia coli***. Biotechnol Bioeng. Dec 1996; 52: 707-12.
43. Lee SY, Chang HN, Chang YK. **Production of poly(beta-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli***. Ann N Y Acad Sci. May 1994; 721: 43-53. [a]
44. Lee SY, Lee YK, Chang HN. **Stimulatory Effects of Amino Acids and Oleic Acid on Poly(3-Hydroxybutyric Acid) Synthesis by Recombinant *Escherichia coli***. Journal of fermentation and bioengineering. 1995; 79: 177-180.

45. Lee SY, Yim KS, Chang HN, Chang YK. **Construction of plasmids, estimation of plasmid stability, and use of stable plasmids for the production of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli*.** J Biotechnol. Feb 1994; 32: 203-11. [b]
46. Lee SY. **Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria.** Trends in Biotechnology. Nov 1996; 14: 431-438
47. Li M, Wang J, Geng Y, Li Y, Wang Q, Liang Q, Qi Q. **A strategy of gene overexpression based on tandem repetitive promoters in *Escherichia coli*.** Microb Cell Fact. Feb 2012 6; 11:19.
48. Li R, Chen Q, Wang PG, Qi Q. **A novel-designed *Escherichia coli* for the production of various polyhydroxyalkanoates from inexpensive substrate mixture.** Appl Microbiol Biotechnol. Jul 2007; 75: 1103-9. [a]
49. Li R, Zhang H, Qi Q. **The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*.** Bioresour Technol. Sep 2007; 98: 2313-20. [b]
50. Li ZJ, Cai L, Wu Q, Chen GQ. **Overexpression of NAD kinase in recombinant *Escherichia coli* harboring the *phbCAB* operon improves poly(3-hydroxybutyrate) production.** Appl Microbiol Biotechnol. Jul 2009; 83: 939-47.
51. Lim SJ, Jung YM, Shin HD, Lee YH. **Amplification of the NADPH-related genes *zwf* and *gnd* for the oddball biosynthesis of P3HB in an *E. coli* transformant harboring a cloned *P3HBCAB* operon.** J Biosci Bioeng. 2002; 93: 543-9.
52. Madison LL, Huisman GW. **Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic.** Microbiol Mol Biol Rev. 1999 Mar; 63: 21-53. Review.
53. Mahishi LH, Tripathi G, Rawal SK. **Poly(3-hydroxybutyrate) (P3HB) synthesis by recombinant *Escherichia coli* harbouring *Streptomyces aureofaciens* P3HB biosynthesis genes: Effect of various carbon and nitrogen sources.** Microbiol. Res. 2003; 158: 19–27
54. Manchak J, WJ Page. **Control of polyhydroxyalkanoate synthesis in *Azotobacter vinelandii* strain UWD.** Microbiology. Apr 1994; 140: 953-963.
55. Martínez K, de Anda R, Hernández G, Escalante A, Gosset G, Ramírez OT, Bolívar FG. **Coultivation of glucose and glycerol enhances the production of aromatic compounds in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system.** Microb Cell Fact. Jan 2008 22; 7: 1.
56. Meza E, Becker J, Bolivar F, Gosset G, Wittmann C. **Consequences of phosphoenolpyruvate: sugar phosphotranferase system and pyruvate kinase isozymes inactivation in central carbon metabolism flux distribution in *Escherichia coli*.** Microb Cell Fact. Sep 2012 13; 11: 127.

57. Miyake M, Miyamoto C, Schnackenberg J, Kurane R, Asada Y. **Phosphotransacetylase as a key factor in biological production of polyhydroxybutyrate.** Appl Biochem Biotechnol. 2000; 84-86:1039-44.
58. Monteil-Rivera F, Betancourt A, Van Tra H, Yezza A, Hawari J. **Use of headspace solid-phase microextraction for the quantification of poly(3-hydroxybutyrate) in microbial cells.** J Chromatogr A. Jun 2007; 1154: 34-41.
59. Moreno Sarmiento N., Malagón Romero D., Cortázar J., Espinosa Hernández A. **Recuperación de poli- β -hidroxihexanoato-co-octanoato sintetizado por *Pseudomonas putida* mediante el uso de dispersiones hipoclorito-cloroformo.** Revista de la Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. 2006; 11: 41-48.
60. Nickel PI, de Almeida A, Melillo EC, Galvagno MA, Pettinari MJ. **New recombinant *Escherichia coli* strain tailored for the production of poly(3-hydroxybutyrate) from agroindustrial by-products.** Appl Environ Microbiol. Jun 2006; 72: 3949-54.
61. Nickel PI, Pettinari MJ, Galvagno MA, Méndez BS. **Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis by recombinant *Escherichia coli arca* mutants in microaerobiosis.** Appl Environ Microbiol. Apr 2006; 72: 2614-20. [a]
62. Nickel PI, Pettinari MJ, Méndez BS, Galvagno MA. **Statistical optimization of a culture medium for biomass and poly(3-hydroxybutyrate) production by a recombinant *Escherichia coli* strain using agroindustrial byproducts.** Int Microbiol. Dec 2005; 8: 243-50.
63. Ojumu, TV, Yu J, Solomon BO. **Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer.** African Journal of Biotechnology. Jan 2004; 3:18-24.
64. Ow DS-W, Nissom PM, Philp R, Oh SK-W, Yap MG-S. **Global transcriptional analysis of metabolic burden due to plasmid maintenance in *Escherichia coli* DH5 α during batch fermentation.** Enzyme Microb Technol 2006, 39: 391-398.
65. Pena C, Lopez S, Garcia A, Espin G, Romo-Urbe A, Segura D. **Biosynthesis of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) with a high molecular mass by a mutant strain of *Azotobacter vinelandii* (OPN).** Ann Microbiol. 2014 64:39-47.
66. Peralta-Gil M, Segura D, Guzmán J, Servín-González L, Espín G. **Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic *phbBAC* operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR.** J Bacteriol. Oct 2002; 184: 5672-7.
67. Plumbridge J. **Regulation of gene expression in the PTS in *Escherichia coli*: the role and interactions of Mlc.** Curr Opin Microbiol. Apr 2002; 5: 187-93.

68. Ponce E, Flores N, Martínez A, Valle F, Bolívar F. **Cloning of the two pyruvate kinase isoenzyme structural genes from *Escherichia coli*: the relative roles of these enzymes in pyruvate biosynthesis.** J Bacteriol. Oct 1995; 177: 5719-22.
69. Postma PW, Lengeler JW, Jacobson GR. **Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria.** Microbiol Rev. Sep 1993; 57: 543-94.
70. Rodriguez A, Martínez JA, Báez-Viveros JL, Flores N, Hernández-Chávez G, Ramírez OT, Gosset G, Bolivar F. **Constitutive expression of selected genes from the pentose phosphate and aromatic pathways increases the shikimic acid yield in high-glucose batch cultures of an *Escherichia coli* strain lacking PTS and *pykF*.** Microb Cell Fact. Sep 2013 30; 12: 86.
71. Sabido A, Martínez LM, de Anda R, Martínez A, Bolívar F, Gosset G. **A novel plasmid vector designed for chromosomal gene integration and expression: use for developing a genetically stable *Escherichia coli* melanin production strain.** Plasmid. Jan 2013; 69:16-23 [a]
72. Sabido A, Sigala JC, Hernández-Chávez G, Flores N, Gosset G, Bolívar F. **Physiological and transcriptional characterization of *Escherichia coli* strains lacking interconversion of phosphoenolpyruvate and pyruvate when glucose and acetate are coutilized.** Biotechnol Bioeng. Dec 2013 [b]
73. Sabido Ramos Andrea. **Caracterización fisiológica y transcripcional de cepas de *Escherichia coli ptsHIcrr-* modificadas en el nodo PEP-PYR.** (2014) Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología, UNAM. México.
74. Sanchez AM, Andrews J, Hussein I, Bennett GN, San KY. **Effect of overexpression of a soluble pyridine nucleotide transhydrogenase (UdhA) on the production of poly(3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*.** Biotechnol Prog. Mar-Apr 2006; 22: 420-5.
75. Sauer U, Eikmanns BJ. **The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria.** FEMS Microbiol Rev. Sep 2005; 29: 765-94.
76. Segura D, Espín G. **Mutational inactivation of a gene homologous to *Escherichia coli* ptsP affects poly-beta-hydroxybutyrate accumulation and nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*.** J Bacteriol. Sep 1998; 180: 4790-8.
77. Segura D, Vargas E, Espín G. **Beta-ketothiolase genes in *Azotobacter vinelandii*.** Gene. Dec 2000 30; 260: 113-20.
78. Senior PJ, Dawes EA. **The regulation of poly-beta-hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*.** Biochem J. May 1973; 134:225-38.

79. Shi H, Kyuwa K, Takasu M, Shimizu K. **Temperature-induced expression of PHB genes in *Escherichia coli* and the effect of temperature patterns on the production of poly-3-hydroxybutyrate.** J Biosci Bioeng. 2001; 9: 21-6.
80. Sigala JC, Flores S, Flores N, Aguilar C, de Anda R, Gosset G, Bolívar F. **Acetate metabolism in *Escherichia coli* strains lacking phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system; evidence of carbon recycling strategies and futile cycles.** J Mol Microbiol Biotechnol. 2009; 16: 224-35.
81. Song BG, Kim TK, Jung YM, Lee YH. **Modulation of *talA* gene in pentose phosphate pathway for overproduction of poly-beta-hydroxybutyrate in transformant *Escherichia coli* harboring *phbCAB* operon.** J Biosci Bioeng. Sep 2006; 102: 237-40.
82. Suriyamongkol P, Weselake R, Narine S, Moloney M, Shah S. **Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - a review.** Biotechnol Adv. March-April 2007; 25: 148-75.
83. Thakor N, Trivedi U, Patel KC. **Microbiological and biotechnological aspects of biodegradable plastics: Poly(hydroxyalkanoates).** Indian Journal of Biotechnology. Apr 2006; 5: 137-147.
84. Tsuge T. **Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates.** Journal of Bioscience and Bioengineering. Dec 2002; 94: 579–584
85. Tyo KE, Ajikumar PK, Stephanopoulos G. **Stabilized gene duplication enables long-term selection-free heterologous pathway expression.** Nat Biotechnol. Aug 2009; 27: 760-5.
86. Tyo KE, Fischer CR, Simeon F, Stephanopoulos G. **Analysis of polyhydroxybutyrate flux limitations by systematic genetic and metabolic perturbations.** Metab Eng. May 2010; 12: 187-95.
87. Van Wegen RJ, Lee SY, Middelberg AP. **Metabolic and kinetic analysis of poly(3-hydroxybutyrate) production by recombinant *Escherichia coli*.** Biotechnol Bioeng. Jul 2001. 5; 74: 70-80.
88. Van Wegen RJ, Ling Y, Middelberg APJ. **Industrial Production of Polyhydroxyalkanoates Using *Escherichia coli*: An Economic Analysis.** Chemical Engineering Research & Design. Mar 1998; 76: 417-426
89. Wang F, Lee SY. **Poly(3-Hydroxybutyrate) Production with High Productivity and High Polymer Content by a Fed-Batch Culture of *Alcaligenes latus* under Nitrogen Limitation.** Appl. Environ. Microbiol. Sept 1997; 63: 3703-3706. [a]

90. Wang F, Lee SY. **Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of filamentation-suppressed recombinant *Escherichia coli*.** Appl Environ Microbiol. Dec 1997; 63: 4765–4769. [b]
91. Woolston BM, Edgar S, Stephanopoulos G. **Metabolic engineering: past and future.** Annu Rev Chem Biomol Eng. 2013; 4: 259-88.
92. Zinn M, Witholt B, Egli T. **Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate.** Adv Drug Deliv Rev. Dec 2001; 3:5-21.

Anexos

Anexo 1: Estandarización del protocolo para la extracción, metanólisis y derivatización del P3HB

En nuestro laboratorio (Longoria-Hernández, comunicación personal) se desarrolló un método para la extracción, metanólisis y derivatización del P3HB producido por *E. coli* basado en reportes previos (Braunegg *et al*, 1978; Betancourt *et al*, 2007). Esta metodología permite realizar todos los procesos antes mencionados en el mismo tubo de reacción. La técnica consiste en los siguientes pasos:

- 1) Pesar 10 mg de células liofilizadas en viales de vidrio con tapa de teflón (de 4 mL).
- 2) Agregar 0.5 ml de H₂SO₄ al 10% v/v en MeOH y 25 µL de ácido benzóico (40 mg/ml en MeOH).
- 3) Calentar la muestra (el vial cerrado perfectamente) durante ciclos de 40 s en el microondas máxima potencia. Durante cada ciclo permitir que la mezcla de reacción se enfríe durante 2 minutos hasta completar 5 ciclos de calentamiento.
- 4) Esperar que la muestra regrese a temperatura ambiente y agregar 0.5 ml de cloroformo y 0.25 ml de agua milli Q. Agitar vigorosamente durante 3 ciclos de 1 min c/u.
- 5) Centrifugar a 3000 rpm durante 2 min para separar las fases.
- 6) Tomar la fase orgánica (la más densa) y colocarla en viales para CG.
- 7) Analizar las muestras utilizando el método P3HB2010.

El resultado de este tratamiento es la conversión del P3HB en metil éster de hidroxibutirato (Me-HB) (Figura 21), el cual es un compuesto volátil que es posible detectar usando cromatografía de gases.

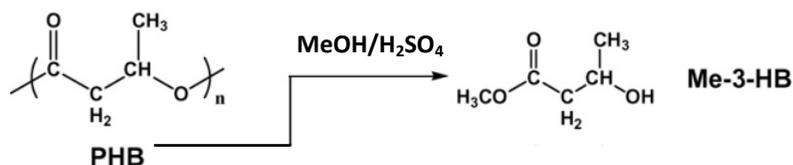


Figura 21. Depolimerización del P3HB. Modificado de Monteil-Rivera *et al*, 2007.

Tras realizar la técnica como se ha descrito anteriormente, las muestras se observaban con residuos celulares, lo cual nos sugería que el proceso no se estaba llevando a cabo eficientemente, pues un indicativo de que el proceso está completo es que los viales se observen transparentes y esto no ocurría. Por tanto, para sortear este problema se realizaron las siguientes modificaciones:

- a) Aumento del número de ciclos de calentamiento de las muestras. No obstante tras una hora de ciclos de calentamiento las muestras seguían observándose turbias, por lo que el objetivo de disminuir el tiempo de reacción al usar un horno de microondas en lugar del calentamiento convencional (3 h, 100°C) no se estaba cumpliendo. Ésto, aunado a que el horno no mantenía la misma potencia conforme transcurría el tiempo de uso, provocaba que las muestras se quemaran y por tanto ya no eran útiles para realizar la cuantificación en el cromatógrafo.
- b) Disminución de la cantidad de células. Se utilizaron 5 mg, 1 mg y 0.5 mg, siendo esta última cantidad la única que dio resultados favorables al no observarse partículas en el vial tras realizar el tratamiento con H₂SO₄- MeOH; sin embargo la cantidad tan pequeña de muestra disminuía también la cantidad de P3HB presente, impidiendo la cuantificación en el cromatógrafo de gases.

Como resultado de los experimentos previos se decidió variar 2 pasos en la técnica para la cuantificación de P3HB:

- a) Se sustituyó el calentamiento en horno de microondas por el calentamiento en un Thermoblock a 95 °C. El tiempo de reacción es dependiente de cada muestra a analizar y la cantidad de P3HB presente en las mismas, este puede ir de 4 a 8 horas en ciclos de 20 minutos, dejando enfriar a temperatura ambiente y dando vórtex por 30 segundos entre cada ciclo.

- b) Incluir un método de extracción previo a la hidrólisis y derivatización del polímero. Esto con la finalidad de eliminar la mayor cantidad de partículas que no fueran P3HB, de tal manera que al tenerlo con mayor pureza se redujera y favoreciera el proceso de metanólisis y derivatización. Con este fin, se realizó una revisión de los diferentes métodos descritos en la literatura (Braunegg *et al.*, 1978; Hahn *et al.*, 1994; Kansiz *et al.*, 2000; Nikel *et al.*, 2006) y se seleccionaron los siguientes para evaluar su efecto sobre la cuantificación de P3HB:

Recuperación de P3HB utilizando una solución de hipoclorito de sodio NaClO (2% v/v): efecto del tiempo de reacción.

El empleo de soluciones de hipoclorito de sodio es un método alternativo a la extracción de P3HB con solventes orgánicos. Debido a su elevado poder oxidante, actúa desestabilizando las membranas y digiriendo partículas no pertenecientes al polímero (Hahn *et al.*, 1994), facilitando así la extracción del P3HB.

Para realizar esta técnica se pesaron 5 mg de células liofilizadas de una misma cepa y se adicionó 1 ml de una solución de NaClO 2% v/v en los mismos viales en los que se llevaría a cabo la metanólisis y derivatización del P3HB. Esto con el objetivo de evitar la pérdida de polímero al momento de cambiar de tubos. Dichas muestras se sometieron a los siguientes tratamientos:

Tabla 14. Tratamientos para la extracción de P3HB.

Temperatura	30°C
Tiempo	60 minutos
	120 minutos

Transcurrido el tiempo de reacción, las muestras se centrifugaron (8 minutos, 8000 rpm) y se eliminó la solución de NaClO, habiendo precipitado el P3HB dada su naturaleza hidrofóbica. Posteriormente se realizaron tres lavados para eliminar los restos de NaClO adicionando 1 ml de agua miliQ, resuspendiendo el P3HB y centrifugando (8 min, 8000 rpm) para eliminar el agua entre cada lavado; finalmente se agregaron 500 µl de acetona para secar la muestra y se dejaron reposar toda la noche a 42°C.

Una vez que las muestras estuvieron secas se realizó la hidrólisis y derivatización del polímero siguiendo la metodología previamente descrita. Las muestras se analizaron en el cromatógrafo de gases y los resultados fueron muy similares entre ellos, por lo que se optó por realizar la extracción a 30°C durante una hora.

Recuperación de P3HB utilizando dispersiones de NaClO y Cloroformo

Ha sido reportado también el empleo de dispersiones de NaClO/Cloroformo como método alternativo para la extracción de P3HB (Hahn *et al*, 1994; Moreno-Sarmiento *et al.*, 2006), ya que el uso de este solvente facilita la extracción del polímero, pues una vez que se libera de la célula por acción del NaClO este puede migrar hacia el cloroformo protegiendo las moléculas de P3HB de cualquier acción destructiva causada por el NaClO.

5 miligramos de células liofilizadas fueron tratadas con una dispersión de 500 µl de NaClO (2%) y 500 µl de cloroformo. Después del tratamiento a 30°C durante 1 hora, la dispersión fue centrifugada 8000 rpm por 10 minutos, obteniéndose 3 fases. La fase superior correspondía a la solución de NaClO, la fase intermedia contenía desechos celulares y la fase inferior contenía el cloroformo con el P3HB. Para recuperar el cloroformo se retiró la fase

superior con una pipeta, posteriormente el cloroformo se extrajo con una jeringa para insulina, colocándola en otro vial para realizar la metanólisis y derivatización del polímero.

Una vez realizado el proceso de metanólisis y derivatización del P3HB, al hacer la separación de fases para recuperar la fase orgánica, el volumen de muestra que se obtenía era muy poco, por lo que no era posible realizar la cuantificación en el cromatógrafo de gases. Esto podría deberse a que durante el proceso de calentamiento y recuperación de las muestras se pierde un volumen considerable. Como resultado de estos experimentos se desechó esta técnica para la extracción del P3HB debido a que era imposible realizar la cuantificación en el cromatógrafo de gases.

Resultado de los experimentos anteriores el protocolo de extracción, metanólisis y derivatización del P3HB para las cepas PB11, PB12 y sus respectivas derivadas, quedó de la siguiente manera:

Etapas de extracción:

1. Pesar 10 mg de células liofilizadas en viales de vidrio con tapa de teflón (de 4 mL).
2. Adicionar 1 ml de NaClO al 2% (v/v) e incubar a 30°C por una hora.
3. Realizar 3 lavados agregando 1ml de agua milliQ y resuspender el polímero para eliminar posibles restos de NaClO. Posteriormente centrifugar la muestra (8 min, 8000rpm) para eliminar el agua.
4. Agregar 500 µl de acetona y dejar secar las muestras una noche a 42°C

Etapas de metanólisis y derivatización:

5. Agregar 0.5 ml de H₂SO₄ al 10% v/v en MeOH y 25 µl de ácido benzoico (40 mg/ml en MeOH).

6. Calentar la muestra (el vial cerrado perfectamente) 95°C durante 4 a 8 horas (el tiempo depende de cada muestra, el calentamiento se detiene hasta que el líquido se observe transparente).
7. Esperar que la muestra regrese a temperatura ambiente y agregar 0.5 ml de cloroformo y 0.25 ml de agua milli Q. Agitar vigorosamente durante 3 ciclos de 1 min c/u.
8. Centrifugar a 3000 rpm durante 2 min para separar las fases.
9. Tomar la fase orgánica (la más densa) y colocarla en viales para CG y analizar las muestras utilizando el método P3HB2010.

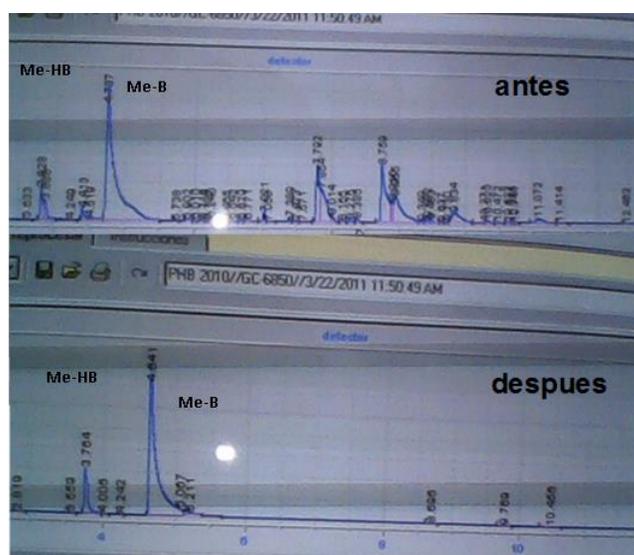


Figura 22. Cromatogramas de antes y después de realizar las modificaciones al protocolo para la extracción, metanólisis y derivatización del P3HB.

Como se observa en la figura 22, antes de realizar la adaptación del método de cuantificación de P3HB los cromatogramas mostraban mucho ruido, lo cual nos indicaba que el proceso de extracción, metanólisis y derivatización del polímero no se estaba llevando a cabo de forma adecuada, impidiendo realizar una cuantificación apropiada del mismo. Sin embargo, después de realizar los cambios al protocolo se logró obtener cromatogramas más limpios,

donde solo se observan los picos de Me-HB y Me-B (estándar interno), permitiéndonos realizar un cálculo más certero del contenido de P3HB en las células.

Cuantificación de P3HB con el método de estándar interno en cromatógrafo de gases

EL método del estándar interno tiene como objetivo compensar los errores inherentes a la preparación y manejo de la muestra a analizar, así como a la variabilidad del propio sistema de GC y método de análisis. El estándar interno es una sustancia que se añade a todos los estándares y las muestras en cantidad conocida y suficiente para ser determinado. Su adición no debe causar interferencia en el análisis y debe proporcionar una señal analítica similar al analito a cuantificar pero distinguible del mismo.

EL método está basado en que cuando las señales del analito y del estándar interno responden proporcionalmente a las fluctuaciones del método y del equipo utilizado, la razón de estas señales es independiente a dichas fluctuaciones. Compensando así, los errores provenientes de la manipulación de la muestra por analizar.

Este método emplea una curva de calibración. Las muestras se preparan colocando una cantidad igual del estándar interno con concentraciones conocidas del analito. A continuación, se inyecta esta solución, el cromatograma contiene dos picos, uno del estándar de referencia (analito) y otro del estándar interno. La relación de área de estos dos picos se grafica con respecto a la concentración del analito (Figura 23). Finalmente, para conocer la concentración de una muestra desconocida, se interpola en la gráfica obtenida, el valor de la razón de área de la muestra, la cual debe contener la misma cantidad de estándar interno que los patrones de la curva de calibrado.

Curva de calibración P3HB

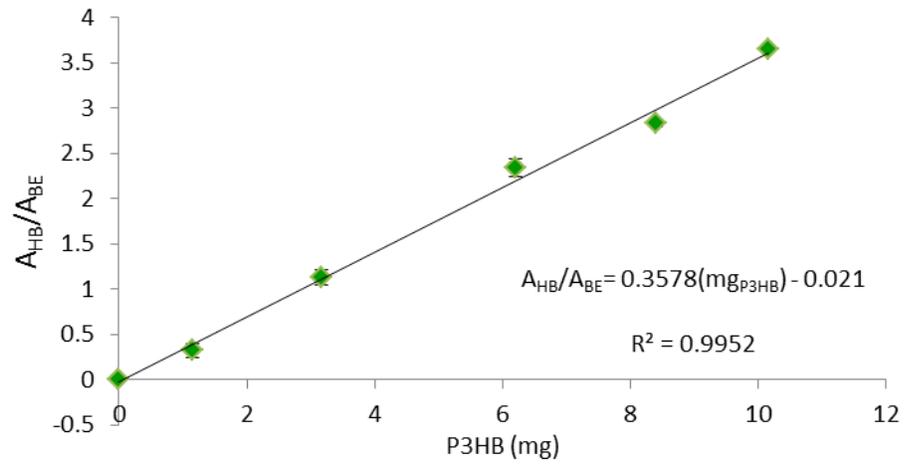


Figura 23. Curva de calibración para la cuantificación de P3HB en cromatógrafo de gases.

Anexo 2: Producción científica

- VII Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica. Organizado por el Colegio Mexicano de Ingenieros Bioquímicos A.C.
Marzo, 2012; Ixtapa-Zihuatanejo, Gro.
- XXIX Congreso Nacional de Bioquímica. Organizado por la Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C.
Noviembre, 2012; Oaxaca, Oax.
- XV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería.
Junio, 2013; Cancún, Q. Roo.