



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

INGENIERÍA METABÓLICA DE *Escherichia coli* PARA LA PRODUCCIÓN DE 2,3-BUTANODIOL A PARTIR DE GLUCOSA MEDIANTE UN SISTEMA DE EXPRESIÓN INDUCIBLE POR TEMPERATURA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
ELISEO RONAY MOLINA VÁZQUEZ

DR. ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ
[Instituto de Biotecnología – Universidad Nacional Autónoma de México](#)

DR. VÍCTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLÁN
[Instituto de Biotecnología – Universidad Nacional Autónoma de México](#)

DR. AGUSTÍN LÓPEZ MUNGUÍA CANALES
[Instituto de Biotecnología – Universidad Nacional Autónoma de México](#)

Ciudad de México. diciembre, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Dr. Ismael Hernández Lucas
Secretario	Dr. Leobardo Serrano Carreón
Vocal	Dr. Andrea Sabido Ramos
Vocal	Dr. Edgar Dantán González
Vocal	Dr. Clarita Olvera Carranza

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Alfredo Martínez Jiménez en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Para su realización se contó con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto apoyado por el FONCICYT: SMIBIO - ERANet-LAC Número C0013 – 248192 y de la UNAM con el proyecto PAPIIT – DGAPA – IV100119.

DEDICATORIAS

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alfredo Martínez Jiménez por su tiempo, paciencia y enseñanzas, las cuales me han permitido ser una mejor persona y crecer profesionalmente. Es un excelente investigador y una persona ejemplar.

Al comité tutorial conformado por el Dr. Agustín López Munguía Canales y el Dr. Victor Bustamante Santillán por su asesoría, observaciones y aportaciones al desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Luis Caspeta por sus ideas, comentarios y asesoría para diseñar experimentos y análisis de resultados.

A la M. en C. Georgina Hernández Chávez por su apoyo en los análisis de muestras por HPLC.

A la IQ. Luz María Martínez por su apoyo en técnicas de biología molecular.

A la Dra. Alejandra Vargas Tah por la construcción de la cepa AV11.

A la Dra. Estefanía Sierra por su apoyo en el área de fermentación.

Al CONACyT por el apoyo económico que hizo posible el presente trabajo.

Contenido

Abreviaturas	11
I. Resumen	12
II. Introducción	13
III. Antecedentes	15
3.1 El 2,3-Butanodiol un químico de plataforma.....	15
3.2 Metabolismo del 2,3-butanodiol.....	16
3.2.1 Biosíntesis del 2,3-butanodiol.....	16
3.2.2 El pH y su relación con el 2,3-butanodiol.....	17
3.2.3 El 2,3-butanodiol y el balance redox celular.....	17
3.3 Producción biotecnológica de 2,3-butanodiol.....	19
3.4 Ingeniería metabólica de <i>E. coli</i> para la producción de 2,3-butanodiol.....	21
3.5 Estrategia propuesta para la producción de 2,3-BDO en <i>E. coli</i> mediante un sistema de expresión inducible por temperatura.....	22
3.6 Transferencia de oxígeno en la producción de 2,3-Butanodiol.....	25
IV. Justificación	28
V. Hipótesis	29
VI. Objetivos	29
VII. Materiales y métodos	30
7.1 Técnicas de biología molecular.....	30
7.1.1 Clonación de extensión de polimerasa circular (CPEC).....	30
7.1.2 PCR de extensión y solapamiento (OE-PCR).....	30
7.1.3 Edición genómica con el sistema CRISPR Cas 9.....	31
7.2 Cepas, plásmidos y oligonucleótidos.....	33
7.3 Cultivos y evaluación de cepas.....	36
7.4 Ensayos de actividad enzimática.....	36
7.5 Métodos analíticos.....	38
7.6 Determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno (k_{La}).....	38
VIII. Resultados	40

8.1	Diseño y síntesis del vector pBDOop.....	40
8.2	Construcción de los elementos necesarios para la técnica CRISPR Cas 9.....	42
8.2.1	Modificación del vector pCas.....	42
8.2.2	Construcción del vector pTarget_HtpG.....	42
8.2.3	Construcción del DNA donador para el locus HtpG.....	43
8.3	Edición genómica de las cepas MG1655 y AV11.....	43
8.4	Evaluación fenotípica de la cepa EM01.....	43
8.5	Producción de 2,3-BDO en fermentadores.....	46
8.5.1	Evaluación del sistema de inducción por choque térmico.....	46
8.5.2	Estudio de transferencia de oxígeno en la fase de crecimiento de EM01.....	50
8.5.3	Efecto del momento de inducción en la producción de BDO.....	55
8.5.4	Estudio de transferencia de oxígeno en la fase de producción de BDO.....	59
8.5.5	Cultivos alimentados y su efecto en la producción de BDO.....	65
8.5.6	Efecto de la eliminación del gen <i>arcA</i> en la producción de BDO con la cepa EM01.....	71
8.5.7	Resumen: Estrategias de ingeniería metabólica y de cultivo para la producción de butanodiol.....	74
IX.	Conclusiones	76
X.	Perspectivas	78
XI.	Referencias	79

Índice de figuras

Figura 1. Diferentes formas enantioméricas del 2,3-Butanodiol.....	15
Figura 2. Reacciones involucradas en la biosíntesis de 2,3-BDO.....	17
Figura 3. Efecto de la presencia de oxígeno en la vía metabólica del 2,3-BDO. Los símbolos en rojo indican el efecto del oxígeno en las reacciones involucradas en la síntesis del 2,3-BDO.....	18
Figura 4. Vía metabólica para la producción de 2,3-Butanodiol en la cepa de <i>E. coli</i> AV1123	
Figura 5. Estrategia propuesta para el control de la expresión de la vía metabólica en la producción de 2,3-BDO mediante choque térmico en <i>E. coli</i>	24
Figura 6. Diagrama del proceso de CPEC.....	30
Figura 7. Diagrama que representa el proceso de OE-PCR.....	31
Figura 8. A) Proceso para determinar k_{La} por el método de "gassing out" y B) método para calcular el coeficiente de transferencia de oxígeno (K_{La}).....	39
Figura 9. Diseño del operón para la producción de 2,3-BDO.....	41
Figura 10. Estrategia utilizada para construir el vector pTarget_HtpG.....	42
Figura 11. Estrategia utilizada para construir el DNA donador HtpG.....	43
Figura 12. Estudios del fenotipo de la cepa EM01, mediante la producción de GFP bajo diferentes temperaturas. Ensayos realizados en tubos con 3 mL de medio AM1 2X, 20 g/L de glucosa, IPTG a 10 μ M, cloranfenicol a 30 μ g/mL y una agitación de 300 rpm. Las mediciones se realizaron a las 24 h y los cambios de temperatura a las 8 h.....	44
Figura 13. A) Cinética de crecimiento y glucosa residual y B) producción de metabolitos de la cepa AV11/pAcycDuet_BDOBa. Etapa de crecimiento 600 rpm; 1.3 vvm y etapa de producción OTR=1.8 mmolO ₂ /L h. La inducción con ITPG, así como el cambio en la transferencia de oxígeno se indica con la línea discontinua. ** El piruvato a altas concentraciones no pudo ser cuantificado con exactitud. En las gráficas se conservan los datos para ilustrar la tendencia en la producción de este metabolito.....	46
Figura 14. A) Cinética de crecimiento y glucosa residual y B) producción de metabolitos de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa. Etapa de crecimiento 600 rpm; 1.3 vvm y etapa de producción OTR=1.8 mmolO ₂ /L h. La inducción térmica a 41 °C, así como el cambio en la transferencia de oxígeno se indica con la línea discontinua. ** El piruvato a altas concentraciones no pudo ser cuantificado con exactitud. En las gráficas se conservan los datos para ilustrar la tendencia en la producción de este metabolito.....	48
Figura 15. A) Cinéticas de crecimiento y glucosa residual y B) producción de metabolitos de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa. Manteniendo la tensión de oxígeno disuelto a 5% y 10%. La inducción térmica a 41 °C se indica con la línea roja discontinua.....	50
Figura 16. A) Cinéticas de crecimiento y glucosa residual y B) producción de metabolitos de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa. Manteniendo concentraciones de oxígeno disuelto de 15 y 20%. La inducción térmica a 41 °C se indica con la línea roja discontinua.....	52
Figura 17. A) Cinética de crecimiento y glucosa residual y B) producción de metabolitos de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa en cultivo a baja transferencia de oxígeno OTR= 1.8	

mmolO₂/L h. La inducción térmica a 41 °C se indica con la línea roja discontinua. ** El piruvato a altas concentraciones no pudo ser cuantificado con exactitud. En las gráficas se conservan los datos para ilustrar la tendencia en la producción de este metabolito.....53

Figura 18. Efecto del momento de la inducción térmica en A) cinética de crecimiento y glucosa residual y B) producción de metabolitos en los cultivos de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa. Fase de crecimiento a O₂d= 5%, fase de limitación de oxígeno de producción OTR= 1.8 mmolO₂/L h (línea punteada azul) e inducción térmica a 41 °C (línea discontinua roja).57

Figura 19. Efecto de diferentes niveles de transferencias de oxígeno en la fase de producción en la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa. A) cinética de crecimiento y glucosa residual y B) producción de metabolitos. Fase de crecimiento a O₂d= 5%, fase de producción diferentes condiciones de transferencia de oxígeno: OTR= 1.8, 8.2 y 11.8 mmolO₂/L h (línea punteada azul), posterior inducción térmica a 41 °C (línea discontinua roja). ** El piruvato a altas concentraciones no pudo ser cuantificado con exactitud. En las gráficas se conservan los datos para ilustrar la tendencia en la producción de este metabolito.....60

Figura 20. Cinéticas de crecimiento y glucosa residual y B) producción de metabolitos de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa. Fase de crecimiento a O₂d= 5%, fase de producción una OTR= 1.8mmolO₂/L h (línea punteada azul), posterior inducción térmica a 41 °C (línea discontinua roja).62

Figura 21. Efecto de la transferencia de oxígeno en la producción y proporción de acetoína y BDO.64

Figura 22. Duplicado de la cinética de crecimiento, glucosa residual y producción de metabolitos del cultivo alimentado de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa. Fase de crecimiento a O₂d= 5%, fase de producción OTR= 1.8 mmolO₂/L h (línea punteada azul) posterior inducción térmica a 41 °C (línea discontinua roja). Alimentación a 0.06 mL/min con glucosa a 200 g/L durante el periodo 18 h a 36 h (líneas punteadas verdes).66

Figura 23. Actividad enzimática en las diferentes etapas del cultivo alimentado de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa.....68

Figura 24. Duplicado del cultivo de la cepa EM01ΔarcA/pAcycDuet_BDOBa con la estrategia de cultivo desarrollada. Fase de crecimiento a O₂d= 5%, fase de producción a una OTR= 1.8 mmolO₂/L h (línea punteada azul), posterior inducción térmica a 41 °C (línea discontinua roja).72

Figura 25. Distribución del carbono destinado a la vía de BDO bajo diferentes estrategias de ingeniería metabólica y de cultivo.....74

Índice de tablas

Tabla 1. Producción de 2,3-BDO utilizando organismos silvestres.....	20
Tabla 2 Elementos necesarios para la edición genómica con el sistema CRISPR Cas 9.....	31
Tabla 3. Cepas utilizadas en este estudio.....	33
Tabla 4. Plásmidos utilizados en este estudio.....	33
Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.....	35
Tabla 6. Parámetros cinéticos y estequiométricos de la cepa AV11/pAcycDuetBDO_Ba (etapa de crecimiento 600 rpm; 1.3 vvm y etapa de producción OTR=1.8 mmolO ₂ /L h).....	47
Tabla 7. Parámetros cinéticos y estequiométricos de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa (etapa de crecimiento 600 rpm; 1.3 vvm y etapa de producción OTR=1.8 mmolO ₂ /L h.....	49
Tabla 8. Parámetros cinéticos y estequiométricos de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa en cultivos a diferentes niveles de oxígeno disuelto.....	51
Tabla 9. Parámetros cinéticos y estequiométricos de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa en cultivo a baja transferencia de oxígeno (OTR=1.8 mmolO ₂ /L h).....	53
Tabla 10. Efecto del momento de inducción en los parámetros cinéticos y estequiométricos de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa (fase de crecimiento O ₂ d=5% y fase de producción OTR= 1.8 mmolO ₂ /L h).....	55
Tabla 11. Parámetros cinéticos y estequiométricos de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa en respuesta a diferentes niveles de transferencias de oxígeno en la fase de producción (OTR= 1.8, 8.2 y 11.8 mmolO ₂ /L h).....	59
Tabla 12. Parámetros cinéticos y estequiométricos de cuatro réplicas del cultivo de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa. Fase de crecimiento a O ₂ d= 5%, fase de producción a una OTR= 1.8 mmolO ₂ /L h posterior inducción térmica a 41 °C.....	63
Tabla 13. Parámetros cinéticos y estequiométricos del cultivo alimentado (0.7 g Glc/h) de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa. Fase de crecimiento a O ₂ d= 5%, fase de producción a OTR= 1.8 mmolO ₂ /L h posterior inducción térmica a 41 °C.....	67
Tabla 14. Parámetros cinéticos y estequiométricos de la cepa EM01ΔarcA/pAcycDuet_BDOBa con la estrategia de cultivo desarrollada. Fase de crecimiento a O ₂ d= 5%, fase de producción a una OTR= 1.8 mmolO ₂ /L h posterior inducción térmica a 41 °C.....	72

Abreviaturas

μ : Velocidad específica de crecimiento

ALD: Acetolactato descarboxilasa

ALS: Acetolactato sintasa

BDH: Butanodiol deshidrogenasa

BDO: Butanodiol

Cas: genes asociados a CRISPR

CPEC: Clonación circular por extensión de la polimerasa (por sus siglas en inglés)

CRISPR: Agrupamientos regularmente interespaciados de secuencias palindrómicas cortas repetidas (Por sus siglas en inglés)

gRNA: RNA guía

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

$K_L\alpha$: Coeficiente de transferencia de oxígeno

NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido-oxidada

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido-reducida

OE-PCR: PCR de sobrelape y extensión (por sus siglas en inglés)

OTR: Velocidad de transferencia de oxígeno (por sus siglas en inglés)

OUR=Velocidad de consumo de oxígeno

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)

qp: productividad

QR: coeficiente de respiración celular (por sus siglas en inglés)

rpm: revolución por minuto

TPP: Tiamina pirofosfato

vvm: volumen de aire por volumen de líquido por minuto

Y_p/s : Rendimiento producto sustrato

Y_p/x : Rendimiento producto biomasa

Y_x/s : Rendimiento biomasa sustrato

I. Resumen

El petróleo es la principal materia prima y fuente de energía de nuestra sociedad. Su descubrimiento y el posterior desarrollo de tecnologías que permitieran su explotación fueron cruciales para grandes avances de la humanidad. Sin embargo, este recurso es limitado y la economía actual depende fuertemente de su disponibilidad. Existen varias fuentes de energía alterna. Pero cuando se trata de un suministro de moléculas, los bioprocesos son la alternativa más prometedora. El (R,R)-2,3-butanodiol es una molécula, que debido a su estructura química, tiene un amplio rango de aplicaciones en la industria de los combustibles, plásticos, alimentos y fármacos.

En este proyecto se hizo ingeniería metabólica en *E. coli* para producir (R,R)-2,3-butanodiol a partir de glucosa. Se construyó un operón sintético con los genes *alsS* de *B. licheniformis*, *alsD* de *B. amyloliquefaciens* y *bdhA* de *B. subtilis*, bajo el control un promotor T7, con sitios de unión a ribosoma y uso de codones optimizados. El operón fue clonado en el vector de bajo número de copia pAcycDuet-1. Para dirigir el flujo de carbono a esta vía metabólica, se utilizó la cepa AV11 que posee un fondo genético sin vías fermentativas. Además, pensando en su futura aplicación en procesos de sacarificación y fermentación simultánea y en evitar el costo de un inductor químico, se desarrolló un sistema molecular inducible por temperatura. Para ello se integró la RNA polimerasa T7 en el cromosoma de la cepa AV11, específicamente en el locus HtpG dependiente del factor transcripcional $\sigma 32$ que se expresa como respuesta a estrés térmico, resultando así la cepa EM01 (MG1655 $\Delta pflB$, $\Delta frdA$, $\Delta adhE$, $\Delta xyIFGH$, $\Delta midarpA$, $\Delta reg 27.3 kb$, $gatCS184L$, Δldh , $\Delta poxB$, $RNApolT7 ins HtpG$).

Se desarrolló una estrategia de cultivos en dos etapas para la cepa EM01/pAcycDuetBDO_Ba. La etapa de crecimiento a 37 °C y %O₂d=5% y la etapa de producción donde se limitó la transferencia de oxígeno a 1.8mmolO₂/L h y posteriormente se indujo la expresión de la vía al incrementar la temperatura a 41 °C. Estas condiciones favorecieron la producción de acetoína-BDO alcanzado respectivamente títulos de 4.5 y 5 g/L, lo que corresponde con un rendimiento de 48% del máximo teórico. Cultivos en lote alimentados permitieron incrementar este rendimiento al 60%, pero se favoreció la producción de acetoína (11.3 g/L) sobre la de BDO (3.7 g/L).

Estudios de transferencia de oxígeno permitieron identificar la relación entre la transferencia de oxígeno y producción de acetoína-BDO a y su efecto en la proporción de estas moléculas. Ensayos de actividad enzimática, demostraron que la conversión de acetoína a BDO parece estar limitada por una baja actividad del gen BDH (mil veces menos que la reportada), sustituir este gen podría favorecer la formación de BDO. Por otra parte, el carbono que no fue destinado esta vía se metabolizó a lactato y acetato. Para evitar su acumulación, se evaluaron algunas estrategias metabólicas y de cultivo, pero no resultaron exitosas. Sin embargo, existen otras estrategias que aun necesitan ser evaluadas para disminuir la acumulación de subproductos y la optimización del bioproceso planteado en este trabajo.

II. Introducción

En la actualidad, nuestro estilo de vida y economía dependen fuertemente de la industria basada en fuentes fósiles, no obstante, el incremento en los precios del petróleo, la crisis energética y los efectos nocivos al medio ambiente han impulsado el desarrollo de alternativas biotecnológicas. Por esta razón surgen las biorrefinerías, que buscan implementar bioprocesos sustentables para la producción de diversos químicos a partir de materias primas renovables (Larroche et al., 2015).

En este sentido, la ingeniería metabólica, la biología de sistemas, la biología sintética y la ingeniería de procesos han permitido proveer un enfoque global que toma en consideración todos los aspectos de los bioprocesos. Dentro de las estrategias que se implementa a partir de estas disciplinas se incluyen: eliminación y sobreexpresión de genes, construcción de vías metabólicas sintéticas, diseño de sistemas de regulación sofisticados, análisis ómicos, estrategias de cultivo, escalamiento, optimización de procesos, metodologías para purificación de productos, obtención de materias primas renovables y desarrollo de métodos computacionales para modelado y simulación, entre otros. Por otra parte, las condiciones de cultivo son optimizadas al tomar en cuenta: la composición del medio de cultivo, el modo de operación y parámetros fisicoquímicos como la aireación, transferencia de oxígeno, el pH y la temperatura (Cho et al., 2015). En conjunto, estos enfoques pueden potencialmente reducir los costos globales de operación, lo cual impulsa el progreso de la biotecnología y de los bioprocesos.

Utilizando las estrategias antes mencionadas se han generado cepas y procesos capaces de producir eficientemente metabolitos de interés comercial a escala industrial (Burgard et al., 2016; Nakamura & Whited, 2003). Debido a estos avances, en años recientes ha surgido gran interés por el desarrollo de procesos para la producción de biocombustibles, biomateriales y precursores de fármacos (Guo, Sheng, & Feng, 2017). En este ámbito, los químicos base también llamados bloques de construcción son de gran relevancia, al ser moléculas que poseen propiedades fisicoquímicas y estructurales que les permite ser precursores de una amplia gama de metabolitos comerciales. Entre estos, sobresalen los que son ópticamente activos que debido a la complejidad de su estructura les permite ser utilizados para proveer grupos quirales en la síntesis de fármacos o químicos finos (Sabra, Groeger, & Zeng, 2016).

Los dioles de cadena corta, como el butanodiol y propanodiol, son químicos base que tienen una amplia gama de aplicaciones a nivel industrial y su síntesis a partir del petróleo se encuentra bien desarrollada y optimizada (Jiang et al., 2014). El butanodiol es un diol de cuatro carbonos que puede tener sus grupos hidroxilos en diferentes posiciones por lo que existen cuatro isómeros estables 1,2-, 1,3-, 1,4- y el 2,3-butanodiol.

El 1,2-butanodiol se produce principalmente como subproducto de otros procesos químicos a partir del petróleo. El 2,3-butanodiol es el único que se produce de manera natural en

microorganismos. (Jiang et al., 2014). Mientras que los isómeros 1,3- y 1,4-butanodiol, a pesar de que los organismos silvestres no son naturalmente capaces de sintetizarlo, se han logrado producir de forma biológica gracias a la creación de vías metabólicas sintéticas (Burgard et al., 2016; Okabayashi, 2010).

En este estudio se construyó una cepa de *E. coli* capaz de sintetizar (R,R)-2,3-BDO a partir de glucosa mediante la expresión de una vía metabólica sintética, utilizando para esto los genes *alsS* de *Bacillus licheniformis*, *alsD* de *Bacillus amyloliquefaciens* y *bdhA* de *Bacillus subtilis*. El sistema de regulación que permitió la inducción por temperatura fue integrado al cromosoma y la expresión de tres genes en tándem se realizó utilizando el vector pAcycDuet-1. Además, se estudiaron diferentes condiciones de fermentación para favorecer producción del metabolito.

III. Antecedentes

3.1 El 2,3-Butanodiol un químico de plataforma

El 2,3-Butanodiol (2,3-BDO) es un líquido incoloro e inodoro con fórmula química $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ y un peso molecular de 90.12 g/mol, tiene un punto de ebullición elevado (180 °C) y un bajo punto de fusión (-60 °C) (Syu, 2001). Debido a que posee dos centros quirales tiene tres estereoisómeros: dextro (R,R)-, levo (S,S)- y meso (R,S)-2,3-BDO (Li et al., 2015; Ji et al., 2010). Las formas ópticamente activas del 2,3-BDO son de especial interés, ya que pueden ser utilizadas en la síntesis asimétrica de grupos quirales para la elaboración de fármacos de alto valor agregado (Sabra et al., 2016)

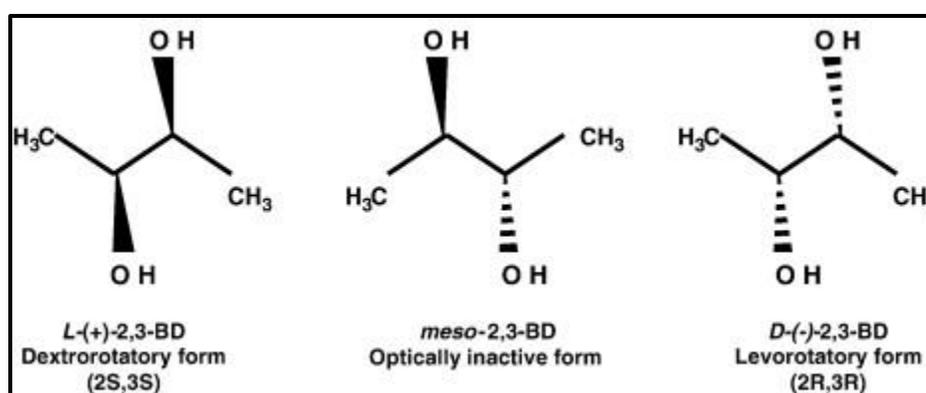


Figura 1. Diferentes formas enantioméricas del 2,3-Butanodiol (Ji et al., 2011).

El 2,3 Butanodiol es un valioso compuesto que tiene aplicaciones potenciales en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica y de químicos finos (Celińska & Grajek, 2009; Ji, Huang, & Ouyang, 2011). Debido a su elevado número de octanaje puede ser utilizado como un potenciador de octanos, mientras que su bajo punto de fusión permite que sea utilizado como anticongelante, por otra parte, su elevado calor de combustión de 22 kJ/g es comparable al de otros combustibles líquidos como etanol y metanol (Celińska & Grajek, 2009; Syu, 2001). Además, el 2,3-BDO por medio de deshidratación puede ser convertido a un compuesto con mayor calor combustión, la metil-etil-cetona que es considerada un efectivo aditivo de combustibles líquidos. Por otra parte, el 2,3-BDO mediante un proceso de deshidrogenación puede ser transformado a diacetil el cual es utilizado como saborizante en productos alimenticios, mientras que su esterificación forma precursores del poliuretano que es utilizado en la elaboración de fármacos y productos cosméticos. Adicionalmente, el 2,3-BDO puede ser transformado a 1,3-butadieno que es empleado para la producción de goma sintética (Syu, 2001).

Tradicionalmente, el proceso de producción del 2,3-BDO está basado completamente en una ruta química a partir del petróleo (Zeng & Sabra, 2011). Sin embargo, la síntesis química de 2,3-BDO requiere de presiones altas, temperaturas elevadas, catalizadores costosos, intermediarios tóxicos y la dependencia a un recurso no renovable, lo cual resulta en un proceso complejo, de bajo rendimiento y poco sustentable desde el punto de vista ambiental (Jiang et al., 2014).

Actualmente, los productos derivados del 2,3-BDO tienen un mercado global potencial de aproximadamente 32 millones de toneladas por año, valuado en cerca de 43 billones de dólares (Köpke et al., 2011). Debido al incremento de la demanda de sus derivados, la manufactura de 2,3-BDO está creciendo anualmente a una velocidad de 4 al 7% (Sabra et al., 2016).

3.2 Metabolismo del 2,3-butanodiol

La biosíntesis del 2,3-BDO tiene grandes implicaciones fisiológicas para los microorganismos, principalmente cumple tres funciones. a) Mantiene el balance redox de la célula al conservar una relación adecuada NADH/NAD⁺. Debido a que su vía metabólica, se encuentra acoplada a la utilización de este cofactor, le confiere la capacidad de obtener o deshacerse del poder reductor. b) Previene la acidificación intracelular, dado que permite cambiar de un metabolismo fermentativo que genera compuestos ácidos a uno que produce moléculas neutras. c) Funciona como fuente de almacenamiento de carbono y energía en microorganismos que lo producen de forma silvestre puesto que puede ser asimilado durante la fase estacionaria cuando los otros sustratos han sido agotados (Celińska & Grajek, 2009; Ji et al., 2011).

3.2.1 Biosíntesis del 2,3-butanodiol

El 2,3-BDO se produce a partir de piruvato, mediante la vía fermentación ácido-mixta en la que también se producen acetato, lactato, formato, succinato, acetoína y etanol (Maddox, 2008). Las reacciones involucradas en la síntesis de 2,3-BDO son representadas en la figura 2. En la primera etapa la enzima α -acetolactato sintasa (ALS) genera un complejo piruvato con tiamina pirofosfato (TPP) para formar acetyl-TPP para posteriormente condensarla con otra molécula de piruvato formando α -acetolactato proceso en el que ocurre una descarboxilación. A su vez, esta molécula, mediante una segunda descarboxilación, es convertida a acetoína por la enzima α -acetolactato descarboxilasa (ALD). Finalmente, la acetoína se reduce a 2,3-BDO por actividad de la enzima butanodiol deshidrogenasa (BDH) utilizando una molécula de NADH (Celińska & Grajek, 2009; Ji et al., 2011). El rendimiento máximo teórico en la producción de BDO a partir de glucosa es de 0.5 gBDO/gGlc.

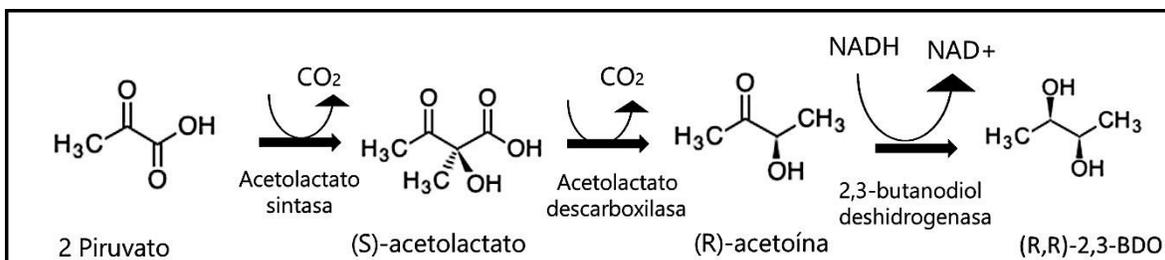


Figura 2. Reacciones involucradas en la biosíntesis de 2,3-BDO.

3.2.2 El pH y su relación con el 2,3-butanodiol

La importancia del 2,3-BDO se ve claramente reflejada en función de su producción como respuesta a las condiciones medioambientales que afronte el microorganismo. Se ha demostrado que en *K. pneumoniae* la síntesis de 2,3-BDO puede ser inducida al acidificar el medio de cultivo. Bajo condiciones ácidas, la síntesis de compuestos ácidos decrece 10 veces, mientras que la del diol incrementa de 3 a 7 veces (Garg & Jain, 1995). Este mecanismo de defensa se desencadena por un elevado gradiente de pH transmembranal, lo que causa una acumulación de acetato que es capaz de inducir las enzimas relacionadas en la síntesis de 2,3-BDO (Celińska & Grajek, 2009). Adicionalmente, el acetato favorece la reducción de acetoína a 2,3-BDO e inhibe la reacción contraria (oxidación de 2,3-BDO a acetoína) ambas catalizadas por la misma enzima (Maddox, 2008).

Estudios anteriores han demostrado que el pH juega un papel importante en la regulación de la vía metabólica del 2,3-BDO. La síntesis de esta molécula puede ser inducida al acidificar el medio de cultivo (Nakashimada et al., 2000). Por otra parte, en *Klebsiella sp.* se ha determinado que la actividad de la enzima α -acetolactato sintasa, clave en la síntesis de este metabolito, disminuye drásticamente cuando el pH es superior a seis (Wong, Yen, Lin, & Chang, 2014). Por el contrario, la oxidación de 2,3-BDO a acetoína se ve inhibida por valores de pH bajos (Maddox, 2008). Esta información sugiere que el nivel de pH puede ser controlado en valores que favorezcan la eficiente producción del 2,3-BDO y que este valor se encuentra por debajo de la neutralidad.

3.2.3 El 2,3-butanodiol y el balance redox celular

La homeostasis celular depende fuertemente de un adecuado balance redox, este a su vez, está asociado al metabolismo y al crecimiento celular (de Graef et al., 1999). Los microorganismos anaerobios facultativos pueden obtener energía y mantener su balance redox de dos formas diferentes, en presencia de oxígeno mediante respiración o en su ausencia a través de la fermentación. Sin embargo, cuando la disponibilidad de oxígeno es limitada (condiciones microaerobias o de limitación de oxígeno, donde la velocidad de transferencia de oxígeno es menor que su velocidad de consumo por los microorganismos) ambas vías pueden activarse simultáneamente.

En el proceso de respiración el NADH proveniente de la glucólisis se regenera utilizando al oxígeno como aceptor final de electrones, mientras que en la fermentación una molécula orgánica realiza esta función dando lugar a productos de fermentación. En la fermentación ácido-mixta la relación NADH/NAD⁺ se conserva normalmente a través de la producción equimolar de etanol y butanodiol, aunque también se produce formato, lactato y acetoína (Celińska & Grajek, 2009).

Desde el punto de vista enzimático, La disponibilidad de oxígeno es una de las variables más importantes en la fermentación del 2,3-BDO, ya que tal como se observa en la figura 3, controla cada etapa de la vía metabólica. En la primera etapa, la enzima α -acetolactato sintasa es rápida e irreversiblemente inactivada en presencia de oxígeno. En la segunda etapa, condiciones aerobias ocasionan que el α -acetolactato sufra una descarboxilación espontánea convirtiéndose en diacetil. Finalmente, la tercera etapa se controla por la relación NADH/NAD⁺ intracelular, de la cual depende la conversión reversible entre la acetoína y el 2,3-BDO (Dai et al., 2014).

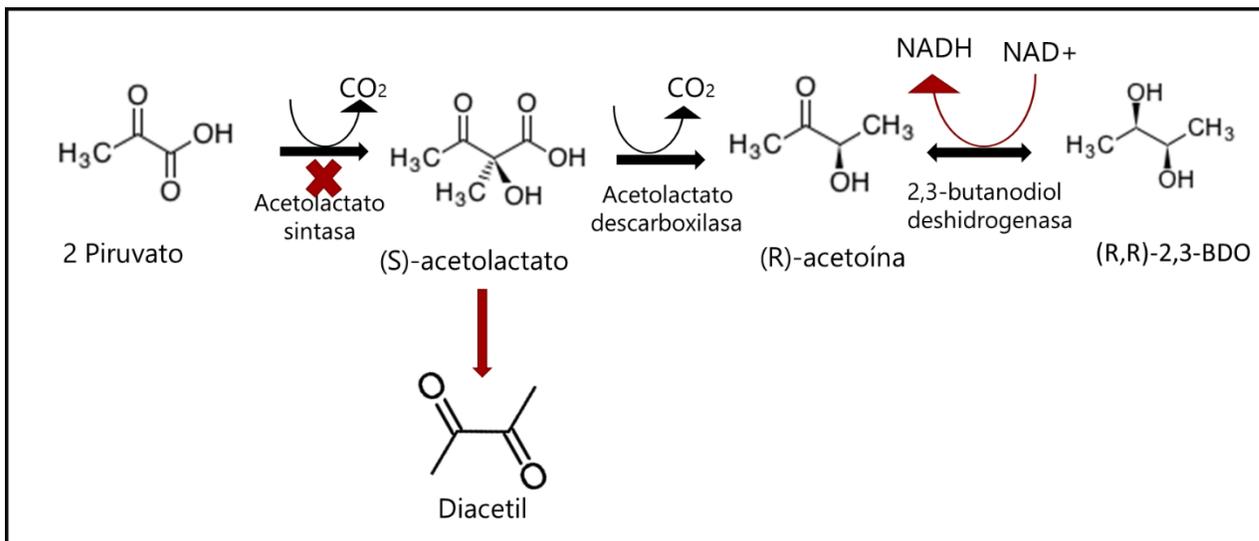


Figura 3. Efecto de la presencia de oxígeno en la vía metabólica del 2,3-BDO. Los símbolos en rojo indican el efecto del oxígeno en las reacciones involucradas en la síntesis del 2,3-BDO.

El 2,3-BDO no puede ser sintetizado en condiciones aerobias, sin embargo, la limitación de oxígeno es ideal para su producción. Niveles de oxígeno disuelto por encima de los niveles microaerobios ocasiona un aumento en la producción de acetoína. Un incremento mayor conlleva a la producción de ácido acético y finalmente una aireación excesiva propicia que los únicos productos sean biomasa y CO₂ (Celińska & Grajek, 2009; Syu, 2001).

El coeficiente de respiración celular (QR por sus siglas en inglés) es un parámetro muy útil para procesos aerobios y microaerobios. Funciona como indicador del desarrollo de las diferentes vías que producen CO₂ en relación con el consumo de O₂ mediante la medición de estas moléculas en la línea de salida de los gases de fermentación. Este parámetro ha

sido utilizado en la producción de 2,3-BDO, para controlar la conversión de acetoína a 2,3-BDO mediante el flujo de aireación y la velocidad de agitación (L. Zhang et al., 2010).

El rendimiento de 2,3-BDO puede ser maximizado al limitar la respiración mediante el control de la transferencia de oxígeno. Sin embargo, al existir una relación directa entre la concentración de biomasa y la producción volumétrica del 2,3-BDO, limitar la disponibilidad de O₂ disminuye la biomasa celular lo que consecuentemente causa que el rendimiento de este producto también decrezca. De tal forma que, incrementar la disponibilidad de O₂ permite alcanzar mayores concentraciones de células y en cierta forma mayores concentraciones de 2,3-BDO.

Las estrategias de cultivos en dos etapas son una solución a la divergencia que supone la transferencia de oxígeno en relación con la síntesis de biomasa y butanodiol. En la primera se establecen condiciones favorables para el crecimiento celular y formación de biomasa y una vez que se alcanzan altas densidades celulares la transferencia de oxígeno se modifica a valores que maximizan la producción de butanodiol. Utilizando este sistema y la bacteria *Klebsiella oxytoca*, Ji y colaboradores (2009) lograron producir hasta 95 g/L de butanodiol con un rendimiento producto sustrato del 95% y con productividades de 1.71 g/L h.

3.3 Producción biotecnológica de 2,3-butanodiol

Una gran variedad de organismos silvestres como *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae* y *Serratia marcescens* pueden utilizar diferentes fuentes de carbono para producir 2,3-BDO, desafortunadamente, lo hacen vía fermentación ácida mixta generando otros subproductos como etanol, lactato, formato y succinato y la gran mayoría produce una mezcla de los diferentes enantiómeros (Ji et al., 2015; Syu, 2001). Otra desventaja, es que la mayoría de estos microorganismos pertenecen a la clase 2 potencialmente patógenos, lo que los vuelve inadecuados para el escalamiento a nivel industrial (Ji et al., 2015; Kim et al., 2013).

En la tabla 1 se resumen algunos estudios en los que se han utilizado organismos silvestres para producir 2,3-BDO a partir de hidrolizados lignocelulósicos. Es posible observar que empleando estos organismos se alcanzan altos niveles de producción con rendimientos cercanos al 100% del teórico. Sin embargo, el escalamiento de dichos procesos se ha visto obstaculizado debido a los problemas mencionados anteriormente. Por esta razón, es altamente deseable el desarrollo de organismos no patógenos capaces de producir eficientemente 2,3-BDO con alta especificidad enantiomérica. Cepas recombinantes de *E. coli* tienen un gran potencial debido a que presenta ventajas frente a otros organismos. Se destacan su habilidad por crecer en medios minerales, metabolizar una amplia variedad de fuentes de carbono, la facilidad para su modificación genética, el gran conocimiento de sus vías metabólicas y la bien desarrollada tecnología de su cultivo (Li et al., 2010).

Tabla 1. Producción de 2,3-BDO utilizando organismos silvestres.

Substrato	Cepa	Tipo de cultivo	Concentración (g/L)	Productividad (g/L*h)	Rendimiento (%)
Hidrolizado de mazorca de maíz (glucosa, xilosa y arabinosa)	<i>K. pneumoniae</i>	Alimentado	78.9	1.3	81.4
Hidrolizado de madera (glucosa y xilosa)	<i>K. pneumoniae</i>	Matraz	13.3	0.28	58.0
Hidrolizado de mazorca de maíz (glucosa y xilosa)	<i>K. oxytoca</i>	Matraz	35.7	0.59	100
Hidrolizado de celulosa de mazorca de maíz (glucosa)	<i>K. oxytoca</i>	SSF	25	0.36	62
Hidrolizado de cascarillas de <i>Jatropha</i> (hexosas y pentosas)	<i>K. oxytoca</i>	Lote	31.4	0.79	80.4
Hidrolizado de rastrojo de maíz (glucosa y xilosa)	<i>E. cloacae</i> SDM 09	Alimentado	74.0	2.1	94.6

• SSF: Sacarificación y Fermentación Simultaneas (por sus siglas en inglés)

• Adaptado de (Li et al., 2015).

3.4 Ingeniería metabólica de *E. coli* para la producción de 2,3-butanodiol

La producción de butanodiol en *E. coli* ha sido ampliamente estudiada. Uno de los estudios más sobresalientes fue la construcción, por primera vez, de una vía metabólica sintética para la producción del enantiómero 2R,3R-BDO. Para esto se caracterizó la actividad de cuatro alcoholes secundarios deshidrogenasas capaces de reducir acetoína a BDO. Una vez que se identificó cuál era capaz de producir el enantiómero puro (R,R), se procedió a construir la vía metabólica sintética. Se logró un título de 6.1 g/L con un rendimiento del 0.31 g/g y una enantiopureza mayor al 99% en medio mínimo M9 con glucosa como fuente de carbono (Yan, Lee, & Liao, 2009).

En otro estudio se expresaron los genes *budB* (ALS) y *budA* (ALD) de *K. pneumoniae* y el gen *ydjL* (BDH) de *B. subtilis* en un vector con un promotor *trc* inducible por IPTG. Sorprendentemente, los títulos de producción más elevados se alcanzaron cuando no se adicionaba IPTG al medio de cultivo, indicando que el sistema presenta transcripción de escape. Utilizando medio mineral AM1 y glucosa como fuente de carbono, en cultivos en lote produjeron 33.8 g/L de 2R,3R-BDO con rendimientos de 0.42 g/g y productividades de 2.11 g/L h, mientras que con estrategias de lote alimentado incrementaron la producción a 115 g/L h conservando el mismo rendimiento pero con una reducción del 30% en la productividad (Ji et al., 2015).

Un año más tarde, se diseñó una estrategia similar en la que se utilizó la misma vía metabólica sintética. En esta ocasión se dejó la expresión de la vía constitutiva en un vector pUC6S bajo el promotor P01. Además, se introdujo un segundo promotor P01 exclusivo para el gen *ydjL* con lo que consiguieron incrementar la conversión de acetoína a BDO. Después de optimizar las condiciones de cultivo en 18 h produjeron 30.5 g/L de BDO, con una enantiopureza mayor al 99%, en medio LB con glucosa como fuente de carbono (Tong et al., 2016).

Aplicando un enfoque sistemático, se evaluó la expresión de vías metabólicas de BDO provenientes de diferentes organismos silvestres incluyendo *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* y *E. cloacae*. Estos operones fueron evaluados bajo el control de diferentes promotores. El promotor nativo para el conjunto de genes de *E. cloacae*, que fue determinado *in silico*, resultó en la mejor producción de BDO (26.4 g/L) y después de optimizar las condiciones de cultivo e implementar una estrategia de cultivo alimentado se obtuvo un título de 73.8 g/L de meso-BDO y 9 g/L de acetoína con una productividad de 1.19 g/L h en medio mineral M9 con glucosa como fuente de carbono (adicionado con extracto de levadura) (Xu et al., 2014).

En otro estudio se buscó la producción estereo específica de 2S,3S-BDO. Para ello expresaron los genes *budB* (ALS) y *budC* (BDH) de *E. cloacae* SDM bajo el control de un promotor T7 en el vector petDuet. En específico, el gen *budC* de esta subespecie es capaz de catalizar la conversión de diacetil a 2S,3S-BDO. Utilizando medio LB suplementado con 10 mM de FeCl₃ lograron 2.3 g/L de 2S,3S-BDO con una enantiopureza del 95% (Chu et al., 2015).

Por otra parte, Nakashima y colaboradores propusieron un novedoso sistema de expresión y lo aplicaron en la producción de BDO. Su sistema consistió en la integración del gen de la RNA polimerasa T7 en el cromosoma de *E. coli*, bajo el promotor de baja expresión inducible por xilosa P_{xylF}. Adicionalmente, los genes *alsS*, *alsD* de *B. subtilis* y el gen *butA* de *L. lactis* fueron integrados en el genoma de *E. coli*, cada uno de estos genes bajo un promotor T7. Es importante mencionar que para que el sistema funcione adecuadamente es necesaria la mutación del gen *m/c*. Esto último, para mantener la actividad del promotor *pxylF* incluso en la presencia de glucosa. Con la cepa resultante en cultivos con medio M9 suplementado con extracto de levadura (5 g/L), alcanzaron niveles de producción 54 g/L de meso 2,3-BDO con rendimientos del 99% del máximo teórico (Nakashima, Akita, & Hoshino, 2014).

3.5 Estrategia propuesta para la producción de 2,3-BDO en *E. coli* mediante un sistema de expresión inducible por temperatura

Estudios previos han demostrado que la producción enantioméricamente pura de isómeros del 2,3-BDO puede ser obtenida al expresar enzimas estereo específicas para su producción (Chu et al., 2015; Tong et al., 2016). Con la finalidad de dirigir el flujo de carbono a la producción de 2,3-BDO, en esta tesis se utilizó la cepa afermentativa AV11 (MG1655 $\Delta pflB$, $\Delta frdA$, $\Delta adhE$, $\Delta xylFGH$, $\Delta midarpA$, Δreg 27.3 kb, *gatCS*184L, Δldh , $\Delta poxB$) y se construyó un operón sintético para su producción estereo específica utilizando los genes *alsS* de *Bacillus amyloliquefaciens*, *alsD* de *Bacillus licheniformis* y *bdhA* de *Bacillus subtilis*. Las vías metabólicas de esta propuesta son presentadas en la figura 4. El operón para la producción de (R,R)-2,3-butanodiol, bajo el control del promotor T7, se clonó en el vector de bajo número de copia pAcycDuet-1.

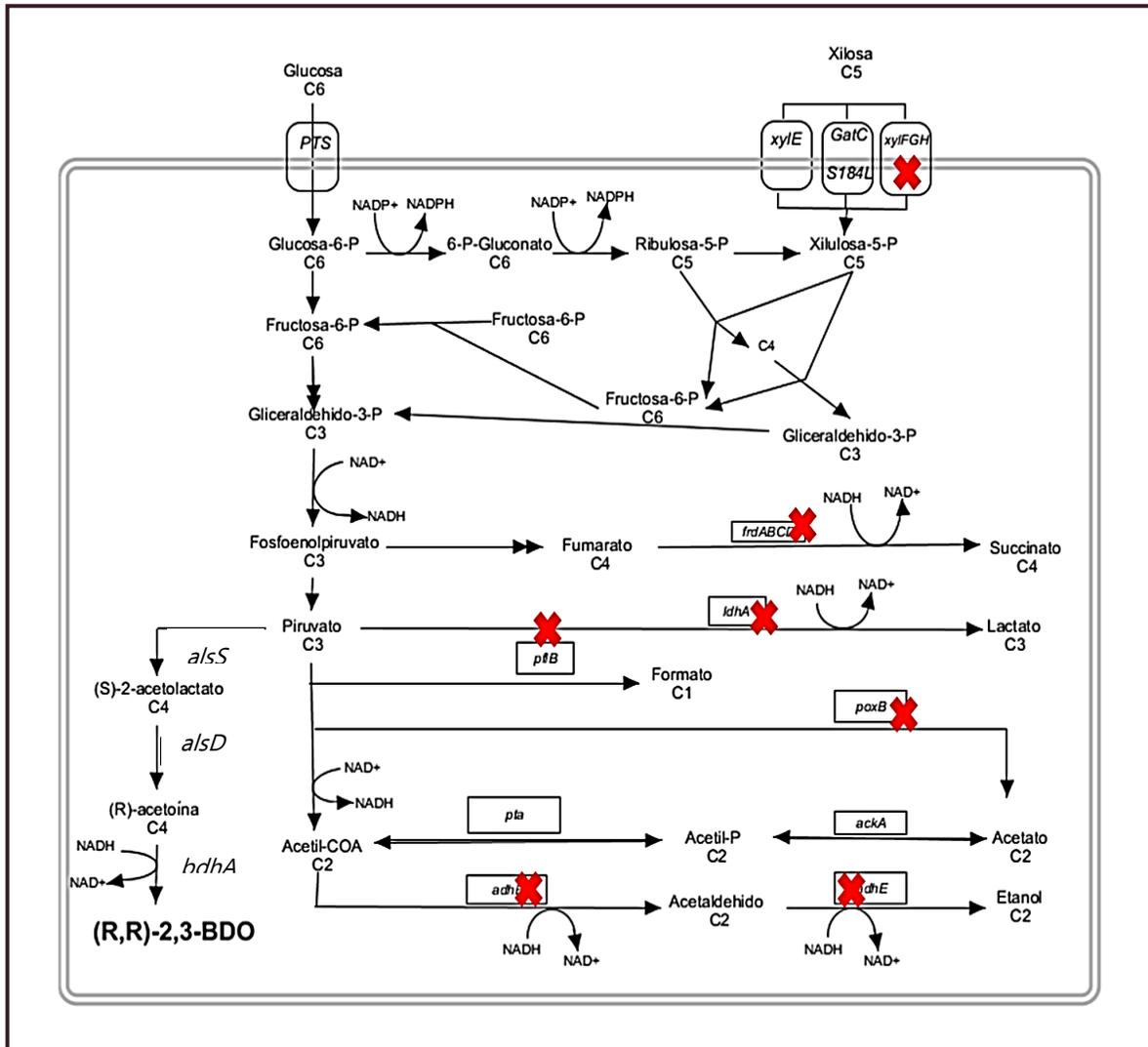


Figura 4. Vía metabólica para la producción de 2,3-Butanodiol en la cepa de *E. coli* AV11

Por otra parte, el gen que codifica para la RNA polimerasa T7 se integró en el cromosoma bajo el promotor del operon *htpG* dependiente del factor σ_{32} . Los genes bajo promotores dependientes del factor σ_{32} se expresan como respuesta a temperaturas elevadas, lo que permitirá controlar la expresión de los genes necesarios para la síntesis de 2,3-BDO mediante un incremento en la temperatura del cultivo. Es importante destacar que la RNA polimerasa del bacteriofago T7 (RNAP7) es altamente eficiente ya que posee una velocidad de síntesis varias veces mayor a las polimerasas de *E. coli*, posee gran procesividad y es altamente selectiva a la secuencia de inicio de sus propios promotores (pT7), por lo que puede ser utilizada cuando se requieren altos niveles de expresión (Tabor, 1990). La estrategia metabólica completa se ilustra en la figura 5.

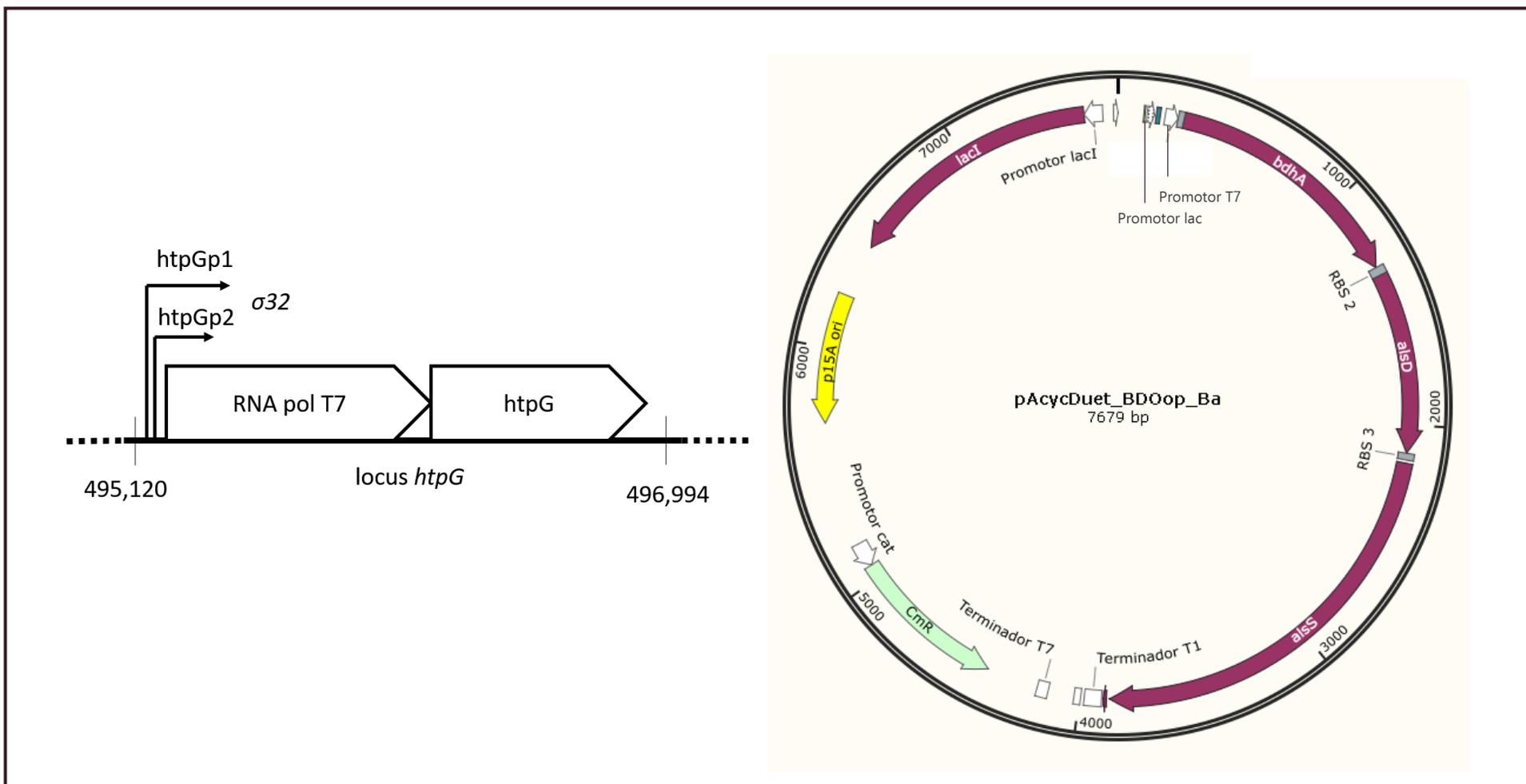


Figura 5. Estrategia propuesta para el control de la expresión de la vía metabólica en la producción de 2,3-BDO mediante choque térmico en *E. coli*.

3.6 Transferencia de oxígeno en la producción de 2,3-Butanodiol

Modificar las vías metabólicas de un microorganismo comúnmente ocasiona desbalances metabólicos y energéticos. Un claro ejemplo es el desbalance de poder reductor en el interior de la célula. Este fenómeno a su vez está relacionado con la respiración celular. Por lo tanto, este tipo de desbalances puede ser solucionado mediante un estudio de transferencia de oxígeno, que permita determinar la aireación y velocidades de agitación que proporcionen un suministro de oxígeno adecuado, para mantener los niveles de poder reductor basales. Por otra parte, la transferencia de oxígeno también es importante desde el punto de vista operacional, ya que la deficiencia de este sustrato favorece la formación de ácidos orgánicos, mientras que su exceso conlleva a la oxidación de la fuente de carbono a dióxido de carbono lo cual, en ambos casos, resulta en un desperdicio de la fuente de carbono, bajos rendimientos y pobres niveles de producción.

En bioprocesos aerobios y bajo limitación de oxígeno, el oxígeno es un sustrato importante empleado para el crecimiento, mantenimiento celular y el buen funcionamiento de diversas rutas metabólicas, incluyendo aquellas relacionadas con la síntesis de los productos de interés. Debido a la baja solubilidad del oxígeno en medios de cultivo, que usualmente son soluciones acuosas, el oxígeno debe ser suplementado constantemente desde una fase gaseosa, por lo que conocer la velocidad de transferencia de oxígeno se vuelve indispensable para el diseño y escalamiento del proceso (García-Ochoa & Gómez, 2009).

La concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo depende de la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR por sus siglas en inglés) desde la fase gaseosa al seno del líquido y de la velocidad a la que es consumido por los microorganismos, es decir la velocidad de consumo de oxígeno (OUR por sus siglas en inglés). La velocidad de transferencia de oxígeno depende del coeficiente de transferencia de masa en la fase líquida (k_L), del área total superficial disponible para la transferencia de materia (α) y de la fuerza impulsora determinada por la diferencia de concentración de oxígeno entre la fase gaseosa y el medio de cultivo. Debido a que los parámetros k_L y α no pueden ser medidos fácilmente, son usualmente manejados en un único parámetro llamado coeficiente volumétrico de transferencia de materia ($k_L\alpha$). La velocidad de transferencia de oxígeno puede describirse como un fenómeno de transporte, tal como se indica en la siguiente ecuación.

$$\text{OTR} = k_L \alpha (C_{AL}^* - C_{AL})$$

Donde C_{AL} es la concentración de oxígeno en el seno del líquido y C_{AL}^* es la solubilidad del oxígeno en el medio de cultivo.

Es bien sabido que la eficiencia en la transferencia de oxígeno es afectada por diversos factores como agitación, flujo de aire, presión, temperatura, geometría del fermentador, características reológicas del caldo de fermentación, presencia de agentes antiespumantes, concentración de sales inorgánicas, entre otros (Martín, Montes, & Galán, 2010). La mayoría de los procesos microbianos industriales son aerobios y se ha demostrado que pequeñas deficiencias de oxígeno en el cultivo afectan significativamente el comportamiento de todo el proceso. Por lo tanto, conocer la velocidad de transferencia de oxígeno se vuelve indispensable para un óptimo diseño, escalamiento y operación de los bioprocesos.

Por lo anterior, es de gran importancia asegurar una adecuada transferencia de oxígeno desde la corriente gaseosa al medio de cultivo. Adicionalmente, una acertada estimación de la OTR en diferentes escalas del proceso o bajo diferentes condiciones de operación tiene un papel fundamental en la predicción de las vías metabólicas involucradas, tanto en el crecimiento como en la producción de metabolitos, proporcionando valiosa información en la selección, diseño y escalamiento de biorreactores (García-Ochoa y Gómez 2009). Por su parte, la velocidad de consumo de oxígeno depende de la concentración celular y de su velocidad específica de consumo de oxígeno (qO_2) que a su vez es una característica fisiológica propia de cada organismo, la cual depende primordialmente de la naturaleza bioquímica de la célula, de las vías metabólicas y de los nutrientes disponibles en el medio ambiente (Doran, 2013).

En cultivos aerobios las moléculas de oxígeno deben superar una serie de barreras al ser transportado antes de poder ser utilizado por las células. Existen ocho pasos que se involucran en este fenómeno de transporte, que comprende desde el interior de las burbujas de aire hasta el sitio de reacción en el interior de la célula (Doran, 2013).

1. Transferencia desde el interior de la burbuja hasta la interfaz gas-líquido.
2. Movimiento a través de la interfaz gas-líquido.
3. Difusión a través de la película líquida que rodea la burbuja.
4. Transporte a través del seno del líquido.
5. Difusión a través de la película líquida que rodea las células.
6. Movimiento a través de la interfaz célula-líquido.
7. Si la célula se encuentra en un flóculo o agregado celular, difusión a través del sólido a la célula individual.
8. Transporte a través del citoplasma al sitio de reacción.

Cuando las células se encuentran bien dispersas y el medio de cultivo está bien mezclado, la mayor resistencia a la transferencia de oxígeno es la película que rodea la burbuja de gas, por lo cual el transporte a través de esta película se vuelve el paso limitante del proceso y controla por completo la transferencia de materia. En estado estable no hay acumulación de oxígeno en ninguna ubicación del fermentador, por lo que la velocidad de transferencia de oxígeno desde la fase gaseosa a la líquida es igual a la velocidad de consumo oxígeno por las células. De tal forma que es posible obtener la siguiente ecuación (Garcia-Ochoa & Gomez, 2009).

$$k_L \alpha (C_{AL}^* - C_{AL}) = qO_2 X$$

De tal forma que en estado estable: OTR = OUR

De las ecuaciones antes descritas se puede deducir que, conociendo el perfil de la concentración de oxígeno en el medio durante el cultivo, la solubilidad del oxígeno en el medio de cultivo y la velocidad de consumo de oxígeno se puede calcular el coeficiente volumétrico de transferencia de materia y por lo tanto la velocidad de transferencia de oxígeno en el fermentador.

Experimentalmente, se puede determinar la velocidad de consumo de oxígeno mediante la siguiente ecuación.

$$OUR = \frac{Q}{V} (O_{2in} - O_{2out}) - \frac{\Delta C_L}{\Delta t}$$

Donde Q es el flujo de aire suplementado al fermentador, V el volumen del biorreactor y O_2 es la concentración de oxígeno medida tanto a la entrada como a la salida de la fase gaseosa. Es importante mencionar que en estado estable el término de acumulación es cero (término derecho de la ecuación). Finalmente, al dividir la velocidad de consumo de oxígeno entre la concentración de células presentes en el medio de cultivo se puede determinar la velocidad específica de consumo de oxígeno (Garcia-Ochoa et al., 2010).

En el presente proyecto conocer los parámetros antes mencionados permitirán caracterizar detalladamente el bioproceso y esta información podrá ser utilizada para desarrollar estrategias que favorezcan la producción del 2,3-BDO.

IV. Justificación

El 2,3-Butanodiol tiene diversas aplicaciones industriales, desde el siglo pasado se sintetiza químicamente a partir del petróleo, sin embargo, a causa de la disminución de las reservas de fuentes fósiles y la crisis energética, los costos de producción del 2,3-BDO han incrementado. Por otra parte, los procesos utilizados para su manufactura no son sustentables ni ambientalmente amigables, razón por la cual existe un gran interés en reducir la dependencia al petróleo y en desarrollar procesos que utilicen como materia prima recursos renovables (Adkins et al., 2012; Jiang et al., 2014). Otra desventaja de la síntesis química de esta molécula es la falta de enantioespecificidad del proceso, ya que producir un enantiómero en específico implica varias etapas de síntesis química y procesos de purificación quiral (Shen et al., 2014).

La principal limitante para una producción biotecnológica de 2,3-BDO es su alto costo de producción, una estrategia para reducirlo es la implementación de materias primas baratas y altamente disponibles. Los residuos celulósicos, provenientes de las agroindustrias, son una atractiva alternativa, ya que puede ser hidrolizada a glucosa por acción de celulasas. Los hidrolizados obtenidos constituyen una materia prima económica para el desarrollo de procesos biotecnológicos y mediante ingeniería genética es posible desarrollar cepas recombinantes capaces de utilizar estos desechos, para la producción de moléculas de interés con elevados niveles de productividad y rendimientos cercanos al máximo teórico.

En el presente proyecto se pretende construir una cepa de *E. coli* capaz de sintetizar (R,R)-2,3-BDO a partir de glucosa, mediante una vía metabólica sintética compuesta por los genes *alsS* de *B. Amyloliquefaciens*, *alsD* de *B. licheniformis* y *bdhA* de *B. subtilis* cuya expresión pueda ser controlada por la temperatura del cultivo.

V. Hipótesis

La disponibilidad de carbono y oxígeno impactan en el desempeño de la vía metabólica de butanodiol, por lo que la producción de este metabolito puede ser controlada mediante estrategias de cultivo.

VI. Objetivos

Objetivo general

Construir una cepa de *E. coli* capaz de generar (R,R)-2,3-butanodiol a partir de glucosa mediante un sistema de expresión inducible por temperatura y evaluar el efecto de la disponibilidad de carbono y oxígeno en la producción de este metabolito.

Objetivos específicos

1. A partir de la cepa AV11 (MG1655 $\Delta pflB$, $\Delta frdA$, $\Delta adhE$, $\Delta xyIFGH$, $\Delta midarpA$, Δreg , 27.3 kb, $gatCS184L$, Δldh , $\Delta poxB$) generar una cepa con capacidad de producir (R,R)-2,3-butanodiol, expresando los genes *alsS*, *alsD* y *bdhA* en tándem en un vector de bajo número de copias.
2. Implementar un sistema molecular que permita controlar la expresión del operón de producción de 2,3-butanodiol mediante la temperatura del cultivo.
3. Caracterizar las cepas productoras de 2,3-butanodiol en biorreactores de 1 litro, evaluar el crecimiento, el consumo de glucosa, la producción de 2,3-BDO y la de otros metabolitos del metabolismo central.
4. En biorreactores de 1 L evaluar el efecto de la transferencia de oxígeno y la disponibilidad de carbono en la producción de 2,3-butanodiol a partir de glucosa.

VII. Materiales y métodos

7.1 Técnicas de biología molecular

7.1.1 Clonación de extensión de polimerasa circular (CPEC)

La técnica denominada CPEC, en inglés Circular Polymerase Extension Cloning (Quan & Tian, 2011), es un protocolo en donde la clonación se realiza por medio de PCR. Primero se linealiza el vector donde se desea realizar la clonación, a continuación, se amplifica el inserto que desea ser clonado. Es importante mencionar que tanto el vector linealizado como el inserto tienen, en sus extremos, homologías entre sí. Ambos fragmentos deben ser separados por electroforesis para luego ser purificados. El último paso es el ensamble de los fragmentos purificados y la recircularización del vector. En esta última etapa ambos fragmentos funcionan como molde y cebador al mismo tiempo y por medio de una reacción de PCR los fragmentos se fusionan. Una característica de este proceso es que durante la CPEC del vector linealizado y del producto de PCR a clonar no se utilizan cebadores y por lo general, solo se requieren unos pocos ciclos térmicos. Más detalles pueden observarse en la figura 6.

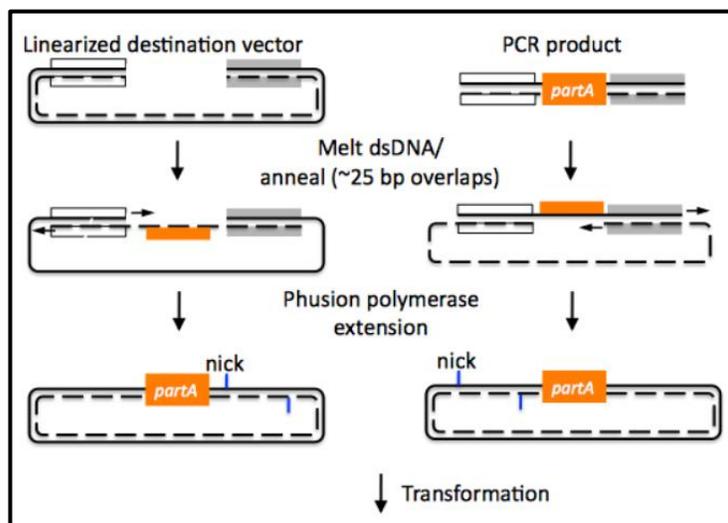


Figura 6. Diagrama del proceso de CPEC.

7.1.2 PCR de extensión y sobrelape (OE-PCR)

La técnica denominada OE-PCR, en inglés Overlap Extention PCR, consiste en unir dos o más fragmentos mediante protocolos de PCR (Orgogozo & Rockman, 2011). En la primera etapa los fragmentos que se desea unir son amplificados con cebadores especialmente diseñados para que en los extremos los fragmentos tengan regiones de homología entre sí, estas homologías son normalmente de 20 pb. Los fragmentos son separados por electroforesis y purificados. En la segunda etapa los fragmentos se ensamblan y se extienden mediante un protocolo de PCR en donde se añaden cebadores que van desde el extremo 3' hasta el 5' de

los fragmentos más externos. En la figura 7 se puede observar una ejemplificación de la técnica.

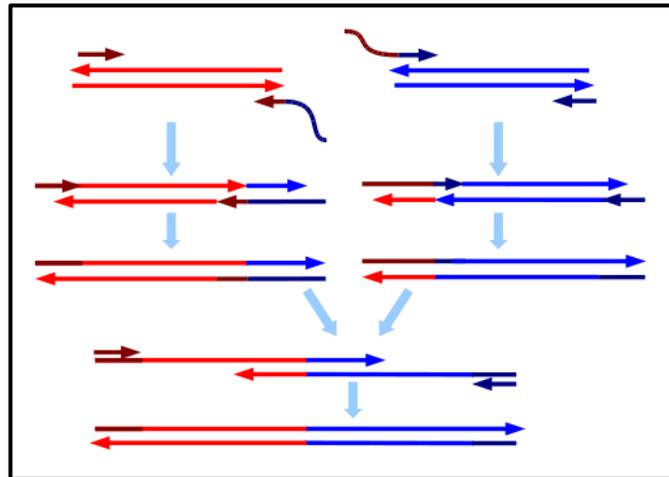


Figura 7. Diagrama que representa el proceso de OE-PCR.

7.1.3 Edición genómica con el sistema CRISPR Cas 9

La abreviación CRISPR Cas proviene de dos acrónimos en inglés: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) y CRISPR-associated genes (Cas) (Jansen, et al., 2002). De manera natural, los sistemas CRISPR/Cas son el mecanismo de defensa de algunas archaeas y bacterias contra DNA o RNA exógeno. A través del tiempo estos sistemas han sido adaptados como herramienta de ingeniería genética. Los elementos indispensables para la edición genómica con el sistema CRISPR Cas 9 se detallan en la tabla 2.

Tabla 2 Elementos necesarios para la edición genómica con el sistema CRISPR Cas 9

Elemento	Descripción
RNA guía (RNAg)	Es un transcrito de fusión conformado por el RNA de andamiaje a la enzima Cas 9 y los 20 nucleótidos (crRNA) que hibridarán con la secuencia a editar.
Secuencia PAM	Secuencia de tres nucleótidos (5'- NGG-3') clave para que la enzima Cas 9 se pueda unir al locus que se desea editar. Se encuentra en la hebra complementaria a la hebra que hibridó con el crRNA.
Enzima Cas 9	Endonucleasa que proviene de <i>S. pyogenes</i> . Cuando la enzima se une al RNAg, ésta se dirige hacia el sitio complementario al crRNA, una vez que ocurrió la hibridación, la enzima realiza un corte de doble cadena entre el tercer y cuarto nucleótido río arriba de la secuencia PAM.

Para editar el genoma de un organismo mediante el sistema CRISPR Cas 9 es necesario que esté presente el gRNA, la secuencia PAM y la enzima Cas 9. En el citoplasma, la enzima Cas 9 se acopla al gRNA. Este complejo se dirigirá hacia el locus a editar mediante la complementariedad de bases entre el gRNA con el genoma. Una vez que hibridó el espaciador del gRNA con locus a editar, se produce un corte de doble cadena en el genoma. Este daño puede ser reparado mediante la unión de extremos no homólogos o reparación dirigida por homología. En el primer caso la maquinaria de reparación une ambos extremos y genera inserciones y/o eliminaciones de nucleótidos al azar. En el segundo caso se requiere de un fragmento de DNA con homología (DNA donador), para que recombine en el sitio de corte (Brito, 2016). De acuerdo con el diseño de estas homología se puede eliminar, sustituir o integrar secuencias en el cromosoma.

Para eliminar una secuencia en el cromosoma, el DNA donador debe estar conformado por dos homología que corresponden a las secuencias que flanquean el sitio de corte, que más tarde será escindido por el complejo Cas 9-gRNA. La región que será eliminada durante la recombinación será la que no se encuentre en el DNA donador. La integración utiliza el mismo principio que la eliminación, la diferencia radica en que la secuencia a integrar se encuentra flanqueada por las homología y no ocurre una eliminación de bases en el genoma a editar. La sustitución es resultado de la integración y la eliminación. En este caso, la secuencia que se desea integrar debe estar flanqueada por homología que delimitan la región que se va a sustituir (Brito, 2016).

El sistema CRISPR Cas 9 como herramienta de edición genómica ha ido evolucionando en los últimos años, en este proyecto se combinaron la metodología propuesta por Jiang y colaboradores en 2015 y la propuesta por Reisch y Prather el mismo año. Estos protocolos requieren dos plásmidos que contienen los elementos necesarios para el sistema CRISPR Cas 9 (Jiang et al., 2015; Reisch & Prather, 2015). Los detalles de estos vectores se describen en la siguiente sección.

7.2 Cepas, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas, los plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este estudio se describen en las tablas 3, 4 y 5.

Tabla 3. Cepas utilizadas en este estudio

Cepa	Genotipo	Referencia
MG1655	<i>E. coli</i> K12 F ⁻ , <i>lambda</i> ⁻ , <i>ilvG</i> , <i>rfb-50</i> , <i>rph-1</i>	(Jensen, 1993)
JU15	MG1655 Δ <i>pf1B</i> , Δ <i>adhE</i> , Δ <i>frdA</i> , Δ <i>xy1FGH</i> , Δ reg 27.3kb, <i>gatC</i> S184L, Δ <i>midarpA</i> (Km ^r)	(Utrilla et al., 2012)
MS01	JU15 Δ <i>ldhA</i> (Km ^r)	(Fernández-Sandoval et al., 2012)
AV11	MS01 Δ <i>poxB</i> (Km ^r)	Vargas Tah (trabajo no publicado)
EM01	AV11 T7_ins_HtpG	Este estudio
EM01 Δ <i>arcA</i>	EM01 <i>arcA</i> ::Km ^r	Este estudio
EM02	MG1655 T7_ins_HtpG	Este estudio

Tabla 4. Plásmidos utilizados en este estudio

Plásmido	Descripción	Referencia
pCas	Vector parte del sistema CRISPR Cas 9. Expresa la endonucleasa Cas 9 y el sistema de recombinasas del fago lamda, Km ^r .	(Jiang et al., 2015)
PtargetF	Vector parte del sistema CRISPR Cas 9. Expresa el RNA guía (RNAg) Spe ^r .	(Jiang et al., 2015)
pCas9-cr4	Vector parte del sistema CRISPR Cas 9. Expresa la endonucleasa Cas 9 bajo el control de aTc como inductor, Cm ^r .	Reisch y Prather, 2015)
pKDsgp15	Vector parte del sistema CRISPR Cas 9. Contiene el origen de replicación y las recombinasas del vector pKD46. Expresa RNAg para dirigir a la endonucleasa Cas 9 hacia el vector pCas9-cr44, Spe ^r .	(Reisch y Prather, 2015)

pKD3	Es un vector que es utilizado como molde para amplificar un casete de cloranfenicol flanqueado por sitios <i>frt</i> , <i>Cm^r</i> .	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKD46	Vector que contiene las recombinasas del fago lamda posee un origen de replicación sensible a temperatura, <i>Cb^r</i> .	(Datsenko & Wanner, 2000)
pCasCm	Construido a partir del vector pCas. Expresa la endonucleasa Cas 9 y el sistema de recombinasas del fago lamda, <i>Cm^r</i> .	Este estudio
pTarget_htpG	Construido a partir del vector pTargetF se cambiaron los 20 nucleótidos del protoespaciador para dirigir a la enzima Cas 9 al locus <i>htpG</i> , <i>Spe^r</i> .	Este estudio
ERMV_BDOop	Expresa el operón sintético de la vía de síntesis de (R,R)-2,3-butanodiol a partir de los genes <i>alsS</i> , <i>alsD</i> de <i>B. licheniformis</i> y <i>bdhA</i> de <i>B. subtilis</i> . El uso de condones fue optimizado para <i>E. coli</i> , <i>Cb^r</i> .	Este estudio
pAcycDuet-1	Vector diseñado para la coexpresión de genes bajo el promotor T7 e inducible por IPTG. Posee un origen de replicación p15A, <i>Cm^r</i> .	Novagen
pAcycDuet_BDOop	Construido a partir de los vectores pAcycDuet-1 y ERMV_BDOop. Contiene el operón sintético de la vía de síntesis del (R, R)-2,3-butanodiol, <i>Cm^r</i> .	Este estudio
pAcycDuet_BDOop_Ba	Versión modificada del vector pAcycDuet_BDOop. Se sustituyo el gen <i>alsS</i> sintético de <i>B. licheniformis</i> por una versión nativa del gen <i>alsS</i> de <i>B. amyloliquefaciens</i> .	Este estudio

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Oligonucleótido	Secuencia (5' → 3')	Descripción
pTarget_seqR	CAT AGC ACG ATC AAC GGC AC	Oligo reverse para secuenciación del vector pTarget
LpCas_F	CTC TTA CGT GCC GAT CAC TCG AGA CAC AAC GTG GCT TTC C	Linealiza el vector pCas para CPEC
Lpcas_R	ATT TAA ATG AAG TTC CTA TTA GCG ATC GCG TAT TTC GTC TCG C	Linealiza el vector pCas para CPEC
Cat_R	AAG CCA CGT TGT GTC TCG AGT GAT CGG CAC GTA AGA GGT TCC	Amplifica el casete de resistencia a Cm para CPEC
Cat_F	AAA TAC GCG ATC GCT AAT AGG AAC TTC ATT TAA ATG GCG C	Amplifica el casete de resistencia a Cm para CPEC
LV1	CTC GAG CGA TCG AGG AAA GAA CAT GTG AGC	Linealiza el vector pTarget
LV2	GTT TTA GAG CTA GAA ATA GCA AG	Linealiza el vector pTarget
F_1S_HtpG	GGT ATA ATA CTA GTA CCT TAA AAT GGC ATT ATT GGT TTT AGA GCT AGA AAT AGC AAG	Cambio de RNAG del vector pTarget
R_1S_HtpG	AAG GTA CTA GTA TTA TAC CTA GGA CTG AGC TAG CTG TCA ACT CGA GCG ATC GAG	Cambio de RNAG del vector pTarget
F_Hd	CGG ACT TCG CGT TCG CGT AAT GAG GTA GAC CTA CAT GAA A	Amplificar homología derecha HtpG sobrelapa con T7
R_Hd	TAC CGG ATT TAG CGA TAG TCC	Amplificar homología derecha HtpG
F_Hi	GGC AGA GGA AAA AAT CAC TG	Amplificar homología izquierda HtpG
R_Hi	TCG TGT TCA TTT AGT GCC TCC CAT TTT AAG GTT AAA AAC AGG	Amplificar homología izquierda HtpG sobrelapa con T7
F_T7	TGT TTT TAA CCT TAA AAT GGG AGG CAC TAA ATG AAC ACG A	Amplificar gen pol T7 sobrelapa con Homologia izq HtpG
R_T7	TTT CAT GTA GGT CTA CCT CAT TAC GCG AAC GCG AAG TCC G	Amplificar gen pol T7 sobrelapa con Homologia der HtpG
F_recR	GCC GTT CTG ATG CAA ACC AG	Comprobación externa del locus HtpG
R_adK	AGC CGA GGA TTT TTT CCA GA	Comprobación externa del locus HtpG
FL_BDO	ACT AGT GGT ACC CGT GAA ACC GTA ACC AGG CA	Linealizar pAcycDuetBDOop conservando los genes alsD y bdhA
RL_BDO	GTC GAC GAG CTC CGA TAA CCT CCT TTG CGC GC	Linealizar pAcycDuetBDOop conservando los genes alsD y bdhA
F_ALSs	GTT TCA CGG GTA CCA CTA GTC TAG AGA GCT TTT GCT TTC A	Amplificar AlsS de B. amyloliquefaciens para CPEC
RL_BA_rbs	GGT TAT CGG AGC TCG TCG ACA TGT TGG CAA AAG CAA CAA ATG A	Amplificar AlsS de B. amyloliquefaciens para CPEC
F_cmp_arcA	GGC CGG CAT GAT GTT TGT GA	Comprobar eliminación del gen arcA
R_cmp_arcA	GAA AGT ACC CAC GAC CAA GC	Comprobar eliminación del gen arcA

7.3 Cultivos y evaluación de cepas

La evaluación y caracterización de las cepas se realizó en fermentadores Applikon® de 1 L en 750 mL medio mineral AM1 (Martinez et al., 2007) con 40 g/L de glucosa en cultivos en dos etapas, el pH de los cultivos se controló en 6 mediante la adición de NaOH 4M. La primera etapa fue para producir biomasa. Se realizó a 37 °C, 600 rpm y 1 vvm de aireación (cuando fue necesario controlar la tensión de oxígeno disuelto, se realizó mediante la velocidad de agitación) antes de que el cultivo alcanzara la fase estacionaria se realizó la inducción del operón para la producción de 2,3-BDO. En la segunda etapa, la aireación se disminuyó a 0.1 vvm para favorecer condiciones de limitación de oxígeno. La inducción se realizó mediante la adición de IPTG a una concentración final de 10 µM para la cepa AV11 o incrementando la temperatura a 41 °C para la cepa EM01. Se determinaron la velocidad de crecimiento, el consumo de glucosa, la producción de metabolitos y los rendimientos del proceso. Para calcular los rendimientos se utilizó la concentración de biomasa máxima. La productividad de los cultivos se calculó utilizando el tiempo en que se alcanzó el título máximo de producción de BDO.

El medio AM1 por litro contiene, 2.63 g (NH₄)₂HPO₄, 0.87 g NH₄H₂PO₄, 0.246 g MgSO₄.7H₂O y 0.15 g KCl, 1 mL betaína 2M y 1.5 mL de elementos traza. La solución de elementos traza contiene por litro: 1.6 g FeCl₃, 0.2 g CoCl₂.6H₂O, 0.1 g CuCl₂, 0.2 g ZnCl₂.4H₂O, 0.2 g Na₂MoO₄, 0.05 g H₃BO₃ y 0.33 g MnCl₂.4H₂O.

En los estudios de transferencia de oxígeno se evaluaron diferentes niveles de transferencia de oxígeno para caracterizar cuál era su efecto en la canalización del flujo de carbono a la vía de producción de 2,3-BDO. Además, se evaluaron estrategias de cultivo alimentado para evitar un sobre flujo de la vía glucolítica con la finalidad de disminuir la producción de ácidos orgánicos e incrementar la eficiencia de la vía de síntesis de BDO.

7.4 Ensayos de actividad enzimática

Los extractos celulares se generaron a partir de 15 mL de cultivo con densidad celular entre 8 y 10 g/L. Una vez colectada la muestra se conservó en hielo y se centrifugó a 8,000 rpm por 5 min a 4 °C. Se descartó completamente el sobrenadante y la pastilla se almacenó a 0 °C. La pastilla celular se resuspendió en 5 mL de la solución de lisis pH 6 (KPO₄ 100 mM, MgCl₂ 10 mM, lizosima 0.75 g/L y DNAsa 10 U/mL) y se incubó en agitación a 37 °C por 1 h. Se centrifugó a 8000 rpm por 20 min a 4 °C y se colectó el sobrenadante (extracto celular). El extracto se almacenó a 4°C. La concentración de proteína total en el extracto se cuantificó mediante el ensayo colorimétrico de Bradford utilizando el kit comercial Bio-Rad Protein Assay. Este ensayo consiste en la unión del indicador azul de Coomassie a residuos de aminoácidos aromáticos y básicos. Cuando esta unión ocurre la absorbancia máxima del

indicador es 595 nm. Para la cuantificación proteica a 595 nm se utiliza una curva de calibración con BSA (albúmina de suero bovino) a diferentes concentraciones conocidas.

Los ensayos de actividad enzimática se realizaron de acuerdo con lo reportado previamente por Stormer en 1975, con modificaciones. Estos ensayos permiten determinar la actividad volumétrica del extracto celular y esta puede ser convertida a actividad específica conociendo la concentración de proteína total del extracto.

Acetolactato sintasa

La actividad de acetolactato sintasa se determinó mediante la incubación de una mezcla de 1 mL que contiene 40 μ moles de piruvato de sodio, 50 μ moles de acetato de sodio pH 5.8, 0.87 μ moles de tiamina pirofosfato, 0.5 μ moles de cloruro de manganeso y extracto celular (300, 400 y 600 μ L). Después de incubar por 1 h a 37 °C la reacción se detuvo adicionando 0.1 mL de H₂SO₄ al 50%. Se incubó por otros 30 minutos a 37°C, proceso en el cuál todo el acetolactato formado se descarboxila a acetoína. Se adicionaron 0.9 mL de NaOH 2.5 M y 0.5 mL de esta solución se transfirieron a un tubo de ensayo con 2 mL de una mezcla 1:1 de a-naftol al 5% en NaOH 2.5 M y creatina al 0.5%. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente por 20 min. Finalmente se agregaron 2.5 mL de NaOH 2.5M, la mezcla resultante se transfirió a una cubeta de espectrofotometría y se determinó su absorbancia a 540 nm. La concentración de acetoína se cuantificó interpolando los datos de absorbancia en una curva de calibración en la que se utilizaron concentraciones conocidas de acetoína y la mezcla a-naftol al 5% en NaOH 2.5 M y creatina al 0.5%.

Acetolactato descarboxilasa

Para llevar a cabo esta reacción se mezclaron 200 μ moles de fosfato de potasio pH 6.2, 10 μ moles de acetolactato y extracto celular (300, 400 y 600 μ L). Se incubó por 1 h a 37°C. La reacción se detuvo al agregar 1 mL de NaOH 2.5 M. La acetoína se determinó con la mezcla creatina-naftol descrita para el ensayo de la acetolactato sintasa.

Butanodiol deshidrogenasa

La actividad de esta enzima puede ser determinada en cualquiera de las direcciones en la reducción de acetoína o en la oxidación de butanodiol. En ambos casos la actividad se determina midiendo las velocidades iniciales de la oxidación de NADH o reducción de NAD a 340 nm. En este estudio fue de interés la reducción de acetoína a butanodiol. Se preparó una mezcla de reacción con 0.1 mL de fosfatos de potasio 1M pH 5.8, 0.1 mL de acetoína 50 mM, 0.1 mL de NADH 1mM y extracto celular (300, 400 y 600 μ L) a un volumen final de 1 mL. Esta mezcla se transfirió a una celda de espectrofotometría de 1 cm de ancho. Se siguió la oxidación de NADH a 340 nm por 30 min. Se utilizó el coeficiente de extinción milimolar de NADH (6.22 cm⁻¹ mM⁻¹) para determinar la velocidad de consumo de este cofactor y por

tanto la actividad de la enzima BDH. Para determinar la actividad enzimática volumétrica se utilizó la siguiente ecuación.

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\left(\frac{\text{Abs}_{340\text{nm}}}{\text{min}}\right)(\text{mL mezcla de reacción})}{6.22 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}}$$

Ensayo acoplado de acetolactato sintasa-acetolactato descarboxilasa

Por practicidad, la determinación de la actividad de esta etapa de la vía metabólica se realizó acoplando los ensayos enzimáticos de la síntesis de acetolactato como su descarboxilación. Para ello se realizó una mezcla de 1 mL que contenía 40 μmoles de piruvato de sodio, 50 μmoles de acetato de sodio pH 5.8, 0.87 μmoles de tiamina pirofosfato, 0.5 μmoles de cloruro de manganeso, 200 μmoles de fosfato de potasio pH 6.2 y extracto celular (300, 400 y 600 μL). Se incubó por 1 h a 37°C. La reacción se detuvo calentando a 80°C por 10 minutos. Las muestras del ensayo se analizaron por HPLC para cuantificar la acetoína producida y el piruvato residual utilizando las condiciones que se describen en la sección 7.5.

7.5 Métodos analíticos

Los sobrenadantes de las muestras analizadas fueron filtrados manualmente con membranas de 0.45 μm e inyectadas (20 μL) de forma automática con ayuda del autoinyector (Waters 717). La determinación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), de azúcares y ácidos orgánicos en muestras de fermentación fue realizada por cromatografía isocrática con fase móvil de H_2SO_4 5 mM a 0.5 mL/min y usando una columna aminada (Aminex HPX- 87H, Biorad) a 50 °C. La detección de los ácidos orgánicos se realizó con un detector de arreglo de diodos a 210 nm (modelo Waters 996, Millipore Co., Milford, MA) y la de azúcares con un detector de índice de refracción (modelo Waters 2410, Millipore Co., Milford, MA). El análisis y procesamiento de datos fueron obtenidos con el programa Empower 2 (Waters). Para la confirmación de los compuestos analizados por HPLC fueron inyectados estándares compuestos por concentraciones conocidas de los metabolitos correspondientes.

7.6 Determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno ($K_L\alpha$)

Para determinar el coeficiente de transferencia de oxígeno ($K_L\alpha$) utilizando el método dinámico de "gassing out", el fermentador con medio de cultivo fue agitado y aireado a velocidades fijas de tal forma que la concentración de oxígeno disuelto (C_{AL}) permaneciera constante (solubilidad del oxígeno en el medio de cultivo a la temperatura utilizada). Al tiempo t_0 , el medio fue desoxigenado burbujeando nitrógeno en el fermentador. Después, aire fue bombeado al medio de cultivo a un flujo constante y el incremento en el oxígeno disuelto se midió en función del tiempo utilizando un

electrodo de oxígeno disuelto hasta que este permaneció constante \bar{C}_{AL} . Esto se representa en la figura 8-A.

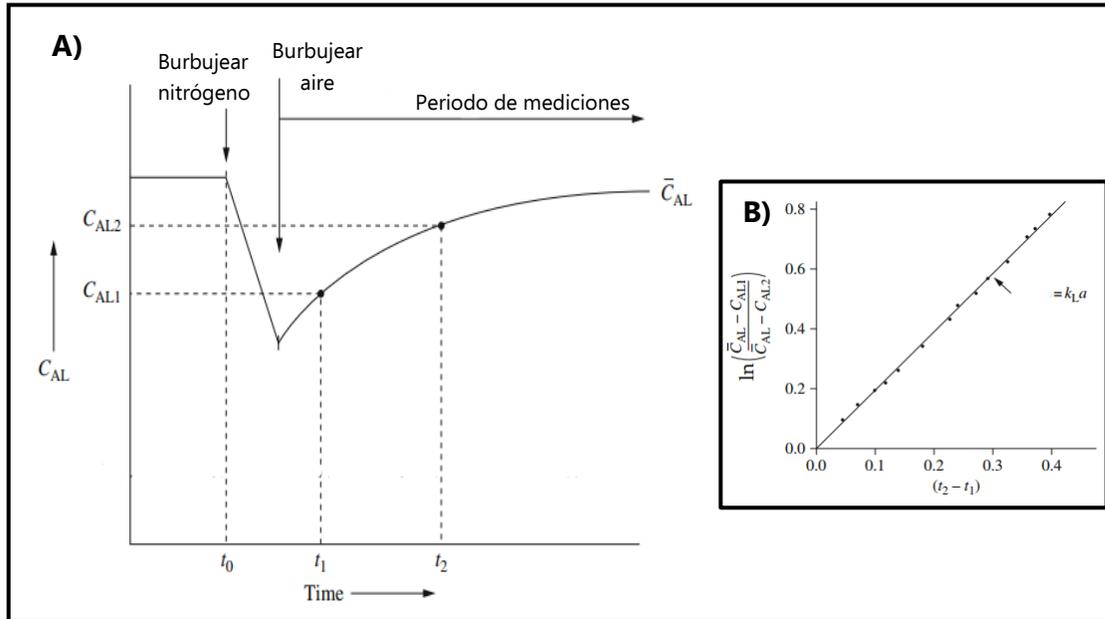


Figura 8. A) Proceso para determinar $k_L a$ por el método de "gassing out" y B) método para calcular el coeficiente de transferencia de oxígeno ($K_L a$) adaptado de (Doran, 2012)

C_{AL1} y C_{AL2} son dos concentraciones de oxígeno medidas durante la reoxigenación a los tiempos t_1 y t_2 respectivamente. Distintos valores de (C_{AL1}, t_1) y (C_{AL2}, t_2) se utilizaron para calcular $\frac{\ln \bar{C}_{AL} - \ln C_{AL1}}{\ln \bar{C}_{AL} - \ln C_{AL2}}$ y estos valores se graficaron contra $(t_2 - t_1)$ de tal forma que la pendiente del gráfico generado equivale a $K_L a$ (ver figura 8-B).

Este coeficiente refleja la transferencia de oxígeno en función de las propiedades del medio de cultivo, el flujo de aireación y la velocidad de agitación empleadas en el proceso de desoxigenación. Como el medio de cultivo AM1 es un medio mineral, se consideró la solubilidad (\bar{C}_{AL}) como la solubilidad del agua a la temperatura empleada. Esta solubilidad se calculó utilizando la siguiente ecuación.

$$\bar{C}_{AL} = 14.161 - 0.3943 T + 0.007714 T^2 - 0.0000646 T^3$$

VIII. Resultados

8.1 Diseño y síntesis del vector pBDOop

El diseño del operón sintético para la producción de (R,R)-2,3-BDO se muestra en la figura 9 y se detalla a continuación. Se utilizaron los genes *alsS* y *alsD* de *B. licheniformis* y el gen *bdhA* de *B. subtilis* los cuales codifican respectivamente para las enzimas acetolactato sintasa, acetolactato descarboxilasa y butanodiol deshidrogenasa. Estas enzimas se seleccionaron por sus elevados niveles de actividad (Xu et al., 2014) y porque pertenecen a organismos capaces de crecer eficientemente a temperaturas superiores a 40 °C. Es importante mencionar que para la síntesis del operón se realizó un proceso de optimización para el uso preferencial de codones en *E. coli*. Los sitios de unión a ribosoma (RBS) fueron calculados utilizando el servidor RBS CALCULATOR v2.0 (www.denovodna.com), el cual genera RBS optimizados tomando en consideración las secuencias río arriba y río abajo al RBS, así como la secuencia de la subunidad 16S del ribosoma del organismo donde se realizará la traducción del RNA mensajero.

Los genes que forman el operón están bajo el control de dos promotores, un promotor T7 que es exclusivamente reconocido por la RNA polimerasa T7 y río arriba se encuentra un promotor lac con su respectivo operador, que permite controlar la expresión del operón con inducción por IPTG. Río abajo de los genes se tiene un doble terminador especial para detener la transcripción de la RNA polimerasa T7. Todo el operón está flanqueado por homologías de 300 pb necesarias para realizar su integración al cromosoma. También se incluyen otros elementos necesarios para la edición en cromosoma, tales como: una secuencia de 20 nucleótidos que al transcribirse hibridará con el locus donde se realizará la integración y otra secuencia que funcionará como andamiaje de la enzima Cas 9.

La síntesis y optimización de codones del operón para la producción del 2,3-BDO se realizó a través de la empresa GENEWIZ®. El operón fue clonado en el vector PUC57, la construcción se identificó como pBDOop. El operón fue clonado en el plásmido pAcycDuet-1. Este vector, al ser de bajo número de copias, genera menor carga metabólica. Por lo que es más adecuado para producción que el vector puc57 que es de alto número de copias.

Posteriormente, el vector pAcycDuetBDOop fue transformado en cepas de producción y evaluado en cultivos y mediante ensayos de actividad enzimática. De estos experimentos se determinó que el gen *alsS* que se estaba utilizando, corresponde a una isoenzima de la acetolactato sintasa que está implicada en la biosíntesis de aminoácidos. Consecuentemente la producción de BDO era deficiente. Se procedió a sustituir el gen *alsS* sintético por uno de *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Esta cepa fue amablemente donada por el Dr. Leobardo Serrano (IBt-UNAM). La sustitución del gen se realizó mediante un protocolo de CPEC (ver apéndice 1). El vector resultante se nombró pAcycDuetBDO_Ba y fue posteriormente utilizado en ensayos de producción con la cepa AV11 y EM01.

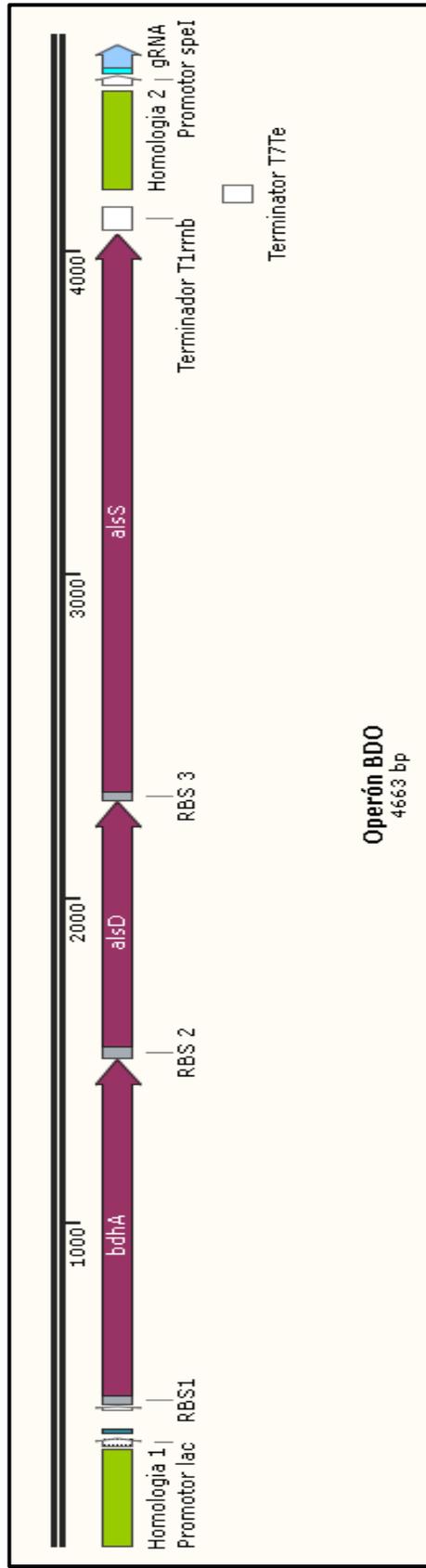


Figura 9. Diseño del operón para la producción de 2,3-BDO.

8.2 Construcción de los elementos necesarios para la técnica CRISPR Cas 9

8.2.1 Modificación del vector pCas

La cepa AV11 es resistente a kanamicina por lo que no era posible utilizar el vector pCas en esta cepa. Mediante un protocolo de CPEC, se reemplazó el gen de resistencia de kanamicina por uno de cloranfenicol. Las condiciones empleadas en esta técnica se detallan en el apéndice 1.

8.2.2 Construcción del vector pTarget_HtpG

Para editar el locus HtpG fue necesario generar un vector que expresara un RNA guía cuyo objetivo fuera este locus. Al vector pTargetF (Jiang et al., 2015) se le modificó la secuencia del protoespaciador, es decir, los 20 nucleótidos que hibridan con la región del cromosoma que se desea editar. La modificación del vector se realizó mediante una variación del protocolo de CPEC. La estrategia se ilustra en la figura 10. Es posible observar que al realizar la modificación del vector también se agregaron sitios de corte *XhoI* y *PvuI* lo que permitió verificar la modificación del vector mediante un patrón de digestión diferente al del vector original.

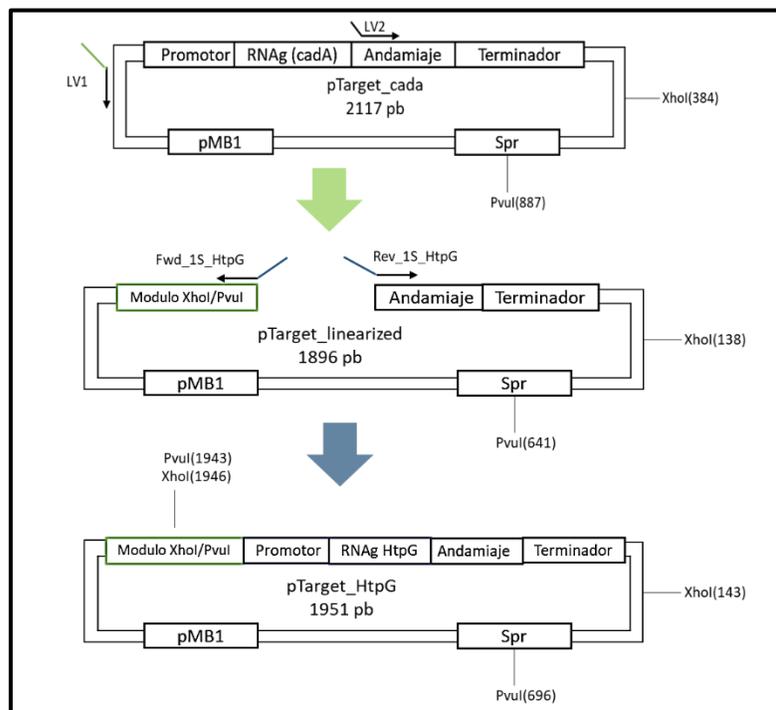


Figura 10. Estrategia utilizada para construir el vector pTarget_HtpG

Una vez realizada la modificación, el vector pTarget_HtpG fue comprobado mediante patrones de digestión con la enzima *PvuI*. Adicionalmente, este vector fue comprobado mediante secuenciación utilizando el cebador pTarget_seqR, la secuencia se encuentre disponible bajo el código de acceso 7712.

8.2.3 Construcción del DNA donador para el locus HtpG

Para realizar la integración de la RNA polimerasa T7 en el locus HtpG se construyó, mediante OE-PCR, una molécula de DNA conformada por el gen T7 flanqueado por regiones de 300 pb homologas al locus HtpG. La estrategia utilizada se representa en la figura 11.

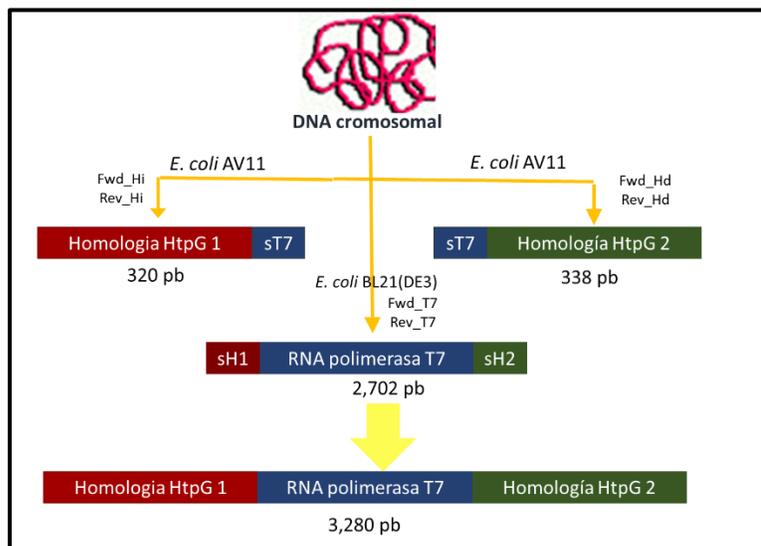


Figura 11. Estrategia utilizada para construir el DNA donador HtpG

El gen de la RNA polimerasa T7 se amplificó a partir de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) y las homología a partir de la cepa AV11. Los productos fueron separados en gel de agarosa y purificados, para luego ser ensamblados mediante un protocolo de PCR que se detalla en el apéndice 1.

8.3 Edición genómica de las cepas MG1655 y AV11

La integración de la RNA polimerasa T7 en el cromosoma de *E. coli* de las cepas MG1655 y AV11 se realizó utilizando el sistema CRISPR Cas 9. Se utilizaron el vector pCas9-cr4 para la expresión de la endonucleasa Cas9, el vector pTarget_HtpG para expresar el RNA guía y dirigir la integración al locus HtpG, el plásmido pKD46 para la expresión de las recombinasas del fago lambda y el producto de OE-PCR como molécula de DNA donador. Para comprobar la integración a nivel molecular, se utilizaron los cebadores internos (F_HI y R_Hd) y externos (F_recR y R_adK). De estos experimentos se obtuvieron las cepas EM01 (AV11 T7 ins htpG) y EM02 (MG1655 T7 ins htpG).

8.4 Evaluación fenotípica de la cepa EM01

En estos ensayos se comprobó el fenotipo de la cepa EM01 y se valuó la estrategia de inducción por temperatura. La cepa MG1655 (DE3) fue utilizada como referencia para comparar con el comportamiento de una cepa que expresa la RNA polimerasa T7 de forma constitutiva bajo el control del factor transcripcional σ_{70} . Las dos cepas fueron

transformadas con el vector pet28_GFP que expresa una variante de la proteína verde fluorescente (GFP) en un vector pet28 bajo un promotor T7 y un operador lac. El vector pet28_GFP fue proporcionado amablemente por el Dr. Paul Gaytan (IBt-UNAM).

Las evaluaciones se realizaron en tubos con 3 mL de medio AM1 2X, 20 g/L de glucosa, IPTG a 10 μ M y cloranfenicol a 30 μ g/mL. Se utilizaron incubadoras con control de temperatura, una agitación de 300 rpm y los cultivos se iniciaron a 0.1 DO_{600nm}. Se evaluaron cultivos a temperaturas fijas por 24 h (30, 37 y 41 °C) y otros haciendo inducción térmica. En el último caso, las primeras 8 h se incubó a 30 o 37 °C para después aumentar la temperatura a 41 °C y seguir el cultivo hasta las 24 h.

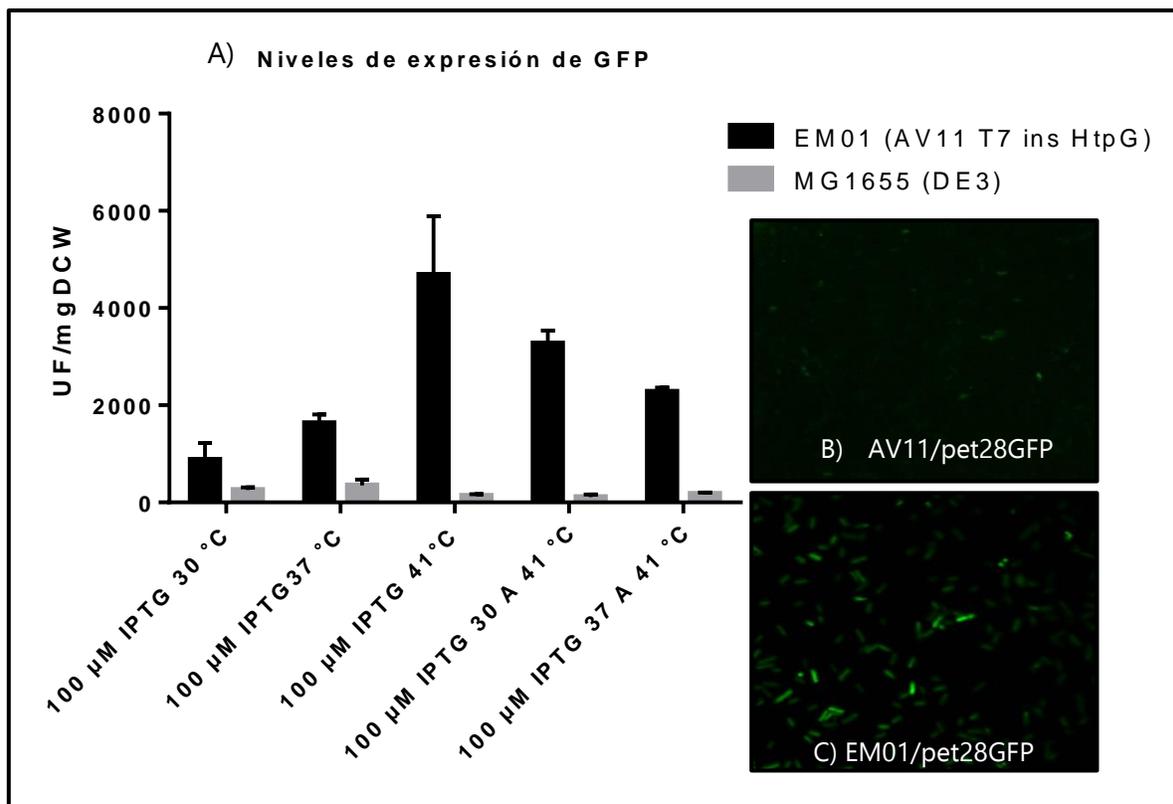


Figura 12. Estudios del fenotipo de la cepa EM01, mediante la producción de GFP bajo diferentes temperaturas. Ensayos realizados en tubos con 3 mL de medio AM1 2X, 20 g/L de glucosa, IPTG a 10 μ M, cloranfenicol a 30 μ g/mL y una agitación de 300 rpm. Las mediciones se realizaron a las 24 h y los cambios de temperatura a las 8 h.

Una vez que los cultivos terminaban (a las 24 h) se hacían diluciones y se procedía a medir fluorescencia en un espectrofotómetro de fluorescencia Perkin Elmer LS55. La excitación se realizó a 395 nm y la emisión se detectó a 509 nm. Los valores de fluorescencia se normalizaron con respecto a peso seco celular. Cultivos sin inducir sometidos a las mismas condiciones experimentales fueron utilizados como blanco. Estas pruebas se hicieron dos veces por triplicado y los datos obtenidos se representan en la figura 12-A.

Se puede observar que la cepa EM01 produce más GFP con respecto a la cepa MG1655 (DE3) en todas las temperaturas. Este comportamiento es normal, debido a que la cepa mutante al contrario de la sepa silvestre no produce altos títulos de ácido acético y se sabe que la producción de este ácido orgánico afecta negativamente la producción de proteínas recombinantes (Backlund, 2011). Por otra parte, ambas cepas presentan tendencias contrarias. Al elevar la temperatura, la producción de GFP con la cepa MG1655(DE3) decremента levemente, mientras que con la cepa EM01 incrementa significativamente. Los niveles de producción con EM01 a 30, 37 y 41 °C fueron aproximadamente 800, 1600 y 4500 UF/gDCW. Estos valores se relacionan con el hecho de que el factor σ^{32} , que controla la expresión de la RNA polimerasa T7 y por lo tanto la producción de GFP, se encuentra más activo mientras la temperatura es más elevada (Roncarati & Scarlato, 2017).

En los experimentos de inducción térmica podemos observar que la producción incrementa respecto a la alcanzada cuando se mantiene la temperatura inicial. Para cultivos a 30 °C la producción se cuadruplicó (de 800 a 3200 UF/gDCW) mientras que para los cultivos a 37 °C solo se obtuvo un incremento del 37% (de 1600 a 2200 UF/gDCW) al realizar la inducción térmica a 41 °C. Es notable que la respuesta a estrés térmico es proporcional con la diferencia de temperatura a la que se realiza la inducción, sin embargo, incluso con el mecanismo de inducción más exitoso (30 a 41 °C) no superan la producción alcanzada cuando todo el cultivo se mantuvo a 41 °C. No obstante, debe considerarse que el crecimiento se ve fuertemente disminuido a temperaturas elevadas, por lo cual el título volumétrico de producción a 41 °C es bastante similar con ambos experimentos de inducción térmica (cerca de 250 UF para las tres condiciones) y la diferencia puede ser observada al normalizar las unidades de fluorescencia con la biomasa generada en cada condición. De acuerdo con estos resultados, se propuso una estrategia de cultivo en dos etapas, una en la que se estimulara el crecimiento celular a 37 °C y una segunda etapa a 41 °C enfocada en la expresión de la vía metabólica de BDO. Con esta estrategia se buscó evitar el efecto negativo sobre el crecimiento celular y se aprovechar el efecto positivo sobre el sistema de inducción.

Adicionalmente, como evidencia de los fenotipos se tomaron imágenes con un microscopio confocal multifotónico (Olympus FV1000). En la figura 19-C se puede observar la cepa EM01/pet28GFP expresando GFP mediante inducción térmica y como control en la figura 12-B se tiene a la cepa AV11/pet28GFP ambas en presencia de 100 μ M de IPTG. Se aprecia una clara diferencia entre ambas cepas, las bacterias EM01 tienen elevados niveles de fluorescencia mientras que las AV11 exhibe una pobre fluorescencia intrínseca. Este par de experimentos permitió demostrar que el sistema de inducción funcionaba y que los niveles de expresión de los genes bajo el control de promotores T7 dependían de la temperatura del cultivo.

8.5 Producción de 2,3-BDO en fermentadores

8.5.1 Evaluación del sistema de inducción por choque térmico

El vector pAcycDuet_BDOBa se evaluó en la cepa EM01 y como control del sistema de inducción térmico se utilizó la cepa AV11. Se utilizó un cultivo de dos etapas. En la primera se empleó una agitación de 600 rpm y una aireación de 1.3 vvm. En la segunda etapa la agitación y aireación se redujeron a 400 rpm y 0.13 vvm respectivamente, lo que proporcionó un coeficiente de transferencia de oxígeno ($kL\alpha$) de 10.40 h^{-1} (lo cual equivale a una velocidad de transferencia de oxígeno de $1.8 \text{ mmolO}_2/\text{L h}$). El proceso de inducción se llevó a cabo con IPTG a una concentración $10 \mu\text{M}$ en el caso de la cepa AV11, mientras que para la cepa EM01 se realizó mediante un incremento en la temperatura de cultivo de 37 a $41 \text{ }^\circ\text{C}$. Los resultados de estas cinéticas se presentan en la figura 13 y la tabla 6 para la cepa AV11/pAcycDuet_BDOBa y en la figura 14 y tabla 7 para la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa.

Ambas cepas crecieron de forma similar a una velocidad específica de 0.51 h^{-1} y alcanzaron la fase estacionaria a las 8 horas. A las 10 horas de cultivo se disminuyó la transferencia de oxígeno a $1.8 \text{ mmolO}_2/\text{L h}$ y simultáneamente se indujo la expresión de la vía metabólica de butanodiol. En la figura 13 se ilustra la cinética de crecimiento y producción de la cepa AV11/pAcycDuet_BDOBa. El momento de inducción con IPTG y cambio de OTR (representado con la línea discontinua morada) desencadena un cambio metabólico observado en la producción de metabolitos.

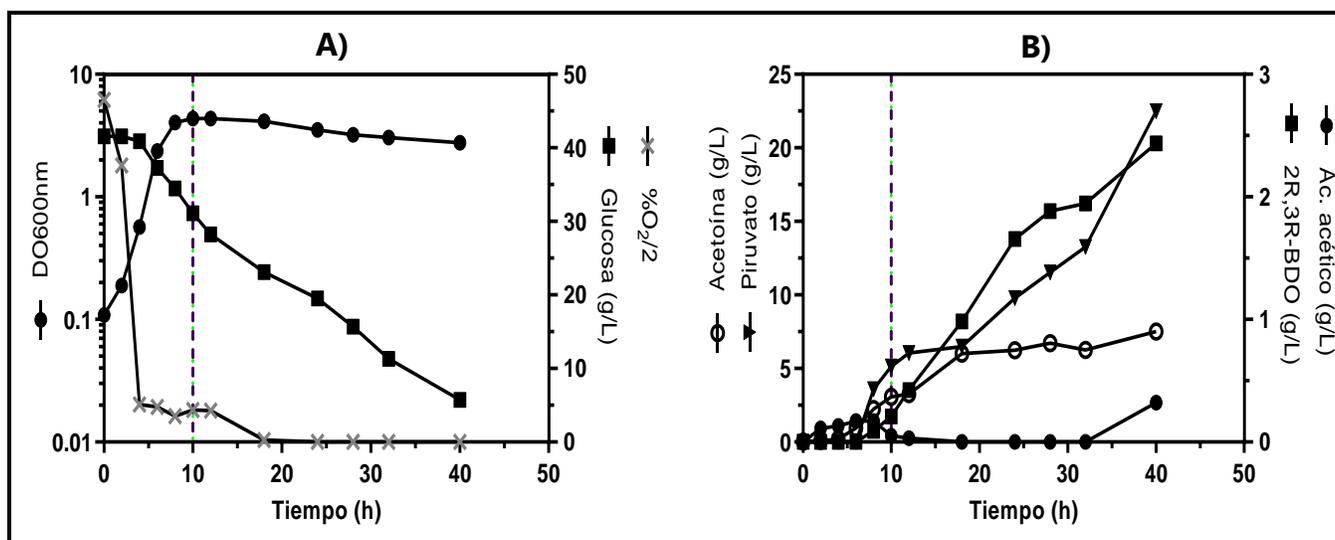


Figura 13. A) Cinética de crecimiento y glucosa residual y B) producción de metabolitos de la cepa AV11/pAcycDuet_BDOBa. Etapa de crecimiento 600 rpm; 1.3 vvm y etapa de producción OTR=1.8 mmolO₂/L h. La inducción con IPTG, así como el cambio en la transferencia de oxígeno se indica con la línea discontinua. ** El piruvato a altas concentraciones no pudo ser cuantificado con exactitud. En las gráficas se conservan los datos para ilustrar la tendencia en la producción de este metabolito.

Durante la fase de crecimiento la cepa AV11 acumuló piruvato (5 g/L) y acetoína (3 g/L). Las 8 horas posteriores a la inducción se caracterizaron por la acumulación de acetoína, alcanzando niveles de 7 g/L. En las 22 horas restantes, los niveles de acetoína se mantuvieron constantes. El BDO se produjo continuamente a una baja velocidad desde el momento de inducción hasta el final de la cinética alcanzando un título final de 2.4 g/L. Es posible observar que desde antes de la inducción se produjeron acetoína y BDO, esto se debe a expresión de escape del promotor lac, sin embargo, es evidente que después de realizar la inducción y el cambio de transferencia de oxígeno incrementa la producción de BDO.

En la etapa del cultivo donde se acumula acetoína (de la hora 10 a la 18) es posible observar que los niveles de piruvato se mantienen constantes (6 g/L). Sin embargo, cuando los niveles de acetoína dejan de incrementar, se observa que los títulos de piruvato se elevan significativamente, alcanzando valores superiores a los 15 g/L. Este perfil nos permite inferir que la velocidad con la que el carbono estaba siendo canalizado a la vía metabólica acetoína/BDO disminuyó de forma importante. Esta disminución en la actividad de la vía podría deberse al agotamiento de algún nutriente que evitara el buen funcionamiento de las enzimas involucradas en la vía metabólica. Debe quedar claro que el flujo no se detiene por completo, ya que una lenta producción de BDO se mantiene hasta el final del cultivo.

La concentración de piruvato a las 40 h no pudo ser determinada con precisión, ya que, en el sistema cromatográfico utilizado el pico correspondiente a este metabolito no se pudo diferenciar de la coelución con el pico de otro compuesto desconocido que se acumuló a lo largo de la cinética. Se sospecha que este compuesto no identificado puede ser acetolactato o diacetil. Sin embargo, no se pudo comprobar la identidad de este metabolito. La producción de acético fue nula durante la mayor parte del cultivo, pero comenzó a acumularse, en la última etapa del cultivo cuando los niveles de glucosa fueron inferiores a 10 g/L.

Tabla 6. Parámetros cinéticos y estequiométricos de la cepa AV11/pAcycDuetBDO_Ba (etapa de crecimiento 600 rpm; 1.3 vvm y etapa de producción OTR=1.8 mmolO₂/L h)

Parámetros	Título (g/L)	
μ (h ⁻¹)	0.51	BDO 2.43
Y _{x/s} (gDCW/gGlc)	0.17	Acetoína 7.50
Y _{p/s} (gBDO/gGlc)	0.07	Piruvato >15
Y _{p/x} (gBDO/gDCW)	1.34	Acetato 0.32
q _p (gBDO/L h)	0.07	Biomasa 1.87

La cinética de crecimiento y producción de la cepa EM01/pAcycDuet_BDO_Ba se presenta en la figura 20. Es notable que al igual que la cepa AV11/pAcycDuet_BDO_Ba, el cambio de transferencia de oxígeno e inducción (línea roja discontinua) tiene un fuerte efecto en el perfil metabólico de la cepa.

Sin embargo, el comportamiento entre ambas cepas difiere significativamente. Durante la fase de crecimiento acumula la misma cantidad de piruvato que su cepa predecesora, sin embargo, en este mismo periodo acumula hasta 1 g/L de BDO y 4 g/L de acetoína. Esta diferencia se explica por qué en la cepa EM01 existe expresión de escape de la polimerasa T7 lo que hace que la vía este activa antes de inducir y como el promotor T7 es de mayor fuerza que el promotor lac, conlleva una mayor expresión de la vía de síntesis de acetoína-BDO y por tanto una mayor producción de ambos metabolitos. Esto coincide con que la velocidad de consumo de glucosa que es mayor en la cepa EM01. A las 10 h la cepa AV11 consumió aproximadamente 10 g/L de glucosa mientras que en ese mismo periodo la cepa EM01 consumió 50% más (15g/L).

También se puede observar que después de la inducción, la acetoína producida disminuye lentamente mientras que la concentración de BDO incrementa hasta que se detiene a las 28 h con valores de 3.47 g/L y es en este mismo momento en que la acetoína alcanza su valor más bajo 2 g/L. El piruvato se acumula a un ritmo constante durante toda la fermentación, al igual que en cultivo anterior las concentraciones de piruvato se encuentran sobreestimadas por el análisis cromatográfico. Estos resultados indican que la actividad de la vía se limitó por la canalización de piruvato hacia la vía de interés. La mayor parte del BDO se produjo a partir de la acetoína que ya se encontraba disponible y no a partir de la glucosa consumida durante esta etapa del cultivo. La causa de este comportamiento podría estar relacionada con algún limitante nutricional tal como se ha discutido previamente.

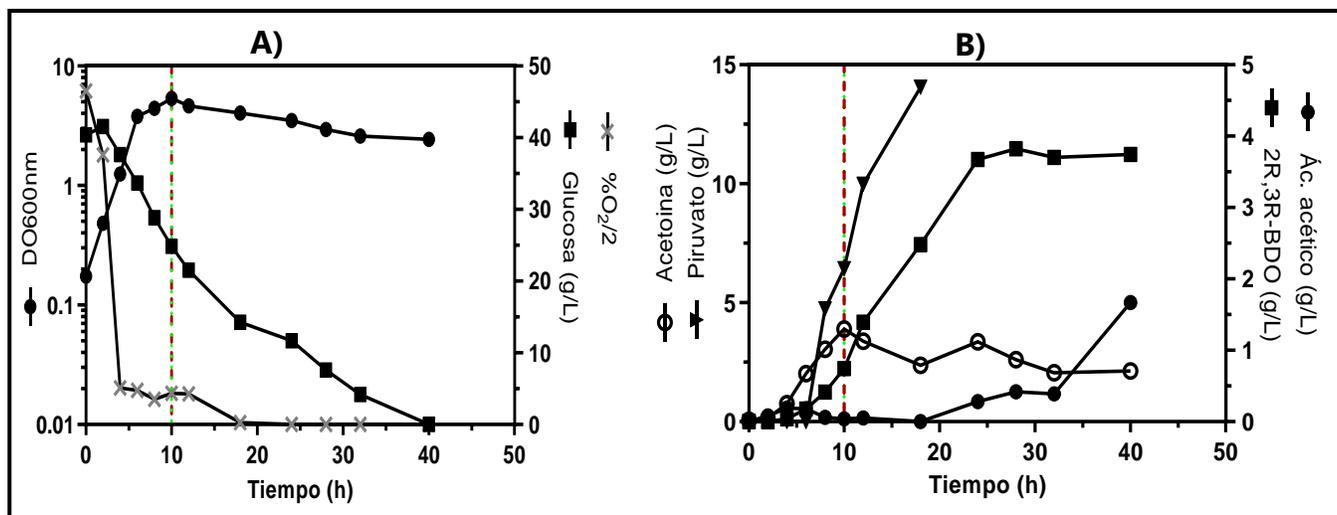


Figura 14. A) Cinética de crecimiento y glucosa residual y B) producción de metabolitos de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa. Etapa de crecimiento 600 rpm; 1.3 vvm y etapa de producción OTR=1.8 mmolO₂/L h. La inducción térmica a 41 °C, así como el cambio en la transferencia de oxígeno se indica con la línea discontinua. ** El piruvato a altas concentraciones no pudo ser cuantificado con exactitud. En las gráficas se conservan los datos para ilustrar la tendencia en la producción de este metabolito.

Comparando los parámetros cinéticos que se presentan en las tablas 6 y 7 podemos identificar que la cepa EM01 es mejor productora de BDO que la cepa AV11. La cepa EM01 produce 65% más BDO que la cepa AV11. También convierte más eficientemente la glucosa

en BDO puesto que tanto su rendimiento producto/ sustrato como producto/biomasa son 30% mayores. La mejor capacidad de producción de BDO de la cepa EM01 puede explicarse mediante el sistema de inducción. Mientras que esta cepa utiliza un promotor T7 la cepa AV11 utiliza un promotor lac, lo que en teoría significa menores niveles de transcrito y por tanto menor actividad de la vía (Tabor, 1990). Por otra parte, tal como se había demostrado previamente (ver sección 8.4) la estrategia de control por choque térmico tiene niveles de fuga elevados a 37 °C, lo que permite que en la cepa EM01 la vía metabólica de BDO se exprese desde las primeras horas de cultivo. Otra diferencia realmente importante entre los dos sistemas de inducción es que la cepa AV11 tiene la capacidad de producir BDO durante todo el cultivo además de acumular grandes cantidades de acetoína mientras la cepa EM01 acumula poca acetoína y la producción de BDO se detiene a la hora 28 de cultivo.

Este fenómeno podría ser consecuencia de la temperatura elevada a la que está sometida la cepa. Es bien sabido que la actividad de la mayoría de las proteínas de respuesta a estrés térmico requiere de ATP (Ramírez et al., 2001) por lo que es energéticamente costoso. Para resistir esta condición, se sugiere que la cepa EM01 debe gastar más energía en mantenimiento, lo que la lleva a reducir sus niveles de NADH y como la conversión de acetoína a BDO esta mediada por la disponibilidad de este cofactor, la vía metabólica se detiene (Yang et al., 2017). Esto también explica la mayor acumulación de acetato, cinco veces mayor en la cepa EM01, puesto que la producción de acetato funciona como una fuente adicional de ATP (Härtig & Jahn, 2012).

Tabla 7. Parámetros cinéticos y estequiométricos de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa (etapa de crecimiento 600 rpm; 1.3 vvm y etapa de producción OTR=1.8 mmolO₂/L h).

Parámetros	Título (g/L)		
μ (h ⁻¹)	0.51	BDO	3.47
Y _{x/s} (gDCW/gGlc)	0.14	Acetoína	2.13
Y _{p/s} (gBDO/gGlc)	0.10	Piruvato	>15
Y _{p/x} (gBDO/gDCW)	1.68	Acetato	1.67
q _p (gBDO/L h)	0.12	Biomasa	2.30

Los resultados obtenidos indican que el sistema de inducción térmico (cepa EM01) es más eficiente para la producción de BDO con una Q_p de 0.12 g/L h, casi el doble de productividad de la cepa AV11. Por su parte, la cepa AV11 resultó ser una cepa prometedora para producir acetoína (Q_p de 0.4 g/L h). Se seleccionó la cepa EM01 para realizar futuros estudios enfocados en mejorar el flujo de carbono hacia la producción de BDO. Uno de los aspectos más notables en estos cultivos fue la acumulación grandes cantidades de piruvato. Este comportamiento indicaba que existía una limitación que estaba impidiendo la conversión de este metabolito a BDO. Esto podía deberse a una limitación nutricional por lo que se decidió triplicar los nutrientes del cultivo. Adicionalmente se buscó explotar el rendimiento producto/biomasa de la cepa (1.4 gBDO/gDCW), por lo que se deseaba incrementar la biomasa en los cultivos.

8.5.2 Estudio de transferencia de oxígeno en la fase de crecimiento de EM01

La primera etapa del estudio se enfocó en mejorar la etapa de crecimiento porque a pesar de que el medio de cultivo proporcionaba los nutrientes necesarios para alcanzar 5 g/L de biomasa los cultivos previos alcanzaron menos del 50% de este valor. Al triplicar los nutrientes del medio AM1 la biomasa máxima que se podía alcanzar eran 15 g/L. En la formulación del medio de cultivo la fuente de nitrógeno actúa como el nutriente limitante. Para que el oxígeno no limitara el crecimiento celular, se evaluaron cultivos con control de oxígeno disuelto a 5, 10, 15 y 20%. El control de oxígeno disuelto se mantuvo durante todo el cultivo mediante cambios en la velocidad de agitación. Se buscaba incrementar la biomasa y al mismo tiempo estudiar el efecto de altas disponibilidad de oxígeno en la producción de BDO. Las cinéticas de estos cultivos se presentan en las figuras 15 y 16 y los resultados obtenidos se resumen en la tabla 8. La inducción térmica se realizó a la hora 9 y se representa con una línea roja discontinua.

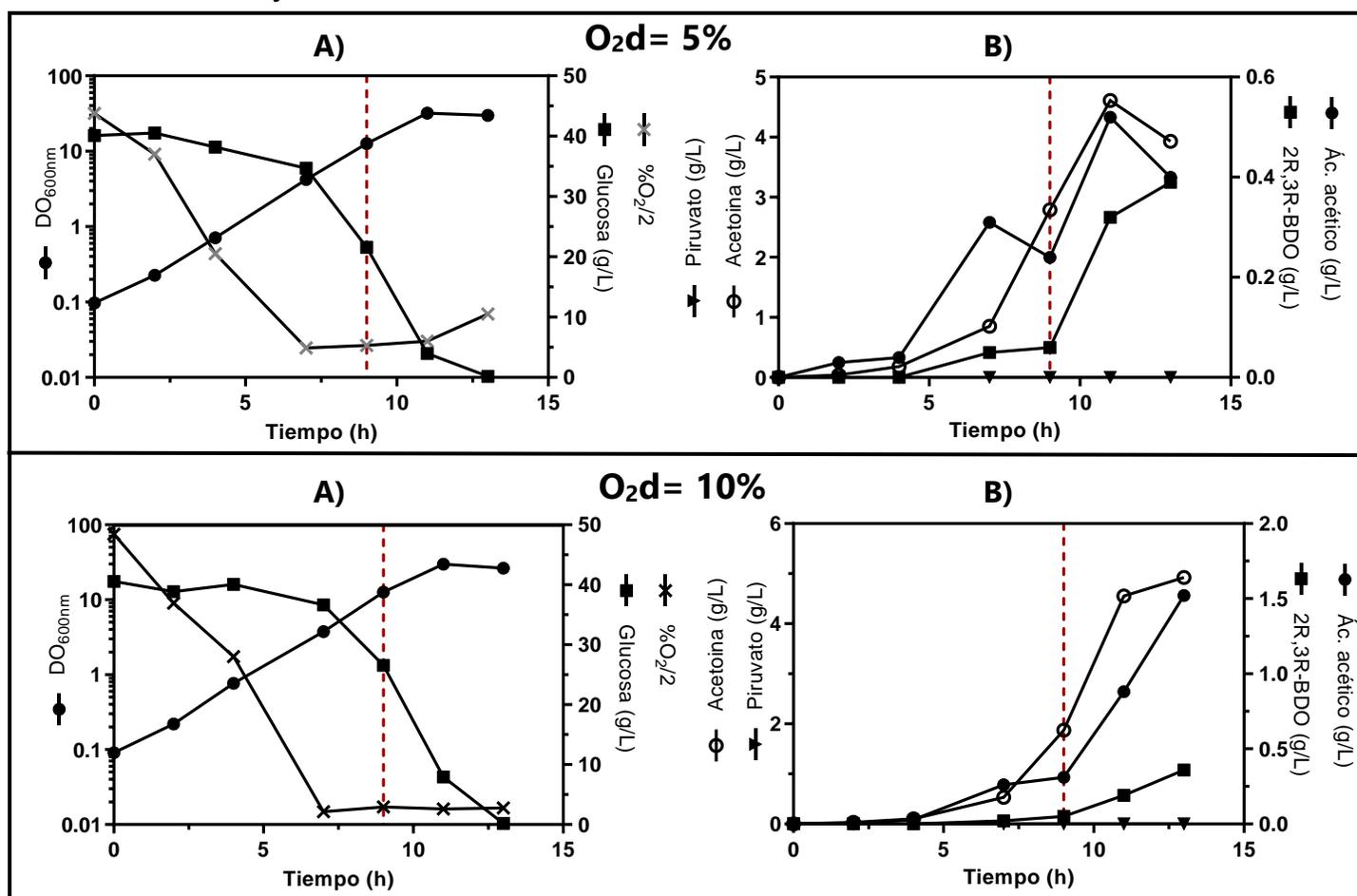


Figura 15. A) Cinéticas de crecimiento y glucosa residual y **B)** producción de metabolitos de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa. Manteniendo la tensión de oxígeno disuelto a 5% y 10%. La inducción térmica a 41 °C se indica con la línea roja discontinua.

Tabla 8. Parámetros cinéticos y estequiométricos de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa en cultivos a diferentes niveles de oxígeno disuelto.

Parámetros	Título (g/L)		Parámetros	Título (g/L)	
	O₂d= 5%			O₂d= 15%	
μ (h ⁻¹)	0.53	BDO 0.36	μ (h ⁻¹)	0.52	BDO 0.43
Y _{x/s} (gDCW/gGlc)	0.30	Acetoína 4.92	Y _{x/s} (gDCW/gGlc)	0.29	Acetoína 4.72
Y _{p/s} (gBDO/gGlc)	0.01	Piruvato 0.00	Y _{p/s} (gBDO/gGlc)	0.01	Piruvato 0.00
Y _{p/x} (gBDO/gDCW)	0.03	Acetato 1.52	Y _{p/x} (gBDO/gDCW)	0.04	Acetato 0.43
q _p (gBDO/L h)	0.03	Biomasa 12.81	q _p (gBDO/L h)	0.03	Biomasa 11.54
	O₂d= 10%			O₂d= 20%	
μ (h ⁻¹)	0.53	BDO 0.39	μ (h ⁻¹)	0.52	BDO 0.43
Y _{x/s} (gDCW/gGlc)	0.30	Acetoína 3.93	Y _{x/s} (gDCW/gGlc)	0.27	Acetoína 4.69
Y _{p/s} (gBDO/gGlc)	0.01	Piruvato 0.00	Y _{p/s} (gBDO/gGlc)	0.01	Piruvato 0.00
Y _{p/x} (gBDO/gDCW)	0.03	Acetato 0.40	Y _{p/x} (gBDO/gDCW)	0.05	Acetato 0.16
q _p (gBDO/L h)	0.03	Biomasa 12.18	q _p (gBDO/L h)	0.03	Biomasa 10.75

La biomasa formada por la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa se ve beneficiada por altas tensiones de oxígeno disuelto. En 8 h se generaron 5 g/L de células mientras que en los cultivos donde no se controló la tensión de oxígeno disuelto, se producían tan solo 2 g/L. Las tensiones de oxígeno disuelto de 5 y 10% acumularon hasta 1 g/L más de biomasa respecto a 15 y 20% O₂d. Es importante mencionar que en las condiciones evaluadas no existe acumulación de piruvato e incluso la pequeña cantidad de acetato que se produce comienza a ser catabolizado en las últimas horas de cultivo. Sin embargo, la concentración de BDO disminuyó de forma drástica y preferencialmente se acumuló acetoína alcanzando títulos cercanos a 5 g/L. Este resultado concuerda con lo reportado previamente y obedece a un estado celular excesivamente oxidado que desplaza la reacción catalizada por la acetoína reductasa a la producción de acetoína (Celińska & Grajek, 2009).

Es evidente que controlar la tensión de oxígeno disuelto por encima del 0% favoreció la formación de biomasa y de acetoína a la vez disminuyó la acumulación de BDO. A pesar de que mantener elevados niveles de oxígeno disuelto permiten mayor biomasa en los cultivos no resultan adecuados para explotar el rendimiento producto/biomasa previamente observado en esta cepa. Ya que, con esta estrategia, al incrementar la biomasa, disminuye la producción de BDO y por lo tanto el rendimiento producto/biomasa disminuyó 14 veces. La explicación a este comportamiento se debe al balance redox intracelular. En las condiciones de cultivo evaluadas en esta sección, el oxígeno se encontraba en exceso, por lo que es de esperarse una baja relación NADH/NAD⁺. Estudios previos han demostrado que cuando esto sucede la producción de BDO decrece mientras que la de acetoína incrementa. (Bao et al., 2015). Con base en estos resultados se decidió evaluar la producción de BDO en un cultivo donde se incrementará la relación NADH/NAD⁺.

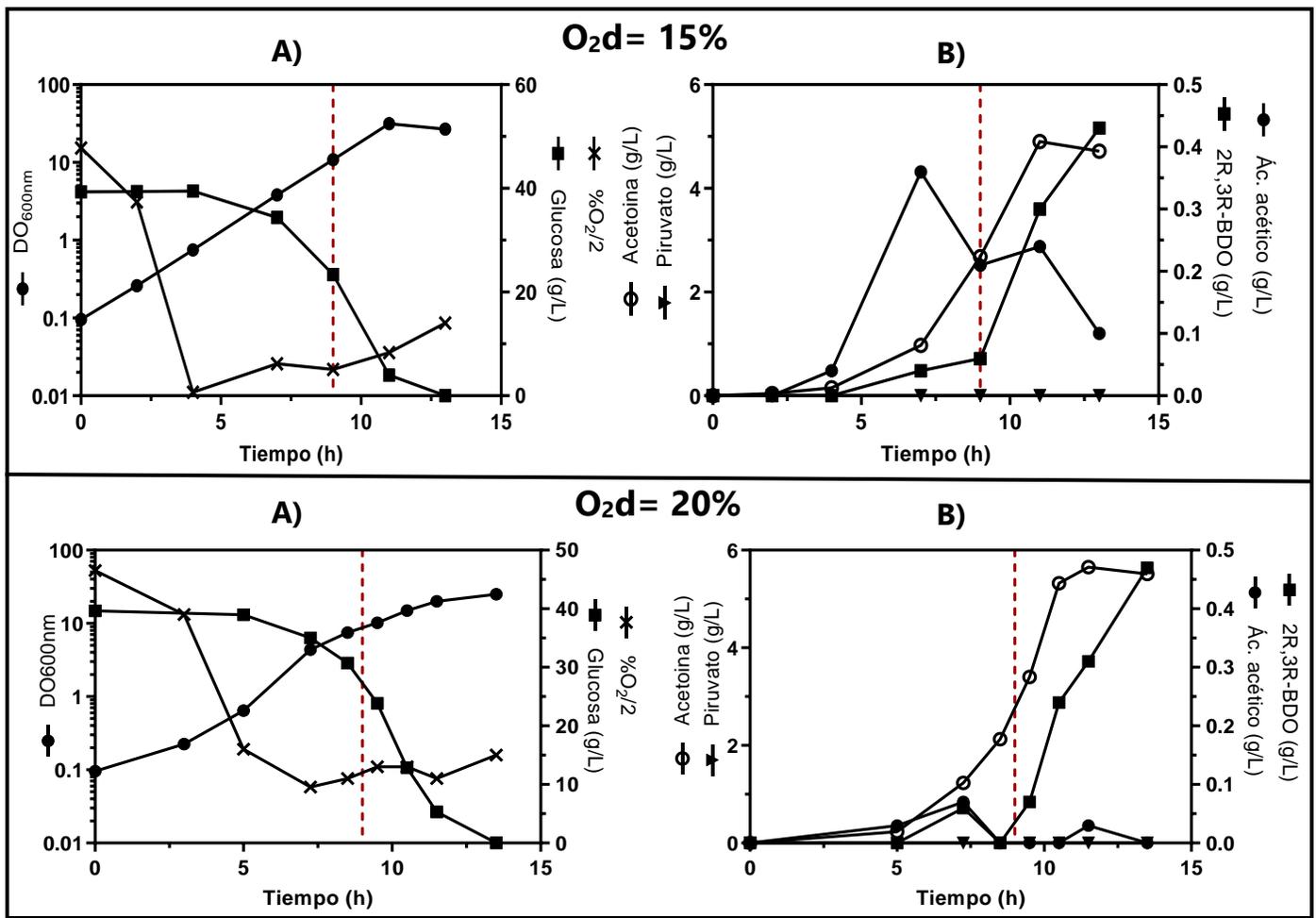


Figura 16. A) Cinéticas de crecimiento y glucosa residual y B) producción de metabolitos de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa. Manteniendo concentraciones de oxígeno disuelto de 15 y 20%. La inducción térmica a 41 °C se indica con la línea roja discontinua.

Para incrementar la relación NADH/NAD^+ se realizó un cultivo de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa con el mismo medio de cultivo (AM1 3X) en una condición inicial de baja transferencia de oxígeno a 400 rpm y 0.13 vvm ($\text{OTR}=1.8 \text{ mmolO}_2/\text{L h}$) que se mantuvo por todo el cultivo. La inducción se realizó cuando el cultivo se había estacionado (8 h). Esta baja OTR tuvo un efecto negativo en la formación de biomasa, únicamente se generaron 1 g/L de células. Este comportamiento era de esperarse por que el oxígeno actuó como un nutriente limitante en el crecimiento celular.

En la figura 17 se observa que bajas concentraciones de biomasa conllevan mayores tiempos de cultivo (hasta un 30% más). La velocidad de crecimiento disminuyó un 16%. También se observa que los principales productos que se obtienen son piruvato (> 15 g/L) y acético (4.4 g/L). Era de esperarse que la producción de ácidos orgánicos incrementara a bajas transferencias de oxígeno. Está bien documentado que en condiciones limitantes de oxígeno tanto la actividad del TCA como la de la cadena respiratoria disminuyen por efecto del regulador ArcA (Park et al., 2013; Shimizu, 2013). Lo que disminuye el flujo de carbono hacia el TCA. En consecuencia, se acumula piruvato y acetyl-CoA, este último es convertido a acetato por la vía *ackA-pta* proceso en donde se genera una molécula de ATP.

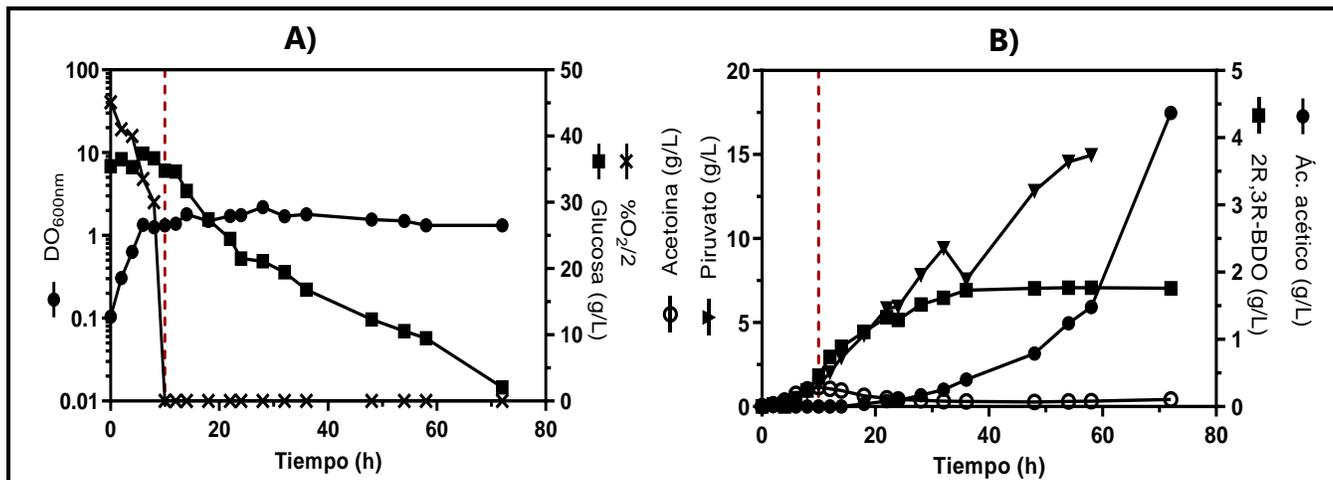


Figura 17. A) Cinética de crecimiento y glucosa residual y B) producción de metabolitos de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa en cultivo a baja transferencia de oxígeno $OTR= 1.8 \text{ mmolO}_2/\text{L h}$. La inducción térmica a $41 \text{ }^\circ\text{C}$ se indica con la línea roja discontinua. ** El piruvato a altas concentraciones no pudo ser cuantificado con exactitud. En las gráficas se conservan los datos para ilustrar la tendencia en la producción de este metabolito.

Por otra parte, la producción de acetoína y BDO decremantan ya que se obtienen títulos de 0.43 y 1.76 g/L, respectivamente. En conjunto, tal como se presenta en la tabla 9 esta condición tiene diversos efectos negativos tanto en los títulos volumétricos como como en la productividad. Por el contrario, se beneficia el rendimiento producto/biomasa siendo este 20 veces mayor que en los cultivos donde se controló la tensión de oxígeno disuelto $>0\%$ (tabla 8) y un 50% mayor que en el cultivo en dos etapas donde se evaluó la capacidad de la cepa EM01 para producir BDO (tabla 7). La observación más importante en esta sección es la relación que existe entre la disponibilidad de oxígeno en los cultivos, el efecto de este nutriente en la relación NADH/NAD^+ y el efecto de este balance redox en la vía metabólica de síntesis de acetoína/BDO. En resumen, a mayor concentración de oxígeno disuelto, menor es la relación NADH/NAD^+ y mayor la proporción acetoína/BDO. También debe quedar claro que la disponibilidad de oxígeno en el cultivo determinará la biomasa que se genere y por tanto la productividad del proceso.

Tabla 9. Parámetros cinéticos y estequiométricos de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa en cultivo a baja transferencia de oxígeno ($OTR=1.8 \text{ mmolO}_2/\text{L h}$)

Parámetros	Título (g/L)	
$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.43	BDO 1.76
$Y_{x/s} \text{ (gDCW/gGlc)}$	0.06	Acetoína 0.43
$Y_{p/s} \text{ (gBDO/gGlc)}$	0.08	Piruvato >15
$Y_{p/x} \text{ (gBDO/gDCW)}$	1.95	Acetato 4.37
$q_p \text{ (gBDO/L h)}$	0.02	Biomasa 0.95

Al comparar los resultados obtenidos con tensiones de oxígeno disuelto >0 y bajas transferencias de oxígeno ($OTR= 1.8 \text{ mmolO}_2/\text{L h}$), es evidente que elevadas transferencias de oxígeno favorecen la formación de biomasa y el producto principal es acetoína.

Por el contrario, bajas transferencias actúan como un limitante en el crecimiento celular y afectan la producción de acetoína-BDO, pero incrementan la relación BDO/acetoína. Estos mismos fenómenos en relación a la transferencia de oxígeno han sido reportados previamente (Celińska & Grajek, 2009; Ji et al., 2011; Xu et al., 2014).

Es interesante comparar el comportamiento de la cepa EM01/pAcycDuetBDO_Ba, cuando la etapa de crecimiento se llevó a cabo a 600 rpm 1.3 vvm y la etapa de producción fue con una OTR=1.8 mmolO₂/L h (tabla 7), con relación a cuando todo el cultivo se realizó a esta última velocidad de transferencia de oxígeno (tabla 9). Cuando se implementaron las dos etapas de transferencia de oxígeno la producción de BDO es el doble y la de acetoína es cinco veces mayor. La causa de esta diferencia en los niveles de producción es ocasionada por la limitación de oxígeno en todo el cultivo, ya que la etapa de crecimiento se ve limitada, y la biomasa obtenida es 60% inferior, lo que ocasiona menor producción del par acetoína-BDO.

Por otra parte, si comparamos este mismo cultivo de dos etapas (tabla 7) pero esta vez con los cultivos a elevadas transferencias de oxígeno (tabla 8), podemos observar que el cultivo en dos etapas permite alcanzar 8 veces más BDO, pero únicamente el 50% de la acetoína, en relación con los cultivos con el oxígeno disuelto controlado a 5, 10, 15 y 20%. Es importante mencionar que en este caso si consideramos el par acetoína-BDO ambas condiciones generan 5.5 g/L entre la suma de ambos compuestos. Lo que indica que la cantidad de carbono canalizado a la vía es la misma, pero la condición de transferencia de oxígeno está determinando si el producto final es acetoína o BDO, este efecto del oxígeno sobre la vía de síntesis de BDO ha sido descrito en otros estudios y obedece a la posa intracelular de NADH/NAD⁺ (Celińska & Grajek, 2009; Z. J. Li et al., 2010).

Al final de estos experimentos se concluyó que durante la fase de generación de biomasa esta cepa al ser afermentativa es incapaz de crecer eficientemente en condiciones limitantes de oxígeno como lo es una OTR=1.8 mmolO₂/L h, por lo que se requiere una condición con mayor transferencia de oxígeno para que crezca adecuadamente. Mientras que la producción de BDO se favorece en condiciones de limitación de oxígeno. Buscando solucionar la divergencia entre el crecimiento celular y la producción de BDO e intentando explotar el rendimiento producto/biomasa de la cepa EM01. Se desarrollo la siguiente estrategia de cultivo en dos etapas: una tensión de oxígeno disuelto de 5% como condición de crecimiento, que permitía generar biomasa rápidamente sin ocasionar una pérdida importante de carbono. Y una etapa de producción donde se limite la transferencia de oxígeno (inicialmente OTR=1.8 mmolO₂/L h). Se seleccionó la hora 10 como el momento adecuado para implementar la fase de producción (limitación de oxígeno), ya que en ese momento el cultivo alcanzaba una biomasa de aproximadamente 5 g/L. Sin embargo, se desconocía si el momento más adecuado para realizar la inducción térmica era durante la etapa de crecimiento o en la etapa de producción.

8.5.3 Efecto del momento de inducción en la producción de BDO

Normalmente los sistemas de expresión molecular se inducen durante la etapa de crecimiento exponencial. Sin embargo, en este estudio la inducción térmica implica una situación de estrés que afecta el crecimiento celular (Roncarati & Scarlato, 2017). Adicionalmente al ser un cultivo en dos etapas con diferentes condiciones de transferencia de oxígeno, se tiene el efecto de la presencia o ausencia de oxígeno en la actividad de las enzimas que se desean expresar. Para determinar qué momento era el más adecuado para realizar la inducción térmica se realizaron tres cultivos en dos etapas. La etapa de crecimiento se mantuvo con un 5% de oxígeno disuelto. La etapa de producción se llevó a cabo con una limitación de oxígeno $OTR=1.8 \text{ mmolO}_2/\text{L h}$.

En el primer experimento se realizó primero la etapa de crecimiento, luego la inducción térmica ($t=8$) y dos horas más tarde la etapa de producción ($t=10$). En el segundo cultivo, se realizó primero la etapa de crecimiento, seguido de la etapa de crecimiento ($t=8$) y dos horas después se realizó la inducción térmica ($t=10$). Un tercer cultivo, que funcionó como un control, se llevó a cabo sin realizar el proceso de inducción por lo que la temperatura se mantuvo constante a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante la etapa de crecimiento y producción. Las cinéticas de estos cultivos se ilustran en la figura 18, donde la inducción térmica se representa con una línea discontinua roja mientras que la limitación de oxígeno se indica con una línea punteada azul. En la tabla 10 se resumen los resultados de esta serie de experimentos.

Tabla 10. Efecto del momento de inducción en los parámetros cinéticos y estequiométricos de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa (fase de crecimiento $O_2d=5\%$ y fase de producción $OTR= 1.8 \text{ mmolO}_2/\text{L h}$)

Parámetros	Título (g/L)	
Inducción antes de limitación de O_2		
$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.49	BDO 1.28
$Y_{x/s} \text{ (gDCW/gGlc)}$	0.22	Acetoína 1.17
$Y_{p/s} \text{ (gBDO/gGlc)}$	0.03	Piruvato 5.75
$Y_{p/x} \text{ (gBDO/gDCW)}$	0.20	Acetato 4.60
$q_p \text{ (gBDO/L h)}$	0.03	Biomasa 5.78
Limitación de O_2 antes de inducción		
$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.54	BDO 3.98
$Y_{x/s} \text{ (gDCW/gGlc)}$	0.25	Acetoína 3.33
$Y_{p/s} \text{ (gBDO/gGlc)}$	0.08	Piruvato 6.19
$Y_{p/x} \text{ (gBDO/gDCW)}$	0.68	Acetato 5.07
$q_p \text{ (gBDO/L h)}$	0.13	Biomasa 6.21
Limitación de O_2 sin inducción		
$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.49	BDO 1.27
$Y_{x/s} \text{ (gDCW/gGlc)}$	0.24	Acetoína 1.15
$Y_{p/s} \text{ (gBDO/gGlc)}$	0.04	Piruvato 16.47
$Y_{p/x} \text{ (gBDO/gDCW)}$	0.24	Acetato 2.69
$q_p \text{ (gBDO/L h)}$	0.03	Biomasa 5.24

Tal como se esperaba de la etapa de crecimiento, la velocidad de crecimiento y el rendimiento biomasa/sustrato se asemejan a los encontrados en los experimentos a 5% de O_2 d. En la fase estacionaria se observa que la biomasa en los cultivos sometidos a estrés térmico decrece (aproximadamente disminuye de 14 DO a 10 DO), mientras la del cultivo a 37 °C no sufre un cambio importante. Este fenómeno parece estar asociado a un efecto sinérgico entre la baja transferencia de oxígeno ($OTR=1.8 \text{ mmolO}_2/\text{L h}$) y la temperatura elevada. Este comportamiento puede ser observado en todos los experimentos que presentan estas condiciones, en contraste con los experimentos de altas tensiones de oxígeno realizados en la sección 8.5.2. Probablemente la prematura muerte celular en los cultivos debe estar relacionada con la alta demanda energética que supone el estrés térmico y la deficiente producción energética relacionada a la limitación de oxígeno. Estudios en *E. coli* han demostrado que el estrés térmico en la expresión de proteína recombinante incrementa significativamente la demanda energética y que las células son capaces de reajustar sus actividades metabólicas para satisfacer este requerimiento energético, incluso a costa de sus capacidades biosintéticas (Hoffmann, Weber, & Rinas, 2002).

En relación con los perfiles de metabolitos de estos cultivos. Se encontró que cultivos sin inducir únicamente son capaces de producir bajas concentraciones de BDO (1 g/L) durante la fase de crecimiento exponencial. Tanto la acumulación de acetoína como de BDO se detiene completamente una vez que inicia la limitación de O_2 y comienza la etapa estacionaria. Los otros productos de estos cultivos son piruvato (15 g/L) y acetato (2.5 g/L). La mayor parte del carbono termina en forma de piruvato, lo cual es de esperarse puesto que la cepa EM01 carece de vías fermentativas y la vía acetoína/BDO se encontraba poco expresada. De tal forma que cuando se limitó la transferencia de oxígeno el piruvato no tenía otro destino, más que acumularse o transformarse en acetyl-CoA y más tarde en acetato.

Es bien sabido que, durante la etapa de crecimiento exponencial, cuando ningún nutriente es limitante, la síntesis de proteínas es más activa (Laakso et al., 2011). Por ello esperábamos que realizar la inducción antes de llegar a la fase estacionaria (inducida por la limitación de oxígeno) permitiría obtener una mayor cantidad de enzimas funcionales y por tanto que la vía metabólica de síntesis de BDO fuera más activa. De forma inesperada, encontramos que realizar la inducción térmica antes de la limitación de oxígeno empobreció la producción de BDO y acetoína, acumulando apenas 1 g/L de cada uno. La causa de este efecto no es clara, pero podría deberse a la inactivación permanente de la enzima ALS ocasionada por altos niveles de oxígeno (Dai et al., 2014) o por un efecto aditivo entre el estrés térmico y oxidativo al que se someten las enzimas de la vía cuando se utiliza esta estrategia de inducción.

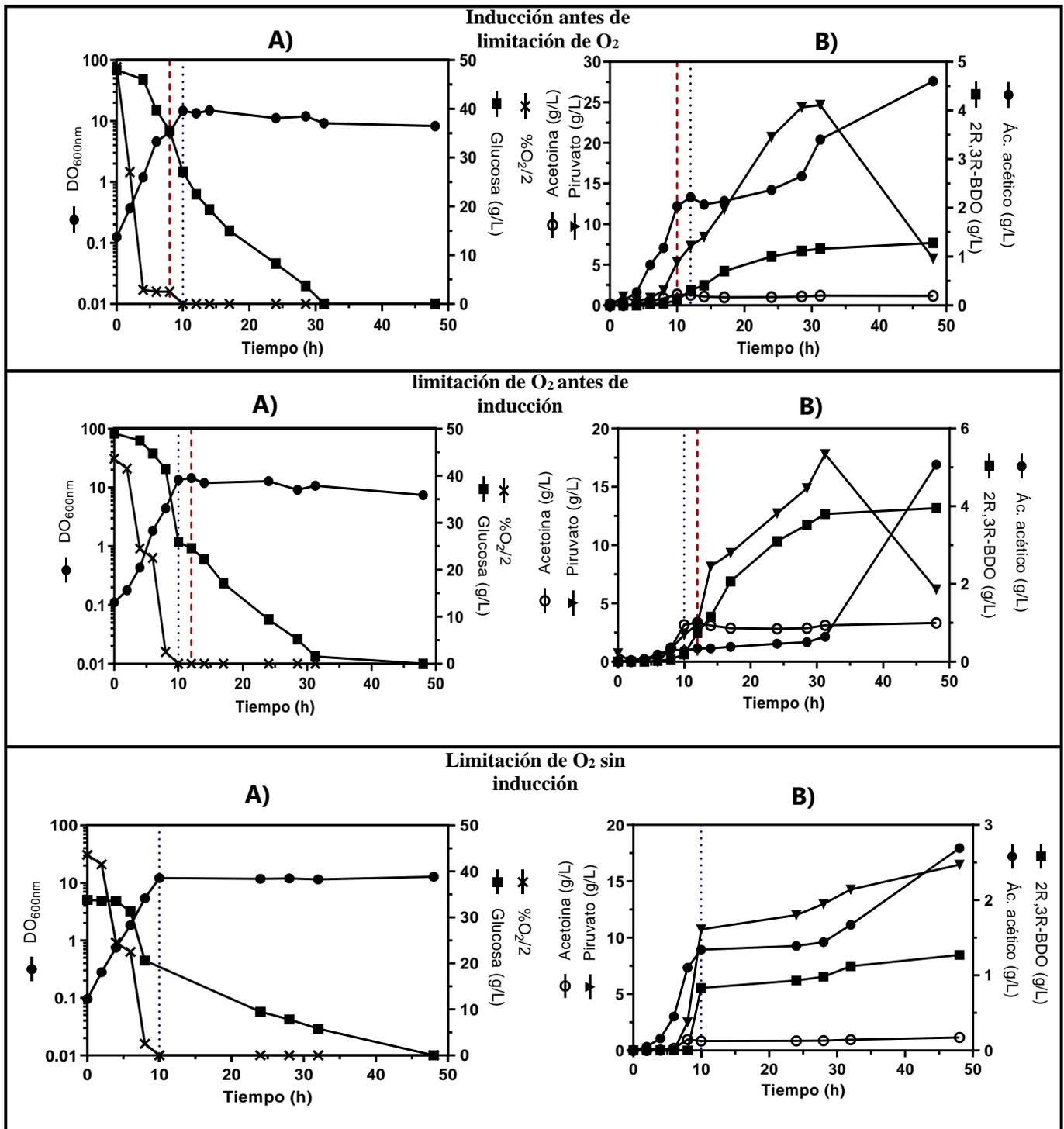


Figura 18. Efecto del momento de la inducción térmica en A) cinética de crecimiento y glucosa residual y B) producción de metabolitos en los cultivos de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa. Fase de crecimiento a $O_2=5\%$, fase de limitación de oxígeno de producción $OTR=1.8\text{ mmolO}_2/\text{L h}$ (línea punteada azul) e inducción térmica a $41\text{ }^\circ\text{C}$ (línea discontinua roja).

La estrategia de implementar una etapa de crecimiento controlando el $O_2d=5\%$, seguido de una etapa de producción con una $OTR=1.8 \text{ mmolO}_2/L$ y la posterior inducción térmica a 41°C permitió mejorar el flujo de carbono desde glucosa a BDO. A pesar de únicamente conservar el 40% del rendimiento producto/biomasa, respecto al experimento en dos etapas donde no se controlaba O_2d durante la fase de crecimiento (tabla 7), con este sistema se produjeron hasta 3.3 g/L de acetoína y 4 g/L de BDO con una productividad de 0.14 g/L h . Es decir, el par acetoína/BDO incremento un 50% respecto a los experimentos evaluados previamente (tabla 7 y 8). Los incrementos en la producción se deben a que, con esta estrategia se establecen las condiciones de cultivo que favorecen individualmente cada etapa del proceso. Con los experimentos realizados en la sección 8.5.2 se determinó que controlar el oxígeno disuelto en valores $\geq 5\%$, parecían mantener un balance redox con una relación baja $NADH/NAD^+$ que permite generar biomasa y acetoína (justo lo que se observa en la figura 18). Mientras que en la segunda etapa se implementan condiciones de limitación de oxígeno que al elevar la relación $NADH/NAD^+$ favorecen la producción de BDO, una vez más comportándose tal como lo esperado.

Es importante mencionar que a pesar de que los cultivos se mantuvieron por 48 h la máxima producción de BDO se alcanzó a la hora 30 cuando la glucosa se agotó. Los títulos finales de piruvato y acetato fueron 6 y 5 g/L respectivamente. A pesar de que existía una considerable cantidad de piruvato que podría ser asimilado por la vía de BDO, este fue preferencialmente catalizado a acetato (como se ha discutido previamente esta puede ser una estrategia para obtener ATP). Como en la etapa de producción existía una limitación de oxígeno, la principal fuente de $NADH$ era la glucolisis y el hecho de que justo cuando este nutriente se terminó también lo hizo la actividad de la vía de acetoína/BDO, sugiere que la asimilación de piruvato por esta vía podría estar limitada por la disponibilidad de $NADH$ (Yang et al., 2017).

A partir de estos resultados se propuso incrementar la transferencia de oxígeno en la etapa de producción. Esto con la finalidad de dirigir cierta cantidad del carbono que se acumulaba en forma de piruvato hacia el TCA. De tal forma que se pudiera obtener el $NADH$ necesario para la síntesis de BDO y a la vez el ATP requerido para que la cepa pudiera resistir el estrés térmico, evitando así la síntesis de acético por la vía *ackA-pta*.

8.5.4 Estudio de transferencia de oxígeno en la fase de producción de BDO

Esta etapa del proyecto se enfocó en tratar de disminuir la acumulación de piruvato en la etapa de producción e incrementar su asimilación a través de la vía de síntesis de BDO. Para que el piruvato pueda ser transformado a BDO requiere de la presencia de NADH. Este cofactor se produce principalmente por la glucólisis y el ciclo de los ácidos tricarbóxicos durante la respiración celular. El hecho de que la producción de BDO se detenga, incluso en presencia de piruvato, cuando la glucosa se agota indica que el factor limitante es el poder reductor y no la fuente de carbono. También apunta a que el NADH que se consume para la síntesis de BDO proviene mayoritariamente de la vía glucolítica. Además, que el piruvato sea convertido a acetato y no consumido por el TCA demuestra que la respiración celular se encuentra bastante suprimida (Hasan & Shimizu, 2008).

Tratando de resolver este dilema metabólico, se implementaron diferentes niveles de velocidad de transferencia de oxígeno, variando la velocidad de agitación, en la etapa de producción de BDO. Para ello se hicieron cultivos en los que en la etapa de crecimiento el oxígeno disuelto se mantuvo en 5%. La etapa de producción se iniciaba a las 10 h, donde se evaluaron agitaciones de 400, 600 y 800 rpm con un flujo de aire de 0.13 vvm, que respectivamente proporcionaron OTR= 1.8, 8.2 y 11.8 mmolO₂/L h. Dos horas después se realizó el proceso de inducción térmica. Las cinéticas de cultivo se representan en la figura 19 mientras que los parámetros de producción se engloban en la tabla 11.

Tabla 11. Parámetros cinéticos y estequiométricos de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa en respuesta a diferentes niveles de transferencias de oxígeno en la fase de producción (OTR= 1.8, 8.2 y 11.8 mmolO₂/L h).

Parámetros	Título (g/L)	
400 rpm 0.13 vvm (OTR=1.8 mmolO₂/L h)		
μ (h ⁻¹)	0.55 BDO	4.45
Y _{x/s} (gDCW/gGlc)	0.25 Acetoína	3.53
Y _{p/s} (gBDO/gGlc)	0.12 Piruvato	6.37
Y _{p/x} (gBDO/gDCW)	0.69 Acetato	2.33
q _p (gBDO/L h)	0.16 Biomasa	6.45
600 rpm 0.13 vvm (OTR=8.2 mmolO₂/L h)		
μ (h ⁻¹)	0.55 BDO	2.10
Y _{x/s} (gDCW/gGlc)	0.29 Acetoína	2.17
Y _{p/s} (gBDO/gGlc)	0.06 Piruvato	>15
Y _{p/x} (gBDO/gDCW)	0.33 Acetato	3.46
q _p (gBDO/L h)	0.04 Biomasa	6.45
800 rpm 0.13 vvm (OTR=11.8 mmolO₂/L h)		
μ (h ⁻¹)	0.55 BDO	1.21
Y _{x/s} (gDCW/gGlc)	0.31 Acetoína	1.93
Y _{p/s} (gBDO/gGlc)	0.04 Piruvato	9.14
Y _{p/x} (gBDO/gDCW)	0.29 Acetato	2.62
q _p (gBDO/L h)	0.04 Biomasa	5.59

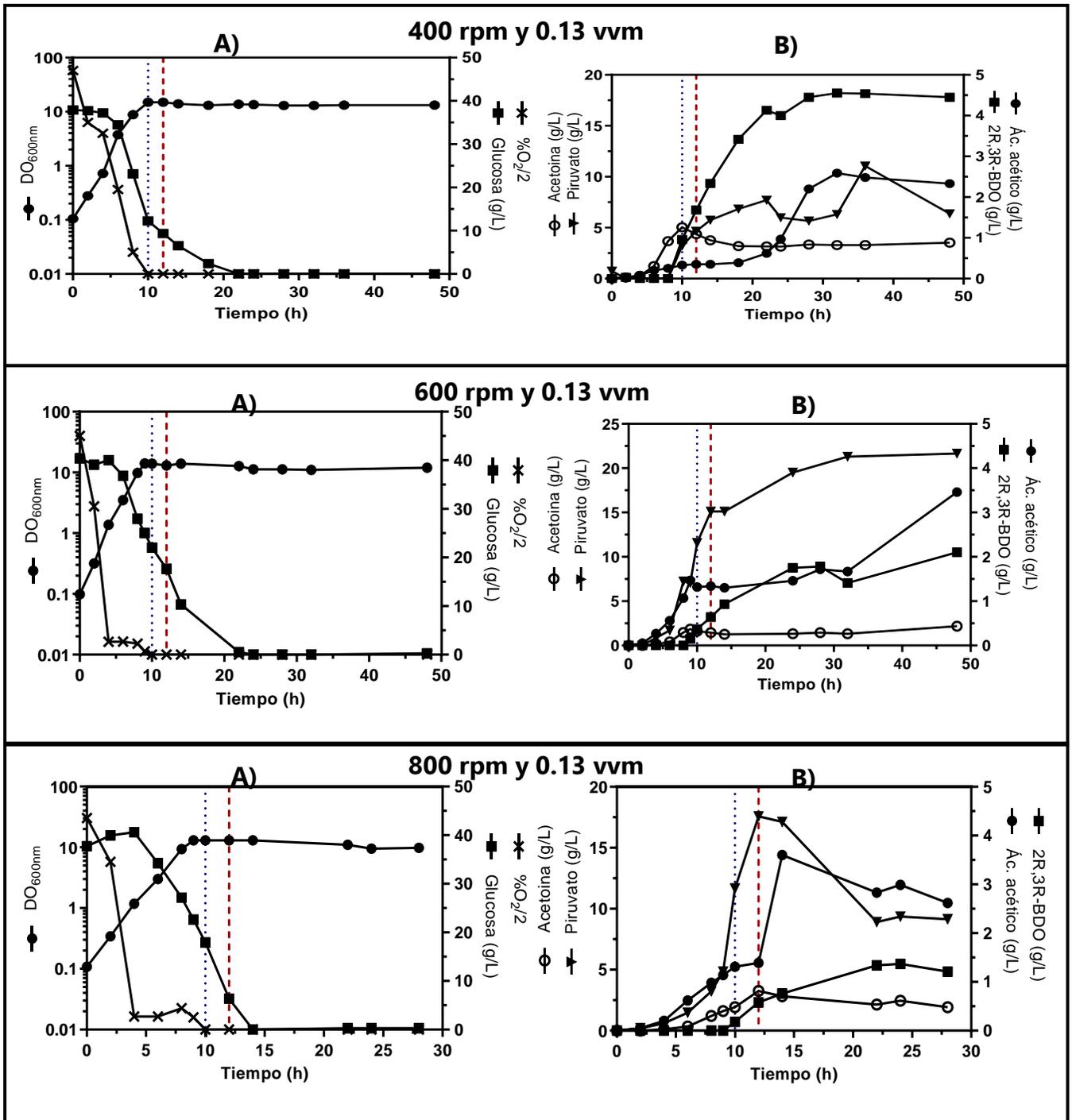


Figura 19. Efecto de diferentes niveles de transferencias de oxígeno en la fase de producción en la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa. A) cinética de crecimiento y glucosa residual y B) producción de metabolitos. Fase de crecimiento a $O_2d = 5\%$, fase de producción diferentes condiciones de transferencia de oxígeno: $OTR = 1.8, 8.2$ y $11.8 \text{ mmolO}_2/\text{L h}$ (línea punteada azul), posterior inducción térmica a 41°C (línea discontinua roja). ** El piruvato a altas concentraciones no pudo ser cuantificado con exactitud. En las gráficas se conservan los datos para ilustrar la tendencia en la producción de este metabolito.

La etapa de crecimiento de los tres cultivos se comportó de la forma esperada. No obstante, la etapa de producción se portó de forma diferente a lo propuesto: ya que mientras mayor fue la transferencia de oxígeno, en esta etapa, menor fue la generación de acetoína y butanodiol. A una OTR=1.8 mmolO₂/L h, condición previamente utilizada, conservaron los títulos de producción con 4.5 g/L de BDO y 3.5 g/L de acetoína. La máxima concentración de BDO se alcanzó a la hora 20 cuando se terminó la glucosa. Al igual que la ocasión anterior se acumularon piruvato (6 g/L) y acetato (2.33 g/L).

Cuando la transferencia de oxígeno de la etapa de producción se mantuvo con una OTR=8.2 mmolO₂/L h la producción de BDO decreció un 50% y la de acetoína un 40%. Por otra parte, cuando la OTR fue de OTR=11.8 mmolO₂/L h la producción disminuyó y tan solo se obtuvieron 1.2 g/L de BDO y cerca de 2 g/L de acetoína. Incluso a condiciones de mayor transferencia de oxígeno, contrario a lo esperado, en los cultivos de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa se acumuló piruvato y acetato. Previamente Xu y colaboradores realizaron un estudio de transferencia de oxígeno para una cepa de *E. coli* BL21, transformada con un plásmido pet28 conteniendo el operón de BDO de *E. cloacae* SDM bajo el control de un promotor sintético predicho para este conjunto de genes. Con esta cepa se estudiaron niveles de agitación de 100 a 500 rpm y flujos de aireación entre 0.5 y 2 vvm en fermentadores de 1 L con 800 mL de medio. La transferencia de oxígeno proporcionada a 400 rpm y 0.5 vvm permitió la producción de acetoína y meso-BDO, obteniendo 0.20 y 21.77g/L respectivamente y una nula producción de acetato (0.4 g/L), a partir de 51 g/L de glucosa. Cabe mencionar que estos experimentos se realizaron en medio mínimo M9 suplementado con extracto de levadura a 37°C (Xu et al., 2014). La transferencia de oxígeno que se utilizó en ese estudio también fue limitante, sin embargo, los resultados obtenidos difieren significativamente. Lo que permite deducir que la transferencia de oxígeno no era el único causante de la incompleta canalización del carbono en la vía de BDO. Si no que otros factores génicos relacionados con el operón utilizado, su estrategia de inducción, la actividad de las enzimas e incluso fenómenos de regulación podrían estar involucrados.

El comportamiento observado en estos experimentos sugiere que la preferencia de la vía *ackA-pta* sobre el TCA podría obedecer más bien a un fenómeno de regulación y no, como se pensaba, a una deficiencia en la transferencia de oxígeno. Ya que incluso incrementando la transferencia de oxígeno en el medio no fue posible observar una mejora en la producción de BDO y/o acetoína, por el contrario, se ve un efecto negativo en la actividad de la vía. Un estudio previo demostró que un efecto indirecto de la inducción térmica, en cultivos de *E. coli* para producción de proteínas recombinantes, eran fenómenos de regulación negativa sobre el TCA a cargo del regulador *arcA* y cuyo efecto principal era la producción de acetato. Al evaluar la mutante $\Delta arcA$ encontraron que la actividad del TCA se recuperaba y la velocidad específica de producción de acético disminuía un 50% (Hasan & Shimizu, 2008).

Para evaluar si este fenómeno pudiera estar sucediendo en los experimentos reportados con la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa (figura 26), se generó la mutante EM01 Δ arcA y se evaluó en cultivos de producción de BDO (ver sección 8.5.6). Adicionalmente, como la condición que más favoreció la síntesis de BDO fue cuando la etapa de producción se mantuvo con una OTR= 1.8 mmolO₂/L h se decidió hacer un duplicado adicional con estas condiciones. Los resultados se resumen en la figura 20. Se presentan las cinéticas de forma independiente porque, a pesar de haberse realizado bajo las mismas condiciones de cultivo, el comportamiento cinético presenta las mismas tendencias, pero con diferentes magnitudes y desplazados en el tiempo.

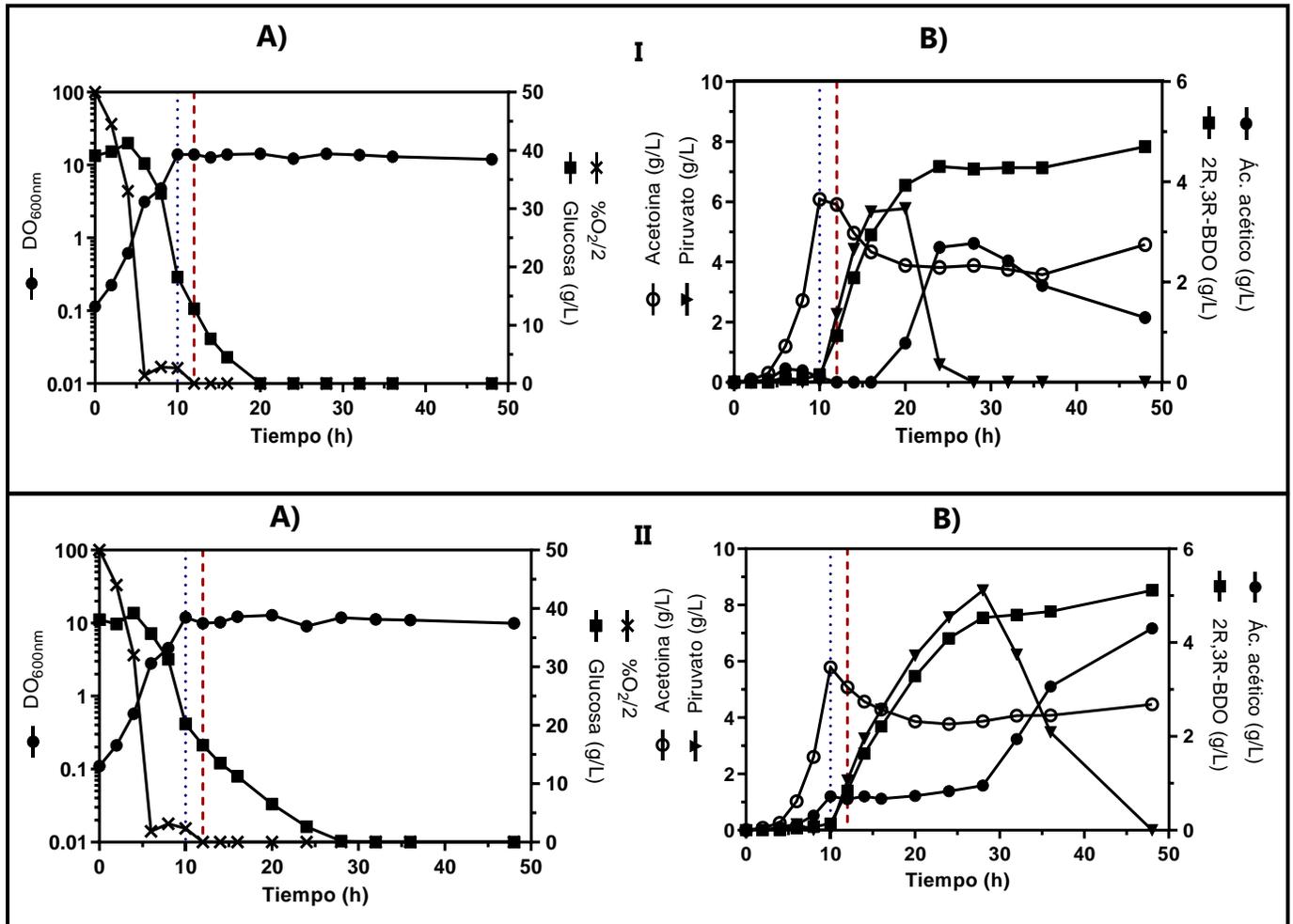


Figura 20. Cinéticas de crecimiento y glucosa residual y B) producción de metabolitos de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa. Fase de crecimiento a O₂d= 5%, fase de producción una OTR= 1.8mmolO₂/L h (línea punteada azul), posterior inducción térmica a 41 °C (línea discontinua roja).

Esta diferencia es ocasionada durante la etapa de crecimiento, donde a pesar de que cada unidad de fermentación controló el oxígeno disuelto al 5%, debido a lo dinámico que resulta el crecimiento exponencial y la necesidad de adicionar antiespumante, el control de este nutriente no se pudo realizar con una gran precisión. Estas ligeras diferencias en la transferencia de oxígeno durante la etapa de crecimiento, ocasionó que la biomasa máxima alcanzada en cada cultivo fuera diferente. Por ejemplo, en este duplicado las biomásas máximas alcanzadas fueron 6 y 5.16 g/L. En consecuencia, tal como se puede observar en la figura 27, es evidente que a mayor biomasa la velocidad de consumo de glucosa, como la velocidad de producción de acetoína-BDO es mayor. Además, como hemos discutido previamente al agotarse la fuente de carbono es posible observar cambios importantes en los perfiles metabólicos y en este caso estos cambios se desplazan ligeramente en el tiempo.

Sin embargo, debe considerarse que el comportamiento general del proceso es bastante similar lo que demuestra la reproducibilidad experimental. Una muestra de esto es que en cada grupo de experimentos se ha repetido el cultivo en dos etapas: etapa de crecimiento al 5% de O_2d , etapa de producción $OTR= 1.8 \text{ mmolO}_2/L \text{ h}$ y posterior inducción térmica. En total se tienen 2 réplicas independientes y un duplicado que al promediarlos y calcular desviaciones estándar podemos observar que los parámetros cinéticos se reproducen con bajos niveles de error. Sin embargo, la producción de ácidos orgánicos si llega a presentar diferencias importantes, aunque esto se debe a que durante las últimas etapas de los cultivos el piruvato se convierte en acetato, solo que en las réplicas esto sucede a diferentes velocidades. Estos resultados se presentan en la tabla 12.

Tabla 12. Parámetros cinéticos y estequiométricos de cuatro réplicas del cultivo de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa. Fase de crecimiento a $O_2d= 5\%$, fase de producción a una $OTR= 1.8 \text{ mmolO}_2/L \text{ h}$ posterior inducción térmica a $41 \text{ }^\circ\text{C}$.

Parámetros	Título (g/L)		
$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.54 ± 0.01	BDO	4.8 ± 0.46
$Y_{x/s} \text{ (gDCW/gGlc)}$	0.27 ± 0.02	Acetoína	4.3 ± 0.52
$Y_{p/s} \text{ (gBDO/gGlc)}$	0.11 ± 0.02	Piruvato*	3.14 ± 3.14
$Y_{p/x} \text{ (gBDO/gDCW)}$	0.79 ± 0.13	Acetato*	3.25 ± 1.5
$q_p \text{ (gBDO/L h)}$	0.12 ± 0.02	Biomasa	5.96 ± 0.49

Recapitulando los experimentos realizados hasta este punto de la investigación, habíamos logrado entender que la transferencia de oxígeno en los cultivos es crucial para el buen funcionamiento de la vía de producción de BDO. En esta tesis se estudió un amplio rango de niveles de transferencia de oxígeno. Desde bajas $OTR= 1.8 \text{ mmolO}_2/L \text{ h}$ hasta elevadas tensiones de oxígeno disuelto ($O_2d \geq 5\%$), para cultivos en dos etapas. Se estableció una condición de $O_2d=5\%$ para la etapa de crecimiento y se evaluaron diferentes $OTR= 1.8, 8.2$ y $11.8 \text{ mmolO}_2/L \text{ h}$ para la etapa de producción. En la figura 21, se resume el efecto de estas condiciones de transferencia de oxígeno respecto a la producción de acetoína y BDO.

Analizando el gráfico de la condición de menor a mayor transferencia de oxígeno. Se observa que el perfil de la proporción del par acetoína-BDO cambia drásticamente. Cuando la OTR= 1.8 mmolO₂/L h se mantuvo todo el cultivo se produjeron 2.19 g/L del par acetoína-BDO, del cual el 80% fue BDO. Cuando se utilizó O₂d=5% para el crecimiento y una OTR= 1.8 mmolO₂/L h para la producción, se obtuvieron 9 g/L del par acetoína-BDO y en esta ocasión el BDO solo representó el 55%. Al seguir incrementando la transferencia de oxígeno en la etapa de producción, se tuvo que para una OTR= 8.2 mmolO₂/L h la producción del par se redujo a 4.3 g/L y ambos compuestos se encontraron en la misma proporción. Cuando la etapa de producción se utilizó una OTR= 11.8 mmolO₂/L h, la producción del conjunto acetoína-BDO decreció a 3.14 g/L y la producción de acetoína se favoreció representando el 60%. Finalmente, cuando ambas etapas del cultivo se mantuvieron a O₂d≥5%, la producción de ambas moléculas fue de 5 g/L de los cuales el 90% fue acetoína.

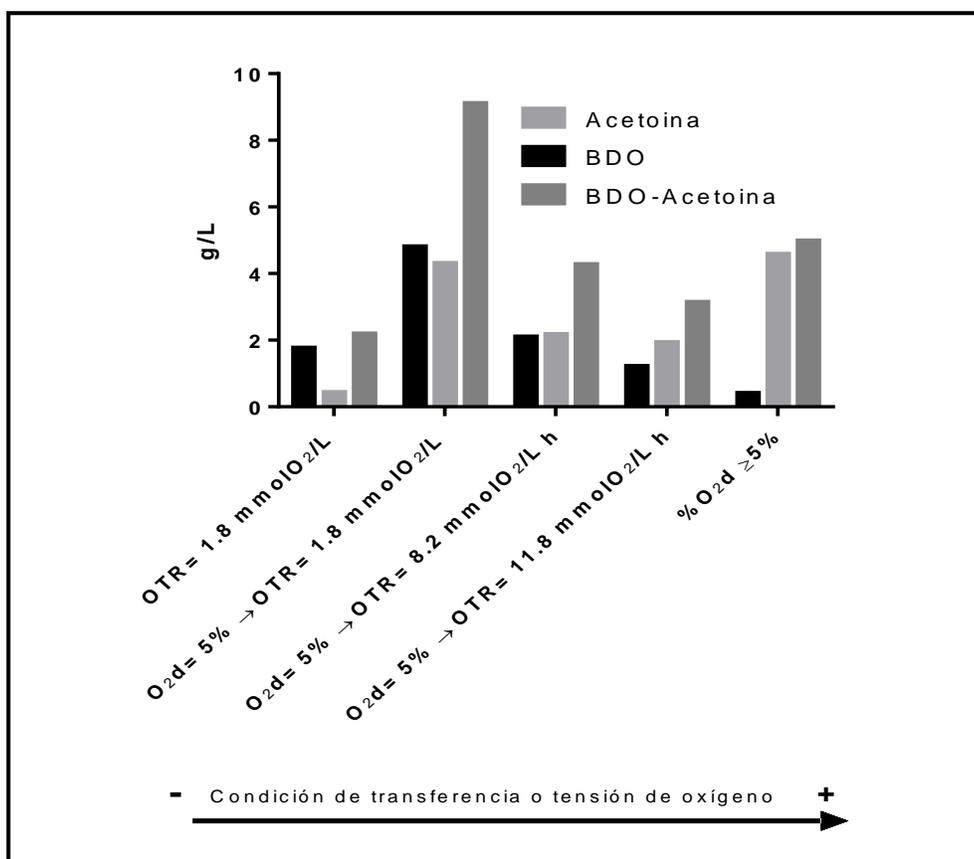


Figura 21. Efecto de la transferencia de oxígeno en la producción y proporción de acetoína y BDO.

Estos resultados permitieron concluir con los estudios de transferencia de oxígeno. Puesto que, dentro de las condiciones exploradas, la que maximizó la producción del par acetoína-BDO con una proporción mayor de este último compuesto y ofrece el mejor rendimiento producto/biomasa fue el cultivo en dos etapas: crecimiento a O₂d=5% y producción a una OTR= 1.8 mmolO₂/L h. También permitió comprender el efecto entre la transferencia oxígeno y el funcionamiento de la vía. Al disminuir la transferencia se puede favorecer la

proporción de BDO y al incrementar la transferencia la proporción del BDO disminuye hasta que el principal producto es la acetoína. De acuerdo con lo observado quedó claro que para incrementar la producción de par acetoína-BDO deberíamos utilizar el conocimiento del efecto de la transferencia de oxígeno y complementarlo con otras estrategias de cultivo o de ingeniería metabólica.

En este sentido, previamente se había observado que el agotamiento de la glucosa afectó de forma importante el metabolismo celular y por tanto la producción del par acetoína-BDO. Por lo que se procedió a explorar el efecto de la concentración de glucosa sobre esta vía. Se decidió utilizar una estrategia de cultivo lote alimentado para mantener un suministro constante de glucosa, y de cierta forma de NADH, con la finalidad de que la producción de BDO se mantuviera activa y evitar la acumulación de piruvato y su futura conversión a acetato.

8.5.5 Cultivos alimentados y su efecto en la producción de BDO

Para realizar los cultivos alimentados se utilizó la estrategia de cultivo en dos etapas que mejores resultados había dado. Se mantuvo 5% de O_2d durante las primeras 10 h para después disminuir la transferencia de oxígeno a una $OTR = 1.8 \text{ mmolO}_2/\text{L h}$ (aireación de 0.13 vvm de aireación y 400 rpm de agitación). El cambio de temperatura a 41 °C se realizó dos horas después y la alimentación de glucosa se inició a las 18 h cuando la glucosa inicial se agotó del medio de cultivo. Se decidió que la velocidad de alimentación igualaría la velocidad de síntesis de BDO obtenida previamente en condiciones similares. De forma que la concentración de glucosa en el medio debería mantenerse en cero. Se propuso que la glucosa consumida sería utilizada únicamente por la vía de síntesis de BDO.

La velocidad de alimentación se determinó a partir de los datos de las cinéticas de la figura 27. Se calculó la velocidad específica de producción de BDO de la cepa EM01. El valor determinado fue 0.9 mmol de BDO/ h gDCW, haciendo una relación equimolar y considerando la biomasa promedio alcanzada en los cultivos (5 g/L), el flujo volumétrico de glucosa calculado fue de 0.7 g de glucosa/h. Para ello, los cultivos fueron alimentados con glucosa a 200 g/L a una velocidad de 0.06 mL/min. Esta estrategia de cultivo alimentado debería permitir mantener la síntesis de BDO y evitar el sobre flujo de la vía glucolítica (acumulación de piruvato). En la figura 22 y tabla 14, podemos observar las cinéticas de crecimiento y producción de metabolitos asociada con esta estrategia de cultivo.

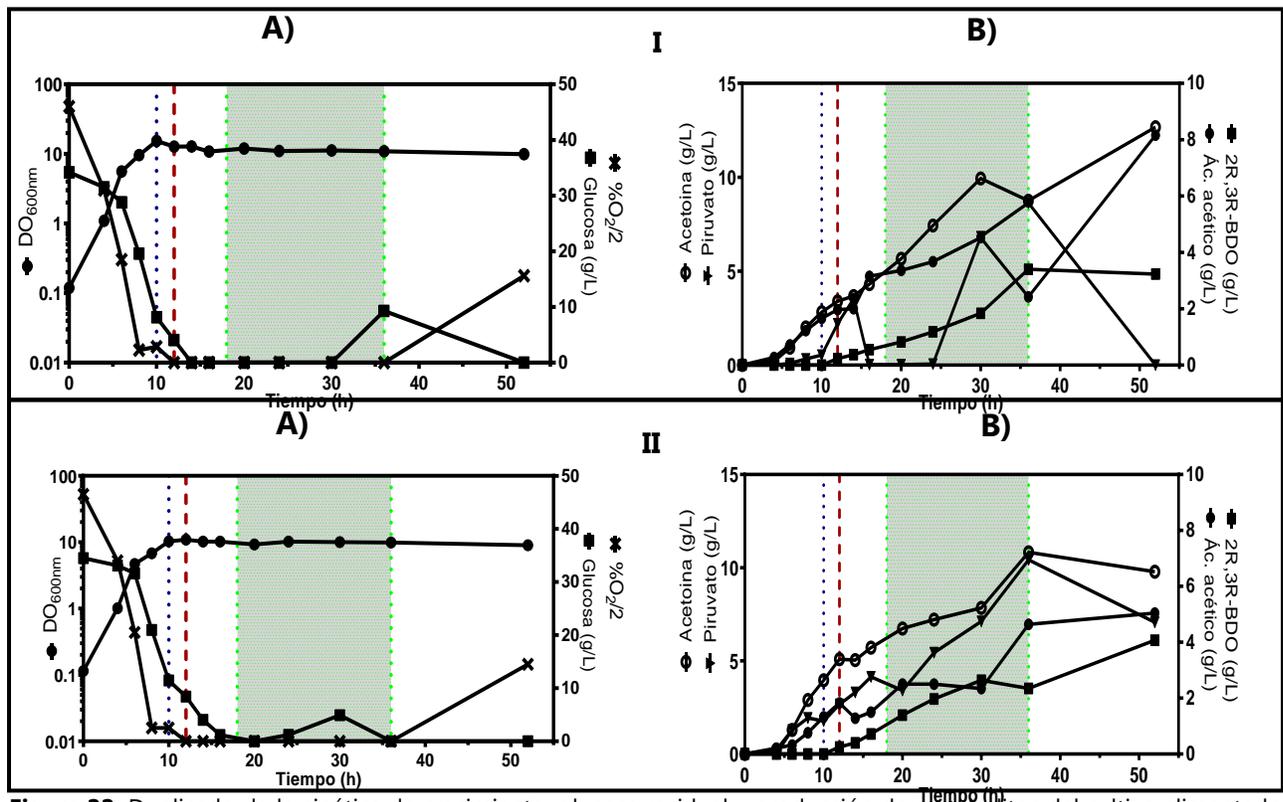


Figura 22. Duplicado de la cinética de crecimiento, glucosa residual y producción de metabolitos del cultivo alimentado de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa. Fase de crecimiento a $O_2d = 5\%$, fase de producción $OTR = 1.8 \text{ mmolO}_2/\text{L h}$ (línea punteada azul) posterior inducción térmica a 41°C (línea discontinua roja). Alimentación a 0.06 mL/min con glucosa a 200 g/L durante el periodo 18 h a 36 h (líneas punteadas verdes).

Estos cultivos se iniciaron con aproximadamente 35 g/L de glucosa los cuales fueron consumidos en las primeras 14 h . En las 4 horas posteriores es posible observar que las células consumieron parte del piruvato que habían acumulado. A las 18 h se inició la alimentación de glucosa y esta se detuvo a las 36 h . En total se alimentaron 12.6 g de glucosa, lo que significa una concentración total de glucosa de 52 g/L . Tal como se esperaba durante la mayor parte del periodo de alimentación la concentración de glucosa en el medio de cultivo se mantuvo en 0 . Es también durante esta etapa donde se produce prácticamente todo el BDO obtenido (aproximadamente 3.5 g/L) a una velocidad constante, de igual forma una gran cantidad de acetoina (entre 10 y 12 g/L) es acumulada. Sin embargo, contrario a lo esperado también se producen cantidades importantes de piruvato (entre 8 y 10 g/L) y acetato (entre 3 y 4 g/L). Cuando la alimentación de glucosa se detiene también lo hace la producción de BDO. En este punto es cuando el piruvato acumulado comienza a ser reasimilado por las células y este es principalmente transformado a acético alcanzando títulos finales entre 5 y 8 g/L .

Tabla 13. Parámetros cinéticos y estequiométricos del cultivo alimentado (0.7 g Glc/h) de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa. Fase de crecimiento a O₂d= 5%, fase de producción a OTR= 1.8 mmolO₂/L h posterior inducción térmica a 41 °C.

Parámetros	Título (g/L)		
	I		
μ (h ⁻¹)	0.55	BDO	3.23
Y _{x/s} (gDCW/gGlc)	0.27	Acetoína	12.67
Y _{p/s} (gBDO/gGlc)	0.18	Piruvato	0
Y _{p/x} (gBDO/gDCW)	0.46	Acetato	8.16
q _p (gBDO/L h)	0.07	Biomasa	6.50
II			
μ (h ⁻¹)	0.50	BDO	4.07
Y _{x/s} (gDCW/gGlc)	0.20	Acetoína	9.78
Y _{p/s} (gBDO/gGlc)	0.18	Piruvato	7.07
Y _{p/x} (gBDO/gDCW)	0.82	Acetato	5.04
q _p (gBDO/L h)	0.08	Biomasa	4.68

Es importante remarcar que en las réplicas el comportamiento difiere un poco en esta etapa, puesto que en la réplica I parte del piruvato es destinado a la producción de acetoína, mientras que en la réplica II este llega a ser transformado a BDO. Otra diferencia importante es la velocidad a la que se reasimila el piruvato. En la réplica I el piruvato es consumido en su totalidad para las 52 h mientras que en la réplica II menos del 50% fue consumido en ese mismo periodo. Esta diferencia se debe principalmente a que en la réplica I la biomasa es un 30% mayor, lo que implica mayores velocidades de consumo y producción de metabolitos.

A pesar de que aún se producen significativas cantidades de acetato, esta estrategia de cultivo permitió producir títulos significativos de BDO y acetoína. Entre los dos representan cerca del 60% del carbono empleado como sustrato en este cultivo. Sin embargo, cabe mencionar que el producto mayoritario fue la acetoína y no el BDO. Esto sugiere que una limitante principal en la producción de BDO está dada por la reducción de la acetoína. La cuestión entonces recae en el origen de la deficiencia de esta reacción. Existen dos posibilidades: una baja actividad de la enzima butanodiol deshidrogenasa o un deficiente suministro del cofactor NADH. Para poder responder a esta pregunta se realizaron ensayos de actividad enzimática de la enzima BDH. Adicionalmente, para comprender con mayor detalle esta vía metabólica, se caracterizó la actividad enzimática de las dos primeras reacciones de la vía catalizadas por ALS y ALD en las diferentes etapas del cultivo. Los resultados de estos ensayos se resumen en la figura 23.

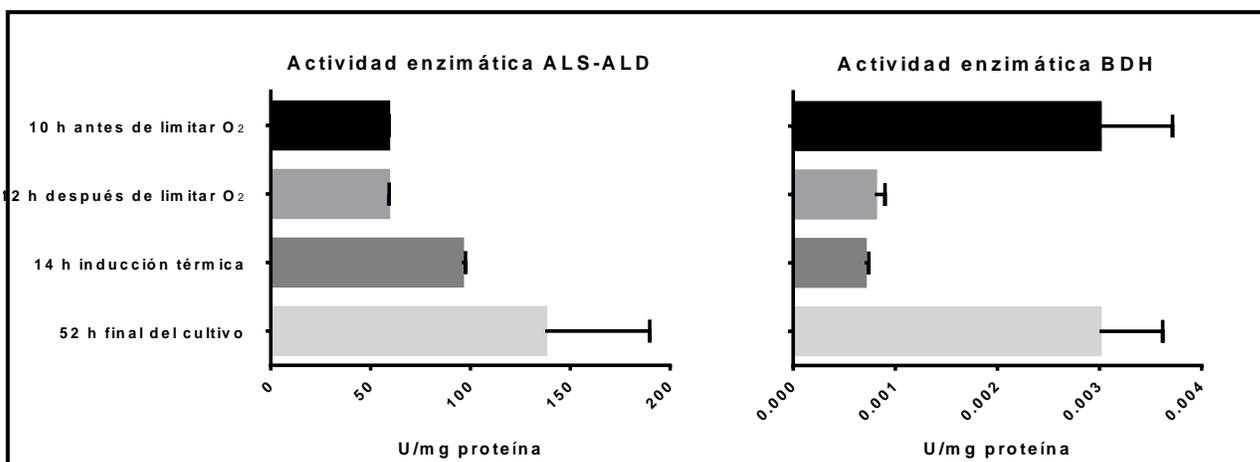


Figura 23. Actividad enzimática en las diferentes etapas del cultivo alimentado de la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa.

El ensayo de actividad ALS-ALD se realizó de forma conjunta, de tal forma que el producto que se cuantificó fue la acetoína. Se hizo un balance de materia cuantificando el piruvato residual del ensayo de actividad y se encontró que prácticamente todo el piruvato consumido (de 7.67 mmoles) en la reacción fue transformado a acetoína (3.37 mmoles) en un periodo de 1 h. Esto indica que la catálisis de ALS (piruvato a acetolactato) no es un paso limitante para la reacción catalizada por ALD (acetolactato a acetoína).

A las primeras 10 h de cultivo, cuando el O₂d era 5%, la actividad de este par de enzimas era aproximadamente 50 U/mg y no se observó ningún cambio cuando la transferencia de O₂ se limitó (OTR= 1.8 mmolO₂/L h). Después de realizar el proceso de inducción térmica la actividad se duplicó alcanzando valores cercanos a 100 U/mg, lo cual era de esperarse al existir mayores niveles de transcripción de la vía. Al final del cultivo (hora 52) la actividad se encontró en niveles cercanos a 150 U/mg, tres veces la actividad inicial. Este incremento se debe a la acumulación de las enzimas de esta vía durante el cultivo. Es de esperarse que, en tiempos avanzados de cultivo, un mayor porcentaje de las proteínas presentes en el extracto celular corresponda con las enzimas que se están sobre expresando.

En general la actividad de estas enzimas se encontró en un rango de 50 a 150 U/mg. Un estudio previo reportó la actividad de estas enzimas provenientes de *B. licheniformis* con valores entre 700 y 3000 U/mg (Xu et al., 2014). Aunque no se puede hacer una comparación estricta, ya que los experimentos fueron completamente diferentes (temperatura, promotores y número de copia de los vectores), la actividad obtenida en esta tesis se encuentra comparable con la reportada previamente. Estos valores de actividad junto con los títulos de producción de acetoína alcanzados, sugieren que las primeras dos reacciones de la vía no son un paso limitante en la formación de BDO. Por el contrario, en el último paso de la vía, ensayos de BDH indican que la actividad encontrada está en un rango de 0.0007 a 0.003 U/mg, mientras que la reportada por Xu y colaboradores para esa misma enzima proveniente del mismo organismo es de 0.75 U/mg, lo que implica de dos a tres

órdenes de magnitud de diferencia. Esto explica los bajos niveles de BDO obtenidos, incluso cuando se generó una gran cantidad de acetoína.

La enzima BDH a la hora 10 se encontró activa con una actividad 0.03 U/mg. Sin embargo, en la cinética de producción de metabolitos podemos observar que en ese tiempo no hay producción de BDO. Esto puede deberse a que, aunque la enzima esta activa, el hecho de que el O_2d sea 5% favorece que la reacción se encuentre desplazada a la formación de acetoína (Celińska & Grajek, 2009). La cual, como se observa en la figura 30, si se produce en ese momento del cultivo. Contrario a lo esperado, al limitar la transferencia de oxígeno ($OTR= 1.8 \text{ mmolO}_2/L \text{ h}$) en el cultivo la actividad de esta enzima disminuye 5 veces. Al momento de realizar la inducción térmica no se observó ningún cambio en la actividad, cuando se esperaba que esta incrementará al haber mayor expresión de la vía. Esto puede deberse al efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima. Previamente se realizó una caracterización de la preferencia en el sentido de la reacción de BDH proveniente de *B. subtilis*. Encontraron que a $pH=6$ (el mismo utilizado en este estudio) la actividad de BDH se favoreció ligeramente en el sentido de la reducción de acetoína a BDO. Por el contrario, cuando la temperatura era cercana a $41 \text{ }^\circ\text{C}$ la actividad de BDH se inclinaba mayoritariamente en el sentido de la oxidación de BDO a acetoína (Zhang et al., 2014).

En conjunto los datos provenientes del cultivo alimentado y los ensayos de actividad enzimática apuntan que la deficiente producción de BDO se encuentra limitada por el último paso de la vía de síntesis, es decir la reducción de acetoína. También se puede concluir que el problema es causado por la pobre actividad de la enzima BDH (al menos en el sentido de la reducción) la cuál es varios ordenes de magnitud inferior a la reportada previamente y cuatro órdenes de magnitud menor al valor encontrado para la actividad conjunta de ALS-ALD encontrada en este trabajo. Una posible solución a esta baja actividad sería cambiar el gen utilizado en este proyecto por otro que permitiera tener mayores niveles de actividad (en el sentido de la reducción a $41 \text{ }^\circ\text{C}$) o introducir otro promotor T7 exclusivo para la expresión de este gen. Esta última estrategia se implementó previamente triplicando la actividad de BDH lo que se vio reflejado un incremento del 20% en la proporción BDO/acetoína (Tong et al., 2016). Otra alternativa sería incrementar la sobreexpresión de este gen utilizando un vector de alto número de copia.

A pesar de que existen diferentes genes de BDH con alta actividad enzimática, como los provenientes de *K. pneumoniae* y *E. cloacae* (Xu et al., 2014) debe tomarse en consideración que cambiar el gen BDH está restringido por su estereoespecificidad, el utilizado en este trabajo de *B. subtilis* ha sido el más utilizado en la literatura para la producción de (R,R)-2,3-BDO. Y con este gen se han obtenido títulos de producción muy variados desde 5 g/L (Yan et al., 2009), como es nuestro caso, hasta títulos de 115 g/L en cultivos alimentados (Ji et al., 2015). Estas grandes diferencias en los niveles de producción probablemente se deben al

fondo genético de las cepas utilizadas, sistema de expresión de los genes y estrategias de cultivo.

Aun sabiendo que la actividad de BDH estaba limitando la producción de BDO, la acumulación de piruvato y su posterior transformación a acetato (una vez que se agotó la glucosa) requería de un análisis. Incluso controlando la velocidad de alimentación de glucosa durante la fase de limitación de oxígeno y de inducción del sistema por incremento de la temperatura, el piruvato acumulado era metabolizado a acetato. Tal como previamente se discutió, una de las posibles causas podía ser fenómenos de regulación. Para explorar esta hipótesis se procedió a construir y evaluar la cepa EM01 Δ arcA/pAcycDuetBDOBa.

8.5.6 Efecto de la eliminación del gen *arcA* en la producción de BDO con la cepa EM01

El sistema de dos componentes ArcAB funciona como un mecanismo de regulación en respuesta al estado respiratorio o fermentativo de las células. La capacidad para unirse al DNA de ArcA es regulada por fosforilación mediante ArcB. A su vez, la actividad quinasa de ArcB se gobierna por el estado redox celular que depende de las pozas de quinonas que se encuentran ligadas a la relación de NADH/NAD⁺. En la ausencia de oxígeno se favorece la proporción de quinonas oxidadas lo que estimula la actividad quinasa de ArcB que activa a ArcA mediante transfosforilación (Park et al., 2013). ArcA tiene la capacidad disminuir la expresión de varios genes como *acnB*, *icdA*, *sucA*, *fumA* por lo que la actividad del TCA se ve disminuida e incrementa la expresión de *arcA* por lo que se incrementa la producción de acetato (Hasan & Shimizu, 2008). En este proyecto se tenía la hipótesis de que el regulador ArcA esta atenuando la actividad del TCA y por ello se acumulan considerables cantidades de piruvato que posteriormente terminan como acetato, para tratar de solucionar este cuello de botella se decidió eliminar el gen *arcA*.

La eliminación del gen *arcA* se realizó mediante un proceso de transducción con el fago P1 a partir de una cepa mutante proveniente del banco de Keio (Baba et al., 2006). La cepa resultante se comprobó mediante PCR a partir de DNA cromosomal. Para ello se utilizaron los cebadores F_cmp_arcA y R_cmp_arcA. La cepa mutante se transformó con el plásmido pAcycDuet_BDOBa. La cepa resultante (EM01Δ*arcA*/pAcycDuet_BDOBa) fue utilizada en cultivo en dos etapas. En la primera etapa se mantuvo una concentración de O_{2d} del 5%. A la hora 10 se cambió la transferencia de oxígeno OTR= 1.8 mmolO₂/L h y dos horas más tarde se cambió la temperatura del cultivo a 41 °C. La cinética de cultivo se siguió hasta la hora 48. Los resultados se presentan en la figura 24 y la tabla 15.

En estos cultivos se observa un comportamiento muy similar al de la cepa EM01. No se observó diferencia en la velocidad específica de crecimiento ni en los niveles de producción de acetoína (entre 5 y 6 g/L) y BDO (entre 3 y 4 g/L). Pero si se observó un incremento en la velocidad de consumo de la fuente de carbono. La glucosa (50 g/L) se consumió completamente entre la hora 20 y 28. En este momento se observó una máxima acumulación de piruvato (10 g/L). En las horas siguientes, este metabolito fue consumido y principalmente transformado a acetato, alcanzando títulos entre 4 y 5 g/L.

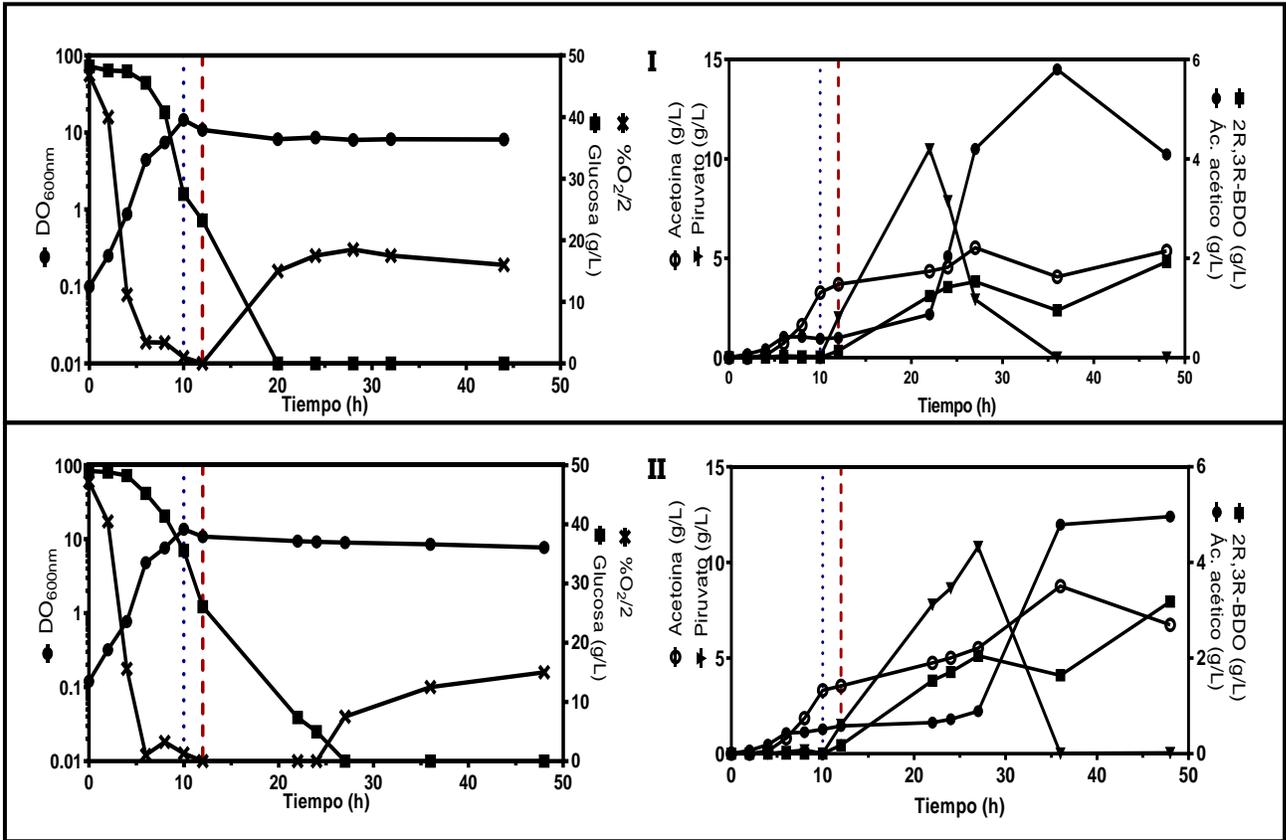


Figura 24. Duplicado del cultivo de la cepa EM01 Δ arcA/pAcycDuet_BDOBa con la estrategia de cultivo desarrollada. Fase de crecimiento a $O_2d= 5\%$, fase de producción a una $OTR= 1.8 \text{ mmolO}_2/\text{L h}$ (línea punteada azul), posterior inducción térmica a 41°C (línea discontinua roja).

Tabla 14. Parámetros cinéticos y estequiométricos de la cepa EM01 Δ arcA/pAcycDuet_BDOBa con la estrategia de cultivo desarrollada. Fase de crecimiento a $O_2d= 5\%$, fase de producción a una $OTR= 1.8 \text{ mmolO}_2/\text{L h}$ posterior inducción térmica a 41°C

Parámetros	Título (g/L)	
I		
$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.52	BDO 4.09
$Y_{x/s} \text{ (gDCW/gGlc)}$	0.32	Acetoína 5.37
$Y_{p/s} \text{ (gBDO/gGlc)}$	0.12	Piruvato 0.00
$Y_{p/x} \text{ (gBDO/gDCW)}$	0.55	Acetato 4.09
$q_p \text{ (gBDO/L h)}$	0.08	Biomasa 6.27
II		
$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.52	BDO 3.18
$Y_{x/s} \text{ (gDCW/gGlc)}$	0.32	Acetoína 6.74
$Y_{p/s} \text{ (gBDO/gGlc)}$	0.12	Piruvato 0.00
$Y_{p/x} \text{ (gBDO/gDCW)}$	0.55	Acetato 4.96
$q_p \text{ (gBDO/L h)}$	0.07	Biomasa 5.84

El comportamiento observado en estos cultivos no fue como el reportado previamente por Hasan y Shimizu en 2008. Se esperaba que la producción de acetato disminuyera significativamente. De tal forma que una mayor cantidad del carbono reasimilado en forma de piruvato fuera destinado a la vía de síntesis de BDO. Sin embargo, ninguno de estos fenómenos pudo ser observado en las condiciones de operación evaluadas. Una posibilidad es que este fenómeno este limitado por la transferencia de oxígeno empleada en la etapa de producción y por la generación de NADH en el catabolismo del piruvato reasimilado. Se debe mencionar que en este proyecto se estudiaron diferentes niveles de transferencia de oxígeno en la etapa de producción utilizando la cepa EM01/*pAcycDuet_BDOBa* y no se observó ningún efecto positivo en la actividad de la vía de BDO. Esto se atribuyó al efecto regulador ejercido por *arcA*. En consecuencia, existe la posibilidad de que, al realizar nuevamente estos estudios, pero utilizando la cepa EM01 Δ *arcA*/*pAcycDuet_BDOBa*, se encuentre una condición diferente de transferencia de oxígeno que favorezca la actividad de la vía de BDO.

8.5.7 Resumen: Estrategias de ingeniería metabólica y de cultivo para la producción de butanodiol

A lo largo de este estudio se estudiaron diferentes estrategias de ingeniería metabólica y de cultivo y su efecto en el metabolismo de la vía de síntesis de butanodiol. En la figura 25 se hace una comparación del carbono destinado a la vía de BDO y su distribución, de acuerdo con cada estrategia implementada con la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa.

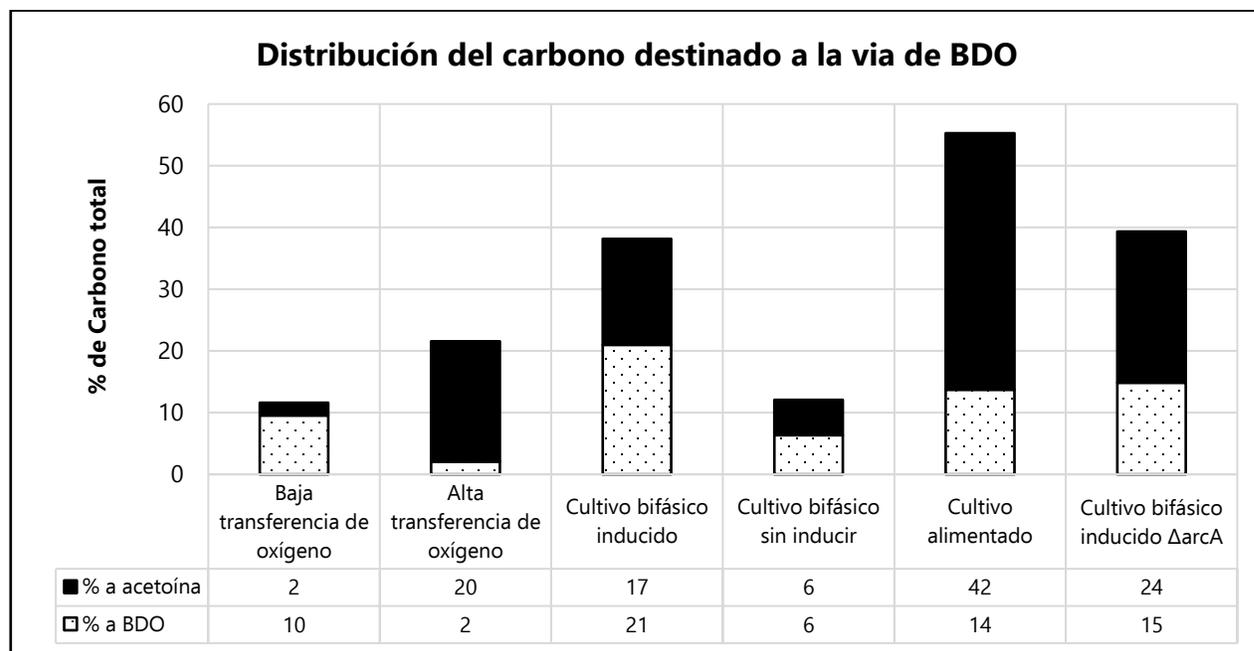


Figura 25. Distribución del carbono destinado a la vía de BDO bajo diferentes estrategias de ingeniería metabólica y de cultivo.

Desde el punto de vista de transferencia de oxígeno es evidente que una excesiva como una deficiente transferencia de oxígeno conlleva a una baja actividad de esta vía metabólica. En el caso de bajas transferencias de oxígeno, menos del 12 % del carbono es destinado a la vía y este principalmente se encuentra en forma de BDO. Cuando la transferencia de oxígeno es elevada el 22 % del carbono se dirige a la vía de interés, pero contrario al caso anterior el producto mayoritario es acetoina. También se debe tener en consideración que a bajas transferencias de oxígeno ($OTR = 1.8 \text{ mmolO}_2/\text{L h}$) el crecimiento se ve limitado y se genera poca biomasa, por el contrario, altas tensiones de oxígeno disuelto ($O_2 \geq 5\%$) conllevan principalmente a la producción de biomasa.

Como respuesta a esta divergencia metabólica se implementaron cultivos en dos etapas. En la primera etapa del cultivo se utilizaron altas tensiones de oxígeno ($O_2d=5\%$) con la finalidad de generar biomasa mientras que en la segunda parte se implementó limitación en la velocidad de transferencia de oxígeno ($OTR= 1.8 \text{ mmolO}_2/\text{L h}$) para favorecer la síntesis de BDO. La inducción térmica a $41 \text{ }^\circ\text{C}$ se realizó en la segunda etapa del cultivo. Con esta estrategia cerca del 45% del carbono se destinó a la vía de interés y se produjeron cantidades iguales de acetoína y BDO. Al evaluar la misma estrategia de cultivo, pero con la cepa EM01 $\Delta arcA$ se obtienen resultados similares. También se observa que utilizando la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa e implementando la estrategia de cultivo en dos etapas, pero sin realizar la inducción térmica, solo el 12 % del carbono se destina a la vía conservando la misma proporción acetoína/BDO.

Finalmente, efectuando una estrategia de cultivo alimentado con la cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa se logró dirigir cerca del 60% del carbono a la vía metabólica del butanodiol. No obstante, únicamente la tercera parte de este carbono se encontró en forma de BDO mientras que el resto estaba presente como acetoína. Ensayos de actividad enzimática demostraron que la causa de este fenómeno es una baja actividad de la enzima BDH en varios ordenes de magnitud inferior a lo reportado previamente (Ji et al., 2015; Xu et al., 2014).

Después de evaluar las estrategias que se implementaron en este estudio y los reportes existentes en la literatura, es evidente que la producción de BDO siempre estará acompañada de una intrínseca producción de acetoína, esto debido a que la actividad de BDH es reversible y aparentemente sigue un equilibrio entre ambos metabolitos (Yang et al., 2017). Por ello es importante estudiar esta vía desde un punto de vista donde tanto la acetoína como el BDO son los productos. Desde esta perspectiva, en este estudio conseguimos dirigir cerca del 60% del carbono a la vía metabólica acetoína/BDO. El resto del carbono, que no fue posible dirigir hacia la vía de interés, se encuentra en forma de piruvato y acetato. Futuras estrategias, principalmente de ingeniería metabólica, se pueden implementar para canalizar este carbono a la vía sintética y mejorar el sistema de producción de acetoína/BDO.

IX. Conclusiones

1. Mediante ingeniería metabólica se construyó una cepa de *E. coli* capaz de producir acetoína y butanodiol, utilizando glucosa como fuente de carbono, con un rendimiento del 60% del máximo teórico. Para lograrlo se utilizó un operón sintético con los genes (*alsS*, *alsD* y *bdhA*) provenientes del género *Bacillus* cuya expresión se reguló mediante un sistema de inducción térmico e implementó una estrategia de cultivo en dos etapas. Cabe mencionar que el operón se encuentra bajo el control de dos promotores de diferente fuerza (*lac* y T7), que son controlados bajo diferentes sistemas de inducción, lo que da versatilidad al sistema de expresión.
2. Se desarrolló un novedoso sistema de expresión inducible por temperatura. Para ello se integró el gen de la RNA polimerasa T7 en el cromosoma de la cepa AV11, obteniendo así la cepa EM01. La integración se realizó en el locus *HtpG* que es dependiente del factor transcripcional σ_{32} . El sistema fue evaluado y se determinó que posee una baja expresión basal a 37 °C y permite una sobreexpresión cuando la temperatura se eleva a 41 °C.
3. Se estudiaron diferentes transferencias de oxígeno, estrategias de cultivo y de inducción. Se determinó que implementar cultivos en dos etapas que favorecieran distintos estados redox de la célula permitirían controlar el flujo de carbono entre la generación de biomasa y la vía metabólica acetoína/BDO. La primera etapa se caracterizó por una alta disponibilidad de oxígeno (5%O₂d) que propició el crecimiento celular y en la segunda etapa se limitó el oxígeno (OTR=1.8 mmolO₂/L h) para impulsar la actividad de la vía de interés. También se estableció que la segunda etapa era el mejor momento para realizar la inducción térmica a 41°C.
4. Se descubrió que la disponibilidad de oxígeno en el cultivo tiene un efecto directo en el título volumétrico, así como en la proporción en la que se producen el par acetoína-BDO. Este fenómeno obedece al balance redox intracelular. Altas transferencias de oxígeno (baja relación NADH/NAD⁺) llevan a la producción de acetoína, en contraste, condiciones de limitación de oxígeno (elevada relación NADH/NAD⁺) favorecen la producción de BDO. Adicionalmente, el control de la disponibilidad de la glucosa mediante cultivos alimentados permitió dirigir el flujo de carbono hacia la vía de acetoína-BDO y disminuir la producción de ácidos orgánicos.

5. A lo largo de los estudios, se revelaron algunos efectos negativos relacionados con el sistema de inducción térmico. Al utilizar una temperatura de 41°C la respuesta a estrés térmico incrementa la demanda energética celular (ATP) e indirectamente parece desencadenar una serie de eventos de regulación que conllevan a la acumulación de piruvato y acetato. Además, se sospecha que la actividad de BDH a esta temperatura se ve favorecida en el sentido de la oxidación de butanodiol a acetoína.

6. Al implementar el operón sintético, el sistema de inducción térmico y las estrategias de cultivo desarrolladas en esta tesis. Se obtuvo un proceso donde *E. coli* es capaz de producir 2R,3R-butanodiol bajo el control de la temperatura. La cepa EM01/pAcycDuet_BDOBa, en cultivo lote es capaz de producir hasta 4.8 g/L de butanodiol y 4.3 g/L de acetoína, entre ambos metabolitos representan un rendimiento del 45% respecto al máximo teórico. La producción de estos metabolitos se incrementó al implementar cultivos alimentados. Obteniéndose títulos de 3.7 g/L de butanodiol y 11.2 g/L de acetoína, representando entre ambos un rendimiento de 60% del máximo teórico. Ensayos de actividad enzimática sugieren que la preferente acumulación de acetoína sobre BDO (3 veces más), en los cultivos alimentados, se debe a una deficiente actividad (al menos en el sentido de la reducción de acetoína a BDO) de la enzima BDH.

X. Perspectivas

1. A pesar de que el sistema de inducción térmica fue evaluado mediante la producción de GFP y demostró funcionar adecuadamente. Es necesario realizar una caracterización molecular más detallada. Se sugiere realizar estudios que impliquen la medición de transcritos, proteínas y de actividad. En diferentes tiempos, temperaturas y gradientes de inducción. Así como en plásmidos de alto y bajo número de copia. Lo anterior con la finalidad de describir detalladamente el sistema de inducción y poder explotarlo al máximo de acuerdo con las necesidades y características de los procesos que se deseen desarrollar en el futuro.
2. Existen diferentes estrategias metabólicas que pueden ser implementadas para mejorar la actividad de la vía metabólica acetoína/BDO. Mediante ensayos de actividad enzimática se demostró que el paso limitante de la vía era la deficiente conversión de acetoína a BDO. Para incrementar el título de BDO sobre acetoína se propone evaluar otros genes que codifiquen para la enzima BDH o subclonar el operón sintético en un vector de alto número de copia como lo es el plásmido petDuet.
3. Otro de los grandes retos para optimizar el proceso desarrollado en este trabajo, es controlar el flujo de la vía glucolítica para evitar la acumulación de piruvato (que termina indeseablemente transformándose a acetato) e intentar canalizar la mayor parte del carbono disponible en la vía acetoína/BDO. En este sentido se recomienda, hacer ingeniería metabólica en los transportadores de glucosa para disminuir la velocidad de consumo y por tanto el sobreflujo de esta vía. La contra parte de esta estrategia sería el efecto negativo que tendría en la velocidad específica de crecimiento. Por lo que se propone implementar, mediante el sistema de inducción térmico, la expresión de RNAs antisentido al transportador principal de glucosa. De tal forma que no se afecte la velocidad de consumo durante la fase de crecimiento, pero que el importe de glucosa decremente durante la etapa de producción de BDO.
4. Siguiendo esta misma línea, una opción prometedora sería realizar estudios de transferencia de oxígeno en la etapa de producción con la cepa EM01 Δ arcA/pAcycDuet_BDOBa. Probablemente con la transferencia de oxígeno adecuada en ese fondo genético, la reasimilación de piruvato pueda ser canalizada a la vía metabólica acetoína/BDO.

XI. Referencias

- Adkins, J., Pugh, S., McKenna, R., & Nielsen, D. R. (2012). Engineering microbial chemical factories to produce renewable "biomonomers". *Frontiers in Microbiology*, *3*(3), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00313>
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M. & Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection. *Molecular Systems Biology*, *6*(3), 1–11. <https://doi.org/10.1038/msb4100050>
- Backlund, E. (2011). Impact of glucose uptake rate on recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Royal Institute of Technology*. Stockholm.
- Bao, T., Zhang, X., Zhao, X., Rao, Z., Yang, T., & Yang, S. (2015). Regulation of the NADH pool and NADH/NADPH ratio redistributes acetoin and 2,3-butanediol proportion in *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Journal*, *10*(1), 1298–1306. <https://doi.org/10.1002/biot.201400577>
- Burgard, A., Burk, M. J., Osterhout, R., Van Dien, S., & Yim, H. (2016). Development of a commercial scale process for production of 1,4-butanediol from sugar. *Current Opinion in Biotechnology*, *42*(1), 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.04.016>
- Celińska, E., & Grajek, W. (2009). Biotechnological production of 2,3-butanediol-Current state and prospects. *Biotechnology Advances*, *27*(1), 715–725. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.05.002>
- Cho, C., Choi, S. Y., Luo, Z. W., & Lee, S. Y. (2015). Recent advances in microbial production of fuels and chemicals using tools and strategies of systems metabolic engineering. *Biotechnology advances*, *33*(7), 1455–1466. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.11.006>
- Chu, H., Xin, B., Liu, P., Wang, Y., Li, L., Liu, X. & Gao, C. (2015). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of (2S,3S)-butane-2,3-diol from glucose. *Biotechnology for Biofuels*, *8*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0324-x>
- Dai, J. J., Cheng, J. S., Liang, Y. Q., Jiang, T., & Yuan, Y. J. (2014). Regulation of extracellular oxidoreduction potential enhanced (R,R)-2,3-butanediol production by *Paenibacillus polymyxa* CJX518. *Bioresource Technology*, *167*(1), 433–440. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.044>
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(12), 6640–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>
- de Graef, M. R., Alexeeva, S., Snoep, J. L., & Teixeira de Mattos, M. J. (1999). The steady-state internal redox state (NADH/NAD) reflects the external redox state and is correlated with catabolic adaptation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *181*(8), 2351–2357.
- Doran, P. (2013). Bioprocess Engineering Principles (2a ed.). United Kingdom. *Academic Press*.
- Fernández-Sandoval, M. T., Huerta-Beristain, G., Trujillo-Martinez, B., Bustos, P., González, V., Bolivar, F. & Martinez, A. (2012). Laboratory metabolic evolution improves acetate tolerance and growth on acetate of ethanologenic *Escherichia coli* under non-aerated conditions in glucose-mineral medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *96*(5), 1291–1300. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4177-y>
- García-Ochoa, F., & Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances*, *27*(2), 153–176. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.10.006>

- Garcia-Ochoa, F., Gomez, E., Santos, V. E., & Merchuk, J. C. (2010). Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochemical Engineering Journal*, *49*(3), 289–307. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.01.011>
- Garg, S. K., & Jain, A. (1995). Fermentative production of 2,3-butanediol: A review. *Bioresource Technology*, *51*(2), 103–109. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)00136-0](https://doi.org/10.1016/0960-8524(94)00136-0)
- Guo, W., Sheng, J., & Feng, X. (2017). Mini-review: In vitro Metabolic Engineering for Biomanufacturing of High-value Products. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *15*(1), 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2017.01.006>
- Härtig, E., & Jahn, D. (2012). Regulation of the Anaerobic Metabolism in *Bacillus subtilis*. *Advances in Microbial Physiology*, *61*(1), 195–216. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394423-8.00005-6>
- Hasan, C., & Shimizu, K. (2008). Effect of temperature up-shift on fermentation and metabolic characteristics in view of gene expressions in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, *7*(1), 35. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-7-35>
- Hoffmann, F., Weber, J., & Rinas, U. (2002). Metabolic adaptation of *Escherichia coli* during temperature-induced recombinant protein production: Readjustment of metabolic enzyme synthesis. *Biotechnology and Bioengineering*, *80*(3), 313–319. <https://doi.org/10.1002/bit.10379>
- Jansen, R., Embden, J. D. A. Van, Gastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes, *43*(1), 1565–1575.
- Jensen, K. F. (1993). The *Escherichia coli* K-12 “wild types” W3110 and MG1655 have an rph frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low pyrE expression levels. *Journal of Bacteriology*, *175*(11), 3401–3407. <https://doi.org/10.1128/jb.175.11.3401-3407.1993>
- Ji, X. J., Huang, H., & Ouyang, P. K. (2011). Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. *Biotechnology Advances*, *29*(3), 351–364. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.007>
- Ji, X. J., Liu, L. G., Shen, M. Q., Nie, Z. K., Tong, Y. J., & Huang, H. (2015). Constructing a synthetic metabolic pathway in *Escherichia coli* to produce the enantiomerically pure (R, R)-2,3-butanediol. *Biotechnology and Bioengineering*, *112*(5), 1056–1059. <https://doi.org/10.1002/bit.25512>
- Jiang, Yu, Chen, B., Duan, C., Sun, B., Yang, J., & Yang, S. (2015). Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(7), 2506–2514. <https://doi.org/10.1128/AEM.04023-14>
- Jiang, Yudong, Liu, W., Zou, H., Cheng, T., Tian, N., & Xian, M. (2014). Microbial production of short chain diols. *Microbial Cell Factories*, *13*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0165-5>
- Kim, S. J., Seo, S. O., Jin, Y. S., & Seo, J. H. (2013). Production of 2,3-butanediol by engineered *saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, *146*(1), 274–281. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.081>
- Köpke, M., Mihalcea, C., Liew, F. M., Tizard, J. H., Ali, M. S., Conolly, J. J. & Simpson, S. D. (2011). 2,3-Butanediol production by acetogenic bacteria, an alternative route to chemical synthesis, using industrial waste gas. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(15), 5467–5475. <https://doi.org/10.1128/AEM.00355-11>
- Laakso, K., Koskeniemi, K., Koponen, J., Kankainen, M., Surakka, A., Salusjärvi, T. & Varmanen, P. (2011). Growth phase-associated changes in the proteome and transcriptome of *Lactobacillus rhamnosus* in industrial-type whey medium. *Microbial Biotechnology*, *4*(6), 746–766. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00275.x>

- Li, L., Li, K., Wang, Y., Chen, C., Xu, Y., Zhang, L. & Xu, P. (2015). Metabolic engineering of *Enterobacter cloacae* for high-yield production of enantiopure (2R,3R)-2,3-butanediol from lignocellulose-derived sugars. *Metabolic Engineering*, 28, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.11.010>
- Li, Z. J., Jian, J., Wei, X. X., Shen, X. W., & Chen, G. Q. (2010). Microbial production of meso-2,3-butanediol by metabolically engineered *Escherichia coli* under low oxygen condition. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(6), 2001–2009. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2676-2>
- Maddox, I. S. (2008). Microbial Production of 2,3-Butanediol. *Biotechnology Set*, 269–291 <https://doi.org/10.1002/9783527620999.ch7f>
- Martín, M., Montes, F. J., & Galán, M. A. (2010). Mass transfer rates from bubbles in stirred tanks operating with viscous fluids. *Chemical Engineering Science*, 65(12), 3814–3824. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2010.03.015>
- Martinez, A., Grabar, T. B., Shanmugam, K. T., Yomano, L. P., York, S. W., & Ingram, L. O. (2007). Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. *Biotechnology Letters*, 29(3), 397–404. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9252-y>
- Nakamura, C. E., & Whited, G. M. (2003). Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(5), 454–459. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2003.08.005>
- Nakashima, N., Akita, H., & Hoshino, T. (2014). Establishment of a novel gene expression method, BICES (biomass-inducible chromosome-based expression system), and its application to the production of 2,3-butanediol and acetoin. *Metabolic Engineering*, 25(1), 204–214. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.07.011>
- Nakashimada, Y., Mabwoto, B., Kashiwamuba, T., Kakizono, T., & Nishio, N. (2000). Enhanced 2,3-Butanediol Production by Addition of Acetic Acid in *Paenibacillus polymyxa*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90(6), 661–664.
- Okabayashi, T., Nakajima, T., & Yamamoto, H. (2010). Transgenic microorganism provided with the ability to produce 1,3-butanediol, and usage therefor. Europe patent number: EP2495305A1.
- Orgogozo, V., & Rockman, M. V. (2011). Molecular Methods for Evolutionary Genetics (1a ed.). *Humana Press*. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-228-1>
- Park, D. M., Akhtar, M. S., Ansari, A. Z., Landick, R., & Kiley, P. J. (2013). The Bacterial Response Regulator *ArcA* Uses a Diverse Binding Site Architecture to Regulate Carbon Oxidation Globally. *PLoS Genetics*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003839>
- Quan, J., & Tian, J. (2011). Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. *Nature Protocols*, 6(2), 242–251. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.181>
- Ramírez Santos, J., Solís Guzmán, G., & Gómez Eichelmann, M. C. (2001). Regulación genética en la respuesta al estrés calórico en *Escherichia coli*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 43(1), 51–63.
- Reisch, C. R., & Prather, K. L. J. (2015). The no-SCAR (Scarless Cas9 Assisted Recombineering) system for genome editing in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 5(1), 15096. Recuperado de <https://doi.org/10.1038/srep15096>
- Roncarati, D., & Scarlato, V. (2017). Regulation of heat-shock genes in bacteria: from signal sensing to gene expression output. *FEMS microbiology reviews*, 41(4), 549–574. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux015>

- Sabra, W., Groeger, C., & Zeng, A.-P. (2016). Microbial Cell Factories for Diol Production. *Bioreactor Engineering Research and Industrial Applications I: Cell Factories* (165–197). Berlin, Springer Berlin https://doi.org/10.1007/10_2015_330
- Shen, M.-Q., Ji, X.-J., Huang, H., Tong, Y.-J., Liu, L.-G., & Nie, Z.-K. (2014). Constructing a synthetic metabolic pathway in *Escherichia coli* to produce the enantiomerically pure (R, R)-2,3-butanediol. *Biotechnology and Bioengineering*, *112*(5), 1056–1059. <https://doi.org/10.1002/bit.25512>
- Shimizu, K. (2013). Regulation Systems of Bacteria such as *Escherichia coli* in Response to Nutrient Limitation and Environmental Stresses. *Metabolites*, *4*(1), 1–35. <https://doi.org/10.3390/metabo4010001>
- Syu, M. J. (2001). Biological production of 2,3-butanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *55*(1), 10–18. <https://doi.org/10.1007/s002530000486>
- Tabor, S. (1990). Expression Using the T7 RNA Polymerase/Promoter System. *Current Protocols in Molecular Biology*, *11*(1), 16.2.1-16.2.11. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1602s11>
- Tong, Y. J., Ji, X. J., Shen, M. Q., Liu, L. G., Nie, Z. K., & Huang, H. (2016). Constructing a synthetic constitutive metabolic pathway in *Escherichia coli* for (R, R)-2,3-butanediol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(2), 637–647. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7013-3>
- Utrilla, J., Licon-Cassani, C., Marcellin, E., Gosset, G., Nielsen, L. K., & Martinez, A. (2012). Engineering and adaptive evolution of *Escherichia coli* for d-lactate fermentation reveals *GatC* as a xylose transporter. *Metabolic Engineering*, *14*(5), 469–476. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.07.007>
- Wong, C. L., Yen, H. W., Lin, C. L., & Chang, J. S. (2014). Effects of pH and fermentation strategies on 2,3-butanediol production with an isolated *Klebsiella sp.* Zmd30 strain. *Bioresource Technology*, *152*(1), 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.101>
- Xu, Y., Chu, H., Gao, C., Tao, F., Zhou, Z., Li, K., & Xu, P. (2014). Systematic metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-yield production of fuel bio-chemical 2,3-butanediol. *Metabolic Engineering*, *23*(1), 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.02.004>
- Yan, Y., Lee, C. C., & Liao, J. C. (2009). Enantioselective synthesis of pure (R,R)-2,3-butanediol in *Escherichia coli* with stereospecific secondary alcohol dehydrogenases. *Organic and Biomolecular Chemistry*, *7*(19), 3914–3917. <https://doi.org/10.1039/b913501d>
- Yang, T., Rao, Z., Zhang, X., Xu, M., & Xu, Z. (2017). Metabolic engineering strategies for acetoin and 2, 3-butanediol production: advances and prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*, *37*(8), 990-1005. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1299680>
- Zeng, A. P., & Sabra, W. (2011). Microbial production of diols as platform chemicals: Recent progresses. *Current Opinion in Biotechnology*, *22*(6), 749–757. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.05.005>
- Zhang, L., Yang, Y., Sun, J., Shen, Y., Wei, D., Zhu, J., & Chu, J. (2010). Microbial production of 2,3-butanediol by a mutagenized strain of *Serratia marcescens* H30. *Bioresource Technology*, *101*(6), 1961–1967. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.052>
- Zhang, X., Bao, T., Rao, Z., Yang, T., Xu, Z., & Yang, S. (2014). Two-Stage pH Control Strategy Based on the pH Preference of Acetoin Reductase Regulates Acetoin and 2, 3-Butanediol Distribution in *Bacillus subtilis*, *9*(3), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091187>

Apéndice 1. Protocolos de PCR

Protocolo CPEC para la construcción del vector pCas_Cm

Se linealizó el vector pCas mediante un protocolo de PCR con los cebadores pCasL_F y pCas. El producto se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. La banda que correspondió a un fragmento de 12,000 pb fue cortada y purificada mediante Thermo® GeneJET Gel Extraction Kit. El inserto (gen de resistencia a cloranfenicol) fue amplificado por PCR a partir del vector pKD3 utilizando los cebadores Cat_F y Cat_R. El producto se separó y purificó de la misma forma que el vector linealizado. Con los fragmentos purificados se siguió el protocolo que se describe a continuación.

Reactivo	Cantidad	Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Vector linealizado	500 ng	Desnaturalización inicial	98	30	1
Inserto	2X moles vector linealizado	Desnaturalización	98	20	20
Buffer phusion HF 5X	10 µL	Alineamiento	Rampa de alineamiento de 65 a 72 con incrementos de 0.1 °C/s	70	20
10 mM dntps	1 µL	Extensión	72	390	20
Phusion (DNA polimerasa de alta fidelidad)	0.5 µL	Extensión final	72	600	1
H ₂ O	Hasta 50 µL	Almacenamiento	4	---	---

El producto de CPEC fue transformado en células electrocompetentes de la cepa AV11, se seleccionaron en cajas en placas de LB con cloranfenicol a 30 µg/mL y como control placas de LB con kanamicina a 30 µg/mL. Las colonias candidatas se aislaron para extraer plásmido y comprobarlo mediante patrones de restricción.

Protocolo CPEC para cambiar el RNAg del vector pTarget

Se linealizó el vector pTarget con los cebadores LV1 y LV2. El producto se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. La banda que correspondió a un fragmento de 1,900 pb fue cortada y purificada mediante Thermo® GeneJET Gel Extraction Kit. Se prosiguió con el protocolo de CPEC que se detalla a continuación. Se utilizaron el par de cebadores F_1S_HtpG y R_1S_HtpG.

Reactivo	Cantidad	Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Vector linealizado	100 ng	Desnaturalización inicial	98	30	1
Buffer phusion HF 5X	10 µL	Desnaturalización	98	10	30
10 mM dntps	1 µL	Alineamiento	58	30	30
Phusion (DNA polimerasa de alta fidelidad)	0.5 µL	Extensión	72	90	30
Cebadores (F y R)	1 µL c/u	Extensión final	72	600	1
H ₂ O	Hasta 50 µL	Almacenamiento	4	---	---

El producto de CPEC fue transformado en células electrocompetentes, se seleccionaron en cajas en placas de LB con estreptomina a 30 µg/mL. Las colonias candidatas se aislaron para extraer plásmido y comprobarlo mediante patrones de restricción.

Protocolo CPEC para construir el vector pAcycDuetBDOBa

Se linealizó el vector pTarget con los cebadores RL_BDO y FL_BDO. El producto se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. La banda que correspondió a un fragmento de 6,000 pb fue cortada y purificada mediante Thermo® GeneJET Gel Extraction Kit. El inserto se amplificó a partir de DNA cromosomal de *B. amyloliquefaciens* con los cebadores R_alsS_ba y F_alsS_Ba. El producto (1,800 pb) se purificó de igual forma que el vector linealizado. Se prosigió con el protocolo de CPEC que se detalla a continuación.

Reactivo	Cantidad	Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Vector linealizado	200 ng	Desnaturalización inicial	98	30	1
Inserto	120 ng	Desnaturalización	98	20	20
Buffer phusion HF 5X	10 µL	Alineamiento	60	30	20
10 mM dntps	1 µL	Extensión	72	240	20
Phusion (DNA polimerasa de alta fidelidad)	0.5 µL	Extensión final	72	600	1
H ₂ O	Hasta 50 µL	Almacenamiento	4	---	---

Protocolo OE-PCR para ensamblar las moléculas de DNA donador HtpG

Los fragmentos correspondientes a las homologías derecha e izquierda se amplificaron a partir de la cepa AV11 utilizando los cebadores F_Hi_HtpG, R_Hi_HtpG, F_Hd_HtpG y R_Hd_HtpG. El gen de la RNA polimerasa T7 se amplificó de una cepa de *E. coli* BL21 (DE3) con los cebadores F_T7_hi y R_T7_hd. Cada uno de los fragmentos tenían extremos que se solapaban. Estos fragmentos se separaron por electroforesis y purificaron por kit. Primero se fusionaron el fragmento A con B, es decir, la homología izquierda con la RNA polimerasa T7 para ello se utilizó el siguiente protocolo de OE-PCR.

Reactivo	Cantidad	Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Homología izquierda (A)	0.2 pmol	Desnaturalización inicial	98	30	1
RNA polimerasa T7 (B)	0.2 pmol	Desnaturalización	98	10	10
Buffer Phusion HF 5X	10 µL	Alineamiento	55	30	10
10 mM dntps	1 µL	Extensión	72	120	10
Phusion (DNA polimerasa de alta fidelidad)	0.5 µL	Extensión final	72	300	1
H ₂ O	Hasta 50 µL	Almacenamiento	4	---	---

Una vez terminado el primer protocolo de OE-PCR se procedió a unir el producto A-B con el fragmento C. Para lo cual se agregaron 0.2 pmol del fragmento C (homología izquierda) y se repitió el protocolo anterior. Después del segundo ciclo de OE-PCR se tenía el producto A-B que fue amplificado por un tercer ciclo de OE-PCR pero esta vez utilizando los cebadores F_Hi y R_Hd. El producto final se separó por electroforesis y se purificó por kit.