



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA  
MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

MODIFICACIÓN GENÉTICA DE *A. vinelandii* PARA LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS  
ANTIFÚNGICOS ALQUILRESORCINOLES.

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

**IBT ANDREA VIRIDIANA MOYAO MEJÍA**

TUTOR PRINCIPAL

DANIEL GENARO SEGURA GONZÁLEZ  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
CARLOS FELIPE PEÑA MALACARA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

GUILLERMO GOSSET LAGARDA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

CUERNAVACA MORELOS, ABRIL 2022



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.

# Agradecimientos

A CONACyT por el apoyo 754253 de beca tradicional de maestría, así como al proyecto PAPIIT UNAM IG200219 por financiar el proyecto y por otorgarme una beca.

A la unidad de síntesis del Instituto de biotecnología UNAM por sus servicios y al M. en C. José Luis Gama por su apoyo con la preparación del material, medios de cultivo y soluciones.

A la Biol. Soledad Moreno y a la M. en C. Josefina Guzmán por proporcionarme algunas de las cepas mutantes y su apoyo técnico para avanzar con los experimentos.

A mi tutor Daniel Segura y a mi comité tutorial Carlos Felipe Peña Malacara y Guillermo Gosset Lagarda por hacerme excelentes observaciones durante mis tutorales, las cuales permitieron mejorar el proyecto en cada etapa.

A la Dra. Cinthia y a la Dra. Guadalupe Espín que aclararon mis dudas durante los seminarios grupales y contribuyeron con sus observaciones para mejorar mis presentaciones y proyecto.

A todos los ex y actuales alumnos del grupo: Leonel, Chantal, Jessica, Thalía, Juliana, Cristian, Fernando, Citlalli, Víctor, Pablo, Alan y Karen que me ayudaron de distintas maneras durante estos años.

# 1 TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	7
ABSTRACT .....	8
<b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>9</b>
1.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS ALQUILRESORCINOLES .....	9
1.2 FUENTES BIOLÓGICAS DE ALQUILRESORCINOLES.....	10
1.3 BIOSÍNTESIS DE ALQUILRESORCINOLES .....	10
1.3.1 <i>PKS Tipo III</i> .....	11
1.4 PAPEL BIOLÓGICO .....	11
1.5 APLICACIONES DE LOS ALQUILRESORCINOLES .....	11
<b>2 ANTECEDENTES .....</b>	<b>13</b>
2.1 <i>AZOTOBACTER VINELANDII</i> .....	13
2.2 OPERÓN <i>ARSABCD</i> Y SÍNTESIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN <i>A. VINELANDII</i> .....	14
2.3 OTROS GENES RELACIONADOS CON ALQUILRESORCINOLES EN <i>A. VINELANDII</i> .....	16
2.4 REGULACIÓN DEL OPERÓN <i>ARSABCD</i> .....	18
2.4.1 <i>ArpR</i> y su regulación sobre la producción de alquilresorcinoles .....	18
2.4.2 Sistema de dos componentes <i>GacS/GacA</i> .....	19
2.4.3 El factor sigma <i>RpoS</i> y su papel en <i>A. vinelandii</i> .....	19
2.4.4 Regulación del operón <i>arsABCD</i> por la vía <i>Gac-Rsm</i> . .....	20
2.4.5 Regulación de <i>arsABCD</i> por el sistema <i>Gac-PTS<sup>Ntr</sup></i> y <i>RpoS</i> . .....	21
2.4.6 Regulón <i>PhoB/PhoR</i> .....	22
2.5 EFECTO DE LA INTERRUPCIÓN DE LA SÍNTESIS DE PHB EN LA PRODUCCIÓN DE ALQUILRESORCINOLES .....	24
<b>3 JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>27</b>
<b>4 HIPÓTESIS.....</b>	<b>28</b>
<b>5 OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
5.1 OBJETIVO GENERAL .....	28
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
<b>6 MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
6.1 CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS.....	29
6.2 TÉCNICAS MOLECULARES .....	30
6.2.1 <i>Reacción en cadena de la polimerasa</i> .....	30
6.2.2 <i>Oligonucléotidos</i> .....	30
6.2.3 <i>Construcción de la mutante phbB::Gm</i> . .....	31
6.2.4 <i>Transformación en E. coli</i> .....	31
6.2.5 <i>Transformación en A. vinelandii</i> .....	31
6.2.6 <i>Extracción de ADN plasmídico de E. coli</i> . .....	31
6.2.7 <i>Extracción de ADN cromosomal por el método de fenol cloroformo</i> .....	32
6.3 MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN.....	32
6.3.1 <i>Cuantificación de proteína por el método de Lowry</i> .....	32
6.3.2 <i>Cuantificación de masa seca</i> .....	33
6.3.3 <i>Detección, extracción y cuantificación de alquilresorcinoles</i> .....	33
6.3.4 <i>Extracción y cuantificación de PHB</i> .....	34
6.3.5 <i>Cuantificación de sacarosa</i> .....	34

6.4	MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	34
6.4.1	<i>Medio Luria-Bertani (LB)</i> .....	36
6.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	36
<b>7</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>37</b>
7.1	DETERMINACIÓN DE LA CEPA MEJOR PRODUCTORA DE ALQUILRESORCINOLES PARA REALIZAR LAS MODIFICACIONES GENÉTICAS. ....	37
7.2	EFFECTO DE LA INACTIVACIÓN DE LOS REGULADORES NEGATIVOS EN LA SOBRE PRODUCCIÓN DE ALQUILRESORCINOLES.....	38
7.2.1	<i>Efecto de la inactivación de la vía de alginato y su efecto en la mutante rsmA.</i> .....	43
7.3	EFFECTO EN LA PRODUCCIÓN DE ALQUILRESORCINOLES AL INACTIVAR LAS VÍAS DE SÍNTESIS DE LOS BIOPOLÍMEROS ALGINATO Y PHB. ....	47
7.3.1	<i>Inactivación de la vía de síntesis de PHB</i> .....	47
7.4	CARACTERIZACIÓN DE LA DOBLE MUTANTE <i>ALGA-RSMA</i> .....	50
<b>8</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>56</b>
<b>9</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>57</b>
<b>10</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>58</b>

# Índice de Tablas

TABLA 1. CONCENTRACIÓN DE ALQUILRESORCINOLES EXTRAÍDOS DE SUS FUENTES. ....	10
TABLA 2. EFECTO ANTIFÚNGICO DE EMULSIONES DE ALQUILRESORCINOLES EN EL CRECIMIENTO RADIAL DE <i>P. expansum</i> Y <i>N. perennans</i> .....	13
TABLA 3. PRODUCCIÓN DE ALQUILRESORCINOLES EN CEPAS MUTANTES DE <i>A. vinelandii</i> .....	25
TABLA 4. PLÁSMIDOS Y CEPAS USADAS EN ESTE TRABAJO. ....	29
TABLA 5. OLIGONUCLÉOTIDOS USADOS EN ESTE TRABAJO.....	30
TABLA 6. SOLUCIÓN AZUL RÁPIDO B- PROPANOL. ....	33
TABLA 7. SOLUCIÓN DE TINCIÓN PARA 50ML. ....	34
TABLA 8. SOLUCIONES STOCK PARA LOS MEDIOS DE CULTIVO DE <i>A. vinelandii</i> .....	35
TABLA 9. MEDIOS DE CULTIVO PARA <i>A. vinelandii</i> .....	35
TABLA 10. MEDIO LURIA-BERTANI PARA <i>E. coli</i> .....	36
TABLA 11. PRODUCCIÓN DE ALQUILRESORCINOLES NORMALIZADA CON MASA SECA. ....	46
TABLA 12. COMPARACIÓN DE PRODUCCIÓN DE ALQUILRESORCINOLES CON MUTANTES OBTENIDAS. ....	46

# Índice de Figuras

FIGURA 1. EJEMPLOS DE ALQUILRESORCINOLES. ....	9
FIGURA 2. VARIEDAD DE LÍPIDOS FENÓLICOS SINTETIZADOS POR LA PKS DE TIPO III ORAS.....	10
FIGURA 3. INHIBICIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS CON QUISTES DE <i>A. vinelandii</i> AEIV EN MEDIO PAPA-DEXTROSA-AGAR. ....	12
FIGURA 4. SÍNTESIS DE ALQUILRESORCINOLES Y ENQUISTAMIENTO EN <i>A. vinelandii</i> . ....	13
FIGURA 5. COMPUESTOS RESORCINÓLICOS PRESENTES EN LOS QUISTES DE <i>A. vinelandii</i> . ....	14
FIGURA 6. GENES INVOLUCRADOS EN LA SÍNTESIS DE ALQUILRESORCINOLES EN <i>A. vinelandii</i> . ....	15
FIGURA 7. VÍA DE SÍNTESIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN <i>A. vinelandii</i> .....	16
FIGURA 8. OTROS GENES RELACIONADOS CON ALQUILRESORCINOLES .....	17
FIGURA 9. MODELO HIPOTÉTICO DE TRANSPORTE DE ALQUILRESORCINOLES A LA EXINA.....	17
FIGURA 10. REGULACIÓN DEL OPERÓN <i>arsABCD</i> Y OTROS SISTEMAS DE REGULACIÓN. ....	18
FIGURA 11. EFECTO DE LA INACTIVACIÓN DE <i>gacA</i> , <i>rsmz1</i> Y <i>rsmA</i> EN LA PRODUCCIÓN DE ALQUILRESORCINOLES .....	21
FIGURA 12. EFECTO DE LA INACTIVACIÓN DE LOS GENES DEL SISTEMA PTS <sup>NTR</sup> EN LA SÍNTESIS DE ARS. ....	22
FIGURA 13. CONTROL DEL REGULÓN PHO POR MEDIO DEL SISTEMA DE TRANSPORTE DE FOSFATO. ....	23
FIGURA 14. PRODUCCIÓN DE ALQUILRESORCINOLES EN CÉLULAS VEGETATIVAS CON MEDIO LIMITADO EN FOSFATOS .....	24
FIGURA 15. CAJA PHO EN REGIÓN PROMOTORA DE <i>arsA</i> .....	24
FIGURA 16. SÍNTESIS DE PHB.....	25
FIGURA 17. RELACIONES ENTRE LAS BIOSÍNTESIS DE PHB Y ALQUILRESORCINOLES. ....	26
FIGURA 18. CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE ALQUILRESORCINOLES EN DISTINTOS FONDOS GENÉTICOS DE <i>A. vinelandii</i> .....	38
FIGURA 19. TINCIÓN DE ALQUILRESORCINOLES EN CEPAS CON LOS REGULADORES NEGATIVOS INACTIVOS. ....	39
FIGURA 20. PRODUCCIÓN DE ALQUILRESORCINOLES EN CEPAS CON REGULADORES NEGATIVOS INACTIVADOS. ....	41
FIGURA 21. REGULACIÓN DEL SISTEMA PHOB/R.....	42
FIGURA 22. MOTIVO CONSENSO Y ESTRUCTURA FORMADA POR LA UNIÓN DE <i>rsmA</i> EN <i>arsB</i> . ....	42
FIGURA 23. COMPARACIÓN DEL FENOTIPO DE LAS MUTANTES <i>rsmA</i> Y <i>algA-rsmA</i> EN MEDIO BS.....	43
FIGURA 24. TINCIÓN DE ALQUILRESORCINOLES EN MUTANTES <i>rsmA</i> EN DOS FONDOS GENÉTICOS DISTINTOS. ....	44
FIGURA 25. PRODUCCIÓN DE ALQUILRESORCINOLES EN CULTIVOS LÍQUIDOS DE 72 H EN MUTANTES <i>rsmA</i> DE LOS FONDOS AEIV Y ATCC9046. ....	45
FIGURA 26. TINCIÓN DE ALQUILRESORCINOLES EN CEPAS NO PRODUCTORAS DE LOS POLÍMEROS PHB Y ALGINATO.....	48

FIGURA 27. PRODUCCIÓN DE ALQUILRESORCINOLES A LAS 72H EN MEDIO BS Y BOH DE CEPAS NO PRODUCTORAS DE LOS POLÍMEROS PHB Y ALGINATO. ....	49
FIGURA 28. SENTIDO DE LA INACTIVACIÓN DEL GEN <i>phbB</i> CON RESISTENCIA A GENTAMICINA. ....	50
FIGURA 29. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS AEIV Y <i>algA-rsmA</i> EN MEDIO BS. ....	50
FIGURA 30. PRODUCCIÓN DE ALQUILRESORCINOLES EN LAS CEPAS AEIV <i>WT</i> Y <i>algA-rsmA</i> . ....	51
FIGURA 31. PRODUCCIÓN DE PHB EN LAS CEPAS AEIV Y <i>algA-rsmA</i> . ....	53
FIGURA 32. CONSUMO DE SACAROSA Y RENDIMIENTOS. ....	54
FIGURA 33. RELACIÓN ENTRE LA SÍNTESIS DE ALGINATO, PHB Y ALQUILRESORCINOLES.....	55



## RESUMEN

Los lípidos resorcinólicos, también conocidos como alquilresorcinoles o 5-n-alquilresorcinoles, son compuestos fenólicos de naturaleza anfipática con una región hidrofílica que consiste en un anillo 1,3-dihidroxibenceno (resorcinol) y una región hidrofóbica representada por una cadena alquil no isoprenoide. Las fuentes naturales de estos compuestos incluyen 11 familias de plantas vasculares como *Anacardiaceae*, *Ginkgoaceae*, *Leguminosae*, entre otros organismos como algas de las familias *Chlorophyceae* y *Sargassaceae*, hongos basidiomicetos y algunas bacterias como *Actinobacterias* y *Pseudomonadales* también los sintetizan. Los alquilresorcinoles han mostrado tener una función adaptogénica en los organismos que los producen cuando se encuentran en condiciones de estrés como: choques térmicos, estrés oxidativo y radiación, también actúan como estabilizadores para macromoléculas como proteína y ácido desoxirribonucleico y se les atribuye la función como molécula de señalización. Debido a su presencia en ciertas fuentes naturales como granos integrales, pueden aplicarse como biomarcadores de consumo de cereales integrales en diferentes poblaciones. Dado que han mostrado tener actividad inhibitoria contra algunas bacterias y hongos, se han estudiado para formular emulsiones de alquilresorcinoles extraídos del centeno para inhibir a los hongos fitopatógenos *Penicillium expansum* y *Neofabraea perennans*.

*Azotobacter vinelandii* es una bacteria capaz de sintetizar estos compuestos, principalmente durante el proceso de enquistamiento. En esta bacteria ya se conocen los genes responsables de sintetizar alquilresorcinoles que forman el operón biosintético (*arsABCD*) y ya se conocen varios sistemas que regulan su producción, como lo son GacA/GacS, PTS<sup>Ntr</sup> y el sistema RsmA y los pequeños RNA's *rsmz1* y *rsmz2*. Además, se ha observado que la inactivación de la síntesis del polímero PHB aumenta la producción de estos compuestos incluso en células vegetativas.

En este trabajo se estableció como meta mejorar la producción de alquilresorcinoles mediante la modificación genética de *A. vinelandii*. Las modificaciones se centraron en la inactivación de reguladores negativos de la síntesis de estos lípidos y en bloqueos metabólicos de rutas que compiten por el carbono suministrado (alginato y polihidroxibutirato). Se comenzó por evaluar la producción de alquilresorcinoles en células vegetativas y enquistadas a las 72 horas de cultivo de las cepas *UW136*, *SW136*, *ATCC9046* & *AEIV*, para determinar la cepa más adecuada para realizar las modificaciones genéticas. Se seleccionó la cepa *AEIV* para realizar las modificaciones genéticas propuestas. Posteriormente, se evaluó la producción de alquilresorcinoles en distintas cepas mutantes de los reguladores negativos de la expresión del operón *arsABCD* (mutaciones en *rsmA*, *ptsN*, *phoB*, *rsmA-ptsN*, *rsmA-phoB* & *rsmA-ptsN-phoB*). Se observó que la inactivación del regulador *rsmA* favorecía la sobreproducción de alquilresorcinoles; sin embargo, una desventaja que presentó esta cepa mutante fue su fenotipo hipermucoide por la sobreproducción de alginato, por lo que se decidió obtener una doble mutante *algA-rsmA* que fuera incapaz de sintetizar este polímero, esperando que esto permitiera mejorar su cultivo y tuviera un efecto beneficioso para obtener mayor producción de los lípidos. También se compararon las producciones volumétricas y específicas de las cepas *algA*, *phbB*, *algA-phbB* & *algA-rsmA-phbB*, esperando que la inactivación de las vías de síntesis de los polímeros PHB y alginato fueran favorecedoras. Finalmente, se seleccionó la mutante con mejores producciones y se realizó una cinética donde se determinó la producción específica y volumétrica de alquilresorcinoles y PHB, así como sus rendimientos respecto al consumo de la fuente de carbono lo que mostró que la combinación de las mutaciones *rsmA* y *algA* permitió una sobreproducción de 3 veces más en células vegetativas, evitando así la necesidad de inducir enquistamiento para producir estos lípidos.

## ABSTRACT

The resorcinolic lipids known as alkylresorcinols or 5-n-alkylresorcinols, are phenolic compounds of an amphipathic nature with a hydrophilic region consisting of a ring of 1,3-dihydroxybenzene (resorcinol) and an hydrophobic region represented by a non-isoprenoid alkyl chain. The natural sources of these compounds include 11 families of vascular plants such as *Anacardiaceae*, *Ginkgoaceae*, *Leguminosae*, *Gramineae*, among others. In addition, some organisms such as algae of the *Clorophyceae* and *Sargassaceae* families, some basidiomycete fungi and bacteria such as *Actinobacteria* and *Pseudomonadales* synthesize them too. Alkylresorcinols have been shown to have an adaptogenic function in the producing cells when they are under stress conditions such as heatshock, oxidative stress and radiation, they also act as stabilizers for macromolecules such as proteins and deoxyribonucleic acid and function as signaling molecules too. Due to their physicochemical characteristics and their presence in certain natural sources like whole grains, they are used as biomarkers of whole grain consumption in different populations and as gluten biomarkers. These compounds can also be used as liposome stabilizers and for skin lightening creams. Besides, because they have inhibitory activity against some bacteria and phytopathogenic fungi, they have been studied to formulate emulsions of alkylresorcinols extracted from rye to inhibit the phytopathogenic fungi *Penicillium expansum* and *Neofabraea perennans*.

*A. vinelandii* is a bacterium able to synthesize these compounds, mainly during its encysting state. In this bacterium, the genes responsible for alkylresorcinols synthesis that form the biosynthetic operon (*arsABCD*) and several systems that regulate its production are already known, such as GacA/GacS, PTS<sup>Ntr</sup> and the RsmA system & the small RNA's *rsmZ1* & *rsmZ2*. Furthermore, it has been observed that the inactivation of PHB synthesis increases the production of these compounds even in vegetative cells.

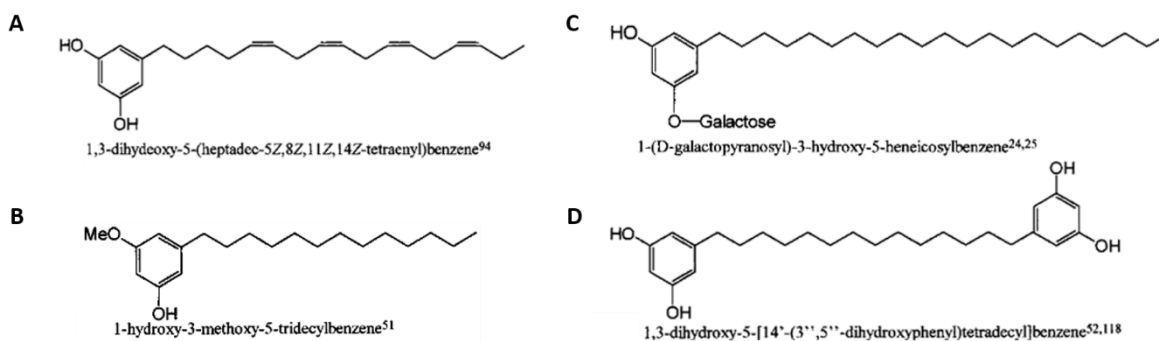
The aim of this work was to overproduce alkylresorcinols in *A. vinelandii* through inactivation of negative regulators of their biosynthesis, and elimination of competing biosynthetic routes (alginate and polyhydroxybutyrate). To identify the most convenient strain for the proposed genetic modifications, the production of alkylresorcinols in vegetative and encysting cells was evaluated at 72 h of culture in strains UW136, SW136, ATCC9046 and AEIV. AEIV strain was selected to perform the genetic modifications. Then, the effect of inactivation of the negative regulators of the *arsABCD* operon (*rsmA*, *ptsN*, *phoB*, *rsmA-ptsN*, *rsmA-phoB* & *rsmA-ptsN-phoB*) was evaluated. It was observed that the inactivation of *rsmA* regulator allowed the overproduction of alkylresorcinols; however, this mutant strain presented a hypermuroid phenotype due to overproduction of alginate. Therefore, a double mutant *algA-rsmA* unable to produce alginate was obtained, hoping that this would eliminate the polysaccharide production, improving its cultivation and having a positive effect on the lipids production. The specific and volumetric productions of *algA*, *phbB*, *algA-phbB* & *algA-rsmA-phbB* strains were compared, hoping that the inactivation of the synthesis of the PHB and alginate polymers could be favorable. Finally, the mutant strain with the best productions of alkylresorcinols was selected and a kinetics was carried out to determine production levels of alkylresorcinols, PHB and their yields per sucrose consumption. This showed that the combination of the *rsmA* and *algA* gene inactivations allowed the overproduction of alkylresorcinols 3 folds using vegetative cells, avoiding the need to induce encystment to produce these lipids.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Características de los alquilresorcinoles

Los lípidos resorcinólicos también conocidos como alquilresorcinoles o 5-n-alquilresorcinoles (ARS), son compuestos fenólicos de naturaleza anfipática con una región hidrofílica que consiste en un anillo 1,3-dihidroxibenceno (resorcinol) y una región hidrofóbica representada por una cadena alquil no isoprenoide (Kozubek, 1999; Kozubek & Stasiuk, 2010). Estos compuestos se pueden clasificar de acuerdo a la longitud de la cadena, que puede variar de 11 hasta 29 carbonos, y al grado de insaturación con hasta 4 enlaces dobles. Además, puede presentar modificaciones (Figura 1) como grupos acetoxi, metoxi, fenilos, carbonilos, galactopiranosil e incluso pueden presentar otros grupos en el extremo de la cadena (Sampietro et al., 2012). Ambas características influyen en el área que ocupa una sola molécula cuando se encuentran formando capas estables en una interface aire-agua, y también los bajos valores de Concentración Micelar Crítica (concentración mínima de surfactante para formar micelas espontáneamente en una disolución) (Kozubek & Stasiuk, 2010).

La incorporación de alquilresorcinoles de cadena larga en las membranas de fosfolípidos generan un efecto de rigidez similar al inducido por el colesterol en las membranas, mientras que en los liposomas estabilizan, mejoran el atrapamiento y disminuyen el tamaño (Gubernator et al., 1999). En eritrocitos se ha observado que al aumentar la concentración de 5-n-heptadecenilresorcinol mejora la permeabilidad de la membrana para diferentes solutos, y también inducen una fuga de iones de potasio mientras aumentan la permeabilidad para no electrolitos (Kozubek, 1987).



**Figura 1. Ejemplos de alquilresorcinoles.** A) cadena con 4 insaturaciones, b) grupo metoxi en la cabeza, C) galactopiranosil en la cabeza & D) grupo resorcinol en el extremo de la cadena. Modificada de Kozubek & Stasiuk, 2010.

## 1.2 Fuentes biológicas de alquilresorcinoles

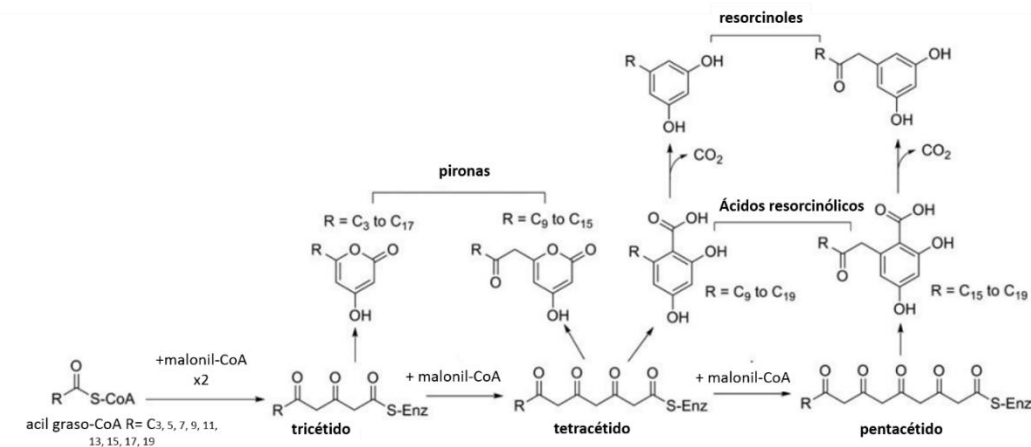
Las fuentes naturales de estos compuestos incluyen 11 familias de plantas vasculares como *Anacardiaceae*, *Ginkgoaceae*, *Leguminosae*, *Gramineae*, entre otras. Además, otros organismos como algas de las familias *Chlorophyceae* y *Sargassaceae*, hongos basidiomicetos y algunos procariontes como las *Actinobacterias* y los *Pseudomonadales* también los sintetizan (Kozubek et al., 1996). Algunos ejemplos de la concentración de alquilresorcinoles extraídos de sus fuentes naturales se muestran en la **Tabla1**.

**Tabla1.** Concentración de alquilresorcinoles extraídos de sus fuentes. (Kozubek et al.,1996 ;Ross et al., 2003; Zarnowska et al., 2000, Zarnowski et al., 2000, Zarnowski et al., 2004).

Fuente	[ µg ARs/g masa seca ]
<i>Ginkgo biloba</i>	400
<i>Centeno</i>	360-3200
<i>Trigo</i>	312-1010
<i>Cebada</i>	44-500
<i>Mijo</i>	100
<i>Apatococcus constipatus</i>	0.2-57
<i>Pseudomonas spp.</i> ( <i>P. aurofaciens</i> , <i>P. chlororapsis</i> & <i>P. fluorescens</i> )	200-800
<i>Azotobacter chroococcum</i>	2300-56200
<i>A. vinelandii</i>	2000-18000*
* por g de proteína	

## 1.3 Biosíntesis de alquilresorcinoles

La síntesis de estos lípidos fenólicos inicia con un ácido graso intermediario que por lo general es un acil-CoA, el cual se extiende y se cicla con ayuda de las policétido sintasas (PKs) que usan malonil-CoA como unidad de extensión (**Figura 2**). Las policétido sintasas son clasificadas en tres grupos principalmente; Tipo I, II y III de las cuales se sabe que las de tipo III son las responsables de sintetizar compuestos como pironas y lípidos resorcinólicos (Sampietro et al., 2013).



**Figura 2.** Variedad de lípidos fenólicos sintetizados por la PKS de tipo III ORAS. Tomada de Yu et al., 2012.

### 1.3.1 PKS Tipo III

Las PKS de tipo III son enzimas con un sólo sitio activo, a diferencia de los otros dos tipos que tienen múltiples sitios activos para cada paso de la secuencia de reacciones. Estas catalizan las reacciones de manera iterativa y las podemos encontrar en plantas, bacterias y hongos. Producen una amplia variedad de compuestos como chalconas, pironas, acridonas, floroglucinoles, estilbenos y lípidos resorcinólicos. En bacterias, se han encontrado 5 variedades de PKS tipo III como lo son; RppA de *Streptomyces griseus*, PhID de *Pseudomonas fluorescens*, DpgA de *Amycolatopsis orientalis*, ArsB y ArsC de *A. vinelandii*. Las tres primeras generan pironas y floroglucinoles usando diferentes sustratos para extender como malonil-CoA y metilmalonil-CoA, difieren en el patrón de ciclación y pueden usar acil-CoA de 4, 8, 12 carbonos, fenilacetil-CoA u octanoil-CoA como unidades de inicio. ArsB de *A. vinelandii* entra en el grupo de alquilresorcinol sintasa (así como SrsA de *Streptomyces griseus*), y fue la primera en la cual se demostró una interacción directa con una sintasa de ácido graso (FAS) de tipo I. Por otro lado, ArsC así como Gsc de *Streptomyces coelicolor*, forman parte de las alquilpironas sintasas, que usan malonil-CoA para obtener alquilpironas (Yu et al., 2012).

## 1.4 Papel biológico

Los alquilresorcinoles han mostrado tener una función adaptogénica en las células productoras cuando se encuentran en condiciones de estrés como; choques térmicos, estrés oxidativo y radiación. Esto se observó en cultivos de *Micrococcus luteus* (organismo productor de ARS) y *Saccharomyces cerevisiae* (un no productor) expuestos a choques térmicos y radiación y, donde la adición de estos compuestos al medio favoreció en diferentes porcentajes a las células para seguir siendo viables (Nikolaev et al., 2006; Stepanenko et al., 2004).

Los alquilresorcinoles también actúan como estabilizadores para macromoléculas como proteínas y ácido desoxirribonucleico, dependiendo la concentración. Se ha observado que bajas concentraciones del compuesto C<sub>12</sub>-AHB (alquil hidroxibenceno del tipo alquilresorcinol con cadena de 12 C) permitieron aumentar la actividad de la tripsina y en concentraciones altas, se inhibió su actividad. Así mismo, al someter esta enzima a una temperatura desnaturizante en presencia de este compuesto se pudo mantener un 50% de actividad (Nikolaev et al., 2006). Por otro lado, se ha demostrado que los alquilresorcinoles de cadenas de 1 y 6 carbonos a concentraciones de 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-4</sup> M protegen al ADN de la degradación por exposición a radiación UV (3 horas), ya que tuvieron una recuperación del 5.9% y 22.4% respectivamente, mientras que la muestra control se degradó (Dmitry et al. 2012).

Otra función que se le atribuye a los alquilresorcinoles es como molécula de señalización (regulador e inductor). Los alquilresorcinoles sintetizados y acumulados por *Micrococcus luteus* son factores de autorregulación que inducen la anabiosis (recuperación de células viables tras desecación) (Mulyukin et al., 1996). En *Azotobacter chroococcum* aumentó la síntesis de alquilresorcinoles de 19, 21 y 23 Carbonos en la cadena alquilo y aumentó la formación de quistes en los que hubo un reemplazo de fosfolípidos en las membranas por alquilresorcinoles (Rejman et al., 2004).

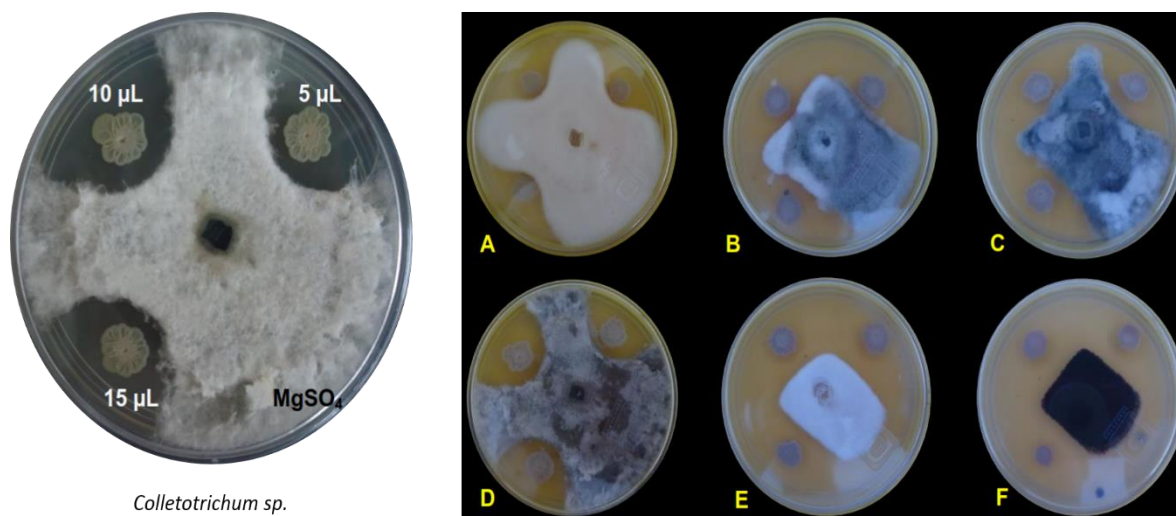
## 1.5 Aplicaciones de los alquilresorcinoles

Debido a la presencia de alquilresorcinoles en granos integrales como el trigo, centeno, cebada, específicamente en su parte externa (cutícula del pericarpio), los podemos encontrar en productos derivados como algunas harinas, panes e incluso cereales (Ross et al., 2003). Por esta razón, los alquilresorcinoles se han utilizado como biomarcadores para determinar el consumo de cereales

integrales en diferentes poblaciones mediante su cuantificación en orina. Esto en el contexto de estudios epidemiológicos que muestran una relación inversa entre el riesgo de desarrollar obesidad y el consumo de granos enteros o integrales, pues los alquilresorcinoles no se encuentran en las harinas refinadas. Igualmente se encontraron útiles como biomarcadores de gluten para monitorear a personas celiacas que se someten a tratamiento. Son considerados como un criterio para clasificar productos como de grano entero o no (Ross et al., 2004, Choung et al., 2016).

En la industria cosmética y farmacéutica, el compuesto 4-hexilresorcinol muestra un futuro prometedor para tratamientos de la piel por sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antisépticas. En el mercado ya existen productos que contienen este compuesto como cremas aclarantes y tonificantes de piel, enjuagues bucales y pastillas para infecciones en la garganta (Deglesne et al., 2019; Raja, K. et al., 2015).

Por otro lado, los alquilresorcinoles también han demostrado tener actividad inhibitoria contra algunas bacterias y hongos fitopatógenos. Por ejemplo, los alquilresorcinoles de *Pseudomonas chlororaphis* PCL16061 y *Pseudomonas fluorescens* PCL1060 redujeron la incidencia de enfermedad en jitomate causada por *Fusarium oxysporum* en un 30 % y 25 % respectivamente (Cazorla et al., 2006). En caso de los alquilresorcinoles extraídos del centeno, se observó que a una concentración de 10 mg/mL puede reducir el crecimiento en placa de *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus versicolor* (Reiss, 1989). Debido a las evidencias de actividad inhibitoria que tienen este tipo de compuestos, en la Universidad Autónoma de Guerrero se evaluó la actividad de los alquilresorcinoles extraídos de *A. vinelandii* (Figura 3), su efecto antagónico ante diferentes fitopatógenos aporta evidencia para continuar una línea de investigación para generar una futura aplicación biotecnológica de los alquilresorcinoles sintetizados por esta bacteria (Bolaños, 2015).



**Figura 3.** Inhibición de las cepas aisladas con quistes de *A. vinelandii* AEIV en medio papa-dextrosa-agar. A. Cepa no identificada, B. *Colletotrichum* sp., C. Cepa no identificada, D. *Fusarium brachygibbum*, E. *Eurotiales* sp., F. *Aspergillus niger*. Tomada de Bolaños, 2015.

Sumado a esto, existen reportes donde se han formulado emulsiones con alquilresorcinoles extraídos del centeno que han mostrado ser efectivos para inhibir el crecimiento y germinación de esporas de *Penicillium expansum* y *Neofabraea perennans* (Tabla 2), que son de los principales

patógenos que afectan a las manzanas, especialmente durante el periodo de post-cosecha (Tahir et al., 2014).

Tabla 2. Efecto antifúngico de emulsiones de alquilresorcinolos en el crecimiento radial de *P. expansum* y *N. perennans* (Tahir et al., 2014).

Patógeno	Tratamiento	Emulsiones añadidas 3 h antes de la inoculación	Emulsiones atomizadas 3 h después de inoculación	% Germinación de conidios
<i>P. expansum</i>		% inhibición	%inhibición	
	ARs1	24	71	37
	ARs11	21	50	55
	Control	-	-	97.5
<i>N. perennans</i>	ARs1	46	77	22
	ARs11	27.5	43	57
	Control	-	-	85

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 *Azotobacter vinelandii*

*A. vinelandii* es una bacteria Gram negativa de la familia *Pseudomonaceae* capaz de sintetizar compuestos de interés industrial como lo son los polímeros  $\beta$ -polihidroxibutirato y el alginato. Las especies de este género como *A. chroococcum* y *A. vinelandii*, forman quistes resistentes a condiciones adversas, como la desecación, y están constituidos por una cápsula con dos capas (intina y exina) y un cuerpo central con membrana doble. En condiciones normales de cultivo, el enquistamiento sólo ocurre en menos del 1% de las células en fase estacionaria; sin embargo, este estado puede inducirse en más del 90% de las células reemplazando el medio de cultivo con azúcares por medio con n-butanol o  $\beta$ -hidroxibutirato (Lin & Sadoff, 1968; Reusch & Sadoff, 1983). En *A. vinelandii* se determinó la producción de alquilresorcinolos en la cepa SW136 (Figura 4) junto con el porcentaje de enquistamiento en cultivos en medio sin inductores y se observó que, al alcanzar un tiempo de cultivo largo, un muy pequeño porcentaje de células se enquistan (Segura et al., 2009).

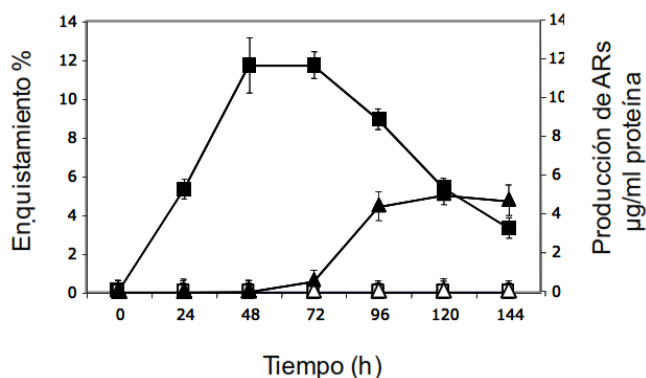
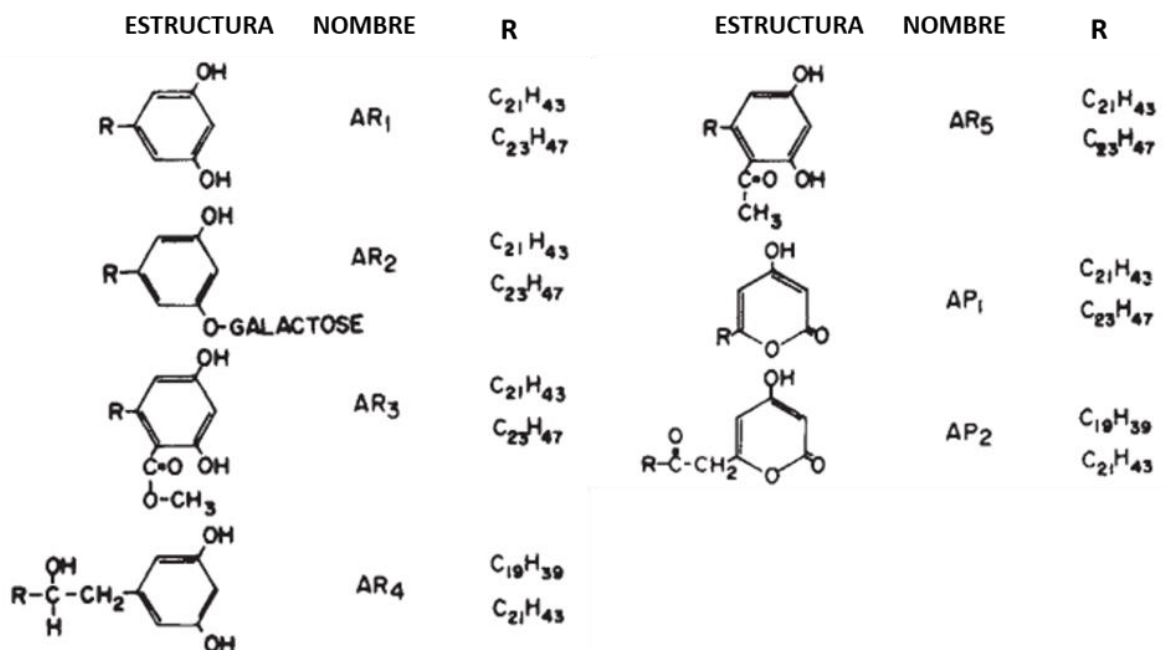


Figura 4. Síntesis de alquilresorcinolos y enquistamiento en *A. vinelandii*. ARs en medio BS (□) y BOH (■). Enquistamiento BS(Δ) y BOH(▲). Tomada de Segura et al., 2009.

Durante el enquistamiento el producto metabólico principal son los lípidos, especialmente los 5-n-alkilresorcinoles y 6-n-alkilpironas. *A. vinelandii* sintetiza una mezcla de estos compuestos, de los cuales los alkilresorcinoles en mayor proporción se identificaron como homólogos de 5-n-heneicosilresorcinol (que también se sintetiza en *Azotobacter chroococcum*), 5-n-tricosilresorcinol y sus derivados galactosidados (**Figura 5**). En bacterias como *Azotobacter chroococcum* y en *Pseudomonas spp.* se han registrado concentraciones de alkilresorcinoles de 2.3 a 56.2 µg/mg peso seco y 0.2 a 0.8 µg/mg peso seco respectivamente, mientras que en *A. vinelandii* se han registrado concentraciones de 2 a 19 µg/mg proteína (Kozubek et al., 1996; Reusch & Sadoff, 1979; Reusch & Sadoff, 1983; Zarnowski et al., 2004).

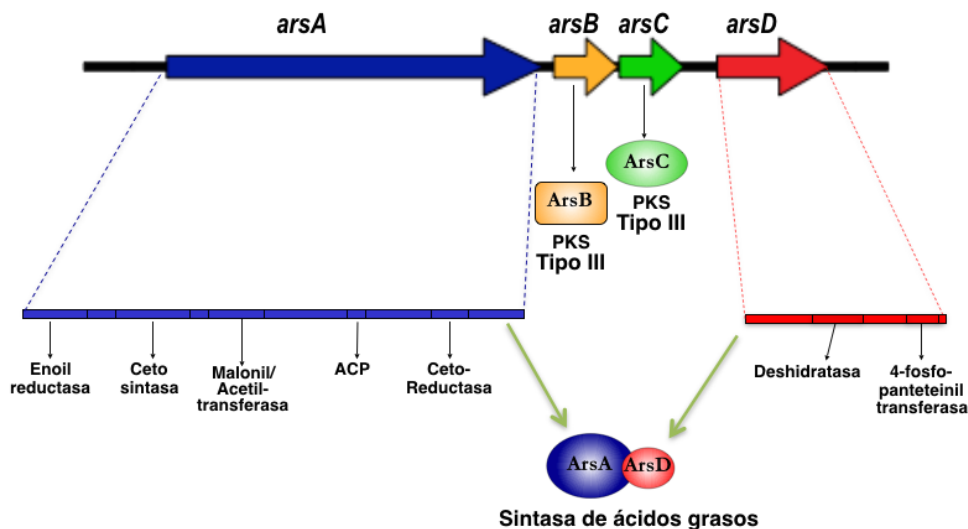


**Figura 5.** Compuestos resorcinólicos presentes en los quistes de *A. vinelandii*. Tomada de Reusch & Sadoff, 1983.

## 2.2 Operón *arsABCD* y síntesis de compuestos fenólicos en *A. vinelandii*

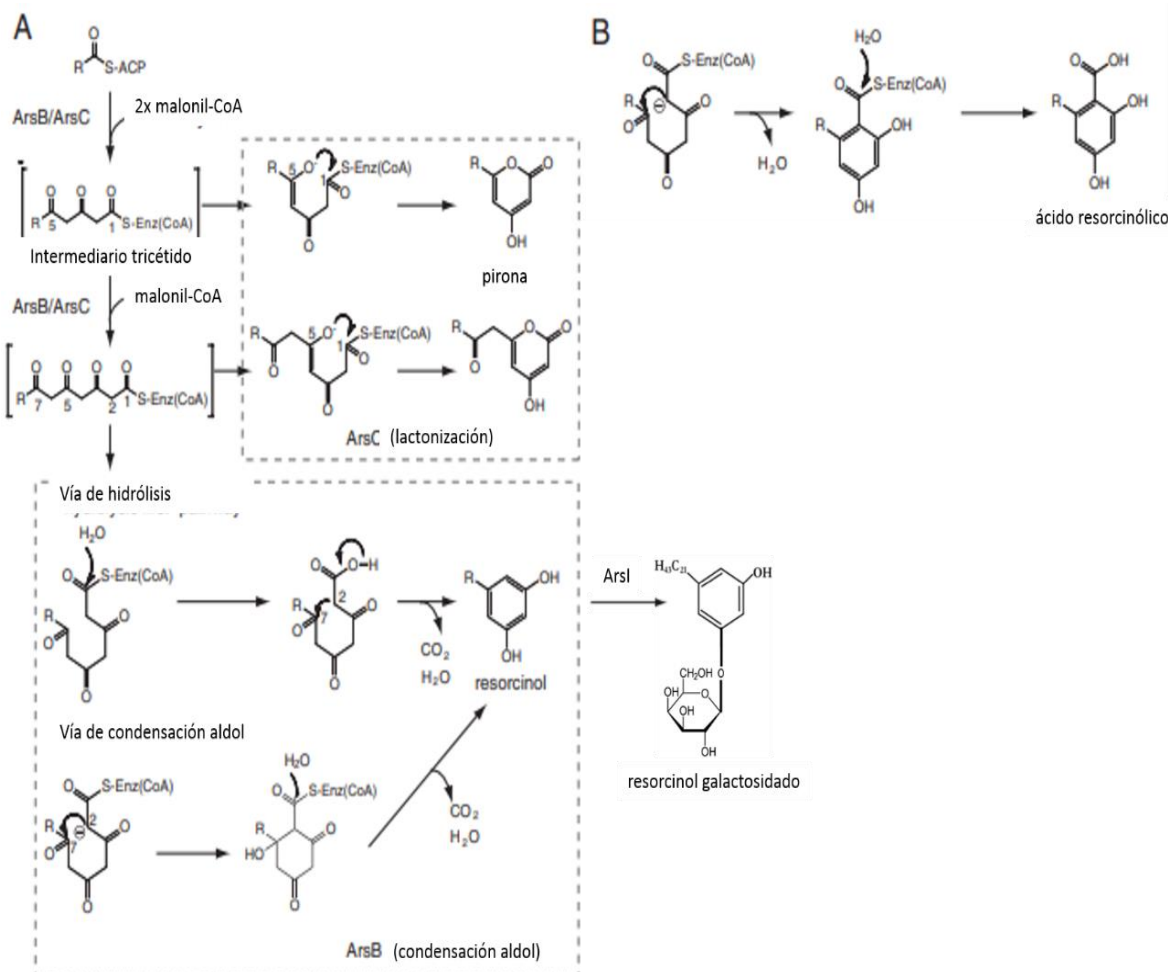
En *A. vinelandii*, se identificó un cluster de genes de los cuales los primeros 4 (*arsABCD*) forman el operón responsable de la biosíntesis de lípidos fenólicos (**Figura 6**). *arsA* codifica para una sintasa de ácidos grasos de tipo I y requiere de una modificación post-traducciona en el dominio ACP (fosfopanteteinilación) llevada a cabo por *ArsD*(4-fosfo-panteteiniltransferasa), *ArsB* y *ArsC* son policétido sintasas de tipo III con 71% de identidad entre sí en la secuencia de amino ácidos, incluyendo el trío catalítico, pero difieren en el mecanismo de ciclación como consecuencia de un aminoácido (W) de la estructura primaria, para formar alkilresorcinoles o alkilpironas (Funa et al., 2006).





**Figura 6. Genes involucrados en la síntesis de alquilresorcinolos en *A. vinelandii*.**

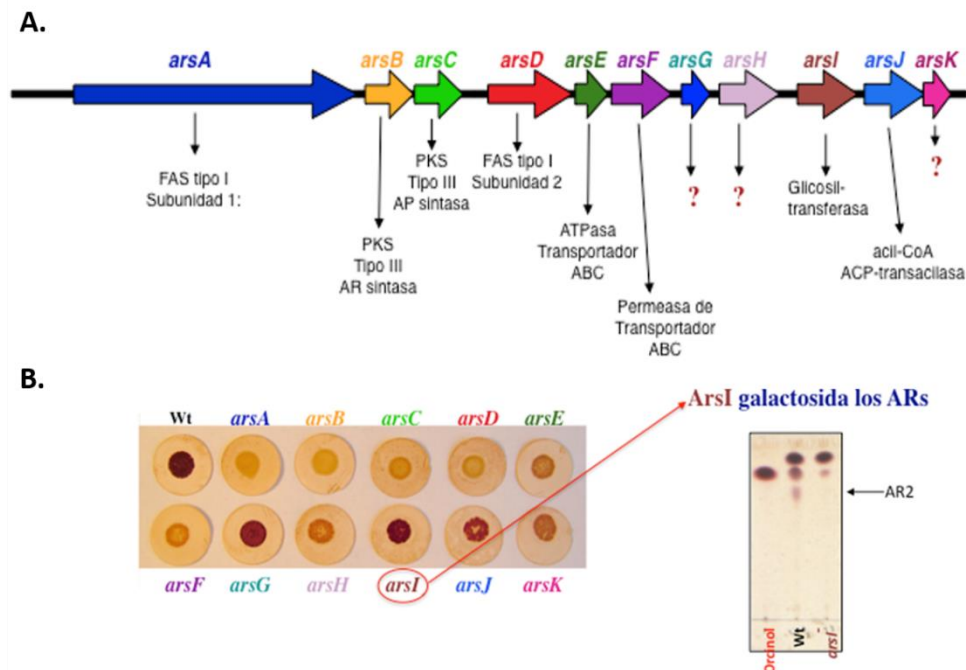
La síntesis de estos compuestos inicia cuando ArsA, modificado por ArsD, sintetiza un acilo de cadena larga (21-23 carbonos). Posteriormente, ArsB y ArsC elongan este acilo mediante una interacción directa con ArsA-D (**Figura 7**) con dos condensaciones de malonil-CoA y se obtiene un intermediario tricétido. Cuando se condensa un tercer malonil-CoA se obtiene un intermediario tetracétido y ambos son usados por ArsC para producir pironas por medio de una reacción de lactonización, mientras que ArsB usa los intermediarios tetracétido para formar resorcinolos por medio de una hidrólisis y condensación aldol (*Satou et al., 2013*). Cabe destacar que en un análisis de la fracción lipídica de la cepa OP de *A. vinelandii*, se encontró que el mayor lípido fenólico de la fracción vegetativa o inducida con  $\beta$ -hidroxibutirato, es 5-heneicosilresorcinol y algunas pironas se identificaron como 6-heneicosil-4-hidroxi-2-pirona y 4-hidroxi-6-(2'-oxotricosil)-2-pirona. Se asume que estos tres compuestos derivan del sustrato inicial n-behenil-CoA. Además, se han identificado otros compuestos fenólicos derivados de n-tricosil-CoA, lo que demuestra que *A. vinelandii* produce lípidos fenólicos como una mezcla con cadenas saturadas que van de los C<sub>21</sub>-C<sub>23</sub>, como en otras especies *Azotobacter* (*Funa et al., 2006*).



**Figura 7. Vía de síntesis de compuestos fenólicos en *A. vinelandii*.** A. Vía de síntesis de alquilpironas y alquilresorcinoles con sus respectivos intermediarios, B. Vía de síntesis de ácidos resorcinólicos. Modificada de Satou et al., 2013.

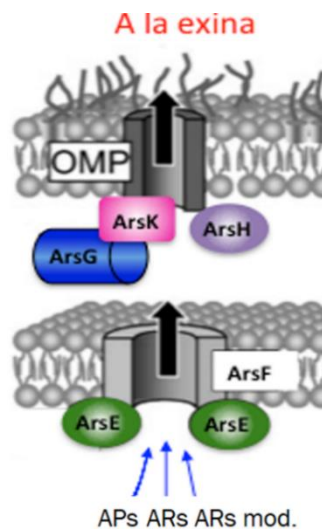
### 2.3 Otros genes relacionados con alquilresorcinoles en *A. vinelandii*

Aparte de los genes que conforman al operón *arsABCD*, se encontraron otros genes en el cluster *ars* (**Figura 8A**) que en un trabajo anterior que se encuentra en preparación para su publicación, fueron interrumpidos para analizar su participación en la biosíntesis de los alquilresorcinoles en *A. vinelandii*. Por medio de tinción con Azul Rápido B, se observó que al silenciar los 4 genes principales (*arsA* → *arsD*) la síntesis de alquilresorcinoles se ve afectada totalmente, mientras que al silenciar otros genes como *arsG*, *arsI* y *arsJ* demuestra que no son necesarios para obtener estos compuestos en el estado de enquistamiento (**Figura 8B**). También se analizaron los extractos en placas de TLC donde se observó que al silenciar *arsI* (cuyo producto presenta similitud con glicosil transferasas), se dejó de producir la forma galactosidada de los alquilresorcinoles, por lo que se dedujo que este gen codifica para la proteína encargada de galactosidar los alquilresorcinoles de esta bacteria (Vences et al., datos no publicados).



**Figura 8. Otros genes relacionados con alquilresorcinoles.** A. Cluster de genes *ars*, B. Tinción de alquilresorcinoles en mutantes sencillas de cada gen del cluster (Vences *et al.*, no publicado).

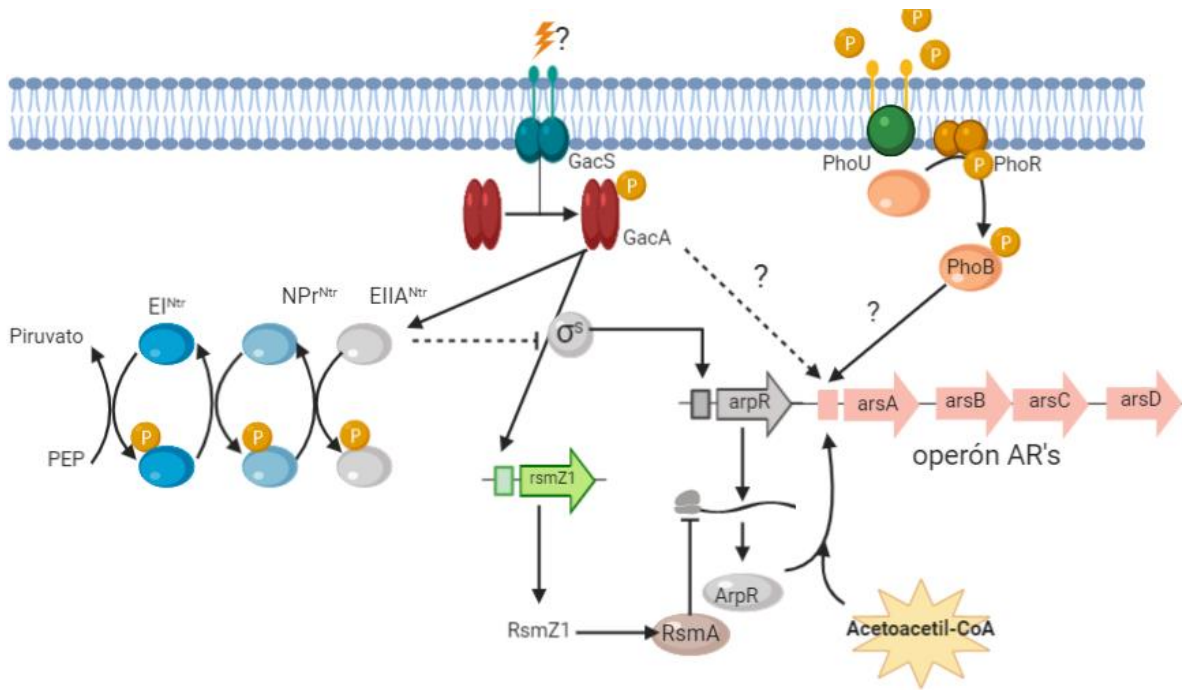
Las proteínas ArsG, ArsH y ArsK presentan un péptido señal y no tienen hélices transmembranales; ArsE, ArsF y ArsH son proteínas con similitud a los transportadores de tipo ABC, mientras que ArsG presenta similitudes con proteínas anotadas como transportadoras de lipoproteínas de la membrana externa. De acuerdo a sus homólogos y a su posible posición por tener o no péptido señal, estas proteínas posiblemente estén formando un sistema para transportar los alquilresorcinoles y las alquilpironas del interior a la parte externa del quiste donde se encuentra la exina (Figura 9).



**Figura 9. Modelo hipotético de transporte de alquilresorcinoles a la exina.** (Vences *et al.*, no publicado).

## 2.4 Regulación del operón *arsABCD*

Por medio de una mutagénesis al azar, se encontró un gen al cual se le denominó *arpR* (alkylresorcinol production regulator), que codifica para un regulador transcripcional tipo LysR. Este tipo de reguladores pueden actuar como activadores o represores. También se sabe que estos reguladores necesitan de coinductores para su funcionamiento, que aparentemente son metabolitos intermediarios de vías metabólicas en las que participan. En el caso de ArpR es el activador de *arsA* sólo en condiciones de enquistamiento y es a su vez controlado positivamente por el factor sigma RpoS (**Figura 10**). Como se mencionó anteriormente, los reguladores de esta familia requieren de coinductores por lo que al probar con moléculas relacionadas al metabolismo de  $\beta$ -hidroxibutirato, se encontró que acetoacetyl-CoA es el coinductor, pues aumenta la unión de ArpR a la región promotora de *arsA* e incluso al añadirlo al medio de cultivo induce la síntesis de alquilresorcinoles en células vegetativas (Romero *et al.*, 2013).



**Figura 10. Regulación del operón *arsABCD* y otros sistemas de regulación.**

Dado que el sistema de dos componentes GacS-A regula la síntesis de otros componentes del quiste como el alginato y  $\beta$ -polihidroxibutirato, se estudió su relación con la síntesis de alquilresorcinoles. Se determinó que este sistema de dos componentes regula positivamente la transcripción de los pequeños ARN's RsmZ1-7 y RsmY, los cuales titulan la actividad de RsmA favoreciendo la síntesis de alquilresorcinoles (**Figura 10**) y se observó que GacA está involucrado en la fosforilación de EIINtr que pertenece al sistema PTS<sup>Ntr</sup>. Además, se sabe que existe una ruta de regulación positiva por parte de GacA sobre el operón *arsABCD*, sin embargo, no ha sido descrita aún (Muriel *et al.*, 2015; Romero *et al.*, 2016; Trejo *et al.*, 2017).

### 2.4.1 ArpR y su regulación sobre la producción de alquilresorcinoles

El regulador ArpR (alkylresorcinol production regulator, Avin19169), del tipo LysR (LSTRs) funciona como activador para el operón *arsABCD*. Se sabe que los reguladores de este tipo poseen un

dominio de unión a ADN en el N-terminal y un dominio de unión a un cofactor en el C-terminal, y requieren de un coinductor para su funcionamiento que son productos o intermediarios de rutas de síntesis y/o metabólicas relacionadas (Maddocks & Oyston, 2008; Vite, 2003). En el caso de ArpR, se observó que regula directamente al gen *arsA*, ya que se une a su región promotora en las posiciones -462 y -171 con respecto al codón de inicio ATG, también se sabe que su transcripción aumenta hasta 120 veces más durante el estado de enquistamiento con respecto a las células vegetativas. Además, ArpR es capaz de autoregularse como la mayoría de los reguladores LysR a pesar de que no se encuentra divergente al gen *arsA* y requiere de acetoacetil-CoA como coinductor para su funcionamiento, ya que al añadir este compuesto al medio Burk Sacarosa se induce la síntesis de alquilresorcinoles en células vegetativas (Romero et al., 2013).

#### 2.4.2 Sistema de dos componentes GacS/GacA.

El sistema GacS/GacA es un sistema de dos componentes común en bacterias Gram negativas que está conformado por una cinasa sensora (GacS) y un regulador de respuesta (GacA) que permiten a los organismos adaptarse a distintas condiciones, así como colonizar nichos específicos dependiendo de su respuesta a ciertas señales ambientales. Estas señales pueden ser abióticas (pH, temperatura, osmolaridad, etc...) o bióticas (productos sintetizados por una población bacteriana). GacS es una cinasa sensora que tiene tres dominios; uno transmisor, receptor y otra histidina fosfotransferasa (Hpt). Cuando GacS se activa al censar el estímulo del ambiente se autofosforila para transferir el grupo fosforilo del residuo histidina del dominio carboxi-terminal a un residuo de aspartato del regulador de respuesta GacA. Dado que aún no se han determinado las secuencias de reconocimiento de GacA en los genes regulador, se ha asumido que el control que ejerce este sistema es indirecto (Heeb, S. & Haas, D., 2001).

En algunas bacterias como *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas chloraraphis* y *Pseudomonas aureofaciens* el sistema GacS/GacA regula positivamente la expresión de genes responsables para sintetizar metabolitos secundarios con actividad antifúngica como 2,4-diacetilfluoroglucinol, pioluteorina, 2-hexil-5-propilresorcinol, entre otros. Por otro lado, se sabe que en *A. vinelandii* el proceso de enquistamiento, la producción de los biopolímeros alginato y  $\beta$ -polihidroxibutirato también son controlados por este sistema. La inactivación de GacA tiene un efecto negativo sobre la producción de alquilresorcinoles y en la expresión de *arsA*, por lo que se sabe que este regulador está involucrado en el control de la síntesis de alquilresorcinoles en esta bacteria (Castañeda et al., 2000; Castañeda et al., 2001, Heeb et al., 2001).

#### 2.4.3 El factor sigma RpoS y su papel en *A. vinelandii*.

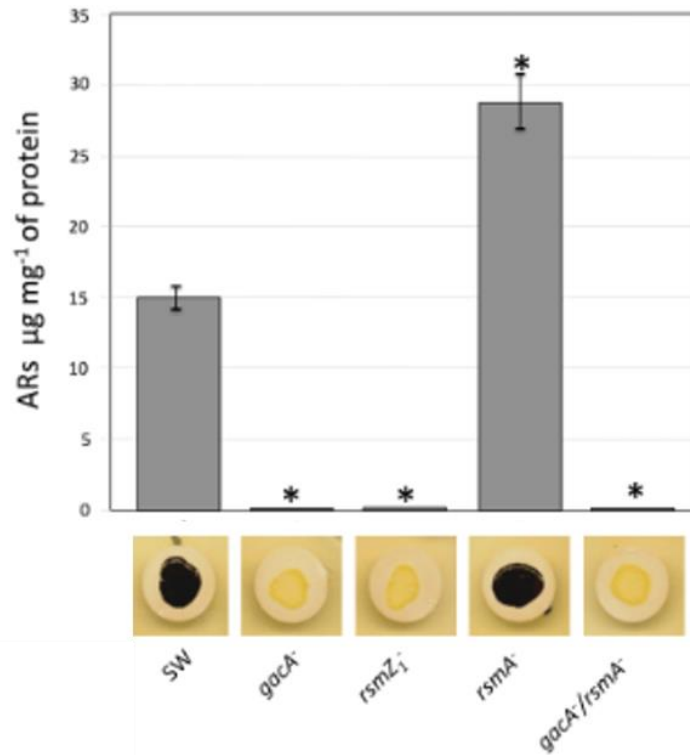
Cuando las bacterias se encuentran bajo condiciones de estrés como variaciones a temperatura, osmolaridad, pH o inanición, deben adaptarse para resistir estos cambios. El factor sigma  $\sigma^{38}$ ,  $\sigma^S$  o también conocido como RpoS es un factor alternativo que regula la expresión de los genes encargados de responder ante este tipo de cambios. Se sabe que RpoS regula la producción de metabolitos secundarios, así como determinantes de patogenicidad en Pseudomonadales. En *A. vinelandii*, RpoS regula algunos genes de catalasas que responden al estrés oxidativo y también está involucrado durante inanición de la fuente de Carbono. Así mismo, se sabe que regula de manera positiva la producción de los biopolímeros alginato y PHB, esto a través de la vía regulatoria de GacA. Mediante la señal de GacS, GacA activa la transcripción de RpoS el cual regula la activación del gen *algD* (promotor 1), mientras que para la síntesis de PHB actúa sobre el gen del activador PhbR y del

operón biosintético *phbBAC* (Battestl et al., 2011; Sanderock et al., 2008; Castañeda et al., 2001; Hernández et al., 2011).

Cabe destacar que la síntesis de alquilresorcinoles también es regulada por RpoS, ya que la mutante SW9 (*rpoS::Sp*) es incapaz de producir estos lípidos y también afecta negativamente la expresión de los genes *arsA* y *arpR*. De manera indirecta, RpoS regula a *arsA* a través de ArpR ya que se encontró que para la expresión de *arpR* es esencial este factor sigma (Romero, 2008 & Romero, 2013).

#### 2.4.4 Regulación del operón *arsABCD* por la vía Gac-Rsm.

Como se mencionó anteriormente, el sistema de dos componentes GacA/GacS regula indirectamente la expresión de varios genes a través de distintos sistemas de regulación como es el caso con el sistema post-transcripcional de RsmA formando una vía de regulación Gac-Rsm. En este caso, GacA activa la transcripción de los pequeños ARNs, RsmZ1-7 y RsmY, que titulan la actividad de RsmA (**Figura 10**). RsmA, ortólogo de CsrA en otras bacterias, es un regulador global que se une a diversos ARN's mensajeros y regula su traducción y estabilidad. En la mayoría de los casos, actúa como un regulador negativo que controla varias vías como el metabolismo central del carbono central, así como la detección de *quorum* modulando las concentraciones de las moléculas señal que participan en la formación de biofilm y movilidad. En el caso de *A. vinelandii*, RsmA controla la síntesis de algunos componentes de los quistes, como el PHB y el alginato. Cuando se analizó la producción de alquilresorcinoles en mutantes de *rsmA*, *gacA* y *rsmZ1* en la cepa SW136, la síntesis de alquilresorcinoles aumentó 80% sólo en la mutante *rsmA* mientras que en las mutantes *gacA* y *rsmZ1* se anuló la producción (**Figura 11**). Además, encontraron 3 posibles secuencias de unión de RsmA en *arpR*, lo que indica que RsmA también regula negativamente la síntesis de alquilresorcinoles al evitar la traducción de *arpR* y afectar la estabilidad del transcrito. Por otro lado, en una doble mutante *gacA/rsmA* (SW15) se observó que la inactivación de *rsmA* no restauró la producción de alquilresorcinoles por lo que al medir la expresión de *arsA* y *arpR* se concluyó que RsmA regula negativamente la expresión de *arpR* a nivel traduccional y que el sistema GacS/GacA controla positivamente la síntesis de alquilresorcinoles por una segunda vía que afecta la expresión de *arsA* independientemente de su regulación por ArpR y del control de *rsmZ1* (Romero et al., 2013; Timmermans & Melderer, 2010).



**Figura 11.** Efecto de la inactivación de *gacA*, *rsmZ1* y *rsmA* en la producción de alquilresorcinolos Tomada de Romero et al., 2013.

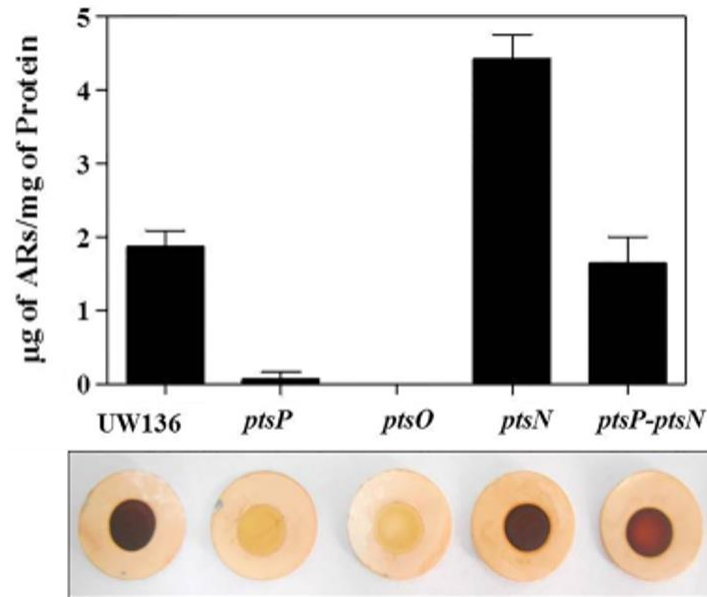
#### 2.4.5 Regulación de *arsABCD* por el sistema Gac-PTS<sup>Ntr</sup> y RpoS.

El sistema fosfotransferasa (PTS) se conforma por los genes *ptsP*, *ptsO* y *ptsN*, que codifican para las proteínas EI<sup>Ntr</sup>, NPR y EIIA<sup>Ntr</sup>. Estas participan en una cadena de fosfotransferencia que deriva del fosfoenolpiruvato (PEP) y donde el último aceptor del fosfato es EIIA<sup>Ntr</sup>. Este sistema regula varios procesos en bacterias, como el consumo de potasio en *E. coli* y patogenicidad en *Salmonella*, también se ha visto que EIIA<sup>Ntr</sup> modula la actividad de varios sistemas de dos componentes como la histidin-cinasa de PhoR en *E. coli* para la respuesta ante falta de fosfato (Pflüger-Grau & Görke, 2010; Pflüger-Grau & Lorenzo, 2014).

Adicional a la vía de regulación Gac-Rsm sobre el operón de *arsABCD* y *arpR*, también se estudió su relación con el sistema PTS<sup>Ntr</sup>. Cuando se inactivaron los genes *ptsP*, *ptsO* y *ptsN* de este sistema en el fondo genético UW136 (una cepa de *A. vinelandii* incapaz de sintetizar alginato por una mutación en *algU*), se observó que la mutación en *ptsN* (EIIA<sup>Ntr</sup>) favorecía a la producción de alquilresorcinolos mientras que la inactivación de *ptsP* y *ptsO* tuvieron el efecto contrario afectando la producción (Figura 12). Dado que la inactivación de *ptsP* y *ptsO* afectan la fosforilación de EIIA<sup>Ntr</sup> por la secuencia de fosforilación en la cascada, se planteó la hipótesis que el estado no fosforilado de EIIA<sup>Ntr</sup> estaba relacionado con el efecto negativo observado en la cepa *ptsN* (Figura 10). Dado que la transcripción de *arpR* depende de RpoS y como se vio afectado su nivel de transcripción en la mutante *ptsN*, estudiaron el efecto de EIIA<sup>Ntr</sup> sobre RpoS, resultando que en su estado no fosforilado afecta la transcripción de *arpR* al degradar a RpoS (Muriel et al., 2015).

Por otro lado, se sugiere que existe una vía GacA-PTS debido a que en una mutante *gacA* sólo se encontró la forma no fosforilada de EIIA<sup>Ntr</sup> y los niveles de transcrito de *ptsP* y *ptsO* aumentaron en

células vegetativas y disminuyeron en células enquistadas lo que podría indicar que GacA se encuentra involucrado en el control de la fosforilación de este sistema; sin embargo, aún no se ha determinado el mecanismo mediante el cual GacA controle la fosforilación de EIIA<sup>Ntr</sup> (Trejo et al., 2017).

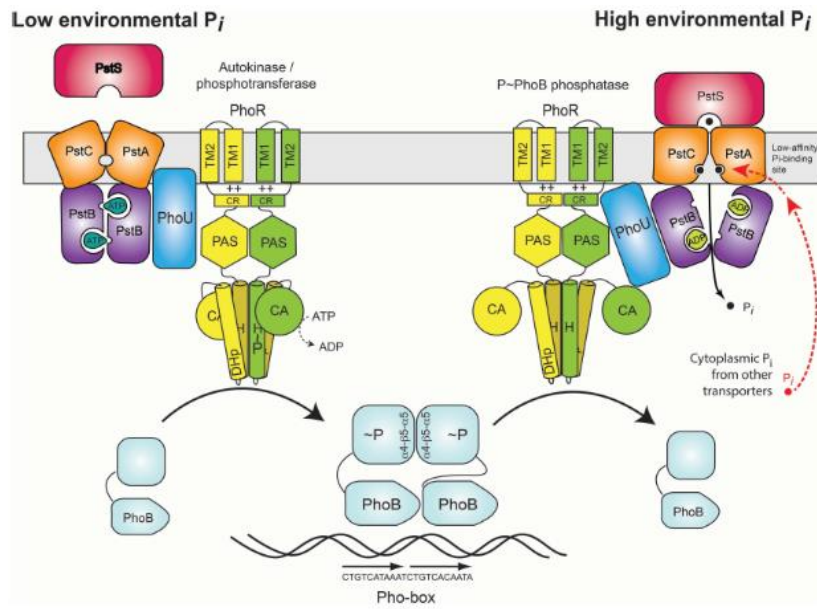


**Figura 12. Efecto de la inactivación de los genes del sistema PTS<sup>Ntr</sup> en la síntesis de ARs.** Tomada de Muriel et al., 2015.

#### 2.4.6 Regulón PhoB/PhoR

Muchas condiciones externas son detectadas por sistemas de regulación de dos componentes en bacterias, uno de estos sistemas es el Regulón Pho, que se compone por una histidina cinasa de membrana interna; PhoR, y un regulador de respuesta; PhoB. Este sistema responde ante los niveles de P<sub>i</sub> periplásmico interactuando junto con un sistema de transporte de fosfato (**Figura 13**). Cuando hay limitación de fosfatos PhoB se activa por PhoR y se une a secuencias específicas de ADN conocidas como Caja Pho que varían entre especies. La actividad de PhoB se puede inducir con el intermediario acetil fosfato y con otros sistemas de regulación como los de Carbono y Vences et al., no publicado, lo que genera una regulación cruzada. Dentro de ésta se ha encontrado relación con respuestas a fuentes de Carbono, Vences et al., no publicado, y otros nutrientes (Gardner & Mcclearly, 2019, Lamarche et al., 2007; Santos, 2015).

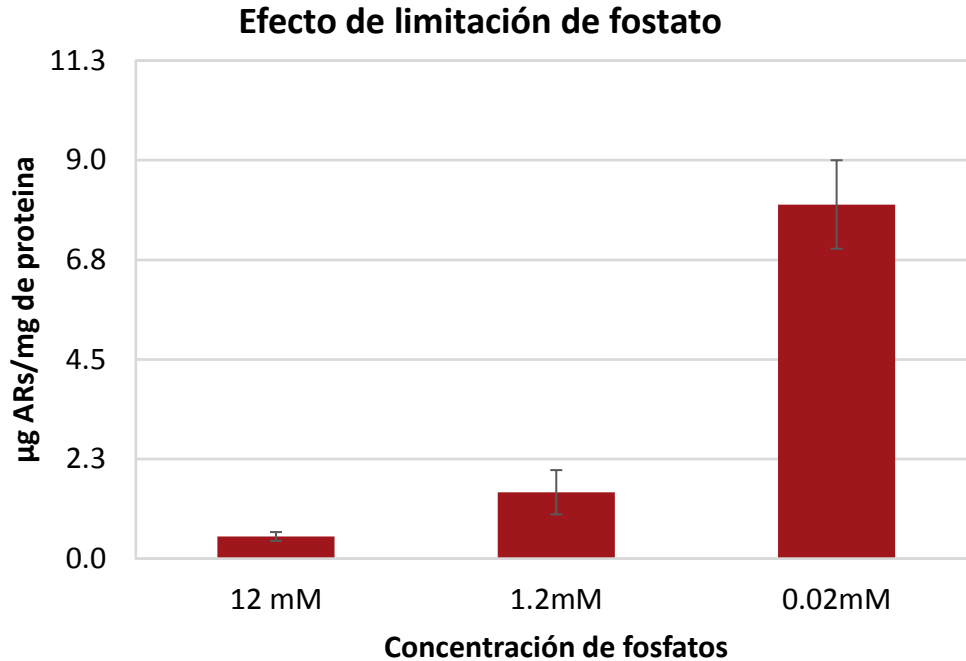




**Figura 13. Control del regulón Pho por medio del sistema de transporte de fosfato.** Tomada de Gardner & McCleary, 2019.

Se sabe que el regulón Pho, está relacionado en la regulación de genes involucrados en procesos como tolerancia a la acidez, producción de toxinas, formación de biofilm y resistencia a compuestos antimicrobianos en bacterias patógenas. Cuando las bacterias se encuentran en condiciones limitadas de fosfato, este regulón participa en los mecanismos para optimizar la captura de nutrimentos esenciales, como se ha visto en *Caulobacter crescentus*, que cambia su estado celular y en *Bacillus subtilis* se modifican los componentes de la superficie. En *Sinorhizobium meliloti*, PhoB regula positivamente la síntesis de algunos exopolisacáridos que se involucran en la invasión de nódulos radiculares cuando el fosfato es escaso (Lamarche et al., 2007).

En *A. vinelandii*, se observó que, al disminuir las concentraciones de fosfato en el medio, la producción de alquilresorcinoles aumentó en células vegetativas (Figura 14). Esto sugiere que el operón de síntesis *arsABCD* es regulado también por este sistema, pues bajo limitación de fosfato los fosfolípidos de las membranas son reemplazados por lípidos sin fosfato, como los lípidos de ornitina y los alquilresorcinoles (Vences, et al., datos no publicados).



**Figura 14. Producción de alquilresorcinolos en células vegetativas con medio limitado en fosfatos** (Vences et al., no publicado).

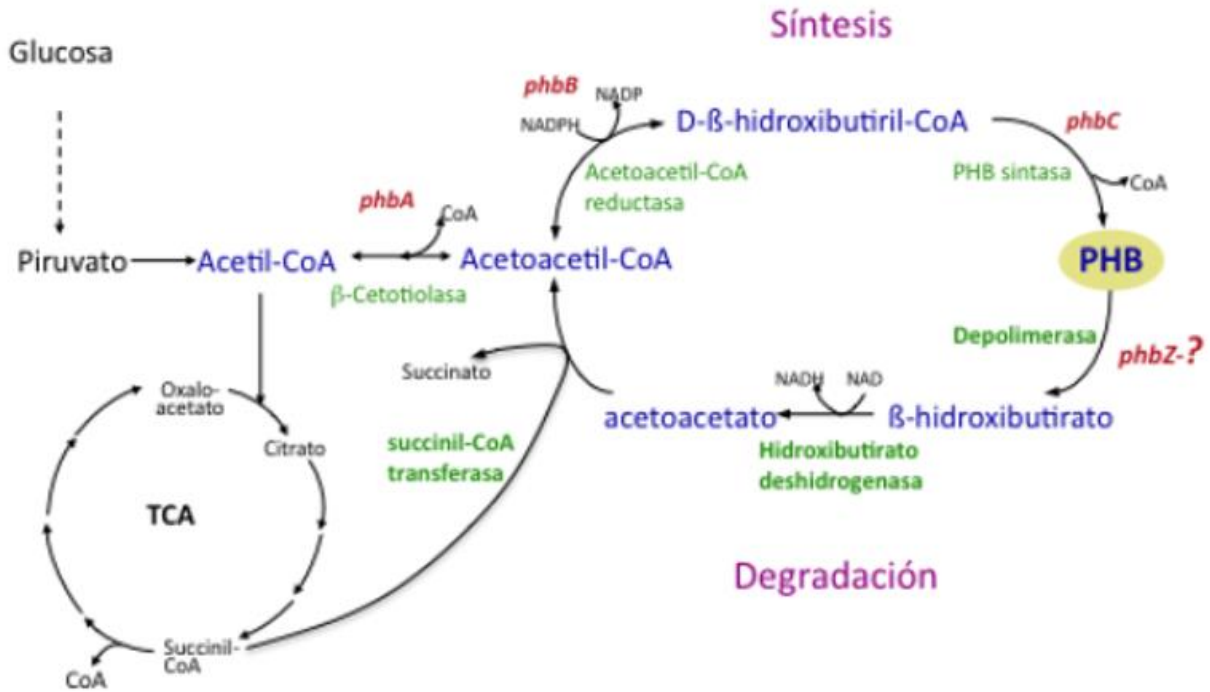
Además, se encontró una secuencia que corresponde posiblemente a una caja Pho dentro de la región reguladora de *arsA* (Figura 15). Con estos resultados, se supone que PhoB estaría actuando como regulador negativo afectando la síntesis de alquilresorcinolos cuando está en su forma no activa (Vences et al., no publicado).

ATTTGTGCAAATTCGATTTGGATTCGGGATTCACCTTCCAGTGACATCGGA<sup>-35</sup>ATGAATTA  
 TCGGCAATTCC<sup>-10</sup>GAGTACGCTTTGTTC<sup>P</sup>GCCGGTAGTGTGAAAACCAAGCATGTCGATATC  
 GCATGTCCGATGGGGCGAGGTCATTTCCCGGACAAGAGGCGAAGACCCTCTTCGCGGT  
 CCGTTCGTCGATCCTCGGGCGATATCAATTGAATGGCATTTCCTCCAGCGGTAGT  
 CGGGGCCATGCCAGTCGAACGCGAGCAGTGTGTGTAGCGGCTCGAACAAGGAACAAAAGC  
 TTGCGCCGAAA<sup>Pho Box</sup>GCGCATCTTTTGAGAGCAGGATGATCAA<sup>arsA</sup>ATGGCTAGT

**Figura 15. Caja Pho en región promotora de *arsA*** (Vences, no publicado).

## 2.5 Efecto de la interrupción de la síntesis de PHB en la producción de alquilresorcinolos

La vía de síntesis de PHB (Figura 16) inicia con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA con ayuda de la  $\beta$ -cetotiolasa para formar acetoacetyl-CoA, el cual se convierte en 3-hidroxi-butiril-CoA por medio de la actividad de la acetoacetyl-CoA reductasa y la PHB sintasa polimeriza los monómeros en PHB. Los genes responsables de la biosíntesis de PHB son *phbB*, *phbA* y *phbC*, estos se encuentran en operón y codifican para las enzimas  $\beta$ -cetotiolasa, acetoacetyl-CoA reductasa y PHB sintasa respectivamente (González et al., 2013).



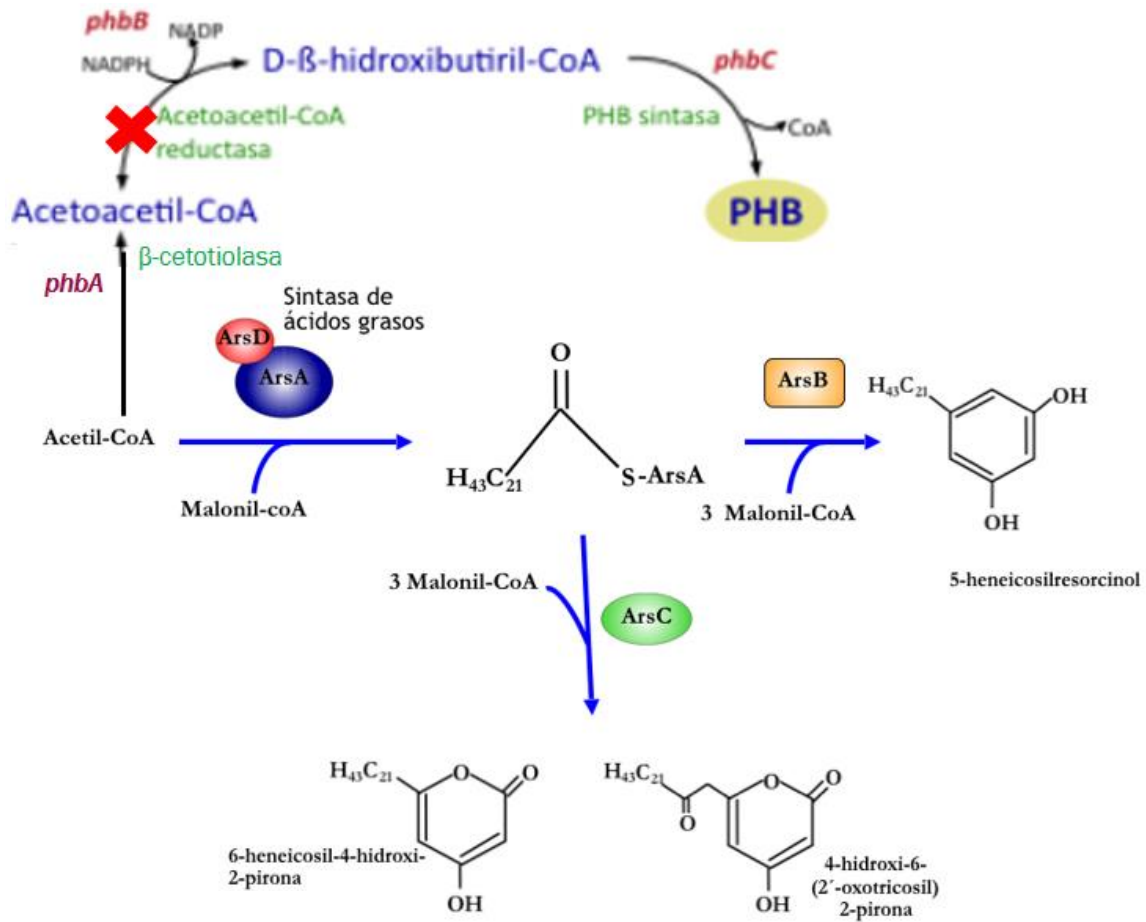
**Figura 16. Síntesis de PHB.**

Cuando *A. vinelandii* se enquista, los productos metabólicos principales son los lípidos alquilresorcinoles y el PHB. Por ello, se estudió el efecto que tiene la inactivación del operón *phbBAC* en la producción de alquilresorcinoles y en la formación de quistes. La inactivación por inserción en los genes *phbB* y *phbC*, aumentó la concentración de alquilresorcinoles incluso en células vegetativas (Tabla 3) (Segura et al., 2003).

Tabla 3. Producción de alquilresorcinoles en cepas mutantes de *A. vinelandii* (Segura et al., 2003).

Cepa	Genotipo	ARs (µg/mg proteína)	
		BBOH	BS
		5 días	5 días
ATCC 9046	WT	13.4 ± 0.6	<0.1
AT6	<i>phbB::miniTn5</i>	112.0 ± 18.0	7.9 ± 0.8
ACS18	<i>phbC::Sp</i>	31.4 ± 5.6	1.2 ± 0.3

Una de las razones por las cuales la producción de alquilresorcinoles aumenta, puede ser por la redirección de flujo de los intermediarios. La biosíntesis de PHB consume una gran cantidad de acetyl-CoA, ya que este polímero llega a representar hasta el 85% del peso seco celular. Adicionalmente, uno de esos intermediarios producidos en el metabolismo de PHB es el acetoacetyl-CoA (producto de *phbA*), el cual funciona como coinductor de ArpR (activador del operón *arsABCD*). Se ha comprobado que al agregarlo al medio las células vegetativas inducen la producción de los lípidos resorcinólicos. Dependiendo del paso enzimático que se bloquee en la biosíntesis de PHB, la concentración de este inductor puede cambiar considerablemente (Figura 17).



**Figura 17. Relaciones entre las biosíntesis de PHB y alquilresorcinolos.** El intermediario acetoacetyl-CoA activa la expresión del operón *arsABCD* al servir como coinductor de ArpR.

### 3 JUSTIFICACIÓN

Los lípidos resorcinólicos son metabolitos secundarios con diferentes papeles como molécula señal o como adaptógenos en las células que los producen ante condiciones de estrés como la radiación y el estrés oxidativo. Los alquilresorcinoles tienen un potencial biotecnológico porque por sus características fisicoquímicas, tienen la capacidad de modificar las propiedades de las membranas lipídicas cuando se integran a éstas y pueden formar o estabilizar estructuras membranales como liposomas para acarrear compuestos de diferente naturaleza. Adicionalmente, pueden inhibir el crecimiento de hongos. Las producciones registradas en *Azotobacter chroococcum* y *Pseudomonas spp.* muestran que las fuentes bacterianas pueden considerarse ricas en estos compuestos; sin embargo, una de las desventajas de algunas bacterias como *A. vinelandii* es que la producción más alta de estos compuestos ocurre durante la fase latente, lo cual es poco favorable desde el punto de vista de cultivo. Por ende, la relevancia de este trabajo recae en el aprovechamiento de métodos moleculares para obtener cepas sobre-productoras de estos compuestos al modificar el control regulatorio ejercido sobre el operón de biosíntesis y el flujo metabólico de los intermediarios involucrados en la producción.

## 4 HIPÓTESIS

La inactivación de los genes *rsmA*, *ptsN*, *phoB* (reguladores negativos del operón *arsABCD*) en conjunto con la interrupción de las vías de síntesis de los biopolímeros PHB y alginato por inactivación de los genes *phbB* y *algA*, permitirá obtener cepas productoras de alquilresorcinoles, tanto en estado de enquistamiento como en células vegetativas de *A. vinelandii*.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Obtener cepas mutantes de *A. vinelandii* que favorezcan la sobreproducción de lípidos alquilresorcinoles en quistes y en células vegetativas.

### 5.2 Objetivos específicos

- ❖ Determinar la cepa de *A. vinelandii* más adecuada para realizar las mutaciones por su nivel de producción de alquilresorcinoles.
- ❖ Evaluar el efecto de la inactivación de los reguladores negativos RsmA, PhoB y sus combinaciones sobre la producción de alquilresorcinoles.
- ❖ Establecer si la eliminación de las rutas de síntesis de PHB y/o alginato favorecen la sobreproducción de alquilresorcinoles.

## 6 MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas de *A. vinelandii* usadas y generadas en este trabajo para evaluar la producción de alquilresorcinoles se encuentran enlistadas con sus respectivas características en la **Tabla 4**, así como las cepas y plásmidos usados de *E. coli* para obtener la mutante con inactivación en *phbB*.

Tabla 4. Plásmidos y cepas usadas en este trabajo.

Plásmidos	Características		Referencia
<b>pJet1.2blunt</b>	Vector de clonación lineal con resistencia a ampicilina.		<i>Thermo Fisher Scientific</i>
<b>pBSL98Gm</b>	Plásmido con resistencia a gentamicina.		<i>Alexeyev et al., 1995</i>
<b>pJet1.2phbB</b>	Vector de clonación con el gen <i>phbB</i> integrado.		<i>Este trabajo</i>
<b>pJet1.2phbB::Gm</b>	Vector de clonación con resistencia a gentamicina insertada en <i>phbB</i> .		<i>Este trabajo</i>
Bacteria	Cepa	Características	Referencia
<i>E. coli</i>	Top10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL (StrR)endA1 λ-	Invitrogen
<i>A. vinelandii</i>	UW136	Cepa <i>algU</i> - derivada de la cepa silvestre DJ	<i>Bishop &amp; Brill, 1997</i>
	SW136	UW136 <i>algU</i> +, mucoide	<i>Segura et al., 2009</i>
	ATCC9046	Cepa silvestre, mucoide	<i>American Type Culture Collection</i>
	AEIV	Cepa silvestre , mucoide	<i>Svein Valla(Norwegian University of Science and Technology)</i>
	AEIV <i>ptsN</i>	AEIV con mutación <i>ptsN::Km</i>	<i>Trejo et al.,2019</i>
	AEIV <i>rsmA</i>	AEIV con mutación <i>rsmA::Sp</i>	<i>Trejo et al.,2019</i>
	AEIV <i>phoB</i>	AEIV con mutación <i>phoB::Gm</i>	<i>Vences, datos no publicado</i>
	AEIV <i>rsmA-ptsN</i>	Derivada de AEIV <i>rsmA</i> con mutación <i>ptsN::Km</i>	<i>Trejo et al., 2019</i>
	AEIV <i>rsmA-phoB</i>	Derivada de AEIV <i>rsmA</i> con mutación <i>phoB::Gm</i>	<i>Este trabajo</i>
	AEIV <i>rsmA-ptsN-phoB</i>	Derivada de AEIV <i>rsmA-ptsN</i> con mutación <i>phoB::Gm</i>	<i>Este trabajo</i>
	AEIV <i>phbB</i>	AEIV con mutación <i>phbB::Gm</i>	<i>Este trabajo</i>
	AEIV <i>algA</i>	AEIV con mutación <i>algA::Km</i>	<i>Ahumada, datos no publicados</i>
AEIV <i>algA-phbB</i>	Derivada de AEIV <i>algA</i> con mutación <i>phbB::Gm</i>	<i>Este trabajo</i>	

	AEIV <i>algA-rsmA</i>	Derivada de AEIV <i>algA</i> resistente Km, con mutación <i>rsmA::Sp</i>	<i>Este trabajo</i>
	AEIV <i>algA-rsmA-phbB</i>	Derivada de AEIV <i>algA-rsmA</i> con mutación <i>phbB::Gm</i>	<i>Este trabajo</i>

## 6.2 Técnicas moleculares

### 6.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa

Debido a que ya se contaban con las mutantes *phoB*, *rsmA*, *ptsN* y *rsmA-ptsN* en el fondo AEIV de *A. vinelandii*, solo se confirmó por PCR la inserción del gen que confiere resistencia a gentamicina (534 pb), en los alelos mutantes usando ADN cromosomal de las cepas *rsmA-phoB*, *rsmA-ptsN-phoB* y los controles (cepa silvestre y *phoB*). Las condiciones utilizadas para la reacción usando la Taq polimerasa de Thermo scientific y los oligonucleótidos PhoBMUFW y PHOBMURV (**Tabla 5**) fueron las siguientes: 1 ciclo de 95°C por 3 minutos, 1 ciclo de 95°C por 35 segundos, 63°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos, estos últimos 3 se repitieron 30 veces y se finalizó la reacción con un ciclo de 72°C por 10 minutos.

Para construir la cepa mutante con la vía de síntesis de PHB inactiva (ya que se contaba con la mutante en *algA* que tiene la vía de síntesis de alginato inactiva), se comenzó por amplificar un fragmento de 1090pb correspondiente al gen *phbB* usando el ADN cromosomal de la cepa AEIV silvestre y los oligos PhbBFw y PhbBRv (**Tabla 5**). Las condiciones utilizadas para las reacciones de PCR usando la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polimerase de Thermo scientific fueron: 1 ciclo a 98°C por 30 segundos, 98°C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos 25 segundos por 30 ciclos y 1 ciclo a 72°C por 10 minutos. Estas condiciones también se usaron para comprobar por PCR de colonia la inserción del gen que confiere la resistencia a gentamicina en los alelos de las mutantes *phbB*, *algA-phbB* y *algA-rsmA-phbB*. Para obtener el material genético usado en la reacción primero se resuspendió una asada de células cultivadas por 48h en medio sólido Burk Sacarosa en 50µL de agua y se calentaron las muestras a 95°C por 25 minutos para después centrifugar por 10 minutos a 13000 rpm y utilizar 2µL de sobrenadante para cada reacción.

### 6.2.2 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo para obtener y corroborar la inactivación de los genes *phoB* y *phbB* se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Oligonucleótidos usados en este trabajo.

Nombre	Secuencia	Características	Referencia
<b>PhoBMUFW</b>	TGACCGACCGCGAGGACGACCTGAAGATCG	Tm=70°C, %GC:63, longitud:30nt	<i>Vences et al., no publicado</i>
<b>PhoBMURV</b>	CGCGTATAGGCGCGTTCCTGGTGGGTCATG	Tm=70°C, %GC:63, longitud:30nt	<i>Vences et al., no publicado</i>
<b>PhbBFw</b>	AGTACGATGTCACCAACGGG	Tm=58°C, %GC:55, longitud:20nt	Este trabajo
<b>PhbBRv</b>	CATCCAGCTTGGTTTGTTTCG	Tm=56°C, %GC:50, longitud:20nt	Este trabajo



### 6.2.3 Construcción de la mutante *phbB::Gm*.

Para inactivar la síntesis de PHB por medio de una inserción de un casete de resistencia a gentamicina en el gen *phbB*, primero se usó el plásmido pJET1.2blunt (Thermo Fisher Scientific) para ligar el producto de PCR correspondiente al gen silvestre *phbB* y obtener el plásmido pJET1.2*phbB* (Tabla 4). Después, se extrajo del plásmido pBSL98Gm (Alexeyev et al., 1995) el fragmento de la resistencia de gentamicina usando la enzima de restricción SmaI, con la cual también se digirió el plásmido pJET1.2*phbB* para poder ligar posteriormente la resistencia purificada en el sitio +380 del gen *phbB*. Con esto, se construyó el plásmido pJET1.2*phbB::Gm* que tiene inactivo el gen *phbB* y se transformó en células *E. coli* Top 10.

### 6.2.4 Transformación en *E. coli*

Para transformar las células de *E. coli* con los plásmidos pJet1.2*phbB* y pJet1.2 *phbB::Gm* se utilizaron células calcio competentes Top 10 las cuales se mezclaron con los respectivos plásmidos ligados y se dejaron 30 minutos en hielo. Después, se les dio un choque térmico de 5 minutos a 38°C y se les añadió 1 mL de medio LB líquido sin antibiótico y se dejaron recuperando en agitación por 1 hora a 37°C a 200 rpm. Finalmente, se seleccionaron las células en cajas petri de medio LB Amp 200 µg/mL y LB Gm 10 µg/mL de las cuales se seleccionaron colonias.

### 6.2.5 Transformación en *A. vinelandii*

Para obtener las cepas mutantes primero se sembraron en medio sólido las cepas AEIV, *rsmA*, *rsmA-ptsN*, *algA* y *algA-rsmA* para tener células frescas con la finalidad de obtener las cepas mutantes AEIV *rsmA-phoB*, *rsmA-ptsN-phoB*, *algA-rsmA*, *phbB*, *algA-phbB* y *algA-rsmA-phbB*. Luego se resembró cada cepa en placas de CM y se incubaron por 48 horas a 30°C. Después se resembraron y se incubaron por 18 horas a 30°C, se recolectaron las células y se lavaron con MgSO<sub>4</sub> 10 mM hasta retirar el alginato para las cepas que presentan un fenotipo mucóide, se resuspendieron en 200 µL de MgSO<sub>4</sub> 10 mM y se añadieron 10 µL de ADN. Después de mezclar las células competentes de *A. vinelandii* y el ADN, se tomaron los 210 µL de volumen y se sembraron en cajas de medio CM sólido dejándose secar en la campana de flujo laminar para incubar cada caja por 24 horas a 30°C. Finalmente se recolectaron las células, se resuspendieron en MgSO<sub>4</sub> 10 mM para sembrar en medio sólido con antibiótico (medio de selección) y se dejaron incubando por 3 días para seleccionar las colonias que crecieron en el medio selectivo con los antibióticos correspondientes a cada mutación esperada.

### 6.2.6 Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*.

A partir de 6 mL de cultivo de *E. coli* en medio LB con gentamicina y ampicilina (10 y 200 µg/mL respectivamente), se realizaron extracciones por el método de perclorato de los plásmidos pBSL98Gm, pJET1.2*phbB::Gm* y pJet1.2*phbB*. Primero, se obtuvieron los pellets celulares y se resuspendieron en 175 µL de TES (15% sacarosa, 50 mM TRIS pH 8.5 y 50 mM EDTA pH 8) y se añadieron 25 µL de lisosima (10 mg/mL) para incubarlos por 20 minutos en hielo. Después se añadieron 400 µL de agua helada y se incubaron los tubos por 15 minutos a 73°C, se centrifugaron por 15 minutos y se descartaron los pellets con palillos estériles. Seguido de esto, se añadieron 60 µL de NaClO<sub>4</sub> 5 M y 600 µL de isopropanol a la fase acuosa, suavemente se mezcló todo y se centrifugó por 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol al 70%.

### 6.2.7 Extracción de ADN cromosomal por el método de fenol cloroformo

A partir de cajas petri de medio sólido Burk Sacarosa incubadas a 30°C por 72 h, se recogieron las células de las cepas; AEIV, *rsmA*, *phoB*, *rsmA-phoB* y *rsmA-ptsN-phoB* de *A. vinelandii* con una espátula previamente esterilizada. Se resuspendieron en MgSO<sub>4</sub> 10 mM para lavarlas y se centrifugaron para obtener un pellet (no debe exceder los 100µL de volumen en el tubo). Después se lavaron las células de cada cepa con 450 µl de amortiguador TE 50/20 y se resuspendieron las células nuevamente en 450 µL. Después se incubaron dos reacciones de lisis; primero se añadieron 50µL de lisozima y se incubaron las muestras por 30 minutos a 37°C, luego, se añadieron 50 µL de proteasa y se volvieron a incubar a 37°C por otros 30 minutos. Posteriormente, se adicionaron 50 µL de SDS 10% y se volvieron a incubar por 15 minutos a 35°C hasta que la solución tuviera una apariencia turbia y viscosa. Una vez transcurrido el tiempo, se añadieron 100 µL de NaCl 5M, se mezcló e incubaron los tubos por 10 minutos a 65°C junto con un tubo con 400 µL de CTAB 10% NaCl 0.7 M para añadir 80 µL de esta solución a cada tubo después de la incubación con NaCl 5 M, y se incubaron por segunda vez durante 20 minutos a 65°C.

Para iniciar con la extracción, se añadieron 750 µL de Cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó y se tomó la fase acuosa superior con mucho cuidado. Después se adicionó (al volumen recuperado) otro volumen de una solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (1 volumen de fenol saturado + 1 volumen de solución cloroformo-alcohol isoamílico) y se repitió el paso anterior, para extraer con otro volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Después de las extracciones, se añadieron 600 µL de isopropanol y se mezcló suavemente, se centrifugó y se lavó dos veces cada pellet con etanol al 70%. Finalmente se secaron las muestras en un concentrador de vacío (Vacufuge plus de eppendorf) y se resuspendieron en 30 µL de ARNasa para incubarse a 37°C por una hora. Antes de usar el ADN extraído, se corrió un gel de agarosa 1% y se cuantificó el ADN por absorbancia en un espectrofotómetro NanoDrop One de Thermo scientific.

## 6.3 Métodos de cuantificación

### 6.3.1 Cuantificación de proteína por el método de Lowry

El crecimiento bacteriano se cuantificó determinando la concentración de proteína celular por mililitro de cultivo y también por masa seca. Para el primer caso la proteína se cuantificó mediante el método de Lowry (1951), a partir de las muestras tomadas de los cultivos se lavaron las células con MgSO<sub>4</sub> 10 mM y se concentraron. Después, se resuspendieron en 1 mL de MgSO<sub>4</sub> 10 mM para apartar 300 µL de muestra de los cuales se realizó una dilución tomando 10 µL y se llevó a un volumen final de 200 µL con agua. Luego, se añadió 1 mL de solución reactiva y se incubó por 10 minutos. Después de la incubación, se añadieron 100 µL de reactivo Folin diluido (2 volúmenes de agua por cada uno de Folin) y se dejaron reposando las muestras por 30 minutos para leer su absorbancia a 625 nm. Simultáneamente se realizó una curva estándar con 200 µL de albúmina sérica en concentraciones de 1 mg/mL de 12.5, 25, 50, 100, 200 y 400 µg/mL.

Para la solución reactiva:

Solución A: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% en NaOH 0.1 N

Solución B: Tartrato de Na y K 2 %

Solución C: CuSO<sub>4</sub> 1 %.

Se mezclaron: 0.5 ml de Solución C + 0.5 ml de Solución B + 49 ml de Solución A.

### 6.3.2 Cuantificación de masa seca

Diferentes volúmenes de muestra de los cultivos se secaron en tubos eppendorf de 1.5 mL. Los tubos vacíos primero se secaron en el horno 24 horas antes de tomar muestra. Después se pesaron vacíos y se transfirieron las muestras, se centrifugaron y se descartó el sobrenadante de cada una. Finalmente, se dejaron en el horno por 24 horas hasta que estuvieran secos a peso constante y se pesaron para obtener la masa seca total por diferencia de peso.

### 6.3.3 Detección, extracción y cuantificación de alquilresorcinoles

Para la extracción de alquilresorcinoles de todas las cepas evaluadas se tomaron muestras de cultivos líquidos incubados a 30°C por 72 horas mientras que para la cepa seleccionada y caracterizada se tomaron muestras en los tiempos 0, 8, 12, 24, 36, 48 y 72 horas, las cuales se centrifugaron y se lavaron con MgSO<sub>4</sub> 10 mM hasta retirar el alginato de las células. El pellet celular se resuspendió en 1 mL de MgSO<sub>4</sub> 10 mM, se apartaron 300 µL para cuantificar proteína y se centrifugaron los 700 µL restantes para extraer los alquilresorcinoles con 1 mL de acetona dos veces; en la primera extracción se añadió la acetona, se agitaron y se dejaron reposar las muestras por una hora. Después, se centrifugaron las muestras colectando el mililitro de acetona, posteriormente, se realizó la segunda extracción, agitando y dejando las células resuspendidas en otro mililitro de acetona hasta el día siguiente. Se colectó la acetona y se juntaron los dos mililitros de extracto secándose sin temperatura en la centrifuga de vacío Vacufuge plus de eppendorf.

El método utilizado para la cuantificación de alquilresorcinoles es el micro método colorimétrico con sales de Azul Rápido B (*Sampietro et al., 2009*). Se añadió 1 mL de solución reactiva azul rápido B-propanol (**Tabla 6**) a los extractos secos y a la curva estándar (4, 8, 20, 40, 60, 100 µg/mL), y se dejaron reaccionar por 1 hora sin exposición a la luz, después se leyeron las muestras a 520 nm. Es importante mencionar, que la pastilla obtenida de las muestras de células vegetativas, se cuantificó directamente mientras que el extracto de las muestras inducidas con n-butanol se resuspendieron en 100 µL de acetona y se tomaron 50 µL para cuantificar.

Tabla 6. Solución Azul Rápido B- Propanol.

Reactivo	Cantidad	Concentración Final
Ácido acético	1 ml	5 %
Azul rápido B	0.016 g	0.08 %
H2O	Aforar a 20 ml	
Propanol*	80 ml	
* La cantidad de propanol es siempre 4 partes con respecto a la solución ácido - azul rápido.		

#### 6.3.3.1 Tinción en placa

Para realizar las pruebas rápidas de la producción de alquilresorcinoles en las cepas mutantes, se tomó el volumen del preinóculo equivalente a 400 µg de proteína, se lavaron las células y se resuspendieron en MgSO<sub>4</sub> 10 mM. Después se inocularon 10 µL en cajas de medio Burk Sacarosa y Burk butanol que se incubaron a 30°C para teñirse con una solución (**Tabla 7**) a las 24, 48 y 72 horas.

Tabla 7. Solución de tinción para 50mL.

Reactivo	Cantidad
Ácido acético	2.5 mL
Azul B rápido	250 mg
Agua	47.5 mL

#### 6.3.4 Extracción y cuantificación de PHB

Para extraer el polímero PHB, las muestras de 1 mL se centrifugaron y los pellets celulares se lavaron con 1 mL de MgSO<sub>4</sub> 10 mM. Después a las células se les añadió hipoclorito de sodio comercial diluido en agua al 30%, se resuspendieron las muestras y se incubaron una hora a 30°C. Después se hicieron lavados, primero con 1 mL agua y se centrifugaron por 5 minutos, luego con 1 mL de etanol absoluto y se centrifugaron por 3 minutos. Finalmente, se lavaron con 1 mL de acetona y se centrifugaron 3 minutos, retirando la acetona y dejando secar.

Una vez secas las muestras, se cuantificó el PHB por medio del método espectrofotométrico, previa conversión en ácido crotónico mediante tratamiento con ácido sulfúrico concentrado (*Law & Splecky, 1961*). Al PHB seco extraído se le añadió 1 mL de ácido sulfúrico y se calentó aproximadamente a 95°C por 10 minutos, para posteriormente leer la absorbancia a 235 nm en celdas de cuarzo de 1 cm. Se utilizó la ecuación de Lambert & Beer para calcular la concentración de crotonato ( $\epsilon = \frac{A}{C \cdot l}$ , donde A es absorbancia, C concentración, l longitud de la celda y  $\epsilon$  coeficiente de extinción molar de  $1.55 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) y convertirlo a equivalentes de PHB.

#### 6.3.5 Cuantificación de sacarosa

Para cuantificar el consumo de sacarosa se utilizó el método de  $\beta$ -fructofuranosidasa-DNS (*Miller, 1959*). Se realizaron diluciones 1:20 con agua destilada de las muestras del sobrenadante (libre de células) y se tomaron 90  $\mu$ L de la dilución, se les añadieron 10  $\mu$ L de la solución enzimática (2.5mg de  $\beta$ -fructofuranosidasa con 1 mL de amortiguador de citratos 0.35 M pH 4.6) y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 100  $\mu$ L de DNS y se colocaron los tubos por 5 minutos en agua ebullo. Finalmente, los tubos se dejaron enfriar en hielo y se les añadió 1 mL de agua destilada para leer las absorbancias a 540 nm. Paralelamente, se corrió una curva patrón de sacarosa.

### 6.4 Medios y condiciones de cultivo

Con la finalidad de seleccionar la mejor cepa sobre-productora de alquilresorcinoles, se evaluó el crecimiento y producciones de alquilresorcinoles en diferentes cepas mutantes de *A. vinelandii* en dos condiciones distintas; en estado celular vegetativo usando medio Burk Sacarosa 2% y en estado de enquistamiento induciendo con medio Burk Butanol 0.2%. Las condiciones establecidas para evaluar el crecimiento y producción de alquilresorcinoles en cada cepa fueron los siguientes; temperatura de incubación a 30°C y 200 rpm en cultivos líquidos de 50 mL (correspondiente al estado celular evaluado) usando matraces de 250 mL por 72 horas.

Cabe destacar que, para los cultivos de las células enquistadas, primero se inocularon las células vegetativas del preinóculo (18-20 horas de cultivo en medio Burk Sacarosa) y se incubaron por 24 horas en las condiciones mencionadas anteriormente. Después, se centrifugaron los cultivos de 24 horas dividiendo los 50 mL de volumen por rondas, ya que los cultivos de las cepas productoras de

alginato requirieron lavarse con  $MgSO_4$  10 mM para solubilizar el alginato y obtener el pellet celular. Una vez que se concentraron las células de los 50 mL, se lavaron tres veces más con  $MgSO_4$  10 mM para retirar la sacarosa y se pasaron las células a los matraces con 50 mL del medio inductor Burk Butanol 0.2% y se incubaron por 72 horas a 30°C, 200 rpm. Las concentraciones de las soluciones que se usaron para los medios de *A. vinelandii* se encuentran enlistadas en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Soluciones Stock para los medios de cultivo de *A. vinelandii*.

Reactivo	Concentración Stock		Concentración final
	M	g/L	mM
<b>MgCl<sub>2</sub>.6 H<sub>2</sub>O</b>	0.79	160	0.79
<b>NaMO<sub>4</sub>.2 H<sub>2</sub>O</b>	0.00083	0.2	0.83
<b>FeSO<sub>2</sub>. 7 H<sub>2</sub>O</b>	0.018	5	0.018
<b>CaCl<sub>2</sub>. 2 H<sub>2</sub>O</b>	0.05	7.3	0.5
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	0.13	18.3	1.3
<b>Buffer fosfatos</b>			
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	0.046	8.0	4.6
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0.015	2.0	1.5
<b>Sacarosa</b>		200	20%

Por otro lado, para obtener las cepas mutantes *rsmA-phoB*, *rsmA-ptsN-phoB*, *phbB*, *algA-rsmA*, *algA-phbB* y *algA-rsmA-phbB* en *A. vinelandii* AEIV se usó el medio de competencia (CM). Primero, se sembraron las cepas de las cuales derivan cada mutante (AEIV silvestre, *rsmA*, *rsmA-ptsN*, *algA* & *algA-rsmA*) para tener células frescas y sembrarse en cajas petri de medio CM que se dejaron incubando por 48 horas a 30°C. Transcurrido el tiempo, se resembraron por segunda vez en cajas nuevas con medio CM, se dejaron incubar aproximadamente 18 horas para poder obtener suficientes células ya que algunas mutaciones afectaron el crecimiento y se recogieron con una espátula previamente esterilizada por calor para poder hacer los suficientes lavados con  $MgSO_4$  10 mM para retirar el alginato de las cepas productoras del polímero. Posteriormente, se resuspendieron las células en 200  $\mu$ L de  $MgSO_4$  10 mM y se les añadió 10  $\mu$ L del material genético (ADN cromosomal ó plásmido lineal) para sembrar las células en una caja de CM que se incubó 24 horas. Finalmente, se añadió 1mL de  $MgSO_4$  10 mM y con ayuda de una espátula se recolectaron las células en un tubo de 1.5 mL para platear en medio Burk Sacarosa con su respectivo antibiótico para seleccionar y después de 48-72 horas de incubación a 30°C, picar las colonias que crecieron. En la **Tabla 9** se muestran las cantidades necesarias para preparar 1 L de medio Burk Sacarosa, Burk Butanol y medio de competencia.

Tabla 9. Medios de cultivo para *A. vinelandii*.

MEDIO REACTIVO	BURK SACAROSA VOLUMEN (mL)	BURK BUTANOL VOLUMEN (mL)	CM VOLUMEN (mL)
<b>Agar</b>	800	800	800
<b>Agua</b>	-	98	-
<b>Buffer fosfatos</b>	100	100	100
<b>Sacarosa 20%</b>	100	-	100
<b>Butanol</b>	-	2	-
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	10	10	10
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	10	10	10

<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1	1	1
<b>FeSO<sub>4</sub></b>	1	1	-
<b>NaMoO<sub>4</sub></b>	1	1	-

#### 6.4.1 Medio Luria-Bertani (LB)

Con la meta de inactivar el gen *phbB* con la resistencia de gentamicina purificada del plásmido pBSL98Gm, se obtuvieron los plásmidos pJET1.2*phbB* y pJET1.2*phbB::Gm* usando células de *Escherichia coli* Top 10. Todos los cultivos de *E. coli* para la expresar los plásmidos y su posterior purificación fueron hechos en medio Luria-Bertani (**Tabla 10**) con los antibióticos ampicilina 200 µg/mL y gentamicina 10 µg/mL incubados a una temperatura de 37°C a 200 rpm.

Tabla 10. Medio Luria-Bertani para *E. coli*.

<b>REACTIVO</b>	<b>CONCENTRACIÓN (g/L)</b>
<b>Bacto triptona</b>	10
<b>Extracto de levadura</b>	5
<b>Cloruro de sodio</b>	10
<b>Agua destilada</b>	1 L

#### 6.5 Análisis estadísticos

Las producciones volumétricas y específicas, el crecimiento y los rendimientos obtenidos, se analizaron estadísticamente usando el modelo de la anova de dos vías considerando como factores las condiciones de cultivo (medio de cultivo para células vegetativas BS y medio de enquistamiento BOH) y las cepas mutantes. Todas las gráficas representan la media de un triplicado por muestra de un experimento (uno para los fondos genéticos, otro para las mutantes de los reguladores, para comparar los fondos AEIV y ATCCC9046, para las mutantes con las vías de síntesis de los polímeros inactivados y una cinética).

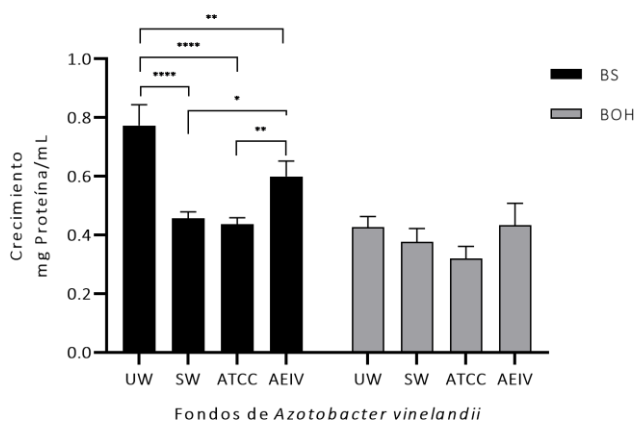
Los datos obtenidos se organizaron por experimento en documentos en GraphPad Prism 8 como datos agrupados con tres replicas, donde el grupo A corresponde a los datos en células vegetativas cultivadas en medio BS y los datos del grupo B corresponden a las células enquistadas inducidas en medio BOH. Para realizar el análisis se seleccionó en el apartado de <<Analysis>> la opción de <<Two-way ANOVA>> en las opciones de análisis de grupo seleccionando el grupo A y B. Posteriormente, en la ventana de parámetros se seleccionó la pestaña de <<Multiple comparisons>> y se realizaron comparaciones entre filas usando como control la fila 1 correspondiente a los datos de la cepa silvestre excepto para las gráficas del fondo genético donde se compararon todas las cepas ya que se buscaba determinar una referencia.

## 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

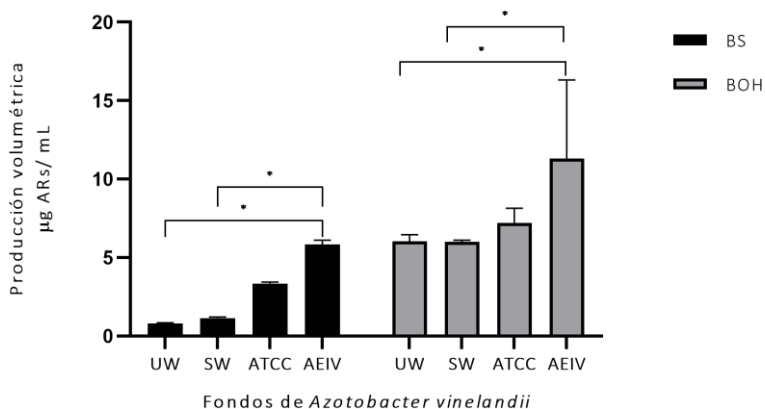
### 7.1 Determinación de la cepa mejor productora de alquilresorcinolos para realizar las modificaciones genéticas.

Con la finalidad de trabajar con un fondo genético más favorable para obtener cepas sobre productoras de alquilresorcinolos, primero se evaluó el crecimiento y las producciones específicas y volumétricas de las cepas *UW136*, *SW136*, *ATCC9046* y *AEIV* de *A. vinelandii* en medio vegetativo (Burk Sacarosa, BS) y medio de enquistamiento (Burk Butanol, BOH) a las 72 horas de cultivo. A pesar de ser una cepa productora de alginato, se observó que el fondo *AEIV* presentó características favorables como su buen crecimiento en ambos medios, ya que alcanzó una concentración de proteína de 0.599 mg/mL en BS y de 0.433 mg/mL en BOH (**Figura 18A**) y fue la cepa con mayor producción de alquilresorcinolos en medio vegetativo (BS) con concentraciones de 5.481 µg/mL y 10.056 µg/mg de proteína (**Figura 18B y C**), lo cual se consideró como una posible ventaja en cuestión de cultivos futuros para no tener que inducir el estado de enquistamiento de las células, pues a nivel industrial la inducción del enquistamiento resulta impráctica y costosa por el cambio de medio de cultivo que se requiere al alcanzar la alta biomasa. Por ende, se decidió continuar usando este fondo genético para evaluar las producciones en las cepas mutantes.

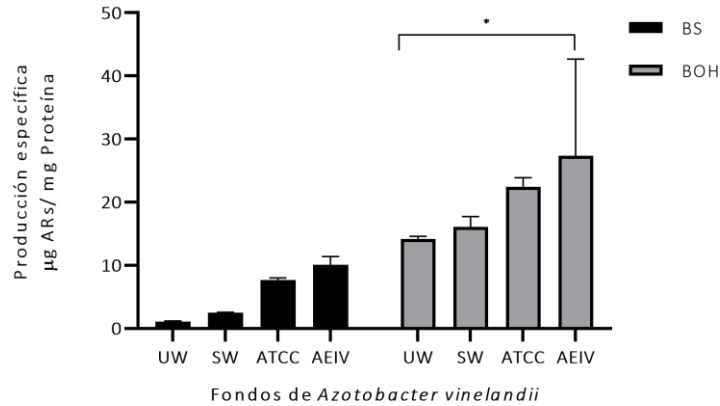
#### A) Crecimiento



#### B) Producción volumétrica



#### C) Producción específica



**Figura 18. Crecimiento y Producción de alquilresorcinoles en distintos fondos genéticos de *A. vinelandii*.** A) Crecimiento, B) Producción volumétrica & C) Producción específica.

## 7.2 Efecto de la inactivación de los reguladores negativos en la sobreproducción de alquilresorcinoles

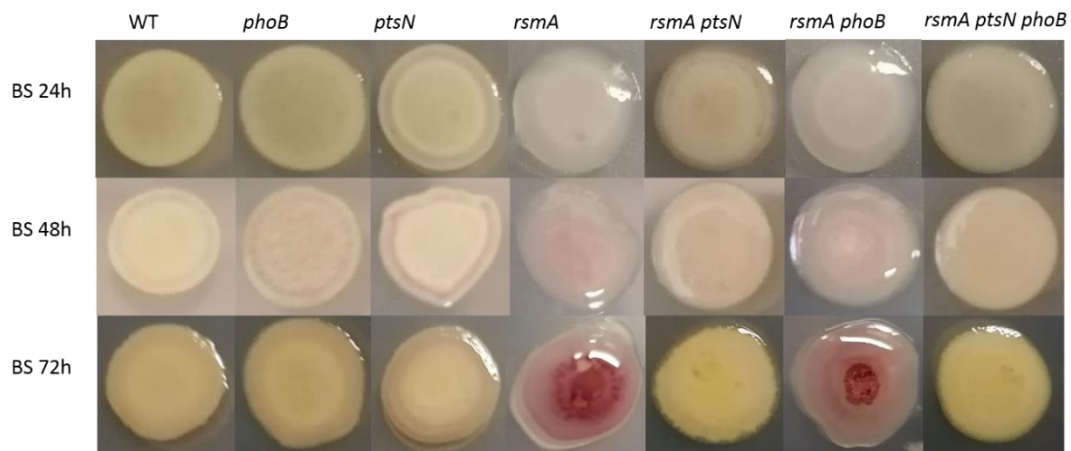
Como se mencionó anteriormente, la expresión del operón *arsABCD* se encuentra controlada por varios sistemas reguladores como el de dos componentes GacA/GacS, RsmA y el sistema de fosfotransferencia PTS<sup>Ntr</sup>. Además, se determinó que existe una sobreproducción de alquilresorcinoles en concentraciones de fosfato limitantes (0.02mM). Adicionalmente, la presencia de un posible sitio consenso de unión del regulador PhoB conocido como caja Pho, en la región reguladora de *arsA*, sugiere que el sistema de dos componentes PhoB/PhoR podría estar regulando al operón biosintético, por lo que se decidió cuantificar la producción de alquilresorcinoles en la cepa AEIV *phoB* que tiene inactivado el gen *phoB*. El efecto de esta mutación se probó tanto en células vegetativas como enquistadas, la cepa mutante en este regulador no presentó una producción significativamente diferente de la cepa silvestre en células vegetativas (medio BS); sin embargo, se observó un aumento en la producción de alquilresorcinoles en células enquistadas (medio BOH), lo que llevó a concluir que PhoB podría estar teniendo un efecto negativo en la expresión del operón principalmente durante este estadio celular (datos no mostrados). Una vez que se comprobó la sobreproducción de alquilresorcinoles en el fondo *phoB*, se realizaron combinaciones de la mutación *phoB* con las cepas mutantes *rsmA* y *rsmA-ptsN* para obtener las cepas mutantes *rsmA-phoB* y *rsmA-ptsN-phoB*. Después, se evaluó el efecto en la producción de alquilresorcinoles de manera cualitativa y cuantitativa en la cepa silvestre y las mutantes *phoB*, *rsmA*, *ptsN*, *rsmA-ptsN*, *rsmA-phoB* y *rsmA-ptsN-phoB* en el fondo AEIV.

Para evaluar cualitativamente el efecto de la inactivación de los reguladores, se realizó una prueba de tinción de alquilresorcinoles con colonias vegetativas y enquistadas en medios sólidos BS y BOH respectivamente. La inactivación de los genes *rsmA* y *rsmA-phoB* tuvo un efecto favorecedor, ya que a las 72 horas las cepas mutantes mostraron tener una sobreproducción de alquilresorcinoles en las células vegetativas, es decir, la producción de alquilresorcinoles fue evidente sin inducir el estado de enquistamiento (**Figura 19A**). Cabe destacar que la mutante sencilla de *phoB* sólo presentó coloración en el contorno de la colonia, lo cual nos llevó a plantear la pregunta si la sobreproducción observada en la cepa *rsmA-phoB* se debía a un efecto acumulativo al inactivar ambos reguladores. Además, la triple mutante *rsmA-ptsN-phoB* la colonia vegetativa no mostró el efecto esperado, dado

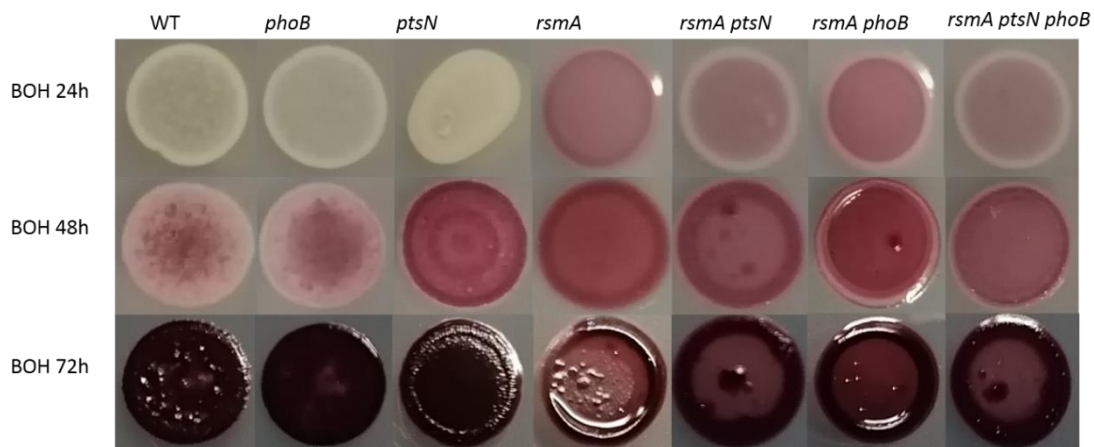


que no presentó sobreproducción de alquilresorcinoles como las mutantes *rsmA* y *rsmA-phoB*, lo cual sugiere que entre estos sistemas existe una interacción que no permitió obtener un efecto acumulativo. Por otro lado, al teñir las colonias enquistadas se observó que todas las cepas mutantes con el gen *rsmA* inactivado (*rsmA*, *rsmA-ptsN*, *rsmA-phoB* y *rsmA-ptsN-phoB*) mostraron una sobreproducción de alquilresorcinoles temprana desde las 24 horas (**Figura 19B**). A partir de las 48 horas, las colonias de la cepa *ptsN* también mostraron un aumento en la producción con respecto a la silvestre, sin embargo; sólo durante el estado de enquistamiento se observó este efecto, lo cual podría sugerir que el control del sistema PTS<sup>Ntr</sup> sobre la síntesis de alquilresorcinoles se da durante este estadio celular mientras que la regulación por parte de RsmA está involucrado durante el estado vegetativo, así como durante el de enquistamiento.

**A) Medio vegetativo (BS)**



**B) Medio de enquistamiento (BOH)**

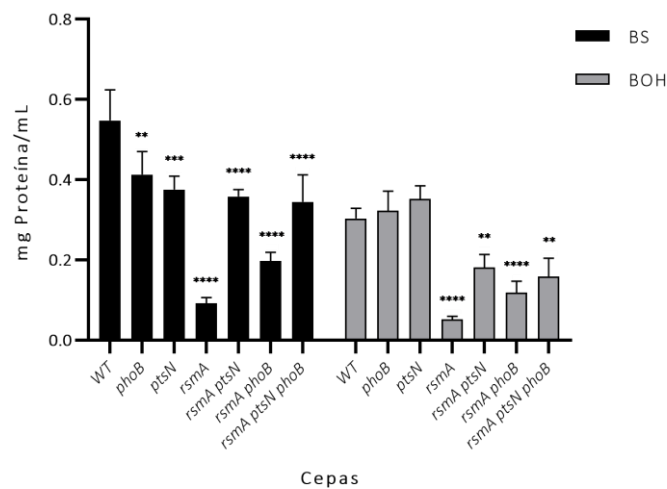


**Figura 19. Tinción de alquilresorcinoles en cepas con los reguladores negativos inactivos. A) Burk Sacarosa, B) Burk Butanol.**

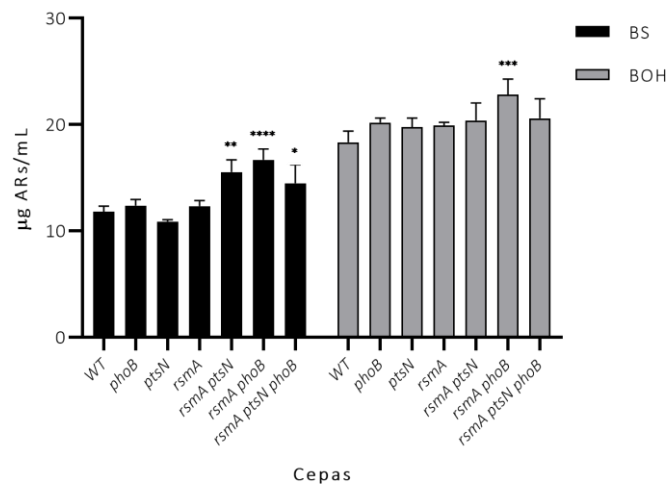
Ya que ésta prueba cualitativa mostró algunos inconvenientes como la difusión de la solución de tinción en el alginato de las cepas hipermucoideas y como se observó que la densidad celular influye en la intensidad al teñir las colonias, también se realizó una estimación cuantitativa de los cambios en la producción de alquilresorcinoles y el crecimiento (proteína). Primero, se observó que entre la cepa silvestre y las cepas mutantes no hubo una diferencia significativa en la producción volumétrica

tanto en células vegetativas como en células enquistadas (**Figura 20B**). No obstante, al obtener las producciones específicas se observó que la mutante sencilla *rsmA* alcanzó concentraciones de 122.5 y 357.0  $\mu\text{g}$  alquilresorcinoles/mg de proteína en células vegetativas y enquistadas respectivamente (5 veces más que la silvestre). Es importante destacar, que la inactivación de *rsmA* tuvo un efecto negativo en el crecimiento en las mutantes *rsmA*, *rsmA-ptsN*, *rsmA-phoB* y *rsmA-ptsN-phoB*, siendo la más afectada la mutante sencilla *rsmA*, creciendo hasta 6 veces menos respecto a la cepa silvestre (**Figura 20A**). Este efecto se le atribuye al fenotipo hipermucoide que presentó la mutante *rsmA*, lo cual físicamente limita su crecimiento al cultivarse. Esta hipermucooidía es consecuencia del control negativo que tiene RsmA sobre la producción de alginato, ya que se sabe que regula post transcripcionalmente al gen *algD* que forma parte del grupo de genes que codifican para las enzimas involucradas en la síntesis del polímero (Manzo *et al.*, 2011).

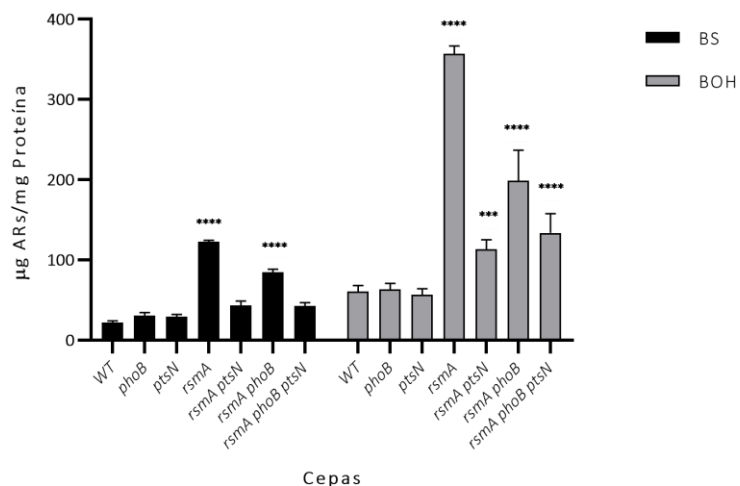
### A) Crecimiento



### B) Producción volumétrica



### C) Producción específica

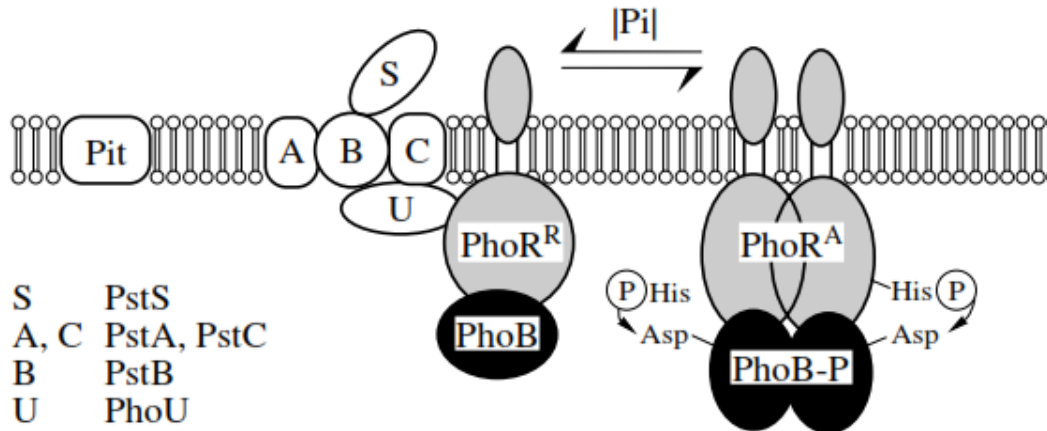


**Figura 20. Producción de alquilresorcinoles en cepas con reguladores negativos inactivados.** A) Cuantificación de proteína, B) Producción volumétrica de alquilresorcinoles & C) Producción específica de alquilresorcinoles.

Cabe destacar que, al inactivar *rsmA* junto con *ptsN* ó *phoB* se observó un efecto contrario al esperado, es decir, no presentaron un efecto acumulativo (**Figura 20C**) sino que se obtuvieron concentraciones menores con respecto a la mutante *rsmA* sencilla. Esto podría estar sugiriendo que entre estos sistemas puede existir una interacción. Además, el efecto no solamente se reflejó en la producción de alquilresorcinoles ya que fenotípicamente las mutantes dobles y triple disminuyeron la producción de alginato.

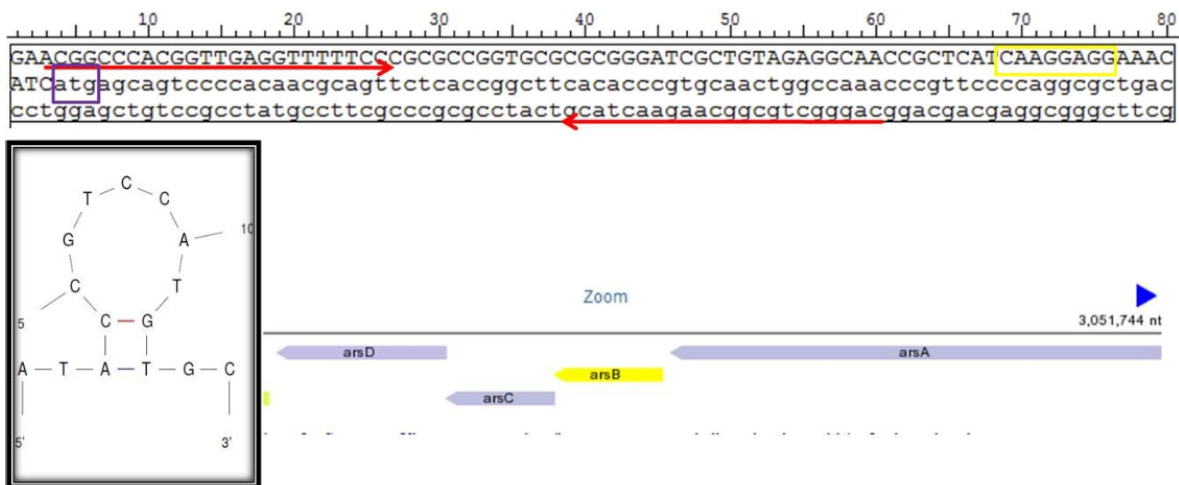
Con el fin de encontrar una posible relación entre RsmA y los otros sistemas reguladores, se consultó una lista de genes que tienen un sitio putativo de unión con RsmA (López, 2018). Dentro de estos genes se encontraron dos que pertenecen al regulón Pho; *phoH* que codifica para una ATPasa, y *pstC* que codifica para una permeasa del sistema de transporte de fosfato Pst, el cual está involucrado en controlar la activación de PhoB a través de un complejo formado con PhoU y PhoR (**Figura 21**) (Vershina, O. & Znamenskaya V., 2002). En otras palabras, es posible que exista una relación entre los sistemas RsmA y Pho que aún no se conozca bien pero esto explicaría el efecto que se observó en los resultados con las mutantes dobles y triples.

Así como se observó que existe una posible relación entre el regulón Pho y RsmA que no está bien estudiada, podemos inferir que también hay relaciones con el sistema PTS<sup>Ntr</sup> que no han sido estudiadas. De acuerdo con experimentos tipo pulldown hechos con la proteína EIIA<sup>Ntr</sup> (tanto su forma silvestre como la no fosforilable) y un proteoma (Olache, 2021), se encontró que la proteína PhoU (Avin48560) interactúa con EIIA<sup>Ntr</sup>. No obstante, queda planteada la pregunta de cómo funciona ésta interacción en *A. vinelandii* ya que en *E. coli* se ha visto que EIIA<sup>Ntr</sup> modula la actividad del sistema de dos componentes PhoB/R a través de su interacción directa con PhoR (Lüttmann et al., 2012) pero en el proteoma no se identificó a PhoR (Avin48530) ni a PhoB (Avin48520). Por otro lado, aún queda pendiente identificar cuál es la relación entre los sistemas de RsmA y PTS<sup>Ntr</sup>, ya que experimentalmente no se ha encontrado una relación directa entre RsmA y EIIA<sup>Ntr</sup> ni tampoco alguna regulación de EIIA<sup>Ntr</sup> sobre la transcripción de los pequeños RNAs *rsmz1* y *rsmz2* que titulan la actividad represora de RsmA (Olache, 2021).



**Figura 21. Regulación del sistema PhoB/R.** Tomada de *Vershinina & Znamenskaya, 2002*.

Otro de los genes que se encontraron dentro de la lista que contienen sitios de unión para RsmA y que nos llamó la atención fue *arsB*, gen responsable de codificar para la policétido sintasa tipo III (alquilresorcinol sintasa) del operón *arsABCD*. En la **Figura 22**, se muestra la secuencia de *arsB* con el sitio putativo de RsmA y la posible forma de la horquilla que se genera durante su regulación. Así como RsmA es capaz de regular post-transcripcionalmente a *phbR* y *phbB* (*Eligio, 2012*), proteínas involucradas en la síntesis de PHB (que también es un compuesto mayoritario de los quistes) no se descarta la posibilidad que además de regular al activador ArpR también esté regulando a *arsB* (a pesar de que no se ha realizado un ensayo para comprobarlo experimentalmente), lo cual podría estar favoreciendo a la producción de alquilresorcinoles en las células vegetativas ya que se sabe que ArpR, sólo es expresado en células enquistadas (*López, 2018; Romero, 2013*).



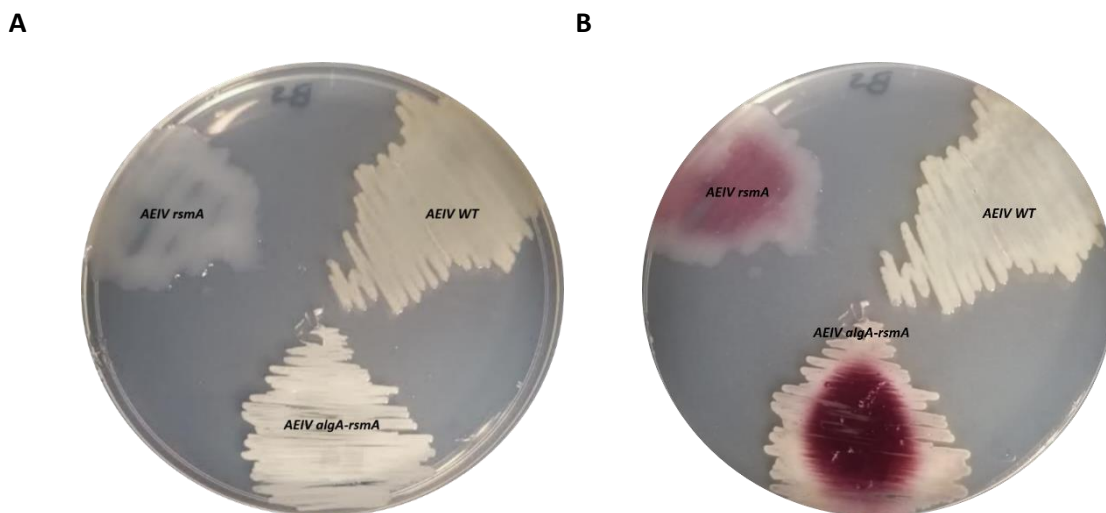
**Figura 22. Motivo consenso y estructura formada por la unión de RsmA en *arsB*.** En amarillo se muestra la secuencia consenso de reconocimiento de RsmA, en morado el sitio de inicio de transcripción. Tomada de *López, 2018*.

En resumen, a pesar de que las mutaciones evaluadas no presentaron una mejora aumentando producción volumétrica, la mutación con *rsmA* inactivado presentó los mejores resultados en cuestión de producción específica al aumentar 5 veces la concentración de alquilresorcinoles producidos tanto en células vegetativas como en células enquistadas. Es por ello, que se decidió

seleccionar la cepa mutante AEIV *rsmA* para continuar buscando una combinación de inactivaciones que favorecieran a la sobreproducción de alquilresorcinoles con un efecto acumulativo.

### 7.2.1 Efecto de la inactivación de la vía de alginato y su efecto en la mutante *rsmA*.

Debido a que se quería estudiar el efecto de la inactivación de las vías de síntesis que pudieran estar compitiendo en la canalización del carbono como lo son las vías de alginato y PHB, se decidió inactivar el gen *algA* para obtener la doble mutante *algA-rsmA*. Es necesario resaltar que la inactivación de la síntesis de alginato también se consideró como una alternativa a la hiper mucoidia que presentó la mutante *rsmA*. La mutante *algA-rsmA* presentó un fenotipo no mucoso, lo cual mejoró el crecimiento, además mostró tener mayor opacidad como consecuencia de una sobreproducción de PHB e incluso aparentemente mostró una mayor producción de alquilresorcinoles al teñirse en placa (**Figura 23**). Esto se debe a que el carbono redistribuye su canalización hacia la síntesis de PHB y alquilresorcinoles al no poder sintetizar alginato, además del efecto metabólico, dado que RsmA actúa como regulador negativo del operón *phbBAC*, al estar inactivo contribuye a una sobreproducción de PHB, así como a la sobreproducción de alquilresorcinoles al no reprimir al activador ArpR.



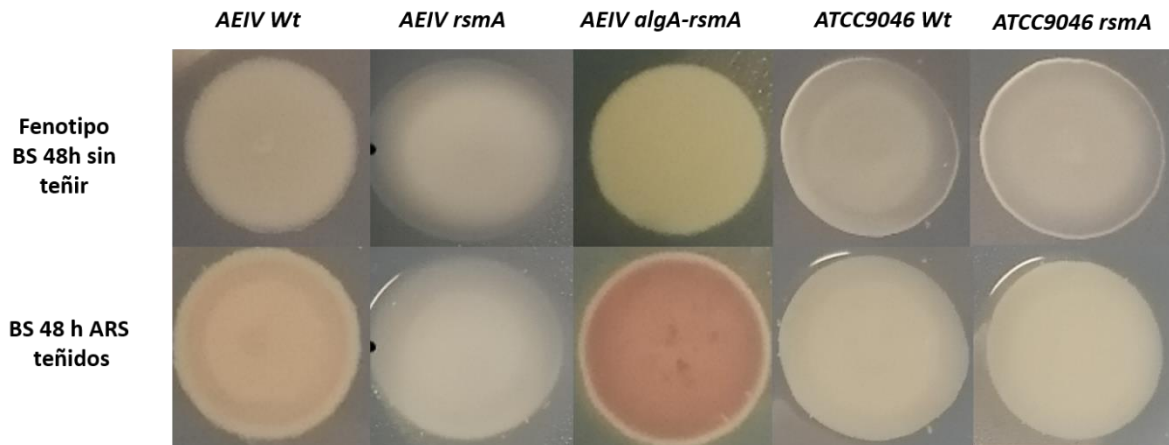
**Figura 23. Comparación del fenotipo de las mutantes *rsmA* y *algA-rsmA* en medio BS. A. Células sin teñir, B. Alquilresorcinoles teñidos.**

Dado que los fondos AEIV y ATCC9046 mostraron ser los que presentaban mayor producción de alquilresorcinoles en ambos estadios celulares (Sección 7.1) y debido a que se tuvo una desviación estadística alta en la cuantificación en BOH, con el fin de no descartar un fondo que fuera favorecedor para la producción de alquilresorcinoles al inactivar *rsmA*. Se evaluaron las cepas ATCC9046, ATCC9046 *rsmA*, AEIV, AEIV *rsmA* y también se decidió incluir la doble mutante AEIV *algA-rsmA* para determinar si la inactivación de la síntesis de alginato promovía un efecto acumulativo en la producción de alquilresorcinoles.

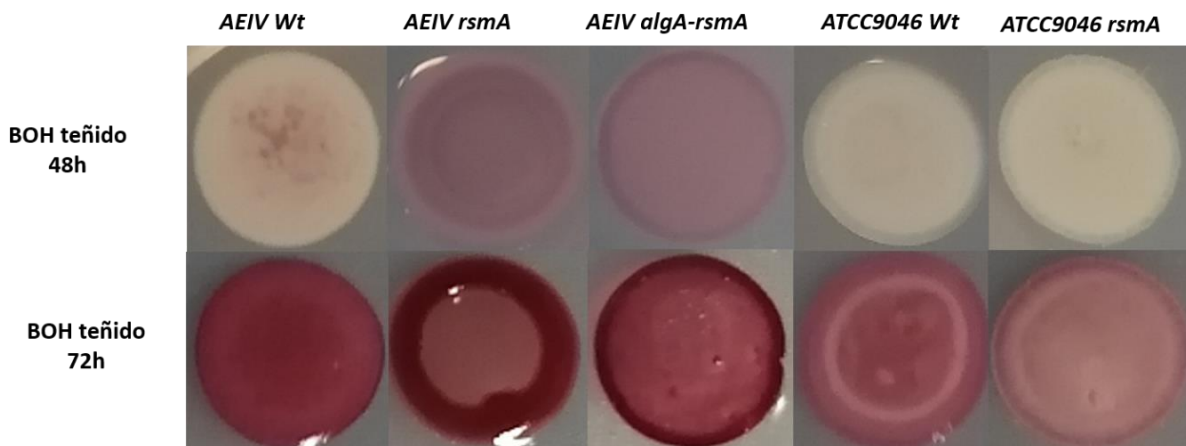
Primero se realizó una prueba cualitativa, donde se observó que el efecto de la inactivación de *rsmA* presentó diferente fenotipo entre ambos fondos (**Figura 24A**), es decir, en el fondo AEIV la mutante *rsmA* tuvo un fenotipo distinto a la silvestre por su sobre producción de alginato mientras que en el fondo de la ATCC9046 no se observó una sobreproducción del polímero en la mutante ATCC9046

*rsmA*. Cabe destacar que, al realizar la tinción de las placas a las 48 horas en medio BS, la mutante AEIV *algA-rsmA* tuvo la mayor concentración de alquilresorcinoles y algo que no se esperaba fue que en medio Burk Butanol a las 48 horas las cepas ATCC9046 y ATCC9046 *rsmA* no mostraron tinción (**Figura 24B**) sino que hasta las 72 horas se observó producción de los alquilresorcinoles, sin embargo; fue menor que las mutantes en el fondo AEIV.

**A) Medio vegetativo (BS)**



**B) Medio de enquistamiento (BOH)**

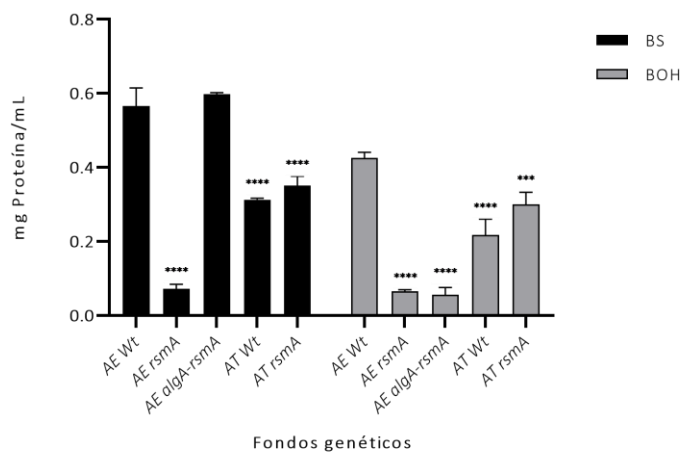


**Figura 24. Tinción de alquilresorcinoles en mutantes *rsmA* en dos fondos genéticos distintos. A. Medio Burk Sacarosa 48h, B. Medio Burk Butanol 48h & 72h.**

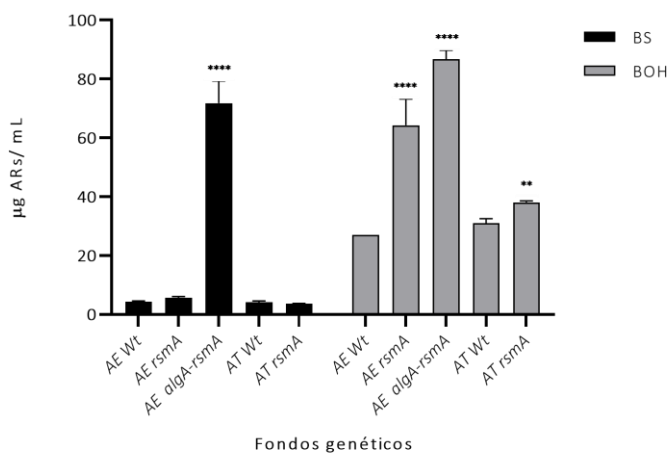
Posteriormente, se cuantificó la proteína y alquilresorcinoles de cultivos líquidos en medio vegetativo (BS) y medio de enquistamiento (BOH) con 72 horas de incubación. Se observó que el efecto de la inactivación de la vía de síntesis de alginato mejoró el crecimiento en la doble mutante AEIV *algA-rsmA* en BS (**Figura 25A**), sin embargo; en células enquistadas se observó una disminución en la proteína. Por otro lado, la producción volumétrica de alquilresorcinoles en la mutante *algA-rsmA* aumentó considerablemente a 71.753µg/mL en BS superando la producción de las células enquistadas de la mutante sencilla *rsmA* (**Figura 25B**) mientras que específicamente se obtuvo una producción de 120.55µg/mg de proteína en BS para la doble mutante que es 1.5 veces más que la mutante *rsmA* (**Figura 25C**). Cabe destacar que en ambos fondos se presentaron aumentos en la producción de alquilresorcinoles al inactivar *rsmA*; sin embargo, el fondo AEIV mostró ser favorecedor.



### A) Crecimiento



### B) Producción volumétrica



### C) Producción específica

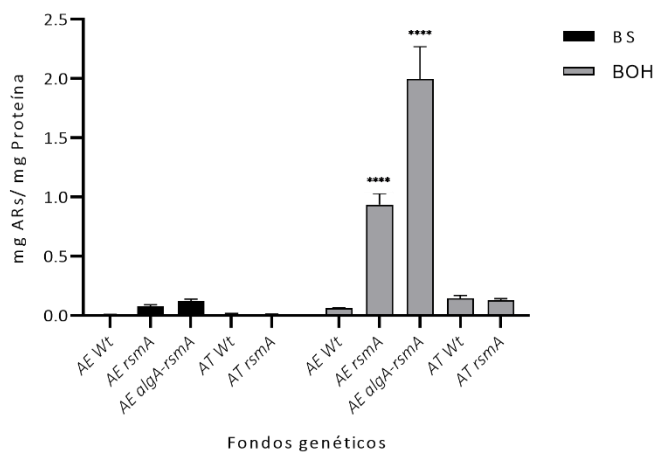


Figura 25. Producción de alquilresorcinolos en cultivos líquidos de 72 h en mutantes *rsmA* de los fondos AEIV y ATCC9046. A. Crecimiento, B. Producción volumétrica, C. Producción específica.

Con el propósito de comparar las unidades en las que se reporta la producción de alquilresorcinoles de *A. vinelandii* con otras fuentes biológicas, también se cuantificó la masa seca y los alquilresorcinoles de las respectivas muestras en ambas condiciones. Para la cepa AEIV silvestre se obtuvieron valores de 2.916 y 19.817  $\mu\text{g}$  de alquilresorcinoles  $\text{mg}^{-1}$  de masa seca, mientras que para la cepa ATCC9046 se obtuvieron valores de 5.208 y 13.700  $\mu\text{g}$  alquilresorcinoles  $\text{mg}^{-1}$  de masa seca en medio BS y BOH respectivamente. Sigue siendo evidente que la inactivación de *rsmA* en el fondo AEIV es más efectivo para la sobreproducción de alquilresorcinoles que en el fondo ATCC9046, ya que en la producción volumétrica la mutante AEIV *rsmA* tuvo 2.19 veces más alquilresorcinoles (Tabla 11).

Tabla 11. Producción de alquilresorcinoles normalizada con masa seca.

Fondo genético	Masa seca (mg/ml)		Producción volumétrica ( $\mu\text{g}$ ARs/ml)		Producción específica ( $\mu\text{g}$ ARs/mg masa seca)	
	BS	BOH	BS	BOH	BS	BOH
AEIV	1.37	1.067	3.98	20.05	2.91	19.81
AEIV <i>rsmA</i>	0.58	2	8.96	46.96	15.40	23.48
AEIV <i>algA-rsmA</i>	6.68	2.233	70.33	71.65	10.54	32.19
ATCC9046	0.73	2	4.08	22.86	5.20	13.70
ATCC9046 <i>rsmA</i>	1.09	1.767	2.76	29.03	2.53	16.49

Con estos resultados se podría decir que la eliminación de la síntesis de alginato en conjunto con la inactivación del regulador negativo RsmA, permitió obtener una cepa con mayor producción de alquilresorcinoles y con muy buen crecimiento, facilitando su cultivo.

Comparando estos últimos datos con las concentraciones de otras fuentes biológicas (Tabla 12), se podría decir que las bacterias del género *Azotobacter* también son fuentes ricas en alquilresorcinoles y hasta el momento para la especie *A. vinelandii* con las mutantes *rsmA* y *algA-rsmA* se obtuvieron cepas con producción superior a las fuentes ricas como los cereales integrales y sin la necesidad de inducir el enquistamiento de las células

Tabla 12. Comparación de producción de alquilresorcinoles con mutantes obtenidas.

Fuente	[ $\mu\text{g}$ ARs/mg masa seca]	Información extra
Centeno	0.360-3.200	-
Trigo	0.312-1.010	-
Cebada	0.044-0.500	-
Mijo	0.100	-
<i>Apatococcus constipatus</i>	0.002-0.057	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	0.2-0.8	72 h de cultivo en King's Broth con sacarosa
<i>Azotobacter chroococcum</i>	2.300-56.200	72h de cultivo en Burk glucosa 0.9%
<i>A. vinelandii</i> AEIV	2.9166	72h de cultivo en Burk sacarosa 2%
<i>A. vinelandii</i> AEIV <i>rsmA</i>	15.4013	
<i>A. vinelandii</i> AEIV <i>algA-rsmA</i>	10.546	



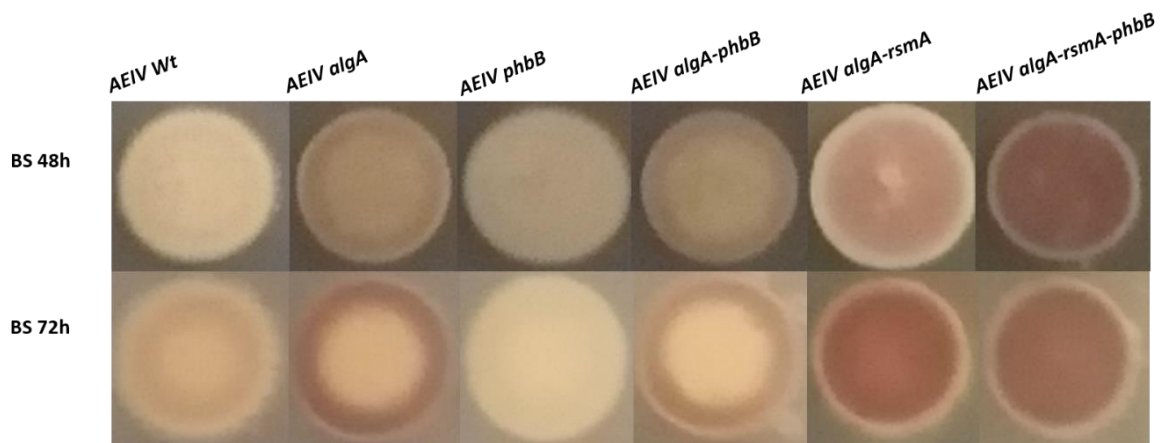
### 7.3 Efecto en la producción de alquilresorcinoles al inactivar las vías de síntesis de los biopolímeros alginato y PHB.

#### 7.3.1 Inactivación de la vía de síntesis de PHB

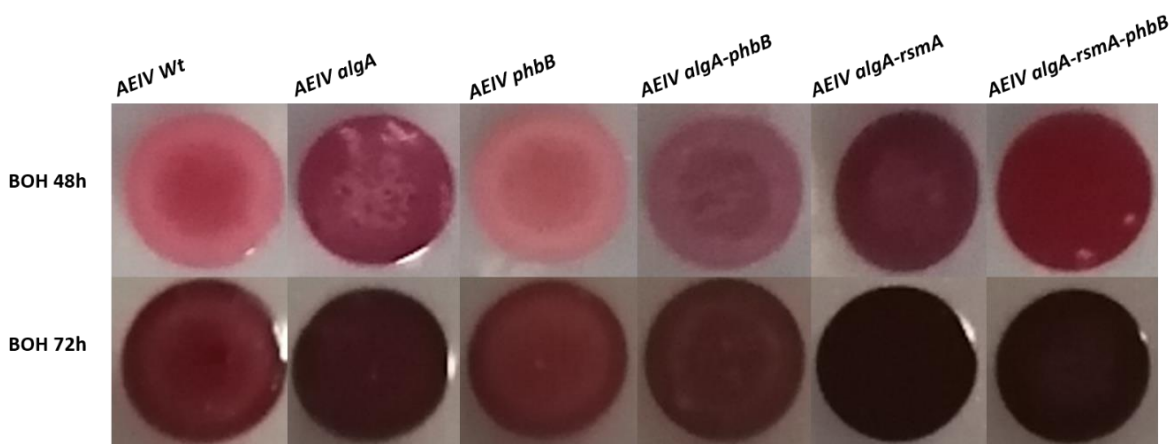
Debido a que se cuenta con el antecedente de que la inactivación del gen *phbB* del operón *phbBAC* afecta positivamente la síntesis de alquilresorcinoles y al no contar con esta mutante en el fondo AEIV, se procedió a construirla. Se obtuvieron las mutantes *phbB*, *algA-phbB* y *algA-rsmA-phbB* para evaluar la producción de alquilresorcinoles en cepas no productoras de alginato ni de PHB en combinación con la inactivación del regulador RsmA. Al ser el PHB un metabolito mayoritario en la fase estacionaria de las células vegetativas y siendo componentes de los quistes, se esperaba que la inactivación de la síntesis este polímero tuviera un efecto acumulativo en la producción de alquilresorcinoles, especialmente en la triple mutante *algA-rsmA-phbB* por el posible aumento de acetoacetyl-CoA.

La evaluación de la producción de alquilresorcinoles en AEIV silvestre, *algA*, *phbB*, *algA-phbB*, *algA-rsmA* y *algA-rsmA-phbB*, por tinción de sus colonias crecidas en cajas petri, mostró que las cepas con mayor concentración de alquilresorcinoles en células vegetativas y quistes a las 48h y 72h fueron *algA-rsmA* y *algA-rsmA-phbB* (**Figura 26A & B**), sin embargo; también se observó que la inactivación de *algA* fue más favorecedora que la de *phbB*, ya que ésta no mostró tener un efecto en producción de alquilresorcinoles como se esperaba (**Figura 26A**).

#### A) Medio vegetativo (BS)



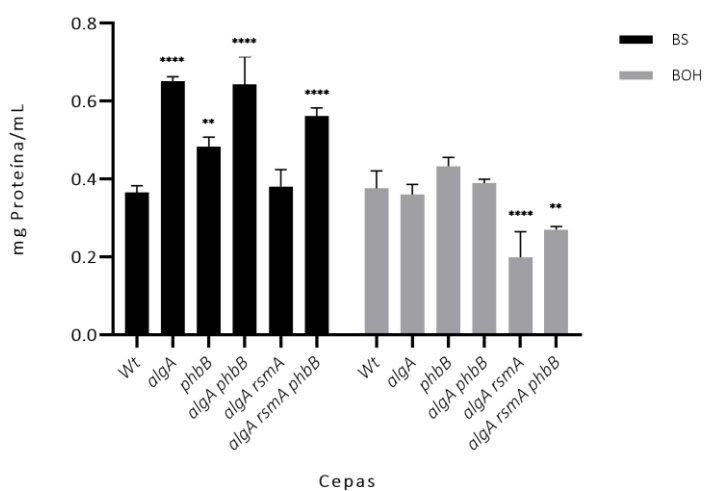
## B) Medio de enquistamiento



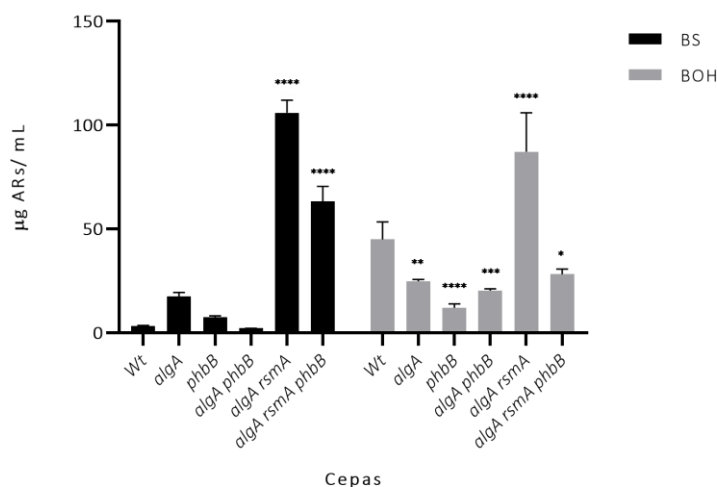
**Figura 26. Tinción de alquilresorcinoles en cepas no productoras de los polímeros PHB y alginato.** A. Medio BS 48 & 72 h, B. Medio Burk Butanol 48 & 72h.

Una vez que se cuantificaron los alquilresorcinoles y el crecimiento (proteína) de los cultivos ya en medio líquido, se observó que la inactivación de *phbB* en la mutante sencilla, mejoró el crecimiento de los cultivos (**Figura 27A**), sin embargo; no hubo efecto del bloqueo en la síntesis de PHB en combinación con las mutaciones *algA* y *algA-rsmA*, pues éstas mostraron un crecimiento menor o semejante al obtenido con la mutación *algA*. En cuanto a la producción de alquilresorcinoles tanto volumétrica como específica, no se obtuvo el efecto esperado, ya que la doble mutante *algA-phbB* tuvo producciones de 2.12 y 20.29  $\mu\text{g}/\text{mL}$  que fueron menores que las de la mutante sencilla *algA* e incluso que la cepa silvestre (**Figura 27B**), mientras que la triple mutante *algA-rsmA-phbB* también disminuyó su producción con respecto a la doble *algA-rsmA*, teniendo una producción de 63.369 $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 110.46  $\mu\text{g}$  alquilresorcinoles/mg proteína en BS (**Figura 27C**).

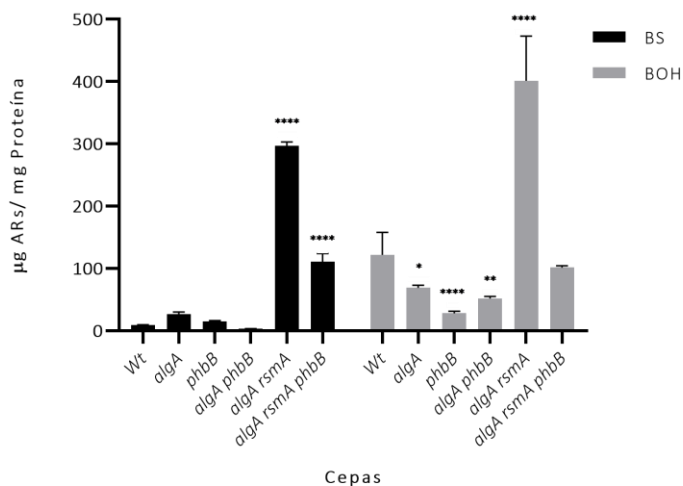
## A) Crecimiento



## B) Producción volumétrica



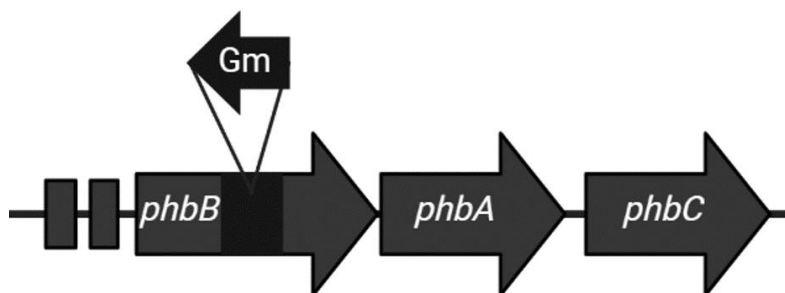
## C) Producción específica



**Figura 27. Producción de alquilresorcinolos a las 72h en medio BS y BOH de cepas no productoras de los polímeros PHB y alginato. A. Crecimiento, B. Producción volumétrica & C. Producción específica.**

En general se observó un efecto negativo de la inactivación del gen *phbB* sobre la producción de alquilresorcinolos. Es posible que esto se deba al tipo de inserción realizada en *phbB*. Este gen encabeza el operón biosintético de PHB *phbBAC*, y el casete de gentamicina se insertó en sentido contrario a la transcripción de estos genes (**Figura 28**). Esto tendría efectos polares negativos sobre la expresión de los genes *phbA* y *phbC* evitando tener una acumulación del intermediario acetoacetyl-CoA (producto de la reacción catalizada por la cetotiolasa PhbA), y este es el coinductor utilizado por el activador ArpR (Romero, 2013) por esta vía. No obstante, a pesar de este inconveniente se concluyó que la inactivación en conjunto de *algA* y *rsmA* fue la mejor combinación

para obtener una cepa capaz de sobreproducir alquilresorcinoles sin la necesidad de inducir las células a enquistamiento.

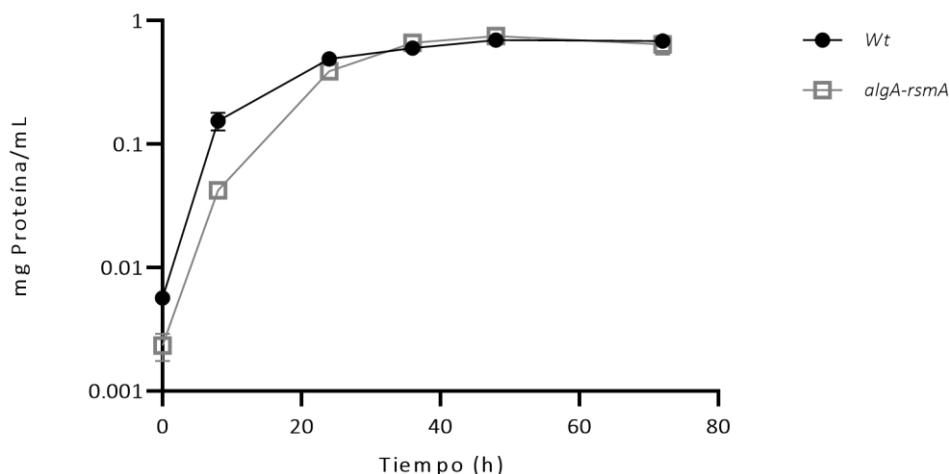


**Figura 28. Sentido de la inactivación del gen *phbB* con resistencia a gentamicina.** Sentido del gen *phbB* de derecha a izquierda y de la resistencia en sentido contrario respecto al gen.

#### 7.4 Caracterización de la doble mutante *algA-rsmA*

Debido a su sobreproducción de alquilresorcinoles sin necesidad de inducir enquistamiento, se decidió caracterizar la cepa *algA-rsmA* en una cinética con la finalidad de observar el comportamiento de crecimiento, síntesis de alquilresorcinoles y PHB, para determinar los rendimientos de producción respecto al consumo de la fuente de carbono (sacarosa 2%).

Al medir el crecimiento de la mutante con respecto a la silvestre (**Figura 29**), se observó que la doble mutante alcanzó un crecimiento semejante con velocidad de crecimiento similar a pesar de que los inóculos no fueron iguales, pero a partir de las 24 horas alcanzó el mismo nivel de proteína que la cepa silvestre. Esto muestra que al inactivar la síntesis de alginato contrarrestó el efecto negativo en el crecimiento ocasionado por la inactivación de *rsmA* y permitió que la doble mutante *algA-rsmA* tuviera un crecimiento similar a la cepa silvestre además de que mejoró la producción volumétrica de alquilresorcinoles.

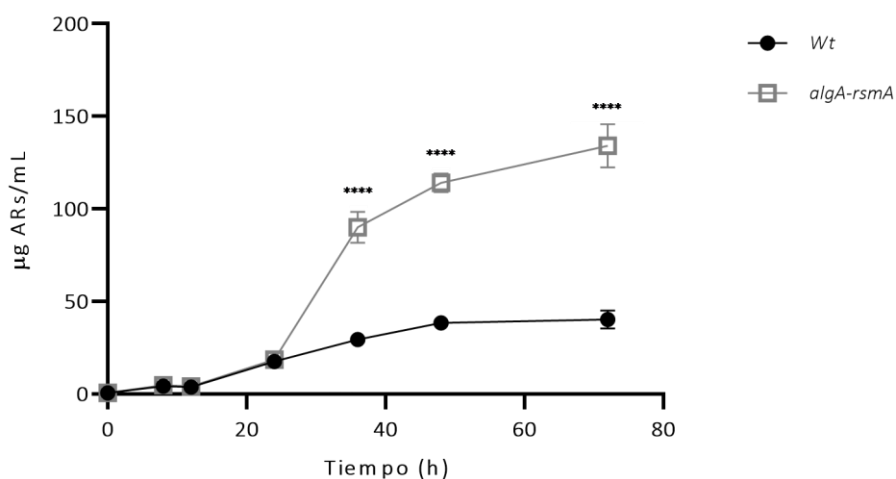


**Figura 29. Cinética de crecimiento de las cepas AEIV y *algA-rsmA* en medio BS.**

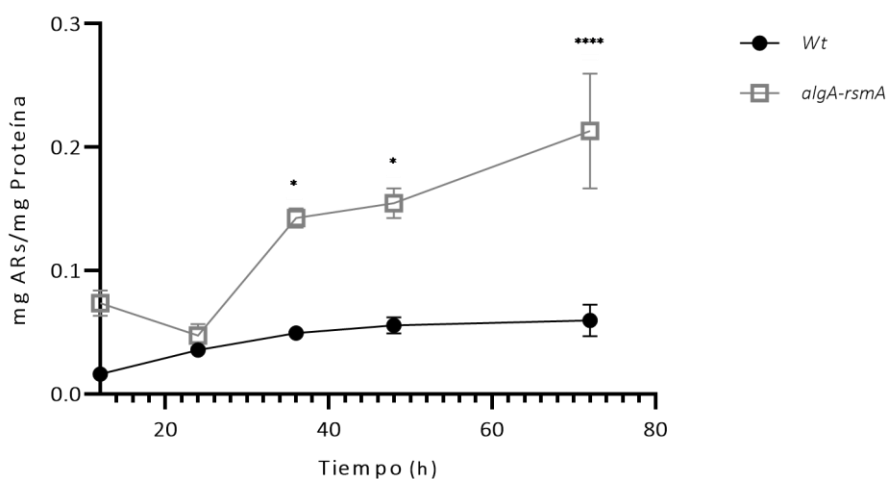
En cuanto a la producción de alquilresorcinoles, se observó que existe una diferencia significativa entre ambas cepas a partir de las 36 horas. Volumétricamente la doble mutante presentó una

producción aproximadamente 3 veces más alta, con una concentración máxima de 134.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mientras que la silvestre alcanzó una producción de 40.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (**Figura 30A**). Así mismo, y como un resultado favorable, la producción específica de la doble mutante alcanzó una concentración de 213  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína (**Figura 30B**), la cual ha sido la mayor producción de alquilresorcinoles para *A. vinelandii* reportada, mientras que la cepa silvestre alcanzó una producción de 59.6  $\mu\text{g}/\text{mg}$ . Estos resultados sugieren que la cepa *algA-rsmA* tiene potencial para producir alquilresorcinoles aplicados como antifúngicos en el control fitopatógenos sin necesidad de inducción de enquistamiento, ya que esto resultaría inconveniente por la necesidad de transferir las células a medio inductor con butanol sin carbohidratos.

#### A) Producción volumétrica de alquilresorcinoles



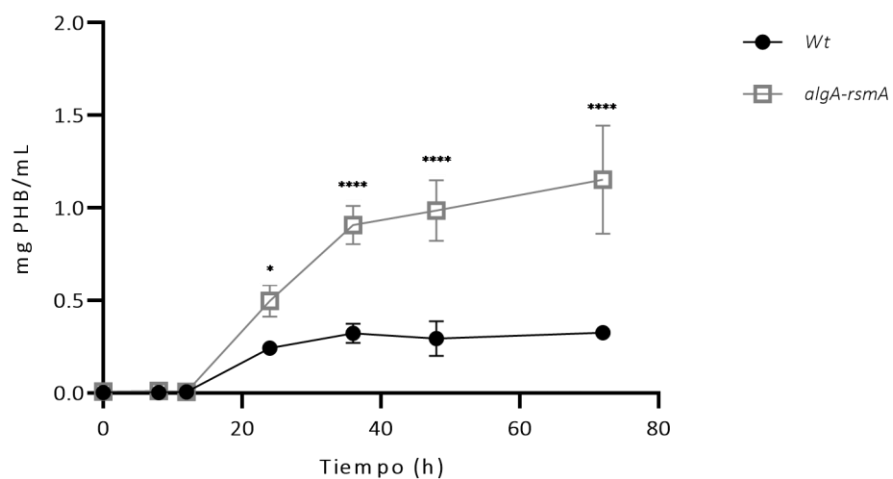
#### B) Producción específica de alquilresorcinoles



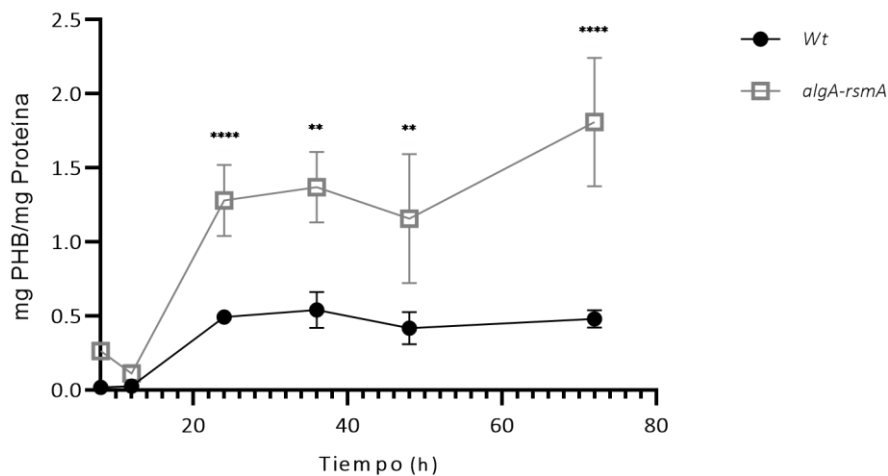
**Figura 30. Producción de alquilresorcinoles en las cepas AEIV *Wt* y *algA-rsmA*. A. Producción volumétrica & B. Producción específica.**

También se cuantificó la producción de PHB, ya que la doble mutante presentó una sobreproducción de este polímero, con la finalidad de conocer la cantidad de carbono consumido que se destina a este. La producción volumétrica de PHB fue significativa desde las 24 horas de cultivo alcanzando una concentración máxima de 1.15 mg/mL a las 72 horas para *algA-rsmA* mientras que la silvestre alcanzó una concentración de 0.32 mg/mL teniendo una diferencia de 3.5 veces menos producción (**Figura 31A**). Por otro lado, la producción específica de la mutante alcanzó una concentración de 1.80 mg/mg de proteína mientras que la silvestre produjo 0.480 mg/mg de proteína (**Figura 31B**). Este resultado muestra que en la cepa mejorada una cantidad significativa del carbono se desvía hacia la producción del polímero de reserva, lo que representa un inconveniente. Además de los futuros estudios con respecto a los alquilresorcinoles esta cepa mutante podría ser útil en proyectos enfocados a la producción de PHB.

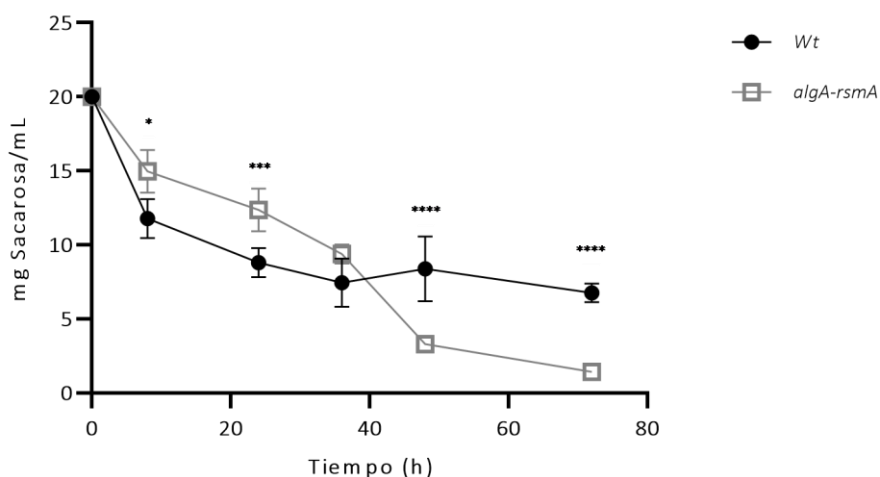
### A) Producción volumétrica de PHB



### B) Producción específica de PHB



### C) Concentración de sacarosa en el medio

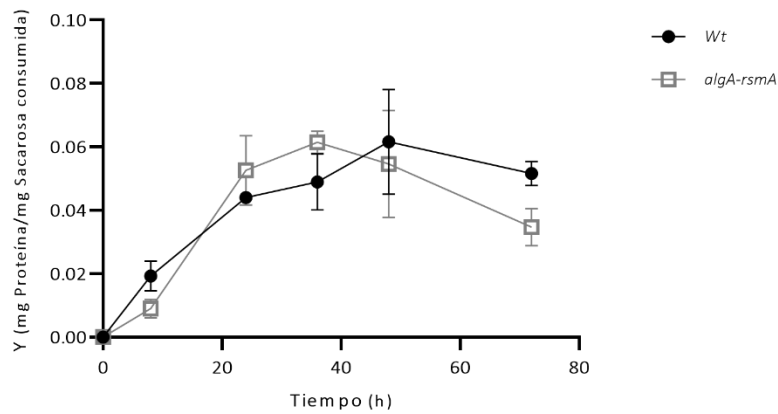


**Figura 31. Producción de PHB en las cepas AEIV y *algA-rsmA*.** A. Producción volumétrica & B. Producción específica.

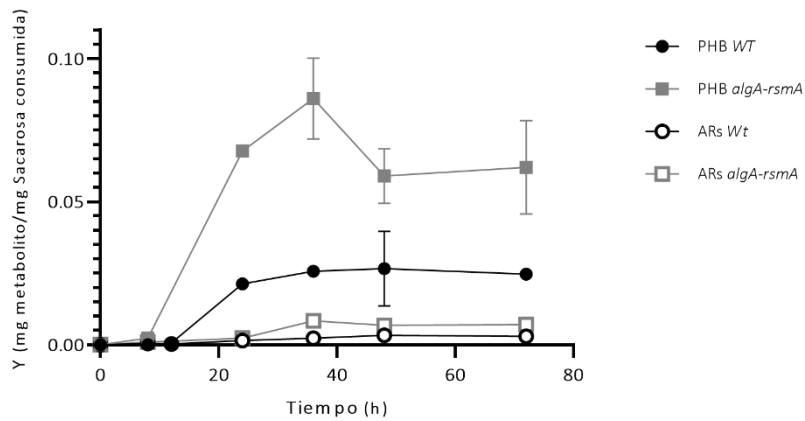
Con la finalidad de determinar los rendimientos de alquilresorcinoles con respecto al consumo de sacarosa, se cuantificó la sacarosa del sobrenadante de cada tiempo. En la **Figura 32C**, se puede observar cómo la concentración inicial de sacarosa del medio va disminuyendo, la cepa *algA-rsmA* consumió el 92.9 % de la fuente de carbono, dejando disponible sólo 1.42 mg/mL mientras que la cepa silvestre sólo llegó a consumir el 66.24 % (13.24 mg/mL) de 20 mg/mL. Esto puede deberse a la sobreproducción de PHB que presentó la doble mutante y a la sobreproducción de alquilresorcinoles que se incrementó 3 veces más.

En cuanto a los rendimientos de proteína, PHB y alquilresorcinoles de acuerdo a los miligramos de sacarosa consumida, se pudo observar el requerimiento de la fuente de carbono para el crecimiento celular con un rendimiento de 0.051 mg proteína/mg sacarosa consumida para la cepa silvestre y para la doble mutante un rendimiento de 0.034mg proteína/mg de sacarosa consumida (**Figura 32A**). No obstante, al obtener los rendimientos de PHB y alquilresorcinoles es notable que la preferencia del uso de carbono es para la síntesis del polímero (**Figura 32B**) porque se consiguieron rendimientos mayores con respecto a los de alquilresorcinoles. Para la cepa *algA-rsmA* se obtuvo un rendimiento de 0.062mg PHB/mg de sacarosa consumida, mientras que para la cepa silvestre se obtuvo uno de 0.025mg PHB/mg de sacarosa consumida, pero esto se puede atribuir a que la cepa silvestre, además de sintetizar PHB, también produce alginato, por lo que la distribución de carbono es distinta. A pesar de que la mayoría del carbono se destina en la síntesis del polímero, se observó que existe una distribución de esta fuente hacia la síntesis de alquilresorcinoles obteniendo rendimientos de 3 y 7µg/mg de sacarosa consumida en la silvestre y mutante respectivamente (**Figura 32B**), aun así, queda planteada la incógnita de qué tanto más podría aumentar la producción de alquilresorcinoles si se inactiva de manera no polar el gen *phbB*.

**A) Rendimiento de proteína por sacarosa consumida**



**B) Rendimiento de alquilresorcinolos y PHB por sacarosa consumida**



**Figura 32. Consumo de sacarosa y rendimientos.** A. Consumo de sacarosa, B. Rendimiento de crecimiento & C. Rendimiento de producción de metabolitos.

Con todos estos resultados queda claro que la sobreproducción de alquilresorcinolos no sólo se atribuye a la inactivación del represor *rsmA*, sino que por el aumento en la disposición de carbono al inactivar la síntesis de alginato, el mejor crecimiento alcanzado en ausencia del polisacárido, y posiblemente al aumentar la producción de PHB también aumentó la concentración de coinductor acetoacetyl-CoA y algunos intermediarios involucrados como malonil-CoA y acetyl-CoA (**Figura 33**).





## 8 CONCLUSIONES

- El fondo genético más adecuado para mejorar la producción de alquilresorcinoles fue AEIV, pues esta cepa presenta la mejor producción, tanto en células vegetativas como en quistes.
- El regulador que mostró tener mayor influencia en la producción de alquilresorcinoles fue el regulador RsmA. Su inactivación permitió incrementar la producción específica 3 veces. El efecto positivo ocasionado por esta inactivación tuvo el inconveniente de aumentar el flujo de carbono hacia la síntesis del polisacárido alginato, pues su biosíntesis también es regulada negativamente por RsmA.
- La inactivación de la síntesis de alginato en conjunto con la inactivación del regulador RsmA no sólo permitió mejorar el crecimiento en la cepa AEIV *algA-rsmA*, sino que permitió obtener una sobreproducción de alquilresorcinoles en células vegetativas sin necesidad de inducir el estado de enquistamiento y también aumentó la producción de PHB.
- La cepa mutante AEIV *algA-rsmA* es una fuente eficiente para la obtención de alquilresorcinoles, en comparación con otras bacterias y los cereales integrales.
- El flujo de carbono se distribuye con mayor eficiencia hacia la síntesis de alquilresorcinoles en la mutante AEIV *algA-rsmA* que en la cepa original; sin embargo, una parte considerable del carbono se dirige a la síntesis de PHB y en menor proporción a la producción de alquilresorcinoles.

## 9 PERSPECTIVAS

1. Caracterizar el mecanismo de regulación de la síntesis de alquilresorcinoles mediada por PhoB.
2. Determinar el efecto en la producción de alquilresorcinoles en la cepa mutante *phbB* no polar
3. Inactivar en sentido no polar el gen *phbB* en las cepas *AEIV* y *algA-rsmA* para comparar el efecto de la mutación sobre la producción de alquilresorcinoles.

## 10 REFERENCIAS

Ahumada C., Marínez I., Hsueh B., Guzmán J., Waters C., Zamorano D., Espín G. & Núñez C. (2020). Increased c-di-GMP levels lead to the production of alginates of high molecular mass in *A. vinelandii*. *J. Bacteriol* 202:e00134-20.

Bishop, P. E. & Brill, W. J. (1977) Genetic analysis of *A. vinelandii* mutant strains unable to fix Nitrogen. *Journal of Bacteriology* 130, 954-956.

Bolaños, A. (2015). Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos de cultivos de mango (*Mangifera indica* L.) y evaluación antifúngica de metabolitos bacterianos [Tesis de licenciatura]. Universidad Autónoma de Guerrero.

Castañeda, M., Guzmán, J., Moreno, S. & Espín, G. (2000). The GacS sensor kinase regulates alginate and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production in *A. vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 1812, 2624-2628.

Castañeda M., Sánchez, J., Moreno, S., Nuñez, C. & Espín, G. (2001). Global regulators GacA and  $\sigma^S$  form part of a cascade that controls alginate production in *A. vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 183, 6787-6793.

Castillo T., García A., Padilla-Córdova C., Díaz-Barrera A. & Peña C. (2020). Respiration in *A. vinelandii* and its relationship with the synthesis of biopolymers. *Electron J. Biotechnol* 48, 36-45.

Cazorla, F., Duckett, S., Bergstrom, E., Noreen, S., Odijk, R., Lugtenberg, B., Thomas-Oates, J., Bloemberg, G. (2006). Biocontrol of Avocado Dematophora Root Rot by antagonistic *Pseudomonas fluorescens* PCL1606 correlates with the production of 2-Hexyl-5-Propyl Resorcinol, *The American Phytopathological Society*, 19, 418-428.

Chen, H. & Du, L. (2016). Iterative polyketide biosynthesis by modular polyketide synthases in bacteria, 100, 541-557.

Chen, Y., Coughlin, J., Lim, S., Shen, B. (2009). Type I polyketide synthases that require discrete acyltransferases, 459, 165-186.

Choung, R., Murray, J., Marietta, E., Dyke, C., Ross, B. (2016). Serum alkylresorcinols as biomarkers of dietary gluten exposure in coeliac disease, *Aliment Pharmacol Therapeutics*, 45, 643-652.

Deryabin, D., Davydova, O., Gryazeva, I. (2012). Alkylresorcinols protect the dNA from UV damage in vitro and in vivo models, *Products and Applications of Biopolymers*, Ed. Dr. Johan Verbeek, ISBN: 978-953-51-0226-7.

Dmitry Deryabin, Olga Davydova & Irina Gryazeva (2012). Alkylresorcinols Protect the DNA from UV-Damage in vitro Models, *Products and Applications of Biopolymers*, dr. Johan Verbeek (Ed.), ISBN:978-953-51-0226-7, InTech.

Fidalgo, J., Deglense, PA., Arroya, R., Ravenna E., Deprez, P. (2019). 4-Heylresorcinol a new molecule for cosmetic application, *Journal of Biomolecular Research & Therapeutics*,8, 170.

Funa, N. Ozawa, H., Hirate, A., Horinouchi, s. (2006). Phenolic lipid synthesis by type III polyketide synthases is essential for cyst formation in *A. vinelandii*, *PNAS*, 103, 6356-6361.

Gardner, S. & Mcclearly, W. (2019). Control of the *phoBR* regulon in *Escherichia coli*. *EcoSal Plus 2019*; doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2019.

Gubernator, J., Stasiuk, M., Kozubek, A. (1999). Dual effect of alkylresorcinols, natural amphiphilic compounds, upon liposomal permeability, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1418, 253-260.

González, Y., Mez, J., González, O. & Córdoba, J. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: Plásticos de origen microbiano. *Revista internacional de Contaminación Ambiental*, 29(1), 77-115.

Heeb, S. & Haas, D.(2001). Regulatory roles of the *GacS/GacA* two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria, (14)12, 1351-1363.

Hernández, A., Moreno, S., Castellanos, M., Castañeda, M., Nuñez, C., Muriel, L.& Espín, G.(2012). *RsmA* post-transcriptionally controls *PhbR* expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *A. vinelandii*. *Microbiology*, 159, 1953-1963.

Hertweck, C., Luzhetskyy, A., Rebets, Y., Bechthold, A. (2006). Type II polyketide synthases: gaining a deeper insight into enzymatic teamwork, 24,162-190.

Kozubek, A. (1987). The effect of 5-(*n*-alk(en)yl)resorcinols on membranes, *Acta Biochimica Polonica*, 34, 357-367.

Kozubek, A. (1999). Resorcinolic lipids, the natural non-isoprenoid phenolic amphiphiles and their biological activity, 99, 1-25.

Kozubek, A., Pietr, S., Czerwonka A. (1996). Alkylresorcinols are abundant lipid components in different strains of *Azotobacter chroococcum* and *Pseudomonas* spp. *Journal of Bacteriology*, 178, 4027-4030.

Lamarche, M., Wanner, B. Crépin, S., Harel, J. (2007). The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis, *FEMS Microbiology*, 32, 461-473.

Law, J. & Slepecky, R. (1960). Assay of  $\beta$ -hydroxybutyric acid. *J. Bacteriol.* 82, 33.36.

Lin, L., Sadoff, H. (1968). Encystment and polymer production by *A. vinelandii* in presence of  $\beta$ -hidroxibutyrate, *Journal of Bacteriology*, 97, 2336-2343.

López, L. (2018). *Búsqueda de sitios consenso de unión de la proteína RsmA a regiones intergénicas del genoma de A. vinelandii UW. [Tesis de maestría]. Universidad Benemérita de Puebla.*

Lüttmann D., Göpel, Y. & Görke, B. (2012). *The phosphotransferase protein EIIA<sup>Ntr</sup> modulates the phosphate starvation response through interaction with histidin PhoR in Escherichia coli, Molecular microbiology 86(1), 96-119.*

Maddocks, S. & Oyston P. (2008). *Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. Microbiology, 154, 30609-3623.*

Miller, G.(1959). *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31(3), 426-428.*

Mulyukin, A., Kozlova, N., Kaprel'yants, A., Registan, G. (1996). *The d1 autoregulatory factor in Micrococcus luteus cells and culture liquid: detection and accumulation dynamics, Microbiology, 61, 20-25.*

Muriel, L., Moreno, S., Romero, Y., Bedoya, L., Castañeda, M., Segura, D., Espín, G. (2016). *The unphosphorylated EIIA<sup>Ntr</sup> protein represses the synthesis of alkylresorcinols in A. vinelandii, PLoS ONE, 10(2): e0117184*

Nikolaev, Y., Mulyukin, A., Stepanenko, Y., Registan, G. (2006). *Autoregulation of stress response in microorganisms, Microbiology, 75, 420-426.*

Nikolaev, Y., Tutel'yan, A., Loiko, N., Buck, J., Sidorenko, S., Lazareva, I. (2020). *The use of 4-hexylresorcinol as antibiotic adjuvant. PLoS ONE 15(9):e0239147.*

Olache, P. (2021). *Estudio in vitro e in vivo de la relación entre las proteínas EIIA<sup>Ntr</sup> y RsmA de A. vinelandii. [Tesis de licenciatura]. Universidad Autónoma de México.*

Patzke, H. & Schieber, A. (2018). *Growth-inhibitory activity of phenolic compounds applied in an emulsifiable concentrate-ferulic acid as natural pesticide against Botrytis cinerea, Food Research International, 113, 18-23.*

Peña, C., Castillo, T., García, A., Millán, M., Segura, D. (2014). *Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): a review of recent research work, Microbial Biotechnology, 7, 278-293.*

Pflüger-Grau, K. & Görke, B. (2010). *Regulatory roles of the bacterial nitrogen-related phosphotransferase system, Trend in Microbiology, 19, 205-214.*

Pflüger-Grau, K. & Lorenzo, V. (2014). *From the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system to selfish metabolism: a story retraced in Pseudomonas putida, FEMS Microbiol Lett, 356,144-153.*

Raja, K. et al. *Cosmeceuticals and Active Compounds, Third Edition. CRC Press. 71-79 (2015).*

Registan, G., Mulyukin, A., Nikolaev, Y., Suzina, N., Gal'chenko, V., Duda, V. (2006). Adaptogenic Functions of extracellular autoregulators of microorganisms, *Microbiology*, 75, 380-389.

Reiss, J. (1989). Influence of alkylresorcinols from rye and related compounds on the growth of food-borne molds, *Cereal Chem.*, 66, 491-493.

Rejman, J., Kozubek, A. (2004). The effect of alkylresorcinol on lipid metabolism in *Azotobacter chroococcum*, *Naturforsch*, 59, 393-398.

Reusch, R., Sadoff, H. (1979). 5-n-alkylresorcinols from encysting *A. vinelandii*: Isolation and characterization, *Journal of Bacteriology*, 139, 448-453.

Reusch, R., Sadoff, H. (1981). Lipid Metabolism during encystment of *A. vinelandii*, *Journal of bacteriology*, 145, 889-895.

Reusch, R., Sadoff, H. (1983). Novel lipid components of the *A. vinelandii* cyst membrane, *Nature*, 302, 268-270.

Romero, Y. (2008). Regulación de la expresión genética de *arsA* en *A. vinelandii*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 1-85.

Romero, Y. (2013). Regulación de la expresión de los genes de biosíntesis de alquilresorcinoles por los sistemas *Gac*, *Rsm*, el factor sigma *RpoS* y el regulador transcripcional *ArpR* en *A. vinelandii*. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. 1-82.

Romero Y., Moreno, S., Guzmán, J., Espín, G., Segura, D. (2013). Sigma factor *RpoS* controls alkylresorcinol synthesis through *ArpR*, a *LysR*-type regulatory protein, during encystment of *A. vinelandii*, *Journal of Bacteriology*, 195, 1834-1844.

Romero, Y., Guzmán, J., Moreno, S., Cocotl, M., Vences, M., Castañeda, M., Espín, G., Segura, D. (2016). The *GacS/A-RsmA* signal transduction pathway controls the synthesis of alkylresorcinol lipids that replace membrane phospholipids during encystment of *A. vinelandii* SW136, *PLoS ONE* 11(4): e0153266.

Ross, A., Shepherd, M., Schüpphaus, M., Sinclair, V., Alfaro, B., Kamal-Eldin, A., Aman, P. (2003). Alkylresorcinols in cereals and cereal products, *Journal of Agricultural and food chemistry*, 51, 4111-4118.

Ross, A., Kamal-Eldin, A., Aman, P. (2004). Dietary alkylresorcinols: Absorption, bioactives, and possible use as biomarkers of whole-grain wheat-and rye-rich foods, *Nutrition Reviews*, 62, 81-95.

Sampietro, D., Belizán, M., Vattuone, M., Catalán C. (2013). Alkylresorcinols: Chemical properties, methods of analysis and potential uses in food, industry and plant protection, *Natural Antioxidants and Biocides from Wild Medicinal Plants*, 148-166.

Santos, F. (2015). *The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria*, *Frontiers in Microbiology*, 6:402. Doi: 10.3389/fmicb.2015.00402

Satou, R., Miyanaga, A., Ozawa, H., Funa, N., Katsuyama, Y., Miyazono, K., Tanokura, M., Ohnishi, Y., Horinouchi, S. (2013). *Structural basis for cyclization specificity of two Azotobacter type III polyketide synthases*, *The Journal of Biological Chemistry*, 288, 34146-34157.

Segura, D., Cruz, T., Espín, G. (2003). *Encystment and alkylresorcinol production by A. vinelandii strains impaired in poly- $\beta$ -hydroxybutyrate synthesis*, 179, 437-443.

Segura D, Vite O, Romero Y, Moreno S, Castañeda M, Espín G. (2009). *Isolation and characterization of A. vinelandii mutants impaired in alkylresorcinol synthesis: Alkylresorcinols are not essential for cysts desiccation resistance*. *J Bacteriol*, 191:3142–3148

Stasiuk, M. & Kozubek, A. (2010). *Biological activity of phenolic lipids*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, 841-860.

Stepanenko, I., Mulyukin, A., Kozlova, A., Nikolaev, Y., Registan, G. (2005). *Role of alkylhydroxybenzenes in the adaptation of Micrococcus luteus to heat shock*, *Micribiology*, 74, 20-26.

Tahir I., Ahmadi-Afzadi M., Nybom H. & Dey S. (2014). *Rye Bran alkylresorcinols inhibit growth of Penicillium expansum and Neofabraea perennans in vitro and in vivo on different apple cultivars*. *Europ. J. Hort. Sci.* 79(4), 218-225.

Timmermans, J., Van Melder, L. (2010). *Post transcriptional global regulation by CsrA in bacteria*, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, 2897-2908.

Trejo, A., Moreno, S., Cocotl, M., Espín, G. (2017). *GacA regulates the PTS<sup>Ntr</sup>-dependent control of cyst formation in A. vinelandii*, *FEMS Microbiology Letters*, 364, 2-7.

Vershinina, O. & Znamenskaya, L. (2002). *The Pho regulons of bacteria*. *Microbiology*, 71(5), 497-511.

Vite, O. (2003). *Identificación y caracterización de genes involucrados en la síntesis de lípidos alquilresorcinoles en A. vinelandii*. *Tesis de Licenciatura*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 1-52.

Yu, D., Xu, F., Zeng, J., Zhan, J. (2012). *Type III Polyketide synthases in natural product biosynthesis*. *Life*, 64, 285-295.

Zarnowska, E., Zarnowki, R., Kozubek, A. (2000). *Alkylresorcinols in fruit pulp and leaves of Ginkgo biloba L.* *Z. Naturforsch*, 55, 881-885.



Zarnowski, R., Kozubek, A., Pietr, S. (1999). *Effect of rye 5-n-alkylresorcinols on in vitro growth of phytopathogenic Fusarium and Rhizoctonia Fungi*, *Bulletin of the polish academy of sciences biological sciences*, 47.

Zarnowski, R., Suzuki, Y., Esumi, Y., Pietr, S. (2000). *5-n-Alkylresorcinols from the Green microalga Apatococcus constipatus*, *Phytochemistry*, 55, 975-977.

Zarnowski, R., Suzuki, Y., Zarnowska, E., Esumi, Y., Kozubek, A., Pietr, S. (2004). *5-n-alkylresorcinols from the nitrogen fixing soil bacterium Azotobacter chroococcum Az12*, *Z. Naturforsch*, 59, 318-320.

Zhang, Z., Pan, H., Tang, G. (2017). *New insights into bacterial type II polyketide biosynthesis*.