



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

INGENIERÍA METABÓLICA DE *Escherichia coli* PARA LA PRODUCCIÓN DE (R)-3-HIDROXIBUTIRATO AUMENTANDO LA DISPONIBILIDAD DE NADPH

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

MAURICIO GARCÍA BENÍTEZ

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Alfredo Martínez Jiménez

Instituto de Biotecnología – Universidad Nacional Autónoma de México

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Cinthia Ernestina Núñez López

Instituto de Biotecnología – Universidad Nacional Autónoma de México

Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán

Instituto de Biotecnología – Universidad Nacional Autónoma de México

MÉXICO, D. F. ENERO, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

Para la realización del mismo se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca CONACyT con No. de registro: 298421 y de la Universidad Nacional Autónoma de México a través del proyecto DGAPA/PAPIIT/UNAM IT201414.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Dra. Cinthia Ernestina Núñez López	Instituto de Biotecnología/UNAM
Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán	Instituto de Biotecnología/UNAM
Dr. Alfredo Martínez Jiménez	Instituto de Biotecnología/UNAM

MIEMBROS DEL JURADO

Presidente	Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo	Instituto de Biotecnología/UNAM
Secretario	Dra. Katy Juárez López	Instituto de Biotecnología/UNAM
Vocal	Dr. Humberto Flores Soto	Instituto de Biotecnología/UNAM
Vocal	Dr. Ricardo Oropeza Navarro	Instituto de Biotecnología/UNAM
Vocal	Dr. Luis Caspeta Guadarrama	Centro de Investigación en Biotecnología/ UAEM

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer al Dr. Alfredo Martínez Jiménez por la oportunidad que me otorgó de aprender acerca del área que me apasiona, la ingeniería metabólica. También de por su paciencia y su guía en mi crecimiento académico. Es un excelente investigador y una gran persona que tengo en gran estima

Al comité tutorial comprendido por la Dra. Cinthia Núñez López y el Dr. Víctor Humberto Bustamante, por su apoyo y consejos en el desarrollo del proyecto.

Me gustaría agradecer por el apoyo técnico y metodológico en las diversas etapas del desarrollo del proyecto a todas las personas involucradas: Dr. Guillermo Gosset Lagarda, Dr. Adelfo Escalante Lozada, Q.I. Luz María Martínez Mejía, M. en C. Ramón de Anda Herrera, M. en C. Georgina Hernández Chávez, C. D. Mercedes Enzaldo Cruz, Sra. Aurelia González Guzmán. Así mismo, a la Dra. Ana Alejandra Vargas Tah y al I.Q Diego Muguerza Medina por la obtención de las cepas AV11 y AV14, respectivamente. Al grupo del Dr. Daniel Segura por la aportación del reactivo estándar para la cuantificación de (*R*)-3-hidroxitirato.

Gracias al apoyo otorgado por el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) de la UNAM, para la asistencia al XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería; cuya sede fue la ciudad de Jalisco, Guadalajara las fechas del 21 al 26 de junio del 2015.

Le agradezco a mis compañeros de laboratorio por su apoyo, por sus ideas tan creativas, por su amistad y por los momentos divertidos, que hacían olvidar un poco el estrés del posgrado.

*“Para comprender la palabra felicidad debes entenderla
como una recompensa no como un fin”*

Antoine de Sant-Exupéry

*Dedico este trabajo a las personas que me dieron la motivación
necesaria para seguir mis sueños y buscar la superación personal.*

Mi familia.

En especial a mis dos partes del corazón:

*A mi mejor amiga y compañera de vida, **Rosely**; por su apoyo
sincero y sus cálidas palabras de aliento en éste y cada momento.*

*A mi amado hijo **Elías Mauricio**; por llegar a iluminar nuestra
vida con alegría y esperanzas, cual semilla, germinando y
transformando nuestro mundo, formando juntos, un hogar...*

ÍNDICE DE CONTENIDO

Índice de Figuras.....	VII
Índice de Tablas.....	X
Abreviaturas.....	XI
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Capítulo I- Introducción.....	3
Capítulo II- Antecedentes.....	5
2.1- Los polihidroxicanoatos.....	5
2.1.1- Generalidades y propiedades.....	5
2.1.2- Síntesis del poli-3-hidroxi-3-butanato y su regulación.....	7
2.1.3: Ingeniería metabólica de <i>Escherichia coli</i> para la producción de P3HB.....	9
2.2- Los ácidos hidroxicanoicos quirales.....	13
2.2.1- Generalidades y aplicaciones del 3-hidroxi-3-butanato.....	13
2.2.2- Ingeniería metabólica para la producción de (<i>R</i>)-3-hidroxi-3-butanato.....	14
2.2.3- Producción de (<i>R</i>)-3-hidroxi-3-butanato utilizando residuos agroindustriales.....	15
2.3- Fermentación de xilosa y derivados lignocelulósicos.....	16
2.3.1- El metabolismo de la xilosa por <i>E. coli</i>	16
Justificación.....	17
Capítulo III- Hipótesis.....	18
Capítulo IV- Objetivos.....	18
Capítulo V- Materiales y Métodos.....	19
5.1- Plásmidos, cepas y técnicas de biología molecular.....	19
5.1.1- Construcción del plásmido pTrc-R3HB.....	22
5.1.2- Construcción del vector pLoxGapNopt.....	22
5.1.3- Construcción del vector pTrc-gapN-R3HB.....	23
5.1.4- Integración cromosomal de gapN en <i>E. coli</i>	24
5.1.5- Preparación y transformación de células electrocompetentes.....	24

5.2.- Condiciones y Medios de Cultivos.....	24
5.2.1- Caracterización de las cepas construidas.....	24
5.2.2- Evaluación de la producción de R3HB en matraz.....	25
5.2.3- Evaluación de la producción de R3HB en biorreactor.....	25
5.3- Determinaciones de productos y metabolitos.....	26
Capítulo VI- Resultados y Discusión	28
6.1- Construcción de vectores plasmídicos.....	28
6.2- Construcción y evaluación de las cepas mutantes en las vías fermentativas.....	29
6.2.1- Eliminación de las vías de producción de acetato e integración del gen <i>gapN</i>	29
6.2.2- Evaluación del crecimiento y de producción de acetato en matraz.....	30
6.3- Evaluación de la producción de R3HB a nivel de matraz.....	32
6.4- Evaluación de la producción de R3HB a nivel de biorreactor.....	36
6.4.1- Evaluación de la producción de R3HB utilizando glucosa como fuente de carbono y 800 rpm de agitación.....	36
6.4.2- Evaluación de la producción de R3HB utilizando xilosa como fuente de carbono y 500 rpm de agitación.....	40
6.4.3- Evaluación de la producción de R3HB utilizando xilosa como fuente de carbono y 800 rpm de agitación.....	42
6.4.4- Evaluación de la producción de R3HB utilizando glucosa como fuente de carbono en condiciones de limitación de nitrógeno.....	43
6.4.5- Discusión sobre la producción de R3HB a nivel de biorreactores.....	45
6.5- Determinación de la actividad enzimática de GapN y GapA en la cepa AV14N1.....	48
6.6- Evaluación de la producción de R3HB sobreexpresando <i>gapN</i>	49
6.6.1- Evaluación de la producción de R3HB sobreexpresando <i>gapN</i> con un sistema de dos vectores a nivel de matraz.....	49
6.6.2- Evaluación de la producción de R3HB sobreexpresando <i>gapN</i> con un sistema de un vector a nivel de matraz.....	54
Capítulo VII- Conclusiones.....	57
Capítulo VIII- Perspectivas.....	59
Capítulo IX- Bibliografía citada.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1A	Estructura química general de los polihidroxicanoatos.....	5
Figura 2.1B	Estructura química del poli-3-hidroxitirato.....	5
Figura 2.2	Esquema de la síntesis de P3HB en <i>Azotobacter sp.</i> FA8.....	8
Figura 5.1	Metabolismo central de carbono y vía sintética de producción de (<i>R</i>)-3-hidroxitirato en la cepa AV14N1.....	20
Figura 6.1	Vector construido para la síntesis del (<i>R</i>)-3-hidroxitirato.....	28
Figura 6.2	Digestión del vector pLoxGen4 con <i>NcoI</i> y <i>XhoI</i> ; confirmación de la eliminación del segundo sitio múltiple de clonación.....	29
Figura 6.3A	Comprobación de la construcción del vector pLoxGapNopt / Amplificación por PCR del inserto de varias colonias candidatas	29
Figura 6.3B	Comprobación de la construcción del vector pLoxGapNopt / Digestión con las enzimas <i>HindIII</i> y <i>XhoI</i> de varias colonias candidatas.....	29
Figura 6.3C	Comprobación de la construcción del vector pLoxGapNopt / Esquema del vector pLoxGapNopt.....	29
Figura 6.4A	Comprobación de la construcción de la cepa AV14N1 / Análisis de PCR de la región de integración de AV14N1 en una mezcla de colonias candidatas ..	30
Figura 6.4B	Comprobación de la construcción de la cepa AV14N1 / Análisis de PCR, confirmación de la candidata 12 como la cepa AV14N1	30
Figura 6.4C	Esquema de la construcción diseñada para la cepa AV14N1.....	30
Figura 6.5	Cinética de crecimiento y producción de acetato en cultivos tipo lote en matraz con glucosa (5 g/L), 300 rpm a 37 °C.....	31
Figura 6.6	Comprobación del genotipo de las cepas utilizadas en la fermentación.....	32
Figura 6.7A	Cinéticas de crecimiento en matraz con las cepas MG1655, MS01, AV14N1, AV14 y MG1655 Δ <i>ackA-pta</i> ; transformadas con el vector pTrc-R3HB.....	35
Figura 6.7B	Cinéticas de consumo de glucosa en matraz con las cepas MG1655, MS01, AV14N1, AV14 y MG1655 Δ <i>ackA-pta</i> ; transformadas con el vector pTrc-R3HB.....	35
Figura 6.7C	Cinéticas de producción de (<i>R</i>)-3-hidroxitirato en matraz con las cepas MG1655, MS01, AV14N1, AV14 y MG1655 Δ <i>ackA-pta</i> ; transformadas con el vector pTrc-R3HB	35

Figura 6.7D	Cinéticas de producción de acetato en matraz con las cepas MG1655, MS01, AV14N1, AV14 y MG1655 $\Delta ackA-pta$; transformadas con el vector pTrc-R3HB	35
Figura 6.8A	Cinéticas de consumo de glucosa y producción de piruvato de cultivos tipo lote utilizando biorreactores con glucosa y agitación de 800 rpm	37
Figura 6.8B	Cinéticas de crecimiento y de tensión de oxígeno disuelto de cultivos tipo lote utilizando biorreactores con glucosa y agitación de 800 rpm	37
Figura 6.8C	Cinéticas de producción de (<i>R</i>)-3-hidroxiбутирато y de acetato de cultivos tipo lote utilizando biorreactores con glucosa y agitación de 800 rpm.....	37
Figura 6.9A	Cinéticas de consumo de xilosa y de producción de piruvato de cultivos tipo lote utilizando biorreactores con xilosa y agitación de 500 rpm	41
Figura 6.9B	Cinéticas de crecimiento y de tensión de oxígeno disuelto de cultivos tipo lote utilizando biorreactores con xilosa y agitación de 500 rpm.....	41
Figura 6.9C	Cinéticas de producción de (<i>R</i>)-3-hidroxiбутирато y de acetato de cultivos tipo lote utilizando biorreactores con xilosa y agitación de 500 rpm	41
Figura 6.10A	Cinéticas de consumo de xilosa y de producción de piruvato de cultivos tipo lote utilizando biorreactores con xilosa y agitación de 800 rpm	42
Figura 6.10B	Cinéticas de crecimiento y de tensión de oxígeno disuelto de cultivos tipo lote utilizando biorreactores con xilosa y agitación de 800 rpm	42
Figura 6.10C	Cinéticas de producción de (<i>R</i>)-3-hidroxiбутирато y de acetato de cultivos tipo lote utilizando biorreactores con xilosa y agitación de 800 rpm	42
Figura 6.11A	Cinéticas de consumo de glucosa, de producción de piruvato y de acetato de cultivos tipo lote utilizando biorreactores con glucosa y con limitación de nitrógeno.....	45
Figura 6.11B	Cinéticas de crecimiento y de producción de (<i>R</i>)-3-hidroxiбутирато de cultivos tipo lote utilizando biorreactores con glucosa y con limitación de nitrógeno.....	45
Figura 6.12A	Cinéticas de crecimiento de cultivos en matraz con glucosa utilizando las cepas transformadas con los vectores pTrc-R3HB / pACYC <i>gapN</i>	52
Figura 6.12B	Cinéticas de consumo de glucosa de cultivos en matraz con glucosa utilizando las cepas transformadas con los vectores pTrc-R3HB / pACYC <i>gapN</i>	52

Figura 6.12C	Cinéticas de producción de (<i>R</i>)-3-hidroxi-butirato de cultivos en matraz con glucosa utilizando las cepas transformadas con los vectores pTrC-R3HB / pACYC <i>gapN</i>	52
Figura 6.12D	Cinéticas de producción de acetato de cultivos en matraz con glucosa utilizando las cepas transformadas con los vectores pTrC-R3HB / pACYC <i>gapN</i>	52
Figura 6.13	Vector construido para la síntesis del (<i>R</i>)-3-hidroxi-butirato junto con la sobreexpresión el gen <i>gapN</i>	54
Figura 6.14A	Cinéticas de crecimiento de cultivos en matraz con glucosa utilizando las cepas transformadas con el vector pTrc- <i>gapN</i> -R3HB, e induciendo con 10 μ M de IPTG.....	56
Figura 6.14B	Cinéticas de consumo de glucosa de cultivos en matraz con glucosa con las cepas transformadas con el vector pTrc- <i>gapN</i> -R3HB, e induciendo con 10 μ M de IPTG.....	56
Figura 6.14C	Cinéticas de producción de (<i>R</i>)-3-hidroxi-butirato de cultivos en matraz con glucosa utilizando las cepas transformadas con el vector pTrc- <i>gapN</i> -R3HB e induciendo con 10 μ M de IPTG.....	56
Figura 6.14D	Cinéticas de producción de acetato de los cultivos en matraz con glucosa utilizando las cepas transformadas con el vector pTrc- <i>gapN</i> -R3HB e induciendo con 10 μ M de IPTG.....	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1	Propiedades fisicoquímicas de los PHAs.....	6
Tabla 2.2	Resumen de producción de PHAs por varios productores naturales y recombinantes de <i>E. coli</i>	9
Tabla 5.1	Cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	21
Tabla 6.1	Parámetros cinéticos y estequiométricos de los cultivos de producción de R3HB en matraz con glucosa en cepas con el vector pTrc-R3HB.....	34
Tabla 6.2	Parámetros cinéticos y estequiométricos de los cultivos de producción de R3HB en biorreactor con glucosa, 0.5 vvm, 800 rpm a 37 °C y limitación de nitrógeno (47.6mM), 0.5vvm a 37°C, manteniendo una TOD superior a 20%	39
Tabla 6.3	Parámetros cinéticos y estequiométricos de los cultivos de producción de R3HB en biorreactor con xilosa, 0.5 vvm y agitación de 800 y 500 rpm.....	39
Tabla 6.4	Tabla comparativa de las principales estrategias de producción de (R)-3-hidroxitirato entre diversos microorganismos.....	46
Tabla 6.5	Actividad enzimática específica por cantidad de proteína total de la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) dependiente de NAD ⁺ y NADP ⁺ en extractos celulares de las cepas AV14, AV14N1, AV14/pACYCgapN y AV14N1/pACYCgapN.....	49
Tabla 6.6	Parámetros cinéticos y estequiométricos de los cultivos de producción de R3HB sobreexpresando gapN en matraz con glucosa, 300 rpm a 37 °C, en cepas transformadas con los vectores pTrc-R3HB y pACYCgapN (0.1 mM de IPTG) o el vector pTrc-gapN-R3HB (10 μM de IPTG).....	53

:

ABREVIATURAS

ED	Vía Entner-Doudoroff
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
MFA	Análisis de flujos metabólicos
MMME	Ingeniería metabólica modular multivariable
NA	No aplicable
ND	No determinado
NDT	No detectado
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
Tg	Temperatura de transición vítrea
Tm	Temperatura de fusión
U	Unidades enzimáticas
US\$	US\$ americanos

Compuestos químicos y polímeros.

1,3-BPG	1,3-bifosfoglicerato
3-HAME	R-3-hidroxicanoatos metil ésteres
3HB-CoA	3-hidroxiacetil coenzima A
3-HBME	3-hidroxiacetilato-metil-éster
3-HDD	3-hidroxiodecanoato
3HV	3-hidroxiacetato
3-PG	3-fosfoglicerato
ACE	Acetato
acetil-CoA	Acetil-coenzima A
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Amp	Ampicilina
ATP	Trifosfato de adenosina
Cm	Cloranfenicol
DHA-P	Dihidroxiacetona-fosfato
Fru-1,6-BP	Fructosa-1,6-bifosfato
Fru-6-P	Fructosa-6-fosfato

G-3-P	Gliceraldehído-3-fosfato
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GLC	Glucosa
Glu-6-P	Glucosa-6-fosfato
Gly-3-P	Gliceraldehído-3-fosfato
HA	Ácidos hidroxialcanóico
HSCoA	Coenzima A libre
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
MCL-PHA	Polihidroxialcanoatos de cadenas de tamaño medio
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
P(3HB-co-3HV)	Poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato)
P(3HH-co-3HO)	Poli(3-hidroxi hexanoato-co-3-hidroxi octanoato)
P(HB-co-HB)	Poli(3-hidroxi butirato-co-4-hidroxi butirato)
P(HB-co-HV)	Poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato)
P(HO-co-HHx)	Poli(3-hidroxi octanoato-co-3-hidroxi hexanoato)
P3HB	Poli-3-hidroxi butirato
PDHC	Complejo piruvato deshidrogenasa
PEP	Fosfoenolpiruvato
PHA	Polihidroxialcanoato
PYR	Piruvato
R3HB	(<i>R</i>)-3-hidroxi butirato
Tc	Tetraciclina
XYL	Xilosa

Bioprocesos y Bioingeniería.

μ	Velocidad específica de crecimiento microbiano
μ^{exp}	Velocidad específica de crecimiento microbiano en la fase exponencial

CDW	Peso celular seco
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nanómetros de longitud de onda
g _{ACE}	Gramos de acetato
g _{CDW}	Gramos de peso celular seco
gC ^P	Gramos de carbono en el producto
gC ^S	Gramos de carbono en el sustrato
g _{GLC}	Gramos de glucosa
g _{PHB}	Gramos de Poli-3-hidroxiбутирато
g _{PYR}	Gramos de piruvato
g _{R3HB}	Gramos de (<i>R</i>)-3-hidroxiбутирато
g _{XYL}	Gramos de xilosa
q _S	Velocidad específica de consumo de sustrato
q _S ^{exp}	Velocidad específica de consumo de sustrato en la fase exponencial
rpm	Revoluciones por minuto
TOD	Tensión de oxígeno disuelto
vvm	Volumen de aire por volumen de medio
Y _{MaxT}	Rendimiento máximo teórico

Biología molecular.

<i>ackA</i>	Gen de la acetato cinasa
<i>adhE</i>	Gen de la alcohol deshidrogenasa E
<i>buk</i>	Gen de la butirato cinasa
<i>eda</i>	Gen de la enzima 2-ceto-3-deoxy-6-fosfogluconato aldolasa
<i>fadBA</i>	Operón de la δ -3-cis- δ -2-transenoil-coenzima A isomerasa y de la 3-hidroxiacil-coenzima A epimerasa
<i>frdA</i>	Gen de la fumarato reductasa
<i>gapA</i>	Gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADH
<i>gapB</i>	Gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH de <i>Bacillus subtilis</i>
<i>gapC</i>	Gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH de <i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>gapN</i>	Gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH

<i>gatC</i>	Gen de la subunidad transmembranal del transportador PTS del galactitol
<i>gnd</i>	Gen de la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa
<i>hdb</i>	Gen de una acetoacetyl-coenzima A deshidrogenasa dependiente de NADH
<i>ldhA</i>	Gen de la lactato deshidrogenasa
mg _{PROT}	Miligramos de proteína total
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>pct</i>	Gen de la propionil-coenzima A transferasa
<i>pflB</i>	Gen de la piruvato formato liasa
<i>pgi</i>	Gen de la fosfoglucona isomerasa
<i>phaF</i>	Gen de la fasina F
<i>phaJ</i>	Gen de una enoil-CoA hidratasa
<i>phaP</i>	Gen de la fasina P
<i>phaZi</i>	Gen de la despolimerasa I de polihidroxiacanoatos
<i>phbA</i>	Gen de la β -cetoliasa
<i>phbB</i>	Gen de la acetoacetyl-coenzima A reductasa
<i>phbBAC</i>	Operón de la vía de síntesis del poli-3-hidroxi-butirato
<i>phbC</i>	Gen de una PHA sintetasa
<i>phbR</i>	Gen del factor transcripcional PhbR
<i>poxB</i>	Gen de la piruvato oxidasa
p _R	Promotor del gen <i>phbR</i>
<i>pta</i>	Gen de la fosfato acetyltransferasa
<i>ptb</i>	Gen de la enzima fosfotransbutirilasa
RBS	Sitio de unión a ribosomas
<i>tesB</i>	Gen de la tioesterasa II
<i>xylE</i>	Gen del transportador protón-simpor-te para xilosa
<i>xylFGH</i>	Genes del transportador ABC para xilosa
<i>zwf</i>	Gen de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
σ^S	Factor transcripcional sigma S

RESUMEN

El (*R*)-3-hidroxiбутирато (R3HB) es un precursor químico de alto interés en la industria farmacéutica para la síntesis de compuestos de alto valor agregado, como antibióticos. Su producción en sistemas microbiológicos presenta diversas ventajas entre las que destacan la estereoespecificidad y sustentabilidad del sistema. Para esto se han utilizado las vías de síntesis de los polihidroxiálcanoatos; polímeros de reserva en muchos microorganismos formados por monómeros de ácidos (*R*)-hidroxiálcanoicos, como el R3HB. Se ha estudiado la producción de este compuesto en *E. coli* utilizando varias estrategias, destacando la utilización de la tioesterasa II endógena de *E. coli* (expresada por el gen *tesB*), la cual tiene un amplio rango de especificidad hacia sustratos acilo de coenzima A de distintos números de carbono. Sin embargo; la producción podría ser mejorada por medio de la ingeniería metabólica. Los factores clave para mejorar la producción de R3HB son la disponibilidad del precursor acetil-CoA y la del cofactor NADPH en la célula. En este trabajo se evaluó la producción de R3HB utilizando las primeras dos enzimas de la vía de producción del P3HB de *Azotobacter vinelandii* (genes *phbA* y *phbB*) junto con la sobreexpresión de la tioesterasa II de *E. coli* (gen *tesB*). Además se estudió el efecto de la eliminación de las vías que compiten por el flujo de carbono para la acumulación de acetil-CoA y el aumento de la disponibilidad de NADPH por medio de una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ de *Streptococcus mutans*. Se logró la producción de R3HB a partir de glucosa en condiciones de limitación de oxígeno moderada, utilizando una cepa de *E. coli* transformada con el vector de producción que expresa los genes *phbB*, *phbA* y *tesB* en operón. Se alcanzó 10.4 g/L de R3HB, un rendimiento de 0.27 g_{R3HB}/g_{GLC} y con una productividad de 0.59 g L⁻¹ h⁻¹, la cual es la más alta reportada hasta la fecha utilizando a *E. coli*. Así mismo, se observó una posible actividad de la tioesterasa II sobre el acetil-CoA para la formación de acetato, por lo cual el tener una vía de regeneración de acetil-CoA a partir del acetato; como es la vía *ackA-pta* resulta en una ventaja para la producción de R3HB. Adicionalmente la sobreexpresión del gen *gapN* de *S. mutans* logró aumentar el rendimiento de producción entre el 30% hasta a más del 100%, comparado con el obtenido expresando únicamente la vía sintética de producción. Los resultados dejan claro que el aumento en la disponibilidad del cofactor es una estrategia adecuada para la producción del (*R*)-3-hidroxiбутирато. Sin embargo, la sobreexpresión de los genes *tesB* y *gapN* causa una carga metabólica excesiva, por lo cual la modulación de su expresión es un factor que debe ser considerado para futuros estudios.

ABSTRACT

The building block (*R*)-3-hydroxybutyrate (R3HB) is a chemical precursor for the synthesis of fine chemicals, among others in the pharmaceutical industry, such as antibiotics. In comparison to chemical processes, R3HB production by microorganism has some advantages: to obtain optically pure R3HB preparations; and the use of sustainable processes. The biosynthetic pathways for polyhydroxyalkanoates (PHAs; which are carbon and/or energy storage materials in many microorganisms) has been used as a starting point for the microbiological production of R3HB. The PHAs are polymers formed by (*R*)-hydroxycarboxylic acids such as R3HB. The production of R3HB has been studied using *E. coli* with different metabolic strategies, highlighting the use of the endogenous thioesterase II of *E. coli* (expressed by the gene *tesB*); which has a wide range of specificity for acyl coenzyme A substrates with different numbers of carbons. However, the R3HB titer and rate of synthesis could be improved through metabolic engineering. We propose that the key factors to improve the production of this compound are the availability of acetyl-CoA and NADPH in the cell. In this study, the production of R3HB was evaluated using the first two enzymes of the polyhydroxybutyrate pathway of *Azotobacter vinelandii* (*phbA* and *phbB* genes), together with the overexpression of the *E. coli* thioesterase II (*tesB* gene). In addition, the effect of eliminating competitive pathways for acetyl-CoA consumption and the increased availability of NADPH, through the expression of a glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase NADP⁺ dependent from *Streptococcus mutans*, was studied. An *E. coli* strain transformed with a plasmid harboring the *phbA*, *phbB* and *tesB* genes, was used to produce (*R*)-3-hydroxybutyrate from glucose in bioreactors with a stage of oxygen limitation; achieving 10.4 g/L R3HB, a yield of 0.27 g_{R3HB}/g_{GLC}, and a productivity of 0.59 g_{R3HB} L⁻¹ h⁻¹, which are one of the highest productivities reported so far using recombinant *E. coli*. Likewise, a possible thioesterase II activity on acetyl-CoA to form acetate was observed; together with other results, this fact suggests that the *ackA-pta* pathway is required for the production of high titers of R3HB, mainly due to a potential regeneration of acetyl-CoA from acetate through this route. Furthermore, compared with the yield obtained using only the synthetic R3HB pathway, the overexpression of the *gapN* gene of *S. mutans* allowed to increase the production yield from 30 % up to more than 100 %. The results make it clear that the increased availability of the cofactor NADPH is an appropriate strategy for the production of (*R*)-3-hydroxybutyrate. However, overexpression of the *gapN* and *tesB* genes in plasmids causes a metabolic burden effect, reducing the growth of the strain and the production of R3HB; whereby a tight modulation of *gapN* and *tesB* levels should be considered in future studies.

I.- INTRODUCCIÓN

La obtención de precursores químicos para la síntesis de compuestos de alto valor agregado es un área en crecimiento con un gran potencial de investigación y optimización. Un ejemplo de estas moléculas son los ácidos hidroxialcanoicos quirales (HAs) que son de gran interés en la síntesis de compuestos como vitaminas, antibióticos, feromonas, etc., además de tener otras aplicaciones como la formación de polímeros, biocombustibles e incluso aplicación en el área clínica (Chen y Wu, 2005; Tokiwa y Ugwu, 2007; Lee y Lee, 2003). En particular el estereoisómero (*R*)-3-hidroxi-butirato (R3HB), es un importante precursor para la síntesis de 4-acetoxi-azetidinona, el cual es utilizado para la formación de antibióticos carbanepem; cuyo mercado global asciende a mil millones de US\$ al año (Lee y Lee, 2003).

Algunos de los precursores químicos se obtienen a partir del cultivo de microorganismos los cuales los sintetizan de manera natural, aunque muchos de estos en cantidades no suficientes para su comercialización. Con el surgimiento de disciplinas como la ingeniería genética y la ingeniería metabólica, ha sido posible la modificación genética de microorganismos, con el fin de alterar su metabolismo y dirigirlo hacia la obtención de estas moléculas (Lee y Lee, 2003; Chen et al. 2013; Lee et al. 2011a; Lee et al. 2011b). La ingeniería metabólica se puede definir como la manipulación del metabolismo para re-dirigir los flujos de carbono hacia la formación de algún producto o mejorar las propiedades celulares; a través de la modificación de reacciones bioquímicas específicas o de la introducción de nuevas, con el uso de la tecnología del ADN recombinante (Stephanopoulos *et al.*, 1998, Yang *et al.*, 1998).

Los Polihidroxialcanoatos o PHAs son un grupo de poliésteres producidos por una gran variedad de microorganismos como respuesta al estrés ambiental o desbalances en sus potenciales de óxido-reducción. Por lo que se pueden sintetizar en condiciones tales como bajos niveles de nitrógeno, fósforo u oxígeno, así como con un exceso de la fuente de carbono (Keshavarz y Roy, 2010). Estos polímeros son de gran interés comercial debido a sus propiedades termoplásticas y de biodegradabilidad (Nikel *et al.*, 2005). El Poli-3-HidroxiButirato (P3HB) es el PHA más estudiado y mejor caracterizado. Mediante ingeniería metabólica se ha logrado la producción de P3HB en *Escherichia coli*, expresando los genes de la vía de síntesis de P3HB de diversos organismos en plásmidos (Madison y Huisman, 1999; Nikel *et al.*, 2006; Centeno-Leija *et al.*, 2014). Debido a la estereoespecificidad de las enzimas implicadas en la vía de síntesis del P3HB es posible utilizar

éstas para la obtención del estereoisómero (*R*)-3-hidroxitirato (Lee y Lee, 2003; Liu *et al.*, 2007; Tseng *et al.* 2009).

Los genes que participan en la vía de síntesis del P3HB se encuentran en un operón que consta de tres genes: *phbA*, que codifica una β -cetotilasa; *phbB* que codifica para la acetoacetil CoA reductasa; y *phbC*, que codifica para la PHA sintetasa (Madison y Huisman, 1999). Una estrategia interesante para la producción heteróloga de (*R*)-3-Hidroxitirato, es incorporar parcialmente la vía de síntesis de P3HB de *A. vinelandii*, sustituyendo el gen *phbC* que codifica para la PHA sintetasa, por el gen *tesB* que codifica para la tioesterasa II de *E. coli* con el fin de dirigir la producción de 3HB-CoA a R3HB (Liu *et al.*, 2007). La acetoacetil CoA reductasa (PhbB) es una enzima dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH). Se ha demostrado que la cantidad de NADPH disponible en la célula es un factor limitante para la vía de síntesis del P3HB, por lo cual se han buscado diversas estrategias para aumentar su disponibilidad en la célula (Madison y Huisman, 1999; Lee *et al.*, 2013; Centeno-Leija *et al.*, 2014). En un estudio reciente, en nuestro laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas, se comprobó que la sobre expresión del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, dependiente de NADP (*gapN*) proveniente de *Streptococcus mutans*, logra aumentar el NADPH disponible en la célula y aumentar la producción de P3HB (Centeno-Leija *et al.*, 2013, Centeno-Leija *et al.*, 2014).

Otros factores importantes a considerar son la cantidad de acetil-CoA, el precursor de la vía de síntesis, y la capacidad de utilización de las fuentes de carbono deseadas. En estudios previos de nuestro laboratorio se logró obtener, mediante ingeniería metabólica y evolución adaptativa, la cepa JU15 que fermenta eficientemente la glucosa o xilosa a ácido D-láctico (Utrilla *et al.*, 2012). A esta cepa se eliminó adicionalmente el gen que codifica para la D-lactato deshidrogenasa (*AldhA*), para obtener la cepa MS01 (Fernández-Sandoval *et al.*, 2012). Con la finalidad de disminuir la competencia por el uso de esqueletos de carbono en la síntesis de otros productos, en el presente trabajo a la cepa MS01 se le eliminaron los genes que codifican para la piruvato oxidasa (*poxB*) y fosfotransacetilasa (*pta*), por lo tanto la formación de ácido acético, de tal forma que se obtuvo una cepa no fermentativa. Una estrategia para aumentar la cantidad de proteína expresada es la optimización del uso de codones de la secuencia de un gen heterólogo. Por lo que se propone adaptar la secuencia de *gapN* mediante la optimización del uso de codones para *E. coli*, esto permitirá la producción acoplada de R3HB con la generación del cofactor NADPH.

II- ANTECEDENTES

2.1- Los polihidroxicanoatos.

2.1.1- Generalidades y propiedades.

Los polihidroxicanoatos (PHA) son poliésteres naturales sintetizados y acumulados en forma de gránulos intracelulares por una gran variedad de microorganismos que la utilizan como una fuente de almacenaje de carbono y energía (Madison y Huisman, 1999; Keshavarz y Roy, 2010). Estos se producen en condiciones de estrés y de limitación de nutrientes, tales como nitrógeno, fósforo u oxígeno, así como en cultivos donde la fuente carbono se encuentra en exceso (Madison y Huisman, 1999; Keshavarz y Roy, 2010). Los PHAs poseen propiedades termoplásticas y elastómeras que se asemejan a las propiedades de algunos plásticos como es el polipropileno. Por lo cual han sido ampliamente estudiados para su aplicación como sustitutos de los plásticos derivados del petróleo (Keshavarz y Roy, 2010; Suddesh *et al.*, 2000). La fórmula general del monómero del cual se forman los PHAs es un ácido R-hidroxicanoico (**Fig. 2.1**) con una región variable (*R*) la cual dependiendo de su longitud, ofrece diferentes propiedades fisicoquímicas. En comparación, los PHAs formados por monómeros de cadenas cortas (3-5 C) comúnmente son más rígidos y quebradizos, con una cristalinidad y temperaturas de fusión mayores que sus contrapartes que son formados por monómeros de cadenas de mayor longitud. Los PHAs formados por monómeros de cadenas de tamaño medio (6-14 C) son elastómeros con menores temperaturas de fusión y cristalinidad (Madison y Huisman, 1999). Con la finalidad de obtener un bioplástico con ciertas propiedades específicas, se pueden generar heteropolímeros que incluyan monómeros de ambas clases (**Tabla 2.1**) (Madison y Huisman, 1999; Keshavarz y Roy, 2010).

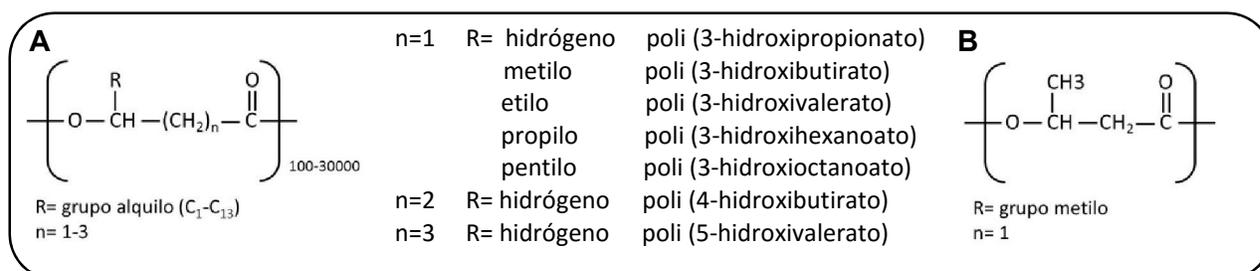


Figura 2.1: (A) Estructura química general de los polihidroxicanoatos. (B) Estructura química del poli-3-hidroxiбутирато.

El primer PHA estudiado fue el poli-3-hidroxi-butirato (P3HB) descubierto por el microbiólogo Maurice Lemoigne. Éste se encuentra en forma de gránulos intracelulares en los microorganismos que lo producen, siendo este el mejor caracterizado de los PHAs. (Keshavarz y Roy, 2010). El P3HB es un polímero con alto peso molecular en un rango de 2×10^5 a 3×10^6 daltones, con un punto de fusión de 177°C y una elongación a la ruptura del 5% (**Tabla 2.1**). Estas características junto con la capacidad de ser biodegradable, hacen que estos polímeros sean de alto interés para la industria. Los biopolímeros derivados de PHAs se han utilizado con diversos fines; entre ellos destacan la producción de contenedores diversos, empaques, consumibles, películas plásticas, además de ser utilizados como agentes acarreadores de sabor en alimentos. Incluso, algunos de estos polímeros tienen aplicaciones médicas debido a su biocompatibilidad y pueden utilizarse como base para la construcción de dispositivos cardiovasculares, píldoras e hilo de sutura, entre otros (Lee, 1995; Keshavarz y Roy, 2010; Madison y Huisman, 1999; Suddesh *et al.*, 2000).

Tabla 2.1: Propiedades fisicoquímicas de los PHAs

Parámetro	Valor Para:				
	P3HB	P(HB-co-HV)	P(HB-co-HB)	P(HO-co-HHx)	Polipropileno
T _m (°C)	177	145	150	61	176
T _g (°C)	2	-2	-7	-36	-10
Cristalinidad (%)	70	56	45	30	60
Extensión de ruptura (%)	5	50	444	300	400

P3HB: poli-3-hidroxi-butirato; **P(HB-co-HV):** poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato), conteniendo 20% de 3HV; **P(HB-co-HB):** poli(3-hidroxi-butirato-co-4-hidroxi-butirato), conteniendo 16% de 4HB; **P(HO-co-HHx):** poli(3-hidroxi-octanoato-co-3-hidroxi-hexanoato), conteniendo 11% de 3HHx. **T_m**, temperatura de fusión; **T_g**, temperatura de transición vítrea. Datos tomados de Doi *et al.*, (1995).

Entre los organismos productores de PHAs se pueden encontrar alrededor de 300 especies, entre las más destacadas debido a su amplio estudio o explotación comercial están *Alcaligenes (Ralstonia) eutropha*, *Pseudomonas sp*, *Methylobacterium sp* y *Azotobacter sp* (**Tabla 2.2**). Estos organismos han sido ampliamente estudiados y optimizados para la producción y acumulación del biopolímero utilizando varias fuentes de carbono (Madison y Huisman, 1999; Suddesh *et al.*, 2000).

El principal problema en la producción industrial de los PHAs es el alto costo de producción contra el muy reducido costo de los plásticos derivados del petróleo. Los PHAs se han comercializado a un valor de US\$ 16/kg y si consideramos el precio de un plástico convencional como el polietileno

o polipropileno; el cual es menor que US\$ 1/kg; es difícil considerar a los PHAs para la manufactura a gran escala de materiales plásticos con el fin de sustituir todas las aplicaciones del polipropileno (Choi y Lee, 1997). De acuerdo a esto, se han buscado diversas estrategias para reducir los costos de producción, aumentar los rendimientos de síntesis de los PHAs y la simplificación del proceso (Madison y Huisman, 1999; Keshavarz y Roy, 2010).

Los microorganismos que acumulan PHAs naturalmente, comúnmente tienen tiempos de crecimiento muy largos, tasas de respiración muy elevadas y temperaturas de crecimiento óptimas relativamente bajas comparadas con otros modelos de producción ampliamente utilizados. Éstas características no son muy adecuadas para una producción industrial eficiente. Aunado a esto, son organismos con dificultad de ser lisados para la recuperación del polímero y además poseen vías alternas para la degradación de PHAs, lo cual complica el proceso de producción del polímero. Otra característica desfavorable es el poco conocimiento del metabolismo y del genoma de estos organismos, impidiendo la utilización de técnicas de manipulación de ADN para poder mejorar la producción del polímero (Keshavarz y Roy, 2010; Madison y Huisman, 1999).

La bacteria *Escherichia coli* es uno de los organismos mejor conocidos que tiene la ventaja de poseer un tiempo corto de duplicación, crece bien en medios minerales simples con diferentes fuentes de carbono, tienen una temperatura de crecimiento relativamente alta y además por su facilidad de lisis es más sencillo recuperar el polímero a partir del interior de la célula. Debido a estas características se han construido cepas recombinantes de *E. coli* capaces de acumular PHA, alcanzando hasta un 80% de la masa celular, comparable con los productores naturales de PHAs, e incluso reduciendo costos de producción (Lee *et al.*, 1999a; Choi y Lee, 1997) (**Tabla 2.2**). Entre los retos actuales está mejorar por medio de ingeniería metabólica la producción de PHAs, para lograr un proceso de producción eficiente y de bajo costo (Madison y Huisman, 1999).

2.1.2- Síntesis del poli-3-hidroxibutirato y su regulación.

El poli-3-hidroxibutirato (P3HB) es un poliéster del monómero 3-hidroxibutirato y ha sido utilizado como el modelo de estudio para el desarrollo de estrategias de producción de PHA mediante fermentación (Khanna y Srivastava, 2005). La vía de síntesis del P3HB en la mayoría de los organismos incluye 3 reacciones, catalizadas por 3 distintas enzimas. La primera reacción de síntesis consiste en la condensación de 2 moléculas de acetyl-CoA para la formación del acetoacetyl-CoA, catalizada por una β -cetoacetyl-CoA tiolasa (codificada por el gen *phbA*). La

segunda reacción es la reducción del acetoacetyl-CoA al (*R*)-3-hidroxiacetyl-CoA, catalizado por la acetoacetyl-CoA deshidrogenasa dependiente de NADPH (codificada por el gen *phbB*) (Keshavarz y Roy, 2010; Madison y Huisman, 1999). Finalmente se utiliza el (*R*)-3-hidroxiacetyl-CoA como monómero para la síntesis del Poli-3-hidroxiacetylato, mediante la polimerasa de P3HB (codificada por el gen *phbC*). Los genes codificantes de estas tres enzimas se encuentran comúnmente en un operón, lo cual permite que se expresen las tres de forma coordinada. Actualmente; los genes estructurales involucrados en la síntesis de PHAs de diversos microorganismos se han clonado y secuenciado (Madison y Huisman, 1999). En el 2001 se identificaron y describieron los genes de síntesis de P3HB en *Azotobacter sp.* FA8, los genes participantes en la vía de síntesis de P3HB se encontraban en el operón *phbBAC* (Figura 2.2). (Pettinari *et al.*, 2001).

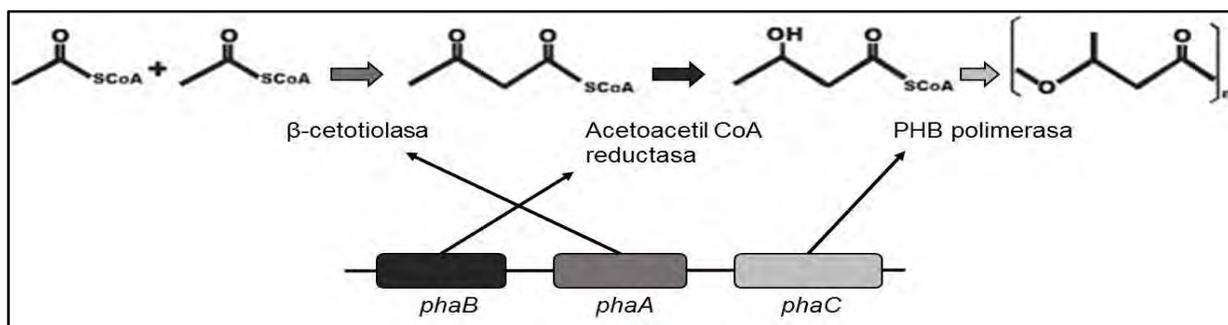


Figura 2.2: Esquema de la síntesis de P3HB en *Azotobacter sp.* FA8 (Pettinari *et al.*, 2001).

Los genes involucrados en la síntesis de PHAs difieren según el microorganismo productor considerado. Por ejemplo, la polimerasa de PHA (o PHA sintasa), que determina el tipo de monómero incorporado al polímero (Amara y Moawad, 2011). Existen otros genes que están directa o indirectamente relacionados con la síntesis de los polímeros. El gen *phaJ* de *Aeromonas caviae*, por ejemplo, codifica para una enoil-CoA hidratasa que provee monómeros para la síntesis de PHAs a partir de las vías de β-oxidación de los ácidos grasos (Madison y Huisman, 1999). Algunos genes con actividad regulatoria son *phaF* y *phaP*, que codifican para una proteína de unión al PHA llamada fasina; cuya función es la de estabilizar y mejorar la formación de los gránulos del polímero en el interior de la célula (Prieto *et al.*, 1999; York *et al.*, 2002).

Tabla 2.2: Resumen de la producción de PHAs por varios productores naturales y recombinantes de *E. coli*.

Microorganismo	Tipo de Cultivo	Fuente de Carbono	Tipo de PHA	Cont. PHA (%p/v)	Productividad (g/L . h)	Rendimiento (g/g)	Referencias
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Lote Alimentado	Glucosa	P3HB	76	2.42	0.3	Kim <i>et al.</i> , 1994
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Lote Alimentado	Glucosa	P3HB	82	3.14	0.38	Ryu <i>et al.</i> , 1997
<i>Alcaligenes latus</i>	Lote Alimentado	Sacarosa	P3HB	88	4.94	0.42	Wang y Lee, 1997a
<i>Methylobacterium organophilum</i>	Lote Alimentado	Metanol	P3HB	52	1.86	0.19	Kim <i>et al.</i> , 1996
<i>Pseudomonas aeuroginosa</i>	Lote	Ácidos oleicos	MCL-PHA	54.6	0.08	ND	Fernández <i>et al.</i> , 2005
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Lote Alimentado	n-Octano	P(3HH-co-3HO)	33	0.25	ND	Preusting <i>et al.</i> , 1993
<i>Pseudomonas putida</i>	Lote Alimentado	Ácidos oleicos	MCL-PHA	36	1.79	ND	Lee <i>et al.</i> , 1999c
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Lote con dos etapas	Sacarosa	P3HB	76	1.05	0.32	Chen y Page <i>et al.</i> , 1997
Cepas de <i>Escherichia coli</i> recombinantes con los genes de síntesis de PHA's							
<i>Escherichia coli</i> GCSC4401 / genes de <i>Alcaligenes latus</i>	Lote Alimentado con reciclaje de células.	Lactosa	P3HB	87	4.6	ND	Ahn <i>et al.</i> , 2001
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue / genes de <i>Alcaligenes latus</i>	Lote Alimentado	Glucosa	P3HB	73	4.63	ND	Choi <i>et al.</i> , 1998
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue / genes de <i>Alcaligenes eutrophus</i>	Lote Alimentado	Glucosa	P3HB	65.9	2.8	0.28	Wang y Lee, 1997b
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue / genes de <i>Alcaligenes latus</i>	Lote Alimentado	Glucosa + ácido propiónico + ácidos oleicos	P(3HB-co-3HV)	78.2	2.8	ND	Choi y Lee, 1999
<i>Escherichia coli</i> CGSC 5040 / genes de <i>Azotobacter vinelandii</i>	Lote	Lactosa	P3HB	62.74	0.62	ND	Nikel <i>et al.</i> , 2005
<i>Escherichia coli</i> MG1655/ genes de <i>Azotobacter vinelandii</i>	Lote	Glucosa	P3HB	84	ND	0.36	Centeno-Leija <i>et al.</i> , 2014

MCL-PHA (Medium Chain Length-PHA): PHAs con cadena de tamaño medio; **P(3HH-co-3HO)**: co-polímero de poli-3-hidroxihexanoato y poli-3-hidroxioctanoato; **P(3HB-co-3HV)**: co-polímero de poli-3-hidroxibutirato y poli-3-hidroxivalerato; **ND**: No determinado

La producción del P3HB en *Azotobacter vinelandii* está regulada a nivel genético por la presencia de dos promotores superpuestos (p_{B1} y p_{B2}). El promotor p_{B1} es el más fuerte de los dos y es activado por el factor transcripcional PhbR durante la fase estacionaria de crecimiento. El factor PhbR, codificado por el gen *phbR*, posee dos promotores (p_{R1} y p_{R2}) y es el promotor p_{R2} , el cual es estimulado en la fase estacionaria por el factor σ^S y reprimido por el mismo PhbR (Peralta-Gil *et al.*, 2002; Centeno-Leija, 2013). Adicionalmente, la síntesis de P3HB también se encuentra regulada a nivel de actividad enzimática, mediante la inhibición competitiva llevada a cabo por la coenzima A libre (HSCoA) sobre la enzima β -cetotiolasa. La coenzima A libre (HSCoA) es formada principalmente debido a la incorporación de la acetil-CoA al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) durante condiciones de crecimiento no limitantes de oxígeno (Oeding y Schlegel, 1973; Manchak y Page, 1994; Kessler y Witholt, 2001; Centeno-Leija, 2013). En contraste, en condiciones de crecimiento limitantes de oxígeno junto con un exceso de fuente de carbono, se produce un arresto en el crecimiento y los niveles de cofactores como el NADPH aumentan (Oeding y Schlegel, 1973; Manchak y Page, 1994). El cofactor NADPH en altas concentraciones es un inhibidor de las enzimas del ciclo de ácidos carboxílicos: citrato sintetasa e isocitrato deshidrogenasa, provocando un aumento en la poza de acetil-CoA y la disminución de los niveles de coenzima A libre, lo cual le permite a la β -cetotiolasa superar la inhibición y llevar a cabo la síntesis del P3HB (Oeding y Schlegel, 1973; Manchak y Page, 1994; Kessler y Witholt, 2001; Centeno-Leija, 2013).

2.1.3: Ingeniería metabólica de *Escherichia coli* para la producción de P3HB.

E*scherichia coli* ha sido utilizado como un organismo modelo de expresión de genes heterólogos, debido al amplio conocimiento de su metabolismo y su genoma. Además como se mencionó anteriormente, posee diversas ventajas que la colocan como una de las primeras opciones para su utilización como sistema de expresión recombinante, con la finalidad de hacer el proceso de producción más sencillo y menos costoso (Fidler y Dennis, 1992; Madison y Huisman, 1999; Choi y Lee, 1997; Wegen *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2013). Anteriormente, se han logrado clonar y expresar los genes involucrados en la vía de síntesis de los PHAs de diversos organismos en *E. coli* (Madison y Huisman, 1999; Li *et al.*, 2007). Desde entonces se ha utilizado ampliamente a *E. coli* para la producción de P3HB utilizando diversas fuente de carbono, principalmente glucosa y residuos agroindustriales (Keshavarz y Roy, 2010; Nikel *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007). Como se

muestra en la **Tabla 2.2**, se han obtenido muy buenas productividades y un gran porcentaje de acumulación del polímero en el interior de la célula, incluso superando a la mayoría de los productores naturales del polímero. Sin embargo; con la finalidad de reducir los costos de producción y aumentar la eficiencia de la síntesis del P3HB se siguen buscando la utilización de fuentes de carbono baratas y la modificación; mediante técnicas de ingeniería metabólica a cepas de *E. coli* (Fidler y Dennis, 1992; Madison y Huisman, 1999, Steinbüchel y Lütke-Eversloh, 2003; Aldor y Keasling, 2003).

En la ingeniería metabólica se deben seguir diversos enfoques con la finalidad de mejorar la producción de un metabolito de interés; en este caso P3HB. Uno de ellos es controlar el flujo de las reacciones implicadas en la vía de síntesis, para esto existen diversas estrategias, una de ellas es aumentar el número de copias de un gen determinado con la finalidad de aumentar su expresión. Sin embargo, generalmente su uso específico para mejorar la producción de P3HB no causa una diferencia significativa en la tasa de producción, ya que existen otros factores que limitan el flujo de carbono hacia la producción del polímero (Aldor y Keasling, 2003). Otra es controlar las fuentes de carbono y su proporción administrada para obtener un co-polímero con el porcentaje deseado de cada monómero; con este enfoque se ha logrado obtener exitosamente el co-polímero P(3HB-co-3HV) el precursor de 3HV al medio de cultivo (Madison y Huisman, 1999; Aldor y Keasling, 2003).

Como fue demostrado por Hong y colaboradores en el 2003, la vía Entner-Doudoroff (ED) es de gran importancia para la producción de P3HB. Ellos predijeron por medio de un análisis de flujos metabólicos (MFA, por su siglas en inglés) que la vía ED es más utilizada por el microorganismo durante la fase de producción de P3HB y posteriormente fue demostrado experimentalmente, mediante la eliminación y reconstitución del gen *eda* que codifica para la enzima 2-ceto-3-deoxy-6-fosfogluconato aldolasa (Hong *et al.*, 2003). Los resultados de este estudio concuerdan con los resultados de un análisis proteómico de una cepa productora de P3HB de *E. coli* y otra cepa que no produce P3HB (Han *et al.*, 2001). Estos estudios indican dos factores de alta importancia para la producción de P3HB, el primero de ellos es la cantidad disponible del precursor acetil-CoA y el segundo es la disponibilidad del cofactor NADPH en la célula; ya que la vía ED es la principal fuente de este cofactor durante la fase de producción de P3HB (Hong *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2001).

Con la finalidad de redirigir el flujo de carbono hacia la producción del metabolito de interés, es común eliminar vías que compiten por los precursores del metabolismo central de carbono. De esta manera aumenta el rendimiento de producción del metabolito de interés (Yang *et al.*, 1998; Jian *et al.*, 2010; Fernández-Sandoval *et al.*, 2012; Centeno-Leija *et al.*, 2014). El acetil-CoA es el precursor inmediato para la síntesis de P3HB por lo que las vías metabólicas que compiten con ésta por el flujo de carbono son las vías de producción de acetato, lactato, etanol, succinato y formato. En el trabajo de Jian y colaboradores se eliminaron los genes de las vías de producción de acetato (*ackA-pta* y *poxB*), lactato (*ldhA*), etanol (*adhE*) y formato (*pflB*); obteniendo un aumento en el rendimiento de producción de P3HB de hasta 4 veces comparado con la cepa silvestre en condiciones microaeróbicas de cultivo (Jian *et al.*, 2010). Así también, se vio aumentada la biomasa generada, a pesar de que la velocidad de consumo de glucosa disminuyó un 40% en relación a la cepa silvestre. Esto es debido a la menor acumulación de subproductos como etanol o acetato; cuya toxicidad retarda el crecimiento celular (Jian *et al.*, 2010).

Existen diversas estrategias para aumentar la disponibilidad del cofactor NADPH en el interior de la célula. Una de las más utilizadas ha sido redirigir el flujo de carbono hacia la vía oxidativa de las pentosas fosfato ya que comúnmente es la principal vía de producción de NADPH en la célula (Lim *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2013; Hua *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2010). Las estrategias utilizadas han sido la sobre expresión de los genes *zwf* y *gnd*, que codifican para la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, respectivamente (Lim *et al.*, 2002). Además se ha evaluado la eliminación del gen *pgi* que codifica para la fosfogluconato isomerasa, con la finalidad de redirigir el flujo de carbono hacia la vía de las pentosas fosfato. Esta estrategia ha sido exitosa para la producción de timidina al aumentar el cociente NADPH/NADP⁺ (Lee *et al.*, 2010). De igual manera, se ha utilizado el sistema de transhidrogenasas de *E. coli* (PntAB y UdhA) para promover la interconversión entre los cofactores NADH y NADPH. La sobreexpresión de la transhidrogenasa citosólica de *E. coli*, UdhA, fue utilizada para mejorar la producción de P3HB en una cepa recombinante de *E. coli*; alcanzando un aumento del 49% al 66% de P3HB/gcdw y un aumento en la concentración final de 3.52 a 6.42 g/L (Sánchez *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2013).

Una estrategia alternativa es utilizar la vía Embden-Meyerhof-Parnas para la generación de NADPH mediante una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺, la cual ha sido reportadas en bacterias como *Bacillus subtilis* (*gapB*), *Streptococcus mutans* (*gapN*) y

Clostridium acetobutylicum (*gapC*) (Centeno-Leija, 2013; Martínez *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2013; Boyd *et al.*, 1995). Recientemente en nuestro laboratorio se reemplazó el gen que codifica para la enzima glucolítica endógena de *E. coli*, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ (*gapA*) por el gen que codifica para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ (*gapN*) de *S. mutans*. Esto logra aumentar el nivel de NADPH disponible en la célula (Centeno-Leija *et al.*, 2013). Sin embargo, la actividad de GapN fue menor a la esperada ya que se había reportado que GapN presenta una afinidad de sustrato 10 veces mayor que GapA (Centeno-Leija *et al.*, 2013; Marchal y Branlant, 2002). En el trabajo de Centeno-Leija se evaluó la co-expresión de los genes *gapA* y *gapN*, mediante el uso de un vector para expresar el gen heterólogo, encontrando resultados favorables tanto para el crecimiento de la cepa, como en el aumento del cofactor NADPH (Centeno-Leija *et al.*, 2014). Así mismo, utilizando la vía de producción de P3HB de *A. vinelandii* y la expresión del gen *gapN*, junto con la eliminación del operón *ackA-pta*, se logró aumentar la producción de P3HB en un 30% comparado con la cepa silvestre. Esto corresponde al 77% del rendimiento máximo teórico (0.48 g_{P3HB}/g_{GLC}). Demostrando así que la sobreexpresión de *gapN* y la eliminación del operón *ackA-pta*, permitieron mejorar la disponibilidad de acetil-CoA y del cofactor NADPH, favoreciendo la producción de P3HB en *E. coli* (Centeno-Leija *et al.*, 2014).

2.2- Los ácidos hidroxialcanoicos quirales.

2.2.1- Generalidades y aplicaciones del 3-hidroxitirato.

Los ácidos hidroxialcanoicos (HAs) representan una clase importante de químicos con propiedades antimicrobianas, insecticidas y antivirales. Además son utilizados ampliamente como moléculas base para la síntesis de compuestos de alto valor agregado como vitaminas, saborizantes, antibióticos, feromonas, etc. (Chen y Wu, 2005; Tokiwa y Ugwu, 2007; Lee y Lee, 2003). Debido a una estricta regulación farmacéutica en diversos países para asegurar la seguridad y eficiencia de los fármacos registrados, éstos deben ser de un enantiómero puro (Angelo, 1996; Chen y Wu, 2005). El (*R*)-3-hidroxitirato (R3HB) es utilizado como precursor para la síntesis de 4-acetoxi-azetidionona, el cual es un precursor para la formación de antibióticos carbanepem, quienes tienen un mercado global que puede ascender a mil millones de US\$ anuales (Lee y Lee, 2003).

Aunado a la aplicación como precursor químico, existen estudios que proponen la utilización directa del R3HB para su uso médico, ya que confiere protección y estabilidad neuronal durante la falta de glucosa, así mismo puede ser fuente de energía durante deficiencias cardíacas, lo cual previene una falla cerebral (Tokiwa y Ugwu, 2007). Un derivado del (*R*)-3-hidroxi butirato, el 3-hidroxi butirato-metil-éster (3-HBME) ha sido investigado por su capacidad como potenciador de la memoria y aprendizaje en ratones (Zou *et al.*, 2009). Adicionalmente se ha propuesto la utilización del 3-HBME y otros *R*-3-hidroxi alcanoatos metil ésteres (3-HAME) como biocombustibles o aditivos para mejorar la combustión. (Zhang *et al.*, 2009b).

La síntesis química de los HAs es un proceso difícil del que se obtienen mezclas racémicas de ambos enantiómeros de la molécula, por lo cual existen pocos reportes al respecto (Chen y Wu, 2005). La principal forma de producción de HAs es la despolimerización de los polihidroxi alcanoatos, los cuales están formados exclusivamente por enantiómeros *R* (Lee *et al.*, 1999a; Chen y Wu, 2005). La despolimerización puede llevarse a cabo por la vía química; mediante hidrólisis ácida o por la vía enzimática la cual incluye el uso *in vitro* de enzimas despolimerasas presentes en los productores naturales de los PHAs. Desafortunadamente, debido al bajo rendimiento y la dificultad del proceso, éste no ha sido una estrategia efectiva para la producción industrial de R3HB (Gao *et al.*, 2002; Chen y Wu, 2005). Otro método reportado y patentado es la degradación *in vivo* de los polihidroxi alcanoatos por organismos como *Ralstonia eutropha* y su posterior purificación mediante cromatografía líquida de alta resolución (Lee *et al.*, 1999b). A pesar de que se han obtenidos buenos resultados con esta estrategia, la utilización de estrategias similares con otros organismos resulta en bajas productividades; por lo que se sigue en búsqueda de estrategias para el aumento de la producción de R3HB (Lee *et al.*, 1999a; Gao *et al.*, 2002).

2.2.2- Ingeniería metabólica para la producción de (*R*)-3-hidroxi butirato.

La principal desventaja de las estrategias de producción utilizando organismos naturales, es la presencia de enzimas que convierten el R3HB a acetoacetato para ser introducido como fuente de carbono al metabolismo del organismo (Tokiwa y Ugwu, 2007). En el 2003, el grupo de Sang Yup Lee reportó el uso de la ingeniería metabólica de *E. coli* para la producción de *R*-HAs, al utilizar la expresión heteróloga de la vía de despolimerización de los PHAs de *R. eutropha*. Logró títulos de 9.6 g/L de R3HB. Así mismo, se ha estudiado la producción de los R3HB a partir de una vía directa utilizando las dos primeras enzimas de la vía de síntesis del P3HB

(*phbA* y *phbB*), junto con otras dos enzimas provenientes de *Clostridium acetobutylicum*, la enzima fosfotransbutirilasa y la butirato cinasa codificadas por los genes *ptb* y *buk*, respectivamente (Gao *et al.*, 2002). Esta estrategia logró la producción de 12 g/L de R3HB en una fermentación en lote alimentado, lo cual resalta la importancia del uso de la ingeniería metabólica para la búsqueda de un proceso más eficiente y económicamente redituable (Gao *et al.*, 2002; Chen y Wu, 2005).

En el 2007 Qian Liu y colaboradores, reportan la sobreexpresión de la tioesterasa II, una enzima endógena de *E. coli*, como una alternativa para la producción de R3HB, al catalizar la hidrólisis directa del (*R*)-3-hidroxi-butiril-CoA al (*R*)-3-hidroxi-butirato. En este estudio reportan títulos de hasta 12.2 g/L de R3HB alcanzando 17 g/L de peso celular seco (CDW). Utilizaron un cultivo tipo lote alimentado con una cepa transformada con el plásmido que lleva los genes *phbA*, *phbB* y *tesB* (que codifica para la tioesterasa II). Superando así a las estrategias anteriores para la producción de R3HB (Liu *et al.*, 2007). Estudios más recientes han evaluado la importancia de la enzima tioesterasa II para la producción del enantiómero (*R*) o (*S*) del 3-hidroxi-butirato (Tseng *et al.*, 2009; Joung *et al.*, 2011). Tseng y colaboradores en su trabajo reportado en el 2009, evaluaron diversas vías de producción de *R* y *S* 3-hidroxi-butirato en *E. coli*, utilizando glucosa como fuente de carbono. En este trabajo, se evalúan enzimas estereoespecíficas para la síntesis de R3HB en su conformación *S* como son la enzima codificada por el gen *hbd*, una deshidrogenasa dependiente de NADH y otras dos tiolasas (*BktB* y *Thl*). Los resultados determinaron que *TesB* remueve la Coenzima A del precursor 3-hidroxi-butiril-CoA en cualquiera de las conformaciones (*R* o *S*). Así mismo, la mejor combinación para la producción de R3HB fue la de la tiolasa *PhbA*, la deshidrogenasa *PhbB* y la tioesterasa II; superando la estrategia con los genes de *C. acetobutylicum* (*ptb* y *buk*) (Tseng *et al.*, 2009).

2.2.3- Producción de (*R*)-3-hidroxi-butirato utilizando residuos agroindustriales.

Uno de los factores que cobran gran importancia para la producción industrial de R3HB es el costo de los substratos. El alto costo de la materia prima puede contrarrestar la ventaja generada por altos rendimientos y altos grados de pureza. Es por esto que varios esfuerzos en investigación se han concentrado en la utilización de substratos baratos como es el caso de los residuos agroindustriales (Ren *et al.*, 2010). Se han reportado la producción de PHAs y HAs utilizando material lignocelulósicos (Li *et al.*, 2007; Alva y Riley, 2008; Yu y Stahl, 2008; Wang y Liu, 2014). Sin embargo, es necesario la optimización de los procesos para obtener HAs con altos

rendimientos y cepas con altas capacidades de utilización de xilosa y otras pentosas; presentes en los residuos lignocelulósicos. Adicionalmente, se busca disminuir la formación de subproductos indeseables, que dificulten los procesos de purificación derivados de los procesos de recuperación de los materiales lignocelulósicos (Ren *et al.*, 2010).

2.3- Fermentación de xilosa y derivados lignocelulósicos.

2.3.1- El metabolismo de la xilosa por *E. coli*.

Los de materiales lignocelulósicos son una gran oportunidad para la obtención de productos fermentativos que se requieren en gran cantidad y a un bajo costo, debido a que son los residuos más abundantes de procesos agroindustriales. La xilosa está presente en la naturaleza en forma de xilano en la hemicelulosa un heteropolisacárido de la pared celular vegetal. Este es el segundo polímero más abundante, después de la celulosa, y constituye de un 20 a un 35 % de la biomasa de los componentes lignocelulósicos (Saha, 2003). Los hidrolizados de lignocelulosa resultan en una mezcla de azúcares, en la cual la glucosa es la hexosa más abundante y la xilosa la pentosa más abundante, con una proporción de hasta el 85 % de pentosas y el 15 % de hexosas (Fernández-Sandoval *et al.*, 2012; Saha, 2003).

A pesar de que la xilosa es un componente abundante en la biosfera, raramente está en forma monomérica, por lo cual la mayoría de los organismos no pueden utilizarla de manera eficiente como fuente de carbono. *Escherichia coli* es capaz de utilizar xilosa como fuente de carbono para la producción de diversos metabolitos, se han diseñado cepas de *E. coli* para aumentar la eficiencia del consumo de xilosa como fuente de carbono (Saha, 2003). Se conocen dos diferentes clases de transportadores de xilosa en *E. coli* que median la internalización de xilosa a la célula. Uno es el transportador ABC codificado por los genes *xylF*, *xylG* y *xylH* y el transportador simporte protón/xilosa codificado por el gen *xylE* (Sumiya *et al.*, 1995). Es conocido que el transportador ABC utiliza una molécula de ATP para el transporte de la xilosa y otra para la fosforilación de la xilulosa, lo que provoca un estado celular limitado de ATP que disminuye el crecimiento de la cepa considerablemente (Hasona *et al.*, 2004, Utrilla *et al.*, 2012). La eliminación de los genes *xylFGH*, junto con otras vías que compiten por el flujo de carbono (*pflB*, *adhE*, *frdA*) aumentaron hasta un 50% el crecimiento de una cepa lactogénica de *E. coli* (Utrilla *et al.*, 2012).

En un estudio reciente de nuestro laboratorio, se ha obtenido una cepa capaz de utilizar xilosa de forma eficiente, mediante evolución adaptativa. La cepa obtenida generó una mutación puntual en el gen del transportador GatC (S184L) confiriéndole una mayor capacidad de consumo de xilosa (Utrilla *et al.*, 2012). Posteriormente, se observó que al sobreexpresar el gen *gatC* en una cepa de *E. coli* modificada para producir PHAs, aumenta el consumo de xilosa y la producción del copolímero poli(lactato-co-3-hidroxi-butirato) (Nduko *et al.*, 2013).

Justificación

De acuerdo con los antecedentes anteriores, el estudio de la utilización de microorganismos para la producción de químicos está en aumento, debido a las diversas ventajas que poseen estos sistemas. Entre las que destacan: un proceso más amigable con el medio ambiente, al reducir la cantidad de dióxido de carbono emitido en comparación con los procesos de producción a partir de derivados del petróleo. Otra ventaja es la posibilidad de utilizar residuos agroindustriales como fuentes de carbono, lo cual permite un proceso más sustentable ecológicamente hablando (Lee *et al.* 2011a; Lee *et al.* 2011b; Chen *et al.*, 2013). En el caso específico de la producción de (*R*)-3-hidroxi-butirato la utilización de la vía de síntesis de los PHAs es adecuada por su estereoespecificidad. Además, el uso de *Escherichia coli* como modelo de estudio para la producción de este compuesto; permite que sea un proceso versátil, sustentable y con posibilidades de mejoramiento por ingeniería metabólica. En este trabajo proponemos la modificación de *E. coli* con el fin de re-dirigir el flujo de carbono hacia la formación del precursor acetil-CoA y hacia la vía sintética de producción de (*R*)-3-hidroxi-butirato. Ésta consiste en las dos primeras enzimas de la vía de formación de los PHAs de *Azotobacter vinelandii* (codificadas por los genes *phbA* y *phbB*) y la tioesterasa II de *E. coli* (codificada por el gen *tesB*) (Yang *et al.*, 1998; Jian *et al.*, 2010; Fernández-Sandoval *et al.*, 2012; Centeno-Leija *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2007). Así mismo, el aumento del cofactor NADPH disponible en la célula por la actividad del gen *gapN* de *Streptococcus mutans* mejorará la producción de R3HB, ésto al favorecer el flujo hacia la formación del producto y la utilización del NADPH acumulado (Lee *et al.*, 2013; Centeno-Leija *et al.*, 2014). En suma, la aplicación de estas estrategias en un sistema microbiológico bien estudiado como es *E. coli* otorgará un proceso adecuado para la obtención de (*R*)-3-hidroxi-butirato a partir de glucosa u otras fuentes de carbono alternas como puede ser la xilosa.

III- HIPOTESÍS.

La generación de NADPH por medio de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa permitirá acoplar el metabolismo de *Escherichia coli* para la producción de R3HB; Además la eliminación de todas las vías de fermentación logrará canalizar eficientemente el flujo de carbono hacia la formación de biomasa, acetil-CoA y los productos indicados a partir glucosa o xilosa.

IV- OBJETIVOS.

Objetivo General:

Evaluar la producción de (R)-3-hidroxitirato utilizando como fuente de carbono glucosa o xilosa, acoplando la vía de síntesis del polímero de *Azotobacter vinelandii* con la generación de NADPH por medio de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de *Streptococcus mutans*, en una cepa de *Escherichia coli* no fermentativa con capacidad incrementada para transportar xilosa.

Objetivos Particulares:

1. A partir de la cepa de *E. coli* MS01 (*E. coli* MG1655 Δ *pfIB*, Δ *adhE*, Δ *frdA*, Δ *xylFGH*, Δ *reg 27.3 kb*, *gatC S184L*, Δ *midarpA*, Δ *ldhA*) generar una cepa no fermentativa con capacidad reducida en producción de acetato (AV14).
2. A partir de la cepa AV14 generar una cepa que exprese los genes *gapA* y *gapN* de forma coordinada (AV14N1).
3. Caracterizar el crecimiento y la producción de acetato por la cepa AV14N1 en matraces con glucosa como fuente de carbono.
4. Expresar los dos primeros genes del operón *phbBAC* de *A. vinelandii* junto con el gen *tesB* de *E. coli*, bajo un promotor inducible por IPTG, para dirigir el acetil-CoA generado por la cepa AV14N1 hacia la producción de R3HB.
5. Evaluar la producción de R3HB en matraces con glucosa como fuente de carbono, usando la cepa AV14N1 transformada con el vector de expresión con la vía de síntesis de R3HB.
6. Evaluar el crecimiento y rendimiento de producción de R3HB de las cepas modificadas de *E. coli* en fermentadores de 0.75 litros, usando como fuente de carbono glucosa o xilosa.
7. Evaluar la producción de R3HB en matraces con glucosa como fuente de carbono, sobreexpresando el gen *gapN* en plásmido.

V- MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1- Plásmidos, cepas y técnicas de biología molecular.

En este estudio se utilizaron diversas cepas de *Escherichia coli* para su evaluación en la producción de (R)-3-hidroxi-butirato. Se utilizaron la cepa silvestre MG1655 y la cepa MG1655 $\Delta ackA-pta$ (cepa con la eliminación de la vía principal del metabolismo de acetato) obtenida en un trabajo previo (Centeno-Leija *et al.*, 2014). La cepa MS01 (MG1655 $\Delta pfIB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xylFGH$, Δreg 27.3 kb, $gatC$ S184L, $\Delta midarpA$, $\Delta ldhA$) es derivada de una cepa obtenida por evolución adaptativa para aumentar su capacidad de transporte de xilosa y su tolerancia a acetato. Además, le fueron eliminadas las vías fermentativas de producción de etanol, lactato, succinato y formato (Utrilla *et al.*, 2012; Fernández-Sandoval *et al.*, 2012).

En el actual trabajo se inactivaron los genes *poxB* y *pta* de la cepa MS01, con la finalidad de reducir la producción de acetato (**Figura 5.1**). Para esto se utilizó el protocolo de inactivación cromosomal en un paso en *E. coli* usando productos de PCR reportado anteriormente (Datsenko & Watner, 2000). Se obtuvieron 2 cepas derivadas de estas inactivaciones, la AV11 (MS01 $\Delta poxB$) y la AV14 (MS01 $\Delta poxB$, Δpta). Las inactivaciones fueron comprobadas mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos para las regiones adyacentes al gen blanco. Se observó el tamaño diferencial del amplificado entre las cepas mutadas y la silvestre, provocado por el remplazo de la región blanco por el por el casete de resistencia a cloranfenicol. Posteriormente se realizó la escisión del casete de resistencia, como es reportado en un estudio anterior (Datsenko & Watner, 2000). Las cepas AV11 y AV14 fueron obtenidas con el apoyo de la Dra. Alejandra Vargas Tah y el I.Q Diego Muguerza Medina.

El vector pACYC*gapN* fue obtenido en el trabajo de la Dra. Sara Centeno-Leija, (Centeno-Leija *et al.*, 2014). Las técnicas de biología molecular empleadas en esta tesis (como: PCR, digestión con enzimas de restricción, transformación de cepas por electroporación, visualización del ADN por electroforesis en geles de agarosa, etc.) se llevaron a cabo de acuerdo a los procedimientos estándar (Sambrook, 2001) y a las recomendaciones de los proveedores de enzimas o reactivos. El ADN cromosomal fue aislado y purificado con el kit "Ultra Clean Microbial DNA Isolation" (MO BIO laboratories, Inc, USA).

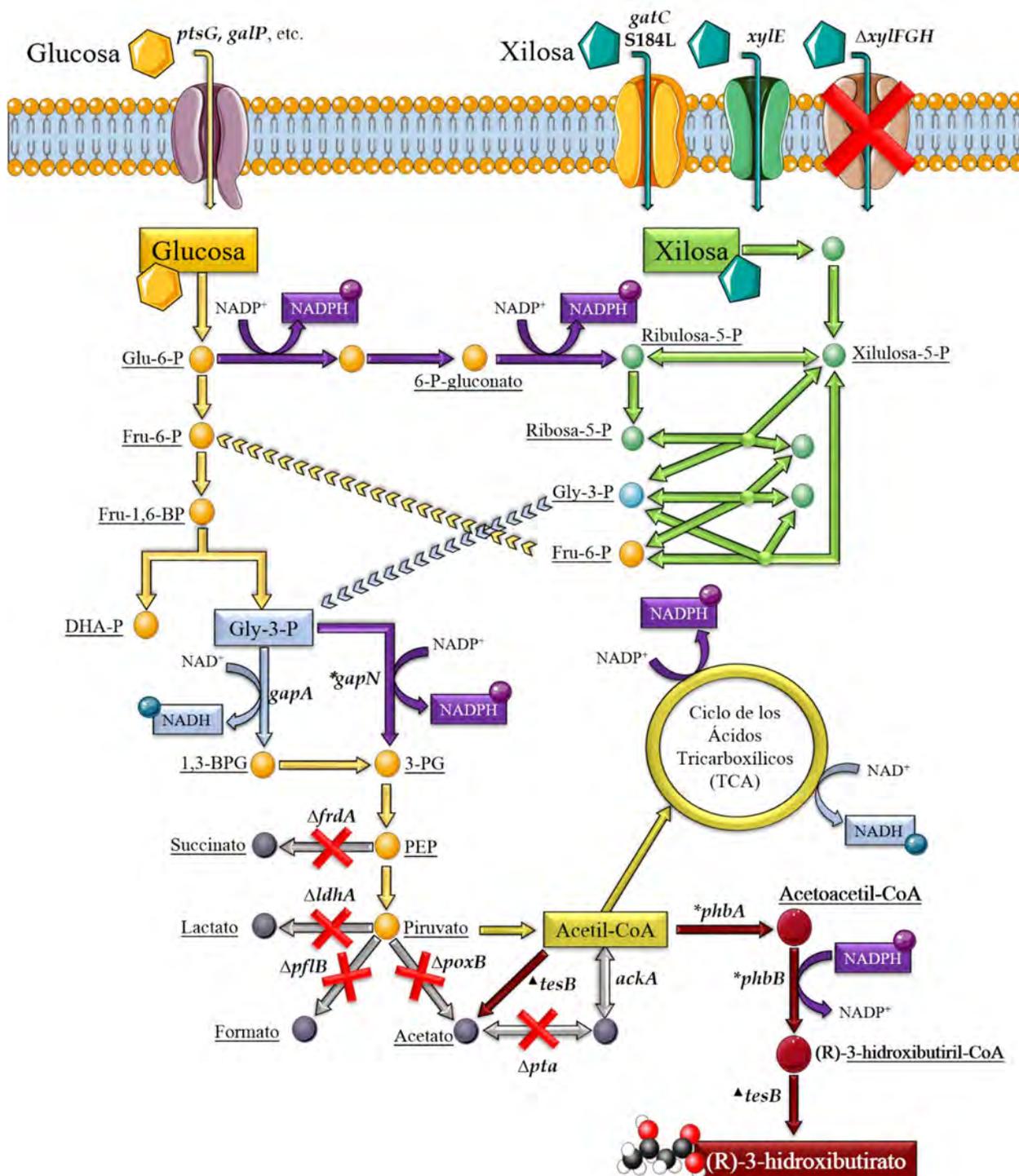


Figura 5.1: Metabolismo central de carbono y vía sintética de producción de (R)-3-hidroxiacetil-CoA en la cepa AV14N1. La vía Embden-Meyerhof se muestra en color naranja; en verde la vía de las pentosas fosfato (PPP, por sus siglas en inglés); en color guinda se encuentra la vía sintética de producción de (R)-3-hidroxiacetil-CoA; las vías fermentativas se colocaron en color gris; en color morado se destacan las vías productoras del cofactor NADPH y en azul celeste las de NADH. *, gen heterólogo; ▲, gen endógeno sobreexpresado, Δ, gen eliminado.

Tabla 5.1: Cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Cepas		
Nombre	Genotipo	Referencia
MG1655	<i>E. coli</i> K12 <i>F</i> ⁻ , <i>lambda</i> ⁻ , <i>ilvG</i> ⁻ , <i>rfb</i> -50, <i>rph</i> -1	Jensen, 1993
MG1655 Δ <i>ackA-pta</i>	MG1655 Δ <i>ackA-pta</i>	Centeno-Leija <i>et al.</i> , 2014
JU15	<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>pf1B</i> , Δ <i>adhE</i> , Δ <i>frdA</i> , Δ <i>xylFGH</i> , Δ <i>reg</i> 27.3 kb, <i>gatC</i> S184L, Δ <i>midarpA</i>	Utrilla <i>et al.</i> , 2012
MS01	JU15 Δ <i>dha</i>	Fernández-Sandoval <i>et al.</i> , 2012
AV11	MS01 Δ <i>poxB</i>	Este trabajo
AV14	MS01 Δ <i>poxB</i> , Δ <i>pta</i>	Este trabajo
AV14N1	AV14 <i>gapA-gapN_{op}</i>	Este trabajo
Plásmidos		
Nombre	Descripción	Referencia
pTrc992A	Diseñado como vector de expresión inducible por IPTG bajo el control del promotor híbrido <i>trp/lac</i> . Amp ^r	Muñoz-Gutiérrez <i>et al</i> 2012
pACYC184	Diseñado como vector de bajo número de copias (15 copias/ célula) con un origen de replicación p15A compatible con el origen ColE1, Tc ^r y Cm ^r	Chan y Cohen, 1978
pTrc-R3HB	Derivado del vector pTrc99A, diseñado para la expresión inducible por IPTG de los genes <i>phbB</i> y <i>phbA</i> de <i>A. vinelandii</i> , junto con el gen <i>tesB</i> de <i>E. coli</i> .	Este trabajo
pACYC <i>gapN</i>	Derivado del vector pACYC184; diseñado para la expresión inducible por IPTG del gen <i>gapN</i> de <i>Streptomyces mutans</i> .	Centeno-Leija <i>et al.</i> , 2014
pLoxGen4	Diseñado con el casete de resistencia a gentamicina flanqueado por los sitios de recombinación loxP.	Palmeros <i>et al.</i> , 2000
pLoxGapNopt	Derivado de pLoxGen4 conteniendo el gen <i>gapN</i> optimizado para el uso de codones de <i>E. coli</i>	Este trabajo
pUC57GapNopt	Derivado de pUC57 conteniendo el gen <i>gapN</i> optimizado para el uso de codones de <i>E. coli</i>	Este trabajo
pTrc- <i>gapN</i> -R3HB	Derivado del vector pTrc-R3HB, añadiéndose para su expresión conjunta el gen <i>gapN</i> optimizado para el uso de codones de <i>E. coli</i> ,	Este trabajo
Oligonucleótidos		
Nombre	Secuencia (5' - 3')	
ClonphbBA992-Fw	GTCTATCCGGAATTCTAATGAAAGGAGTATTCATGAGCAATCAACGAATTGCATTTCG	
ClonphbBA992-Rv	TGTAGAGTCGGTACCTCAACGCTCCACTGCGAGG	
ClontesB992-Fw	ACGACACTGGGTACCAAGGAGCTTATATGAGTCAGGCGCTAAAAAATTAC	
ClontesB992-Rv	AGTTCTCGGAAGCTTTTAATTGTGATTACGCATCACCC	
ClongapNlox-FW	ATAGGTCTTAAGAAGGAGCGGCAATGACAAAACAATATAAAAATTATG	
ClongapNlox-RV	ATGGACCTCGAGCCGTTATTTGATATCAAATACGACGG	
ClonGapNo-F1	GTTATAGGCAAGCTTAAGGAGACACGATGACG	
ClonGapNo-R1	GGTATGGACCTCGAGTTATTTAATGTCAAACACC	
DkGap-A-N-G-Fw:	TTACTCCAACAAAGTTCTGGACCTGATCGCTCACATCTCCAAATAAGTTGTGTGCTGCAAGGCGATTAAG	
DkGap-A-N-G-Rv	TGACCGGAAGGGCAAAAATTTCTTAATCATGACGCAGTCCTTTAACTTCGTGAGCGGATAACAATTTAC	
CompA-N-G-F1	AAAGGCGTTCTGGGCTACAC	
CompA-N-G-R1	TTCTTCACCCGCAGTTTCC	

Los genes fueron amplificados con la enzima de alta fidelidad “Kapa Hifi DNA Polymerases” (KAPA BIOSYSTEMS, Inc, USA) en un termociclador C1000 “Touch Thermal Cycler Manual” (Bio-Rad Laboratories, Inc. USA). Así mismo, los productos de PCR fueron purificados a partir de geles de agarosa con el kit “GeneJet Gel Extraction” (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA). Se ordenó la síntesis del gen *gapN* optimizado para el uso de codones de *E. coli* con la compañía Genscript, Inc, USA. La secuencia fue diseñada bajo el criterio del algoritmo Gene Optimum™ (Genscript, Inc, USA). La compañía entregó el gen *gapN* clonado en el vector pUC57.

5.1.1- Construcción del plásmido pTrc-R3HB

El plásmido pTrc99A fue extraído a partir de un cultivo saturado “overnight” en medio LB (Luria Broth), mediante lisis alcalina y purificado con isopropanol y etanol. Posteriormente fue digerido utilizando las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI* (Thermo Fisher Scientific Inc. USA) en una digestión consecutiva. Utilizando los oligonucleótidos ClonphbBA992-Fw y Rv se amplificaron los dos primeros genes de la vía de síntesis del P3HB de *A. vinelandii* (*phbB* y *phbA*) junto con los sitios de restricción en los extremos para las enzimas *EcoRI* y *KpnI*, a partir del vector pPHB_{AV} (Centeno-Leija *et al.*, 2014). Con los oligonucleótidos ClontesB992-Fw y Rv se amplificó el gen *tesB* a partir de ADN cromosomal de la cepa MS01 de *E. coli*, los oligonucleótidos incluyen los sitios de restricción para las enzimas *KpnI* y *HindIII* en los extremos. Se realizaron las digestiones de ambos amplificados con las enzimas respectivas en digestiones consecutivas y se purificaron mediante extracción de gel de agarosa usando el kit “GeneJet Gel Extraction” (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA). La ligación exitosa se realizó en una relación vector-inserto de 1:1 utilizando la ADN ligasa T4 (Thermo Fisher Scientific Inc. USA). Se transformó la ligación en la cepa DH5 α y se seleccionaron en placas LB-agar (1.5 %) con carbenicilina (100 μ g/mL). La construcción obtenida fue comprobada con PCR, por digestión con la enzima *EcoRV* (Thermo Fisher Scientific Inc. USA) y por secuenciación.

5.1.2- Construcción del vector pLoxGapNopt.

El vector pLoxGen4 fue extraído y purificado de un cultivo saturado “overnight” en medio LB con gentamicina (10 μ g/mL), mediante el protocolo anteriormente mencionado. El vector fue digerido con las enzimas *NotI* y *EcoRI* (Thermo Fisher Scientific Inc. USA) con la finalidad de retirar el segundo sitio de clonación múltiple (MCS). Posteriormente, se utilizó el fragmento de Klenow

(Thermo Fisher Scientific Inc. USA) para formar extremos romos. El vector fue religado añadiendo polietilenglicol al 5 % (p/v) a la reacción, ésta se incubó a 16 °C “overnight”. Para confirmar la eliminación del segundo sitio de clonación múltiple, se realizó una doble digestión con las enzimas *NcoI* y *XhoI* (Thermo Fisher Scientific Inc. USA), lo cual en el caso de estar presente el segundo MCS el resultado esperado serían dos bandas de aproximadamente 3161 y 1078 pb. En el caso de haber sido eliminado satisfactoriamente se esperaba sólo el corte con la enzima *XhoI*, linearizando el vector de aproximadamente 4,200 pb.

El gen *gapN* optimizado por uso preferencial de codones fue amplificado con los oligonucleótidos ClongapNo-F y R junto con los sitios de restricción *HindIII* y *XhoI*, a partir del vector pUC57GapNopt (Genscript, Inc, USA.). Mediante el uso del kit de clonación rápida en el sistema TOPO®-TA Cloning kit (Invitrogen™, Cat 45061) se obtuvo el plásmido TOPO-GapNopt. Éste fue digerido con las enzimas *HindIII* y *XhoI* para la liberación del inserto y su posterior subclonación en el vector pLoxGen4-short, al cual se le eliminó el segundo MCS. La construcción obtenida (denominada pLoxGapNopt) fue comprobada con PCR, por digestión con la enzima *EcoRV* (Thermo Fisher Scientific Inc. USA) y por secuenciación.

5.1.3- Construcción del vector pTrc-*gapN*-R3HB.

Se partió del vector pTrc-R3HB purificado de un cultivo saturado “overnight” en medio LB con carbenicilina (100 µg/mL) por el protocolo estandarizado de lisis alcalina. El gen *gapN* optimizado fue obtenido del vector TOPO-GapNopt obtenido anteriormente. Ambos vectores fueron digeridos con la enzima de restricción *EcoRI* (Thermo Fisher Scientific Inc. USA). Posteriormente el vector pTrc-R3HB fue desfosforilado con la enzima fosfatasa alcalina de camarón (Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP, Thermo Fisher Scientific Inc. USA) utilizando las condiciones recomendadas por el proveedor. El vector pTrc-R3HB desfosforilado y el inserto liberado por digestión del vector TOPO-GapNopt fueron purificados por extracción a partir de geles de agarosa con el kit “GeneJet Gel Extraction” (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA). La ligación fue realizada con la enzima T4 (Thermo Fisher Scientific Inc. USA) utilizando como controles las reacciones de ligación sin inserto y con el vector pTrc-R3HB sin desfosforilar para comprobar la eficiencia de la clonación. Se transformaron las ligaciones en células competentes de la cepa DH5α y se comprobó la correcta orientación del inserto en las candidatas por digestión con la enzima *XhoI* (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA).

5.1.4- Integración cromosomal de *gapN* en *E. coli*.

La integración del gen *gapN* se realizó utilizando el método modificado de inactivación cromosomal en un paso en *E. coli* usando productos de PCR (Datsenko & Watner, 2000). Del vector pLoxGapNopt se obtuvo un fragmento amplificado que contenía el gen *gapN* y el casete de resistencia a gentamicina flanqueado por los sitios loxP, utilizando los oligos DkGap-A-N-G Fw y Rv. Posteriormente, se realizó la recombinación en la cepa AV14 dirigida a la obtención de la inserción del gen *gapN* río abajo del gen *gapA* formando un operón. La cepa obtenida fue denominada AV14N1 (**Figura 5.1**) y comprobada por PCR con los oligos CompANG Fw y Rv. El producto amplificado fue secuenciado y confirmado su correcta inserción.

5.1.5- Preparación y Transformación de células electrocompetentes.

Las células electrocompetentes fueron preparadas realizando lavados con agua y glicerol, las células fueron mantenidas a 4 °C durante el proceso y almacenadas a -70 °C hasta su utilización. La transformación con los vectores se realizó utilizando una cantidad de 10-100 ng de vector en celdas para electroporar pre-enfriadas y se llevó a cabo en un electroporador Eppendorf® 2510 a 1800 V. Posteriormente, las células electroporadas se recuperaron en medio SOB con glucosa por una hora, al cumplir el tiempo de recuperación fueron “plaqueadas” en cajas Petri con medio solido LB-Agar (1.5 %) y el antibiótico correspondiente a la resistencia del vector utilizado (Sharma y Schimke, 1996).

5.2.- Condiciones y Medios de Cultivos.

5.2.1- Caracterización de las cepas construidas.

Se realizó una cinética de consumo de glucosa y evaluación de la producción de acetato con las cepas MS01, AV14 y AV14N1 en medio mínimo mineral AM2, el cual es derivado del medio mineral AM1 (Martínez *et al.*, 2007) suplementado con ácido cítrico (100 mg/L). El medio AM1 contiene las siguientes sales por litro: 2.63 g (NH₄)₂HPO₄, 0.87 g NH₄H₂PO₄, 0.246 g MgSO₄.7H₂O y 0.15g KCl, además de 1 mM betaína y 1.5 mL de elementos traza. La solución de elementos traza contiene por litro: 1.6 g FeCl₃, 0.2 g CoCl₂.6H₂O, 0.1 g CuCl₂, 0.2 g ZnCl₂.4H₂O, 0.2 g Na₂MoO₄, 0.05 g H₃BO₃ y 0.33 g MnCl₂.4H₂O. Además el pH fue amortiguado mediante la adición de MOPS a 0.1 M de MOPS, pH 7. Se utilizó una concentración de glucosa final de 5 g/L y se realizaron

pruebas por triplicado. El cultivo del pre-inóculo fue realizado “overnight” en medio LB hasta su saturación. El inóculo se realizó en 25 mL de medio mínimo AM2 suplementado con glucosa (5 g/L) en matraces de 250 mL. Se monitoreó el crecimiento del inóculo hasta alcanzar 2-3 densidades ópticas a 600 nm (DO_{600}). Después se procedió a la inoculación de los matraces de 250 mL, conteniendo 50 mL del medio AM2 suplementado con glucosa (5 g/L). Se inoculó con la cantidad necesaria para empezar la cinética con 0.1 DO_{600} . Se monitoreó la DO y se tomaron muestras durante el cultivo. Posteriormente, se determinó la cantidad de azúcares presentes en cada muestra, así como de ácido acético, esto se llevó a cabo mediante cromatografía de alta resolución (HPLC).

5.2.2- Evaluación de la producción de R3HB en matraz.

Se evaluaron las cepas MG1655, MG1655 $\Delta ackA-pta$, MS01, AV14 y AV14N1 para la producción de R3HB con el vector pTrc-R3HB. Así mismo se evaluaron las cepas MG1655, MG1655 $\Delta ackA-pta$, MS01 y AV14N1 con los dos vectores pTrc-R3HB y pACYC*gapN*. Igualmente se evaluaron las cepas anteriores con el vector pTrc-*gapN*-R3HB. Para esto se utilizó el medio mínimo mineral AM2 suplementado con 10 g/L de glucosa y amortiguado con 0.1 M de MOPS, pH 7. Se utilizaron matraces de 250 mL con 50 mL de medio en condiciones aeróbicas a 300 rpm y a 37 °C. Como controles se utilizaron las cepas AV14 y MG1655 $\Delta ackA-pta$ transformadas con el vector pTrc992A. Además de pACYC184 en combinaciones con los vectores pTrc-R3HB y pACYC*gapN* en la cepa MG1655 $\Delta ackA-pta$. Los cultivos fueron inoculados a partir de una adaptación previa en las mismas condiciones de trabajo, empezando con una DO_{600} de 0.1= 0.042 g/L de masa celular en peso seco. Una vez alcanzada la fase exponencial temprana, correspondiente con una DO_{600} de 0.8-1, se realizaba la inducción con 0.1 mM de IPTG (Centeno-Leija et al., 2014). Para la evaluación de producción de R3HB con el vector pTrc-*gapN*-R3HB se utilizaron las cepas MG1655, MG1655 $\Delta ackA-pta$, MS01 y AV14N1, transformadas con el vector en las condiciones previamente descritas.

5.2.3- Evaluación de la producción de R3HB en biorreactor.

Las cepas MG1655, AV14 y AV14N1 transformadas con el vector pTrc-R3HB fueron evaluadas para la producción de R3HB en biorreactores de 1 L Applikon 1010/ ADI 1025 (Schiedam, The Netherlands), con un volumen de trabajo de 750 mL. Los cultivos se realizaron a temperatura controlada de 37°C y pH controlado a 7 con KOH 4 N, el valor de aireación se mantuvo constante

a 0.5 vvm y se utilizó una agitación de 800 rpm y 500 rpm. El medio de cultivo fue el medio mínimo mineral AM2 suplementado con 40 g/L de glucosa o xilosa y con una concentración de sales de amonio 3 veces superior al medio original ($7.89 \text{ g L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $2.61 \text{ g L}^{-1} \text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$); el resto de los componentes del medio se mantuvieron a las concentraciones anteriormente descritas. Los inóculos fueron preparados en medio AM2 suplementado con 5 g/L de glucosa o xilosa, en matraces con condiciones aeróbicas a 300 rpm de agitación y a 37 °C. Alcanzada la fase exponencial se recolectan las células correspondientes para empezar el cultivo en el biorreactor a 0.1 DO₆₀₀. Los cultivos fueron inducidos a una DO₆₀₀ de 0.8-1 con 0.1 mM de IPTG en todas las condiciones. (Fernández-Sandoval *et al.*, 2012; Centeno-Leija *et al.*, 2014). Para realizar el cultivo con limitación de nitrógeno se utilizó el medio AM2 original el cual contiene únicamente 47.6 mM de nitrógeno, lo cual permitiría alcanzar aproximadamente 4.8 g/L de peso celular seco en la cepa evaluada AV14N1/ pTrc-R3HB. En este ensayo se utilizó como fuente de carbono glucosa (40g/L). El cultivo se agitó de 800-900 rpm y 0.5 vvm, manteniendo la tensión de oxígeno disuelto superior al 20 %.

5.3- Determinaciones de productos y metabolitos.

Para el seguimiento del crecimiento celular se tomaron muestras a diferentes tiempos del cultivo y se midió su densidad óptica a 600 nm (DU-70, Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA). Además se utilizó una curva de conversión a peso seco celular donde $1 \text{ DO}_{600} = 0.42 \text{ g/L}$ peso seco celular (DCW, por su siglas en inglés) de acuerdo con el trabajo de Centeno-Leija (Centeno-Leija *et al.*, 2014). Para la determinación de azúcares (glucosa y xilosa) y ácidos orgánicos (incluidos el piruvato, acetato y el R3HB), las muestras colectadas se centrifugaron y el sobrenadante se almacenó a -20°C hasta su análisis mediante HPLC (Waters U6K, Millipore Co., Milford, MA) en una columna de exclusión iónica Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) acoplada a un detector de índice de refracción (Modelo 2410, Waters, Millipore Co., Milford, MA) y a un detector de arreglo de diodos a 210 nm (Modelo 996, Waters, Millipore Co., Milford, MA). La fase móvil usada fue ácido sulfúrico 5.0 mM a un flujo de 0.5 mL/min y 50°C. La determinación de la actividad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, por sus siglas en inglés) de GapN y de GapA se realizó en las cepas AV14N1 sin vector y AV14N1 transformada con el vector pACYCgapN, la cepa AV14 se utilizó como control. Se partió de un cultivo en medio mineral mínimo AM2 suplementado con 10 g/L de glucosa a 37 °C y 300 rpm.

La inducción de la cepa AV14N1/ pACYC*gapN* fue con 0.1 mM de IPTG a una DO₆₀₀ de 0.8-1. Las células fueron colectadas a 3 DO₆₀₀, posteriormente se tomó la cantidad de cultivo necesario para concentrar 10 DO₆₀₀/mL y se centrifugó a 4000 x g (10 min a 4°C). Se realizó un lavado de las células con el amortiguador A (Tricina 20 mM, pH 8.5, suplementado con 2-mercapto-etanol al 3mM), se siguió con una centrifugación a 4000 x g (10 min a 4 °C). Las células fueron resuspendidas en 1 mL del amortiguador A y lisadas por sonicación con 3 pulsos de 30 s y pausas de 30 s a 4 °C usando un sonicador “Soniprep” (150 ultrasonic disintegrator, MSE Ltd, London, U.K.), usando un baño de hielo con etanol. Los restos celulares fueron removidos por centrifugación a 9300 x g (10 min a 4 °C). El sobrenadante fue recuperado y utilizado para las mediciones enzimáticas. Las condiciones utilizadas en las reacciones enzimáticas fueron a 37 °C y volumen total de 1 mL. La reacción para la medición de la actividad NADP⁺-GAPDH se llevó a cabo en una mezcla de NADP⁺ (1 mM) y D-Gliceraldehído-3-Fosfato (1 mM) disueltos en amortiguador A, añadiendo el extracto celular y monitoreando la aparición de NADPH por medio del aumento de la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro “NanoDrop 2000c” (UV-Vis spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific Inc. USA). La actividad NAD⁺-GAPDH se realizó en una mezcla de NAD⁺ (1 mM), D-Gliceraldehído-3-Fosfato (1 mM) y AsO₄³⁻ (10 mM) disueltos en amortiguador A, añadiendo el extracto celular y monitoreando la aparición de NADH de igual manera a 340 nm en un espectrofotómetro (Centeno-Leija *et al.*, 2014). Para el cálculo de la actividad volumétrica se utilizó el coeficiente de extinción molar correspondiente de 6220 M⁻¹cm⁻¹ y utilizando la formula siguiente se calculó la actividad volumétrica del extracto:

$$Actividad\ volumétrica = \frac{m\ (Abs/min)}{\epsilon(M^{-1}cm^{-1})} \times \frac{Volumen\ de\ reacción\ (mL)}{Volumen\ añadido\ de\ enzima\ (mL)}$$

Donde m es la pendiente de la gráfica de Absorbancia vs tiempo, obtenida usando los datos de la cinética de la reacción y ϵ es el coeficiente de extinción molar. Posteriormente, se calcula la actividad específica por miligramo de proteína total; dividiendo la actividad volumétrica entre la concentración de proteína total del extracto. Una unidad de actividad específica se definió como 1 nmol de NADPH o NADH formado por min por mg de proteína (U/mg_{PROT}). La concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford utilizando el reactivo Bio-Rad y albúmina bovina como proteína de referencia (Bradford, 1976).

VI- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1- Construcción de vectores plasmídicos.

El vector pTrc-R3HB fue construido con los genes que codifican para la acetoacetil-CoA reductasa y la β -cetoliasa de *Azotobacter vinelandii* (*phbB* y *phbA*, respectivamente). Además, el gen que codifica para la tioesterasa II de *E. coli* (*tesB*) fue clonado río abajo. El operón construido permitirá la síntesis del (*R*)-3-hidroxi butirato bajo un promotor inducible con IPTG (**Figura 6.1**).

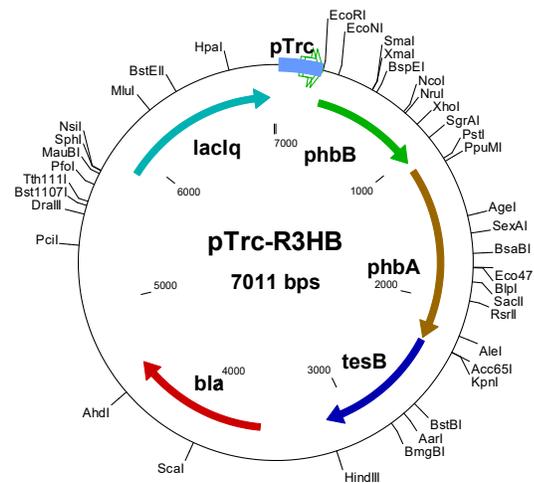


Figura 6.1: Vector construido para la síntesis del (*R*)-3-hidroxi butirato.

El vector pLoxGen4-short fue obtenido al eliminar el segundo sitio múltiple de clonación del vector original (pLoxGen4), con el fin de reducir el espacio intergénico que se formará al realizar la integración del gen *gapN* junto con el casete de resistencia a gentamicina. En la **Figura 6.2** se puede observar la digestión de confirmación para la pérdida del MCS, con las enzimas *NcoI* y *XhoI*. Posteriormente, la secuencia del gen *gapN* optimizada por uso preferencial de codones fue clonada en el vector pLoxGen4-short utilizando los sitios de restricción *HindIII* y *XhoI* (**Figura 6.3**), el cual podrá ser utilizado para la inserción cromosomal junto con el casete de resistencia de gentamicina en la región del gen *gapA*. Esto con el fin de obtener un operón donde se expresen ambos genes bajo el promotor nativo de *gapA*.

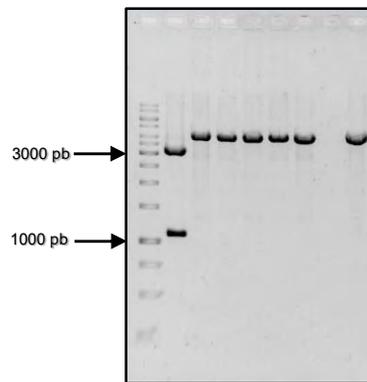


Figura 6.2: Digestión del vector pLoxGen4 con *NcoI* y *XhoI*, para la confirmación de la eliminación del segundo MCS. Línea 1: Marcador 1kb “ladder”. Línea 2: control vector pLoxGen4 (dos bandas de 1078 y 3161 pb). Líneas 3-7: colonias candidatas con el vector pLoxGen4-short (vector linealizado de 4052 pb).

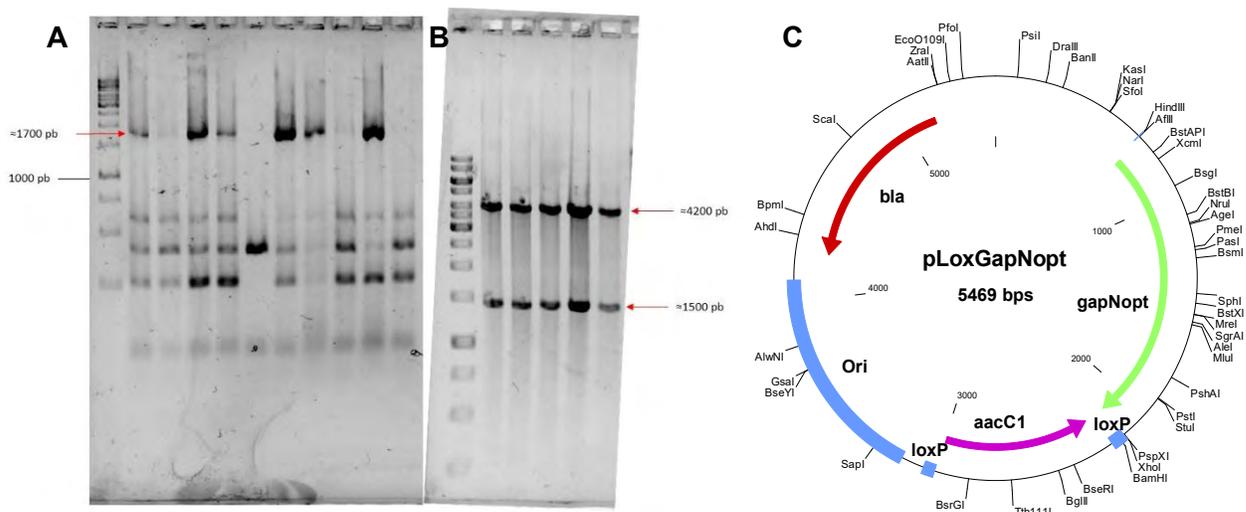


Figura 6.3: Comprobación de la construcción del vector pLoxGapNopt. **A.** Amplificación por PCR del inserto de varias colonias candidatas. **B.** Comprobación por digestión con las enzimas *HindIII* y *XhoI* de varias colonias candidatas. **C.** Esquema del vector construido.

6.2- Construcción y evaluación de las cepas mutantes en las vías fermentativas.

6.2.1-Eliminación de las vías de producción de acetato e integración del gen *gapN*.

Los genes *poxB* y *pta* fueron inactivados, con el fin de reducir la capacidad de producción de acetato. Obteniendo así las cepas AV11 (MS01 Δ *poxB*) y AV14 (MS01 Δ *poxB*, Δ *pta*), respectivamente. Estas cepas carecen de todas las vías de fermentación por lo cual son aerobias estrictas, al no poseer vías de regeneración del cofactor NADH en condiciones anaerobias. Se partió de la cepa AV14 para realizar la integración cromosomal del gen *gapN* optimizado por uso

preferencial de codones. Se diseñó la construcción para alcanzar la expresión conjunta de los genes *gapA* y *gapN*, integrando el gen *gapN* río abajo del gen *gapA*, bajo la influencia de su promotor nativo en un sistema de operón. Se denominó a la cepa obtenida AV14N1 (**Figura 6.4**). La construcción fue obtenida por un método modificado de inactivación cromosomal en un paso en *E. coli* usando productos de PCR (Datsenko & Watner, 2000). En la **Figura 6.4** se puede observar la confirmación de la cepa AV14N1 por PCR.

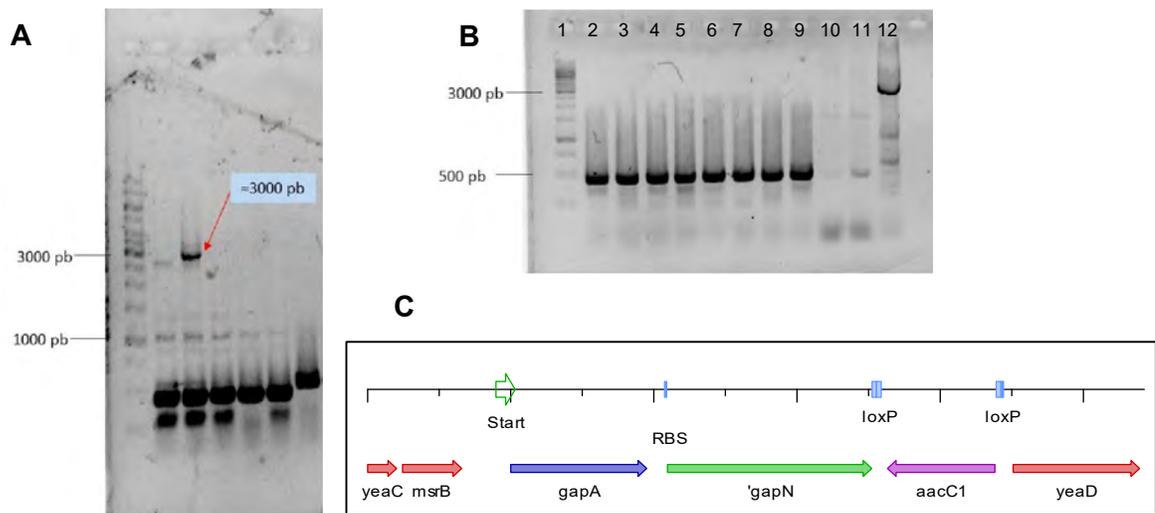


Figura 6.4: Comprobación de la construcción de la cepa AV14N1. **A.** Análisis de PCR de la región de integración de AV14N1 en una mezcla de colonias candidatas, se detecta una banda de aproximadamente 3000 pb. **B.** Colonias candidatas AV14N1, confirmación de la candidata 12 como la cepa AV14N1 (carril 12). **C.** Esquema de la construcción diseñada para la cepa AV14N1

6.2.2-Evaluación del crecimiento y de producción de acetato en matraz.

Como se mencionó anteriormente, la producción de acetato es indeseable, por lo cual se propone, la eliminación o interrupción de las vías de síntesis de acetato (*poxB* y *ackA-pta*) con la finalidad de aumentar los rendimientos de producción de R3HB. Para comprobar esto, se realizó una cinética de crecimiento de las cepas MS01, AV14 y AV14N1 para evaluar el crecimiento y la producción de acetato en condiciones aeróbicas con glucosa (5 g/L) como fuente de carbono. Se utilizó el medio AM2 amortiguado con 0.1 M de MOPS a 37 °C y 300 rpm, en matraces de 250 mL conteniendo 50 mL de medio. En la **Figura 6.5** se puede observar que el crecimiento de las tres cepas fue muy similar, obteniéndose valores de velocidad específica de crecimiento muy similares.

Para las cepas MS01, AV14 y AV14N1 la μ fue de 0.74, 0.75 y 0.77 h^{-1} , respectivamente. De acuerdo a los resultados anteriores, las eliminaciones de los genes *poxB* y *pta* no causaron un decremento en el crecimiento de las cepas en condiciones aeróbicas. Así mismo, la integración del gen *gapN* río abajo del gen *gapA* tampoco causó consecuencias negativas en el crecimiento de la cepa.

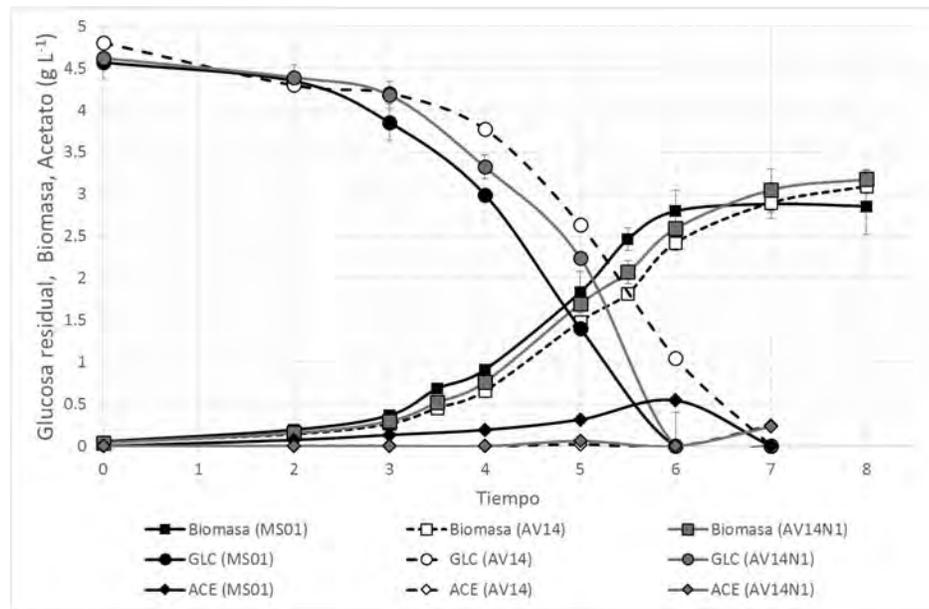


Figura 6.5: Cinética de crecimiento y producción de acetato en cultivos tipo lote en matraz con glucosa (5 g/L), 300 rpm a 37°C. Las cepas evaluadas fueron la cepa parental MS01 junto con las mutantes AV14 (MS01 Δ *poxB*, Δ *pta*) y AV14N1 (MS01 Δ *poxB*, Δ *pta*, *gapA-gapNop*). GLC, glucosa. ACE, acetato. Se presenta el promedio de triplicados.

La producción de acetato en las cepas modificadas es prácticamente nula durante el crecimiento. Sin embargo, durante la fase estacionaria se detectaron cantidades muy pequeñas de acetato, posiblemente debido a un efecto de tioesterasas endógenas de *E. coli* al transformar el acetil-CoA en acetato (Zuang *et al.*, 2008). La cepa parental MS01 presentó una producción aparentemente constante de acetato hasta llegar a 0.55 g/L al final de la fase de crecimiento exponencial, lo cual equivale al 12 % de la fuente de carbono consumida. Esto supone que las eliminaciones de los genes *poxB* y *pta* son efectivas para reducir la producción de acetato sin afectar el crecimiento de la cepa en condiciones aeróbicas.

Para confirmar el genotipo de las cepas utilizadas en el cultivo, se extrajo el DNA y mediante la amplificación por PCR de los locus se comprobó la eliminación del gen *pta* y de la integración del gen *gapN* (Figura 6.6). La amplificación del locus del gen *pta* en el genotipo silvestre da un

producto de aproximadamente 4,000 pb, correspondiente al operón *ackA-pta* intacto; mientras que en las mutantes un tamaño aproximado de 1,800 pb, al eliminarse el gen *pta*. El producto de la amplificación de la región de la integración en las cepas sin modificar da un tamaño aproximado de 500 pb y en la cepa con la integración se obtiene un producto de aproximadamente 3,000 pb. Como se puede observar en la **Figura 6.6** las cepas dan el bandeo esperado, lo cual valida los datos obtenidos en los cultivos presentados en la **Figura 6.5**.

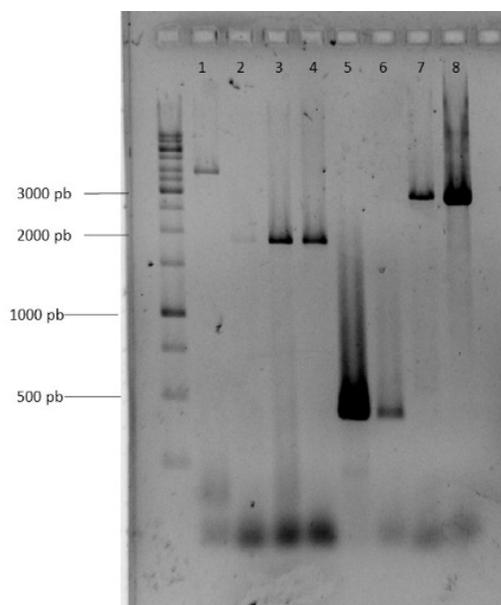


Figura 6.6: Comprobación del genotipo de las cepas utilizadas en la cinética presentada en la **Figura 6.5**. Carril del 1 al 4 corresponden con la amplificación del locus *pta* y los carriles del 5 al 8 corresponden con la amplificación de la región de la integración. MS01 carriles 1 y 5, AV14 carriles 2 y 6, AV14N1 carriles 3 y 7, los carriles 4 y 8 corresponden a un control con el DNA de la colonia candidata 12 (AV14N1).

6.3- Evaluación de la producción de R3HB a nivel de matraz.

La producción de R3HB en las cepas AV14, AV14N1 y las cepas control MG1655, MG1655 Δ *ackA-pta* y MS01 se evaluó en cultivos con medio mineral mínimo AM2 suplementado con 10 g/L de glucosa, en condiciones aeróbicas (matraces de 250 mL, con 50 mL de medio, 37°C, 300 rpm). En la **Figura 6.7** se pueden observar las cinéticas de crecimiento, consumo de azúcares (glucosa) y producción de algunos metabolitos de interés. Así mismo, en la **Tabla 6.1** se resumen los parámetros cinéticos y estequiométricos de los cultivos. Las velocidades específicas de crecimiento de las cepas fueron de $0.53 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$ para la cepa MG1655 y de $0.52 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ para las demás cepas. De igual manera el consumo de glucosa es muy similar con una velocidad de consumo específica promedio de $0.30 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$, correspondiente a todas las cepas. De acuerdo a los resultados anteriores el crecimiento y el consumo de glucosa de las cepas evaluadas, no se ven afectados de forma significativa por las diversas modificaciones. Sin embargo; si se encontraron diferencias en la producción de (*R*)-3-hidroxi-butarato. La cepa que más produce es la silvestre

MG1655 alcanzando un título máximo de 2.3 g/L, seguida por la cepa modificada MS01 (1.67 g/L), dejando atrás a las cepas AV14N1 (1.51 g/L) y AV14 (1.25 g/L). Así mismo, el cultivo con la cepa MG1655 $\Delta ackA-ptA$ produce tan solo 1.4 g/L. Los datos obtenidos de producción de R3HB son contrarios a lo esperado y contrastantes con los resultados obtenidos en estudios previos en la acumulación del polímero P3HB, donde se demuestra que la eliminación de las vías que compiten del flujo de carbono como las vías de acetato, etanol y lactato mejoran el rendimiento de producción del polímero (Jian *et al.*, 2010, Centeno-Leija *et al.*, 2014). En lo que respecta a la acumulación de acetato se pueden observar claramente dos fenotipos, el primero correspondiente con las cepas carentes de las vías del metabolismo de acetato (*ackA*, *pta* y *poxB*) las cuales acumulan acetato durante todo el cultivo. Este comportamiento se puede explicar debido a la especificidad de la tioesterasa II (*tesB*) para romper los enlaces tioéster de otras moléculas del tipo acil-CoA. Tal como el acetil-CoA, lo cual formaría acetato y coenzima A libre (HSCoA) por la acción de TesB. A pesar de que no se ha evaluado *in vitro* la actividad de la tioesterasa II sobre el acetil-CoA, se ha demostrado su amplia promiscuidad para utilizar diversos sustratos (Naggert *et al.*, 1991; Nie *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2007).

El segundo fenotipo es correspondiente a las cepas que poseen activas las vías del metabolismo del acetato (MG1655 y MS01), las cuales producen acetato, pero a su vez lo consumen. Esto otorga un ciclo de reciclado de la coenzima A libre (HS-CoA), proporcionando más precursor acetil-CoA para su conversión a (*R*)-3-hidroxiбутирато. Lo anterior puede explicar la desventaja de la eliminación de las vías del metabolismo del acetato en nuestro caso específico, los cuales contrastan con lo esperado de acuerdo a estudios previos donde estudian su efecto en la producción del polímero P3HB (Jian *et al.*, 2010, Centeno-Leija *et al.*, 2014). La mejor capacidad de producción de la silvestre MG1655 en comparación con la cepa MS01 no puede ser del todo comprendida, debido a las modificaciones que se han llevado a cabo para la obtención de la cepa MS01 (Utrilla *et al.*, 2012; Fernández-Sandoval *et al.*, 2012). Por lo cual harían falta más experimentos para dilucidar las modificaciones causantes de la diferencia de producción de R3HB entre estas cepas.

Organismo / plásmido	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)		Biomasa (gL ⁻¹)		Acetato (gL ⁻¹)		Piruvato (gL ⁻¹)		Fuente de carbono consumida (g _{GLC} L ⁻¹)		q _s (g _{GLC} g _{CDW} ⁻¹ h ⁻¹)		R3HB (gL ⁻¹)		Rendimiento del producto (g _{R3HB} /g _{GLC})		Productividad (g _{R3HB} L ⁻¹ h ⁻¹)		Rendimiento con respecto al Y _{MaxT} (%)
<i>E. coli</i> MG1655 / pTrc-R3HB	0.53	±0.03	4.02	±0.10	0.11	±0.02	NDT		10.40	±0.06	1.43	±0.07	2.30	±0.11	0.22	±0.010	0.24	±0.008	37.85
<i>E. coli</i> MS01 / pTrc-R3HB	0.52	±0.01	3.55	±0.27	0.10	±0.01	NDT		9.53	±0.15	1.31	±0.01	1.65	±0.03	0.18	±0.002	0.18	±0.000	30.41
<i>E. coli</i> AV14N1 / pTrc-R3HB	0.52	±0.01	4.01	±0.17	0.43	±0.02	NDT		10.39	±0.05	1.43	±0.09	1.46	±0.07	0.14	±0.008	0.15	±0.007	23.54
<i>E. coli</i> AV14 / pTrc-R3HB	0.52	±0.01	3.84	±0.24	0.41	±0.00	NDT		9.47	±0.04	1.27	±0.11	1.25	±0.04	0.13	±0.004	0.14	±0.003	22.96
<i>E. coli</i> MG1655 Δ ackA-pta / pTrc-R3HB	0.52	±0.02	4.14	±0.25	0.52	±0.01	NDT		9.29	±0.28	1.17	±0.12	1.45	±0.03	0.15	±0.004	0.16	±0.006	26.76
<i>E. coli</i> MG1655 Δ ackA-pta / pTrc992A	0.65	±0.01	2.89	±0.04	1.47	±0.11	1.93	±0.07	10.14	±0.08	2.28	±0.05	NA		NA		NA		NA
<i>E. coli</i> AV14 / pTrc992A	0.59	±0.01	5.10	±0.09	0.92	±0.08	1.75	±0.07	9.70	±0.07	1.465	±0.17	NA		NA		NA		NA

Tabla 6.1: Parámetros cinéticos y estequiométricos de los cultivos de producción de R-3HB en matraz con glucosa (10g/L), 300 rpm a 37°C, en cepas transformadas con el vector pTrc-R3HB. NA = No aplicable. NDT = No detectado. Y_{MaxT}: Rendimiento máximo teórico (0.578 gR3HB/gGLC). Desviación estándar mostrada en cursiva en las columnas anexas al valor.

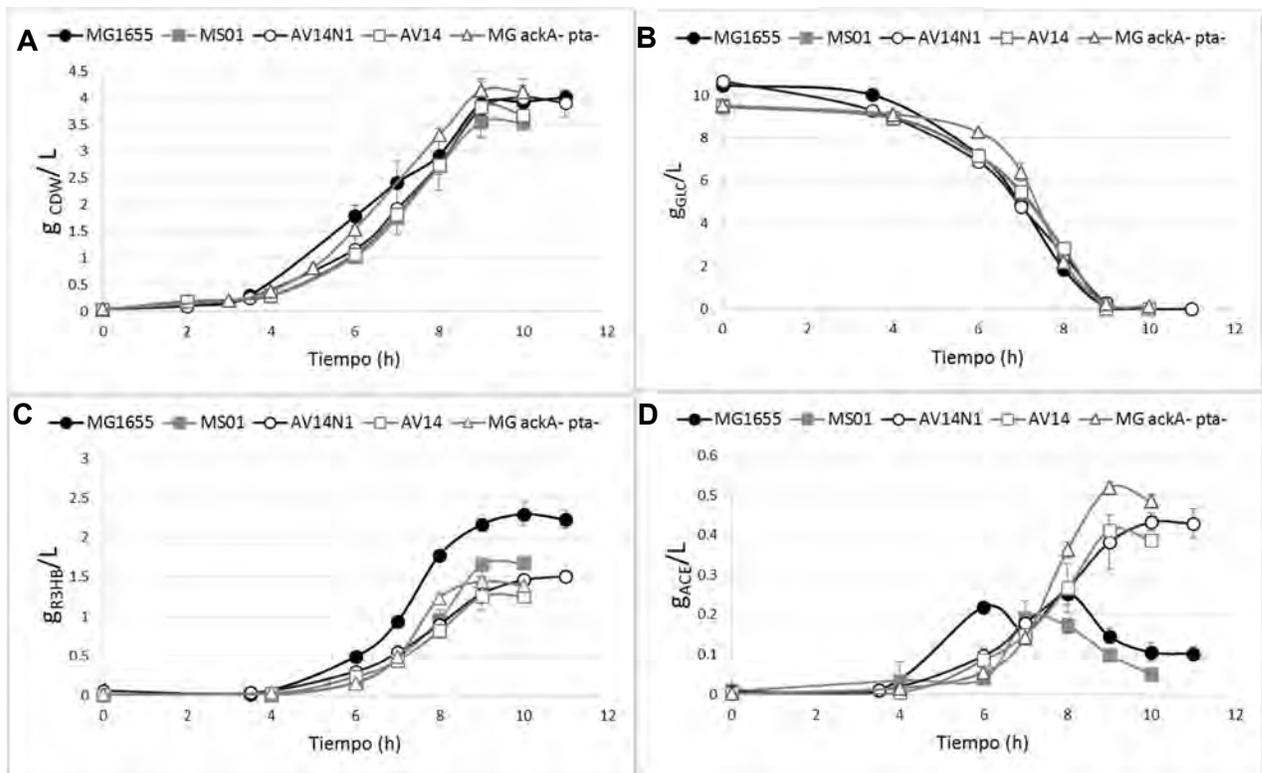


Figura 6.7: Cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa, de producción de R3HB y acetato en matraz con glucosa (10g/L), 300 rpm a 37°C. Cepa evaluadas: MG1655 (círculos negros), MS01 (cuadrados grises), AV14N1 (círculos vacíos), AV14 (cuadrados vacíos) y MG1655 Δ ackA-pta (triángulos vacíos); transformadas con el vector pTrc-R3HB. A. Crecimiento en peso seco de masa celular (CDW, por sus siglas en ingles). B. Consumo de glucosa (GLC). C. Producción del (*R*)-3-hidroxitbutirato (R3HB). D. Producción de acetato (ACE). Se presenta el promedio de triplicados.

Los controles de las cepas AV14 y MG1655 Δ ackA-pta transformadas únicamente con el vector pTrc992A acumulan mayor cantidad de acetato y piruvato (**Tabla 6.1**), en contraste con las cepas transformadas con el vector pTrc-R3HB. Esto indica en la cepa control MG1655 Δ ackA-pta un flujo redirigido a la acumulación de piruvato y a la producción de acetato por medio de la enzima PoxB. A su vez en las cepas evaluadas indica un flujo redirigido a la acumulación de acetyl-CoA y a la producción de R3HB. En el caso de la cepa AV14 / pTrc992A, el flujo es dirigido hacia la formación de biomasa alcanzando 5.1 g/L. La acumulación de acetato en esta cepa es inesperada y se puede suponer que es debido a la actividad de tioesterasas endógenas de *E. coli* (Zuang *et al.*, 2008).

En esta evaluación a nivel de matraz se logró la producción de R3HB a partir de glucosa, con rendimientos de 0.13 a 0.22 $\text{g}_{\text{R3HB}}/\text{g}_{\text{GLC}}$, que corresponden al 23 % y 37.8 % con respecto al rendimiento máximo teórico (Y_{MaxT} , 0.578 $\text{g}_{\text{R3HB}}/\text{g}_{\text{GLC}}$). Debido a la gran diferencia entre el

rendimiento alcanzado y el rendimiento máximo teórico, es deseable utilizar diferentes estrategias de producción con la finalidad de aumentar el rendimiento del proceso.

6.4- Evaluación de la producción de R3HB a nivel de biorreactor.

6.4.1- Evaluación de la producción de R3HB utilizando glucosa como fuente de carbono y 800 rpm de agitación.

Para aumentar el título de (*R*)-3-hidroxitirato se realizaron ensayos a nivel de biorreactor. Se evaluó una velocidad de agitación de 800 rpm y una aireación de 0.5 vvm (k_{La} de 330 h⁻¹; Fernández-Sandoval *et al.*, 2012). Se utilizó la cepa AV14N1 junto con la cepa AV14 como control, con el fin de observar la aportación del gen *gapN* integrado en el cromosoma. Así mismo, se evaluó la cepa MG1655, ya que fue la que mejor produjo a nivel de matraz. Las cepas evaluadas fueron previamente transformadas con el vector pTrc-R3HB para la producción de R3HB. Los cultivos fueron realizados en medio mínimo mineral AM2 suplementado con 40 g/L de glucosa en condiciones controladas de pH 7 (KOH 4 N) y a 37 °C.

En la **Figura 6.8** se pueden observar las cinéticas de crecimiento, consumo de azúcares (glucosa) y de producción de R3HB, acetato y piruvato para las cepas evaluadas. En la **Tabla 6.2** se resumen los parámetros cinéticos y estequiométricos de los cultivos. Las condiciones de agitación y de aireación fueron elegidas con el criterio de alcanzar una cierta limitación de oxígeno, que de tal forma limite el crecimiento y a su vez permita producir (*R*)-3-hidroxitirato con un buen rendimiento y productividad. Para esto se utilizó una transferencia de oxígeno suficiente que permitió el crecimiento aeróbico de la cepa, hasta alcanzar un límite de biomasa cuya velocidad de consumo de oxígeno iguale a la velocidad de transferencia de oxígeno del sistema (OTR), de esta manera ocurre la limitación de oxígeno. Las cepas evaluadas alcanzaron alrededor de 8 g/L de peso celular seco y consumieron en su totalidad la fuente de carbono a la hora 18 de cultivo.

De acuerdo a los resultados obtenidos, no existe diferencia entre la cepa AV14N1 y la cepa AV14, lo cual nos indica una muy poca o nula aportación del gen *gapN* integrado en el cromosoma en la cepa AV14N1, bajo estas condiciones. La cepa MG1655 tuvo la mayor producción a nivel de matraz. Sin embargo; obtuvo rendimientos y títulos muy similares a las cepas AV14 y AV14N1 en la condición evaluada en biorreactor. Como se puede observar en la **Figura 6.8.C**, la cepa MG1655 produce R3HB a una mayor velocidad que las cepas AV14 y AV14N1, a pesar de alcanzar los

mismos títulos a las 18 horas de cultivo cuando la fuente de carbono es consumida en su totalidad. La tasa de consumo específica (q_s) fue menor para la cepa AV14 y mayor para la cepa MG1655. Sin embargo, esta pequeña diferencia no se vio reflejada en la producción de R3HB.

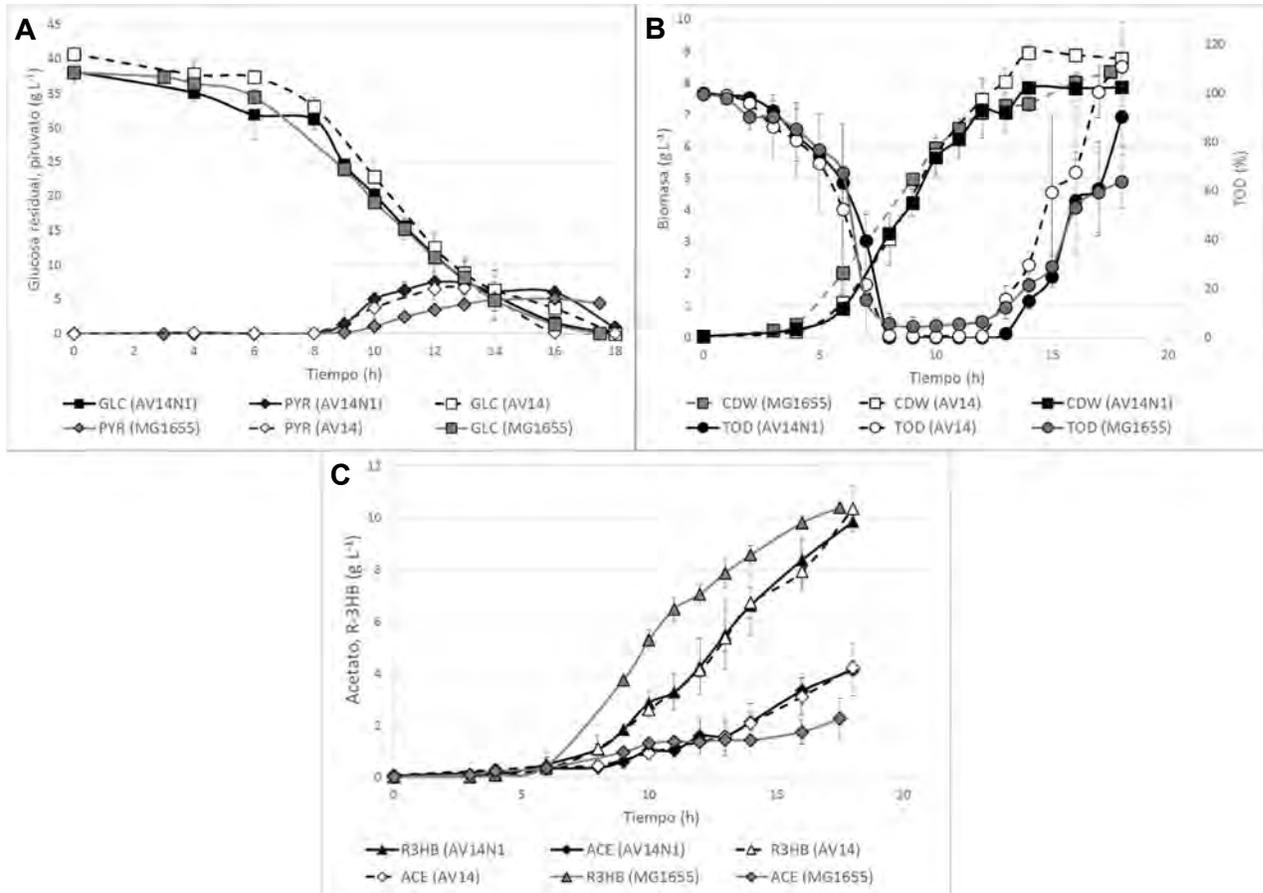


Figura 6.8 Cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa, tensión de oxígeno disuelto y de producción de R3HB, piruvato y acetato. Cultivos con glucosa (40g/L), aireación de 0.5 vvm, agitación de 800 rpm a 37°C en biorreactor con 0.75 L de medio. Cepas evaluadas: MG1655 (línea gris, símbolos cerrados), AV14N1 (línea negra, símbolos cerrados), AV14 (línea discontinua negra, símbolos abiertos). **A.** Consumo de glucosa (GLC, cuadrados) y de producción de piruvato (PYR, rombos). **B.** Crecimiento en peso celular seco (CDW, cuadrados) y de variación de tensión de oxígeno disuelto (TOD, círculos). **C.** Producción del (*R*)-3-hidroxi-butarato (R3HB, triángulos) y de acetato (ACE, rombos). Se presentan promedios de duplicados.

Los títulos alcanzados de R3HB fueron de 9.85, 10.36 y 10.40 g/L y los rendimientos obtenidos de 0.26, 0.25 y 0.27 g_{R3HB}/g_{GLC} ; por las cepas AV14N1, AV14 y MG1655, respectivamente. Los rendimientos alcanzados corresponden aproximadamente al 47 % con respecto al rendimiento máximo teórico, el cual aumentó un 25 % en comparación con los estudios en matraz. Así mismo, se alcanzó una productividad en el intervalo de 0.55 a de 0.59 $g_{R3HB} L^{-1} h^{-1}$ con las cepas evaluadas.

En esta condición evaluada se llegó a una limitación de oxígeno alrededor de las 8 horas de cultivo, observada como una disminución hasta el valor de cero de la tensión de oxígeno disuelto, el valor de cero es mantenido hasta aproximadamente la hora 14 del cultivo, cuando la glucosa alcanza niveles por debajo de los 5 g/L y la tensión de oxígeno disuelto empieza a elevarse gradualmente. Debido a la limitación de oxígeno, el flujo de carbono es dirigido a la producción y acumulación de piruvato, alcanzando éste niveles máximos de hasta 7 g/L a la hora 13 de cultivo. Posteriormente el piruvato es consumido y reincorporado al metabolismo una vez que la tensión de oxígeno disuelto aumenta. Este comportamiento indica una transición entre el metabolismo aeróbico y fermentativo, que conlleva a una inactivación o activación del complejo enzimático piruvato deshidrogenasa (PDHC), el cual es la principal vía de conversión de piruvato a acetil-CoA en metabolismo respiratorio (Sawers y Clark, 2004). Las cepas AV14 y AV14N1 carecen del gen *pflB* que codifica para la enzima piruvato formato liasa, enzima encargada de catalizar la ruptura de piruvato a acetil-CoA y formato, bajo condiciones fermentativas. Debido a esto las cepas son ineficientes en la formación de acetil-CoA, en condiciones limitantes de oxígeno, lo cual solo puede llevarse a cabo por la actividad remanente del complejo PDHC. En estudios recientes se determinó que la actividad del complejo PDHC puede ser hasta de 40% en condiciones microaeróbicas (Fernández-Sandoval *et al.*, 2012). De acuerdo a lo anterior se explica la acumulación de piruvato durante la fase de limitación de oxígeno ocasionado por la disminución del flujo hacia acetil-CoA.

La acumulación de acetato como se explicó anteriormente, puede ser atribuida a la poca especificidad de la enzima tioesterasa II (TesB), llegando a títulos alrededor de 4.2 g/L en las cepas AV14 y AV14N1 en contraste con los títulos alcanzados por la cepa MG1655 de tan solo 2.26 g/L. En relación a la producción de piruvato, la cepa MG1655 acumula 4.41 g/L mientras que las cepas AV14 y AV14N1 fueron capaces de reincorporarlo en su totalidad al metabolismo. Probablemente esto se deba a cuestiones de regulación no consideradas anteriormente por las diferencias entre las cepas, ya que las cepas AV14 y AV14N1 son derivadas de la cepa JU15. Esta cepa fue resultado de una evolución adaptativa en la cual perdió una región de 27.4 kb que contenían genes implicados en la regulación en sistemas de dos componentes (*narP*, *ada*, *rdsD*, *rdsB* y *rdsC*), esto le permitió a la cepa JU15 tener una mayor tolerancia a concentraciones altas de acetato (Utrilla *et al.*, 2010).

Organismo /plásmido	Condiciones de cultivo	Tasa de crecimiento (μ^{exp}) (h^{-1})		Biomasa ($g L^{-1}$)		Acetato ($g L^{-1}$)		Piruvato ($g L^{-1}$)		Fuente de carbono consumida ($g_{GLC} L^{-1}$)		q_s^{exp} ($g_{GLC} g_{CDW}^{-1} h^{-1}$)		R3HB ($g L^{-1}$)		Rendimiento del producto (g_{R3HB}/g_{GLC})		Productividad ($g_{R3HB} L^{-1} h^{-1}$)		Rendimiento con respecto al Y_{MaxT} (%)	
<i>E. coli.</i> MG1655 / pTrc-R3HB	Glucosa, 800 rpm	0.51	± 0.02	8.37	± 0.08	2.26	± 0.79	4.41	± 0.93	37.99	± 1.13	1.62	± 0.20	10.40	± 0.22	0.27	± 0.014	0.59	± 0.012	47.40	
<i>E. coli.</i> AV14N1 / pTrc-R3HB	Glucosa, 800 rpm	0.52	± 0.02	7.88	± 0.58	4.14	± 1.00	NDT		38.17	± 1.34	1.67	± 0.42	9.85	± 0.24	0.26	± 0.014	0.55	± 0.013	44.66	
<i>E. coli.</i> AV14 / pTrc-R3HB	Glucosa, 800 rpm	0.51	± 0.03	8.77	± 0.47	4.22	± 0.27	NDT		40.76	± 1.15	1.46	± 0.05	10.36	± 0.90	0.25	± 0.023	0.58	± 0.050	43.97	
<i>E. coli.</i> AV14N1 / pTrc-R3HB	Glucosa, Limitación de N, 800 -900 rpm	0.48	± 0.06	3.37	± 0.23	15.87	± 1.42	7.31	± 0.45	36.24	± 1.16	1.83	± 0.12	7.67	± 0.27	0.21	± 0.001	0.11	± 0.004	36.65	

Tabla 6.2: Parámetros cinéticos y estequiométricos de los cultivos de producción de R-3HB en biorreactor (0.75 L) con glucosa (40g/L), 0.5vvm y agitación de 800 rpm a 37°C. Así como el cultivo con glucosa (40 g/L), con limitación de nitrógeno (47.6 mM), 0.5 vvm a 37°C, manteniendo una TOD superior al 20%. Cepas evaluadas: MG1655, AV14 y AV14N1 transformadas con el vector pTrc-R3HB. **NDT** = No detectado. **exp**: valor en fase exponencial. **Y_{MaxT}** : Rendimiento máximo teórico (0.578 gR3HB/gGLC). Desviación estándar mostrada en cursiva en las columnas anexas al valor.

Organismo /plásmido	Condiciones de cultivo	Tasa de crecimiento (μ^{exp}) (h^{-1})		Biomasa ($g L^{-1}$)		Acetato ($g L^{-1}$)		Piruvato ($g L^{-1}$)		Fuente de carbono consumida ($g_{XYL} L^{-1}$)		q_s^{exp} ($g_{XYL} g_{CDW}^{-1} h^{-1}$)		R3HB ($g L^{-1}$)		Rendimiento del producto (g_{R3HB}/g_{XYL})		Productividad ($g_{R3HB} L^{-1} h^{-1}$)		Rendimiento con respecto al Y_{MaxT} (%)	
<i>E. coli.</i> AV14N1 / pTrc-R3HB	Xilosa, 800 rpm	0.36	± 0.09	9.20	± 0.36	3.06	± 0.12	NDT		37.25	± 0.99	1.14	± 0.41	5.14	± 0.16	0.14	± 0.008	0.18	± 0.006	23.89	
<i>E. coli.</i> AV14 / pTrc-R3HB	Xilosa, 800 rpm	0.42	± 0.04	9.49	± 0.30	3.52	± 0.15	NDT		37.70	± 1.08	1.09	± 0.16	5.46	± 0.23	0.14	± 0.010	0.19	± 0.008	25.05	
<i>E. coli.</i> AV14N1 / pTrc-R3HB	Xilosa, 500 rpm	0.37	± 0.03	4.42	± 0.51	3.07	± 0.24	14.09	± 0.12	39.79	± 0.00	1.36	± 0.05	2.20	± 0.08	0.06	± 0.003	0.05	± 0.002	9.59	
<i>E. coli.</i> AV14 / pTrc-R3HB	Xilosa, 500 rpm	0.38	± 0.01	3.95	± 0.05	3.21	± 0.29	12.62	± 0.68	38.45	± 0.76	1.41	± 0.47	1.64	± 0.01	0.04	± 0.001	0.03	± 0.001	7.38	

Tabla 6.3: Parámetros cinéticos y estequiométricos de los cultivos de producción de R-3HB en biorreactor (0.75 L) con xilosa (40g/L), 0.5vvm y agitación de 800 y 500 rpm a 37°C. Cepas evaluadas: AV14 y AV14N1 transformadas con el vector pTrc-R3HB. **NDT** = No detectado. **exp**: valor en fase exponencial. **Y_{MaxT}** : Rendimiento máximo teórico (0.578 gR3HB/gXYL). Desviación estándar mostrada en cursiva en las columnas anexas al valor.

6.4.2- Evaluación de la producción de R3HB utilizando xilosa como fuente de carbono y 500 rpm de agitación.

Las cepas AV14 y AV14N1 transformadas con el vector pTrC-R3HB se cultivaron en medio mínimo con xilosa como única fuente de carbono. La agitación se mantuvo a 500 rpm, mientras que las demás condiciones permanecieron igual. Con este experimento se evaluó el comportamiento de las cepas en una condición donde el oxígeno se limitó aún más que en la condición anterior. También se evaluó la aportación del gen *gapN* para la formación de poder reductor en una fuente de carbono alternativa. Si asumimos que el metabolismo de la xilosa puede tener un flujo menor hacia la vía oxidativa de la pentosas fosfato, en comparación con la glucosa, esto disminuiría la aportación de NADPH de esta vía, lo cual es favorable para evaluar nuestra estrategia de formación de NADPH por la enzima GapN (Ver **Figura 5.1**) (González *et al.*, 2002; Mayer y Boos, 2005).

Como se puede observar en la **Figura 6.9** la tensión de oxígeno disuelto disminuye a cero aproximadamente a las 8 horas de cultivo y se mantiene en cero hasta las 48 horas cuando la fuente de carbono es consumida en su totalidad. Aunado a esto, se puede observar una acumulación de piruvato en la fase de limitación de oxígeno llegando a títulos de 14 g/L y 12.6 g/L para las cepas AV14N1 y AV14 respectivamente. En lo que concierne al producto, el (*R*)-3-hidroxi-butarato, se dejó de sintetizar alrededor de la hora 28 de cultivo, llegándose a producir tan solo 2.2 g/L y 1.6 g/L en las cepas AV14N1 y AV14, respectivamente. Por otro lado, el acetato llegó a títulos alrededor de 3 g/L, mayores a los observados de R3HB para ambas cepas. Contrario a resultados anteriores en los cuales la proporción siempre era favorable hacia el R3HB, estos resultados indican que algunas de las primeras dos enzimas de la vía sintética, tanto la β -cetoliasa como la acetoacetyl-CoA reductasa (PhbA y PhbB, respectivamente) puedan estar inhibidas bajo estas condiciones. La enzima β -cetoliasa es inhibida alostéricamente por la coenzima A libre (HSCoA) y la enzima acetoacetyl-CoA reductasa depende de la cantidad disponible de NADPH en la célula (Oeding y Schlegel, 1973; Manchak y Page, 1994; Kessler y Witholt, 2001; Centeno-Leija, 2013).

Considerando las condiciones de limitación de oxígeno, sumado con la eliminación del gen *pflB*, la actividad disminuida del complejo PDHC deriva en una insuficiencia del flujo para formar acetyl-CoA. Por lo tanto, se sugiere que el cociente acetyl-CoA/ HSCoA no logra aumentar a un nivel necesario para superar la inhibición de la enzima β -cetoliasa, esto impediría la síntesis de R3HB

(Oeding y Schlegel, 1973; Manchak y Page, 1994; Kessler y Witholt, 2001; Centeno-Leija, 2013). El acetil-CoA formado por la PDHC puede ser redirigido hacia la formación de biomasa y al ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA, por sus siglas en inglés), lo cual concuerda con el aumento de biomasa durante el transcurso del cultivo. Así mismo, la tioesterasa II (TesB) podría utilizar al acetil-CoA como sustrato para la formación de acetato y HSCoA, concordando con el aumento progresivo de acetato. Ambas vías impiden a su vez el aumento de la poza de acetil-CoA al nivel necesario para activar a la β -cetoliasa (Oeding y Schlegel, 1973; Manchak y Page, 1994; Kessler y Witholt, 2001).

A

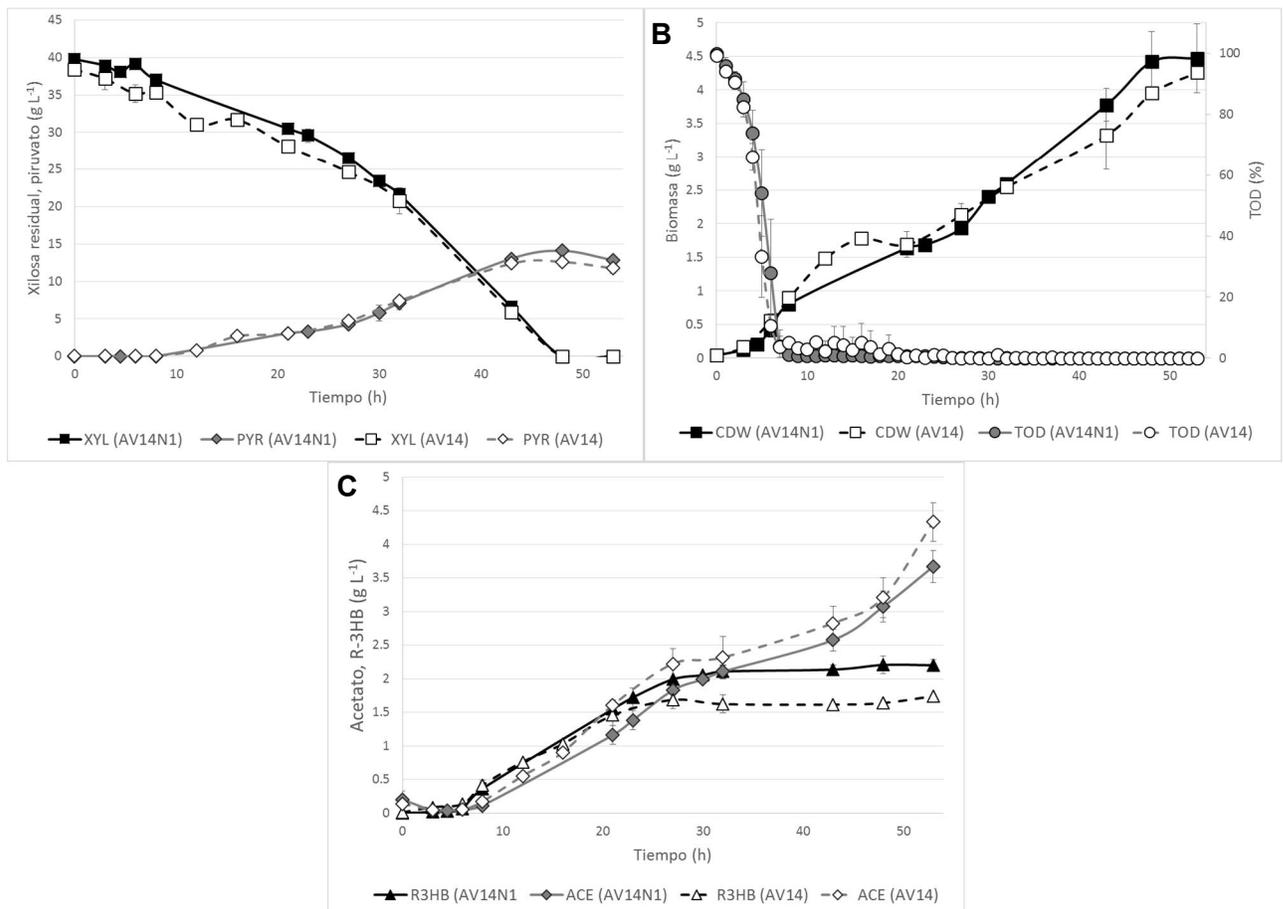


Figura 6.9: Cinéticas de crecimiento, consumo de xilosa, tensión de oxígeno disuelto y de producción de R3HB, piruvato y acetato en los cultivos con xilosa (40g/L), 0.5vvm, agitación de 500 rpm a 37°C en biorreactor con 0.75 L de medio. Cepas evaluadas: AV14N1 (línea continua, símbolos cerrados), AV14 (línea discontinua, símbolos abiertos). **A.** Consumo de xilosa (XYL, cuadrados) y de producción de piruvato (PYR, rombos) **B.** Peso celular seco (CDW, cuadrados) y de variación de tensión de oxígeno disuelto (DOT, círculos). **C.** Producción del (*R*)-3-hidroxibutirato (R3HB, triángulos) y de producción de acetato (ACE, rombos). Se presentan los promedios de duplicados.

6.4.3- Evaluación de la producción de R3HB utilizando xilosa como fuente de carbono y 800 rpm de agitación.

Para la siguiente serie de experimentos se evaluó la producción de R3HB con las cepas AV14N1 y AV14 utilizando xilosa como fuente de carbono, en condiciones de agitación de 800 rpm y aireación de 0.5 vvm (**Figura 6.10**), las cuales fueron las mejores condiciones de producción en glucosa.

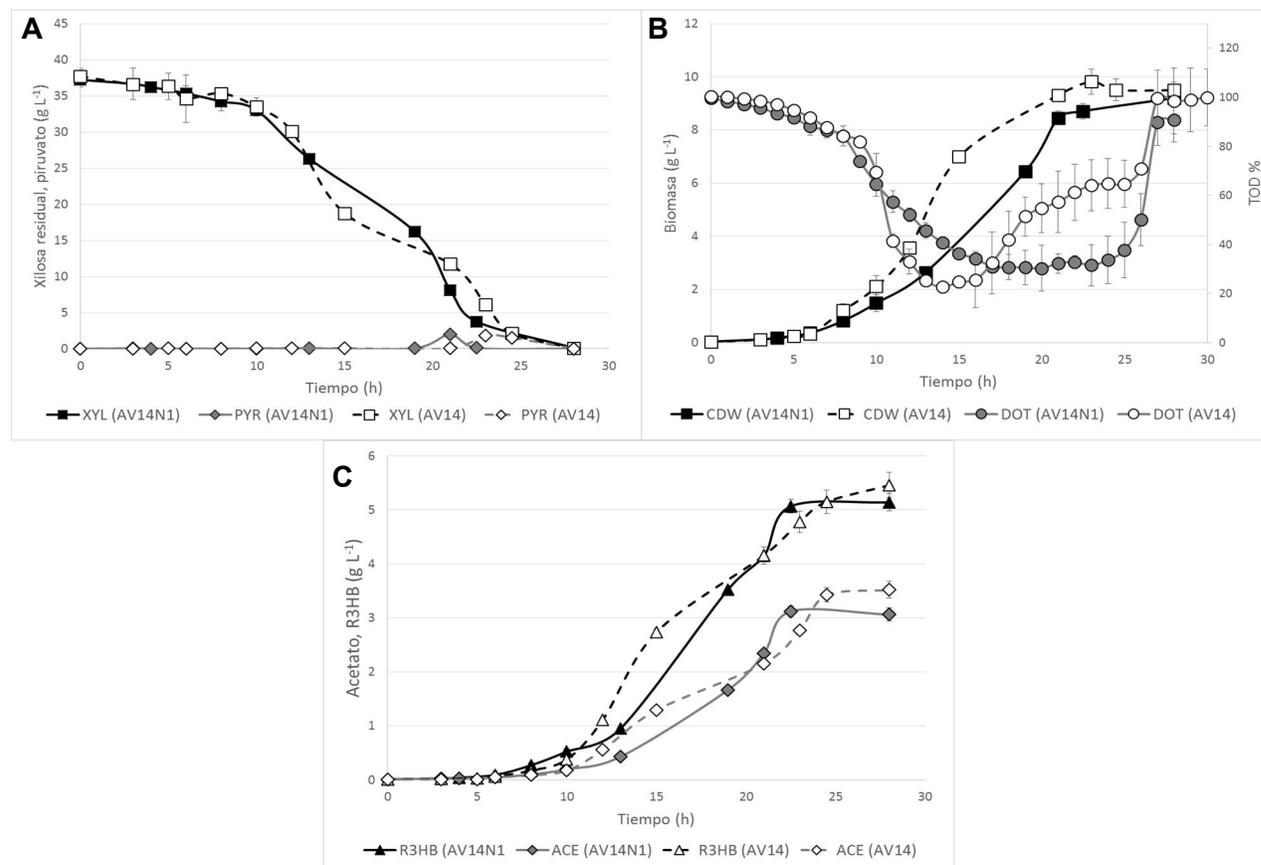


Figura 6.10: Cinéticas de crecimiento, consumo de xilosa, tensión de oxígeno disuelto y de producción de R3HB, piruvato y acetato de los cultivos con xilosa (40g/L), 0.5 vvm y agitación de 800 rpm a 37°C en biorreactor con 0.75 L de medio. Cepas evaluadas: AV14N1 (línea continua, símbolos cerrados), AV14 (línea discontinua, símbolos abiertos). **A.** Consumo de xilosa (XYL, cuadrados), de producción de piruvato (PYR, rombos) y de variación de tensión de oxígeno disuelto (DOT, círculos). **B.** curva de crecimiento en peso celular seco (CDW, cuadrados), de producción del (*R*)-3-hidroxi butirato (R3HB, triángulos) y de producción de acetato (ACE, rombos). Se presentan promedios de duplicados.

La tasa de crecimiento de las cepas (AV14N1 y AV14) utilizando xilosa como única fuente de carbono (0.36 y 0.42 h⁻¹, respectivamente) es menor en comparación con la tasa de crecimiento en

glucosa (0.51 h^{-1}). Debido a lo anterior la velocidad de transferencia de oxígeno del sistema no fue limitante, esto se observa en la **Figura 6.10** donde la tensión de oxígeno disuelto no bajo del 20% considerándose un cultivo completamente aeróbico, por lo cual no se acumula piruvato durante todo el cultivo.

Para los fines de producción de R3HB estas condiciones no fueron adecuadas, ya que el carbono se utilizó en la formación de biomasa, alcanzándose alrededor de 9.3 g/L para ambas cepas, superando la biomasa alcanzada en la condición donde se utiliza glucosa como fuente de carbono (8.3 g/L). La producción de R3HB alcanzó títulos y rendimientos de 5.32 g/L , $0.14 \text{ gr}_{\text{R3HB}}/\text{g}_{\text{GLC}}$ y 5.62 g/L , $0.15 \text{ gr}_{\text{R3HB}}/\text{g}_{\text{GLC}}$, para las cepas AV14N1 y AV14 respectivamente. Los rendimientos corresponden aproximadamente al 25 % del rendimiento máximo teórico (Y_{MaxT} , $0.578 \text{ gr}_{\text{R3HB}}/\text{g}_{\text{XYL}}$), los cuales están muy por debajo del 47 % alcanzado en la fermentación con glucosa a 800 rpm. Con respecto a la producción de acetato, esta alcanzó 3.63 y 3.15 g/L en las cepas AV14N1 y AV14, respectivamente.

Al igual que en el cultivo con glucosa a 800 rpm, no se observó una inhibición de la producción de R3HB como en la condición con xilosa a 500 rpm. Esto debido a la mayor tasa de transferencia de oxígeno. Por lo cual el complejo PDHC se encuentra activo y funcional, lo que proporciona acetil-CoA durante todo el cultivo, que es utilizado para la producción de biomasa, acetato y R3HB (Sawers y Clark, 2004; Fernández-Sandoval *et al.*, 2012). Sin embargo, la producción de (*R*)-3-hidroxi-butirato se ve limitada, debido a la preferencia por la formación de biomasa a partir de la acetil-CoA, ya que no se utilizaron condiciones óptimas de transferencia de oxígeno para la utilización de xilosa, por lo cual sería necesario determinar las condiciones de agitación o aireación para obtener la tasa de transferencia de oxígeno idónea para el sistema (Oeding y Schlegel, 1973; Manchak y Page, 1994; Kessler y Witholt, 2001; Fernández-Sandoval *et al.*, 2012).

6.4.4- Evaluación de la producción de R3HB utilizando glucosa como fuente de carbono en condiciones de limitación de nitrógeno.

Finalmente, se realizó un experimento en el cual se limitó el nitrógeno del medio para que alcanzase cierta biomasa y posteriormente entrara en fase estacionaria en la cual produciría nuestro producto de interés. Además, el cultivo no presentó limitación de oxígeno lo cual siempre mantendría expresado al complejo PDHC. Este experimento se realizó con la cepa AV14N1 utilizando glucosa (40 g/L) como fuente de carbono, una concentración limitante de nitrógeno (47.6 mM), aireación

de 0.5 vvm y con agitación de 800-900 rpm, manteniendo siempre la tensión de oxígeno superior a 20%. Se calculó la cantidad de nitrógeno requerida para alcanzar 4.8 g/L de biomasa, de acuerdo con la fórmula de *E. coli*, considerando que para la cepa AV14N1 el nitrógeno conforma aproximadamente el 14% del peso celular seco. En los resultados se puede observar de nueva cuenta una inhibición de la síntesis de R3HB (**Figura 6.11**), así mismo el crecimiento fue limitado debido a la falta de nitrógeno para la síntesis de proteínas principalmente. Se alcanzó una biomasa máxima de 4.18 g/L a las 22 horas de cultivo, el cual se siguió hasta las 72 horas. Se llegó a un título de 7.67 g/L de R3HB con un rendimiento de 0.21 gr_{R3HB}/g_{GLC}, el cual es el 37% del rendimiento máximo teórico, indicando que la condición de glucosa a 800rpm, sin limitación de nitrógeno, fue la mejor condición de producción de R3HB. En las condiciones de limitación de nitrógeno evaluadas la cepa AV14N1 no fue capaz de consumir en su totalidad la glucosa, ya que como se puede observar en la gráfica (**Figura 6.11**), la velocidad de consumo de glucosa disminuyó de forma drástica cuando entró a fase estacionaria, debido a la limitación de nitrógeno.

Con respecto al piruvato empezó a producirse cuando el cultivo entro en fase estacionaria debido a la limitación de nitrógeno, alcanzando 7.3 g/L. De forma interesante el acetato se acumuló durante todo el cultivo alcanzando un título de 15.87 g/L, superando de nueva cuenta la producción de (*R*)-3-hidroxi-butirato. Este fenómeno es muy parecido al obtenido en la condición de mayor limitación de oxígeno, lo cual sugiere que la inhibición del complejo PDHC puede deberse a un aumento del cociente NADH/NAD⁺. Éste puede ser ocasionado por la limitación del crecimiento y la disminución de la actividad de regeneración del cofactor NADH por la cadena respiratoria, que es la única vía disponible de regeneración de NADH en la cepas AV14 y AV14N1 (Sawers y Clark, 2004). Debido a esto la reducida actividad del complejo PDHC no permite la acumulación necesaria de acetil-CoA, lo cual impide superar por completo la posible inhibición de la enzima β -cetoliasa por la coenzima A libre. Aunado a esto, la posible formación de acetato a partir de acetil-CoA, debido a la baja especificidad de la tioesterasa II (TesB), causa una disminución constante de acetil-CoA y un aumento de HSCoA, que al final se observa en una mayor producción de acetato que de R3HB.

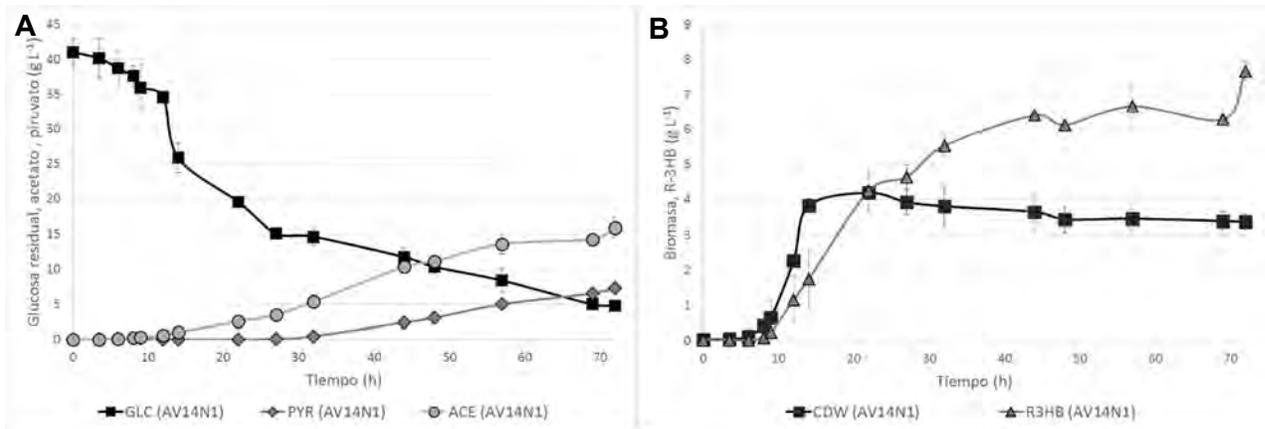


Figura 6.11: Cinética de crecimiento, consumo de glucosa y de producción de R3HB, piruvato y acetato. Cultivo con glucosa (40 g/L), 0.5 vvm, manteniendo la TOD superior a 20 % y con limitación de nitrógeno (47.6 mM) a 37 °C en biorreactor con 0.75 L de medio. Cepas evaluadas: AV14N1/ pTrc-R3HB. A. Consumo de glucosa (cuadrados), de producción de piruvato (rombos) y de producción de acetato (círculos). B. Peso celular seco (CDW, cuadrados) y de producción del (R)-3-hidroxitirato (triángulos). Se presentan promedios de duplicados.

6.4.5- **Discusión sobre la producción de R3HB a nivel de biorreactores.**

En resumen, se logró la producción de R3HB a partir de glucosa y xilosa como fuentes de carbono, obteniendo la mejor condición de producción con glucosa a 800 rpm y 0.5 vvm. Alcanzando la productividad más alta reportada a la fecha con la cepa MG1655 ($0.59 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), para un proceso de producción de (R)-3-hidroxitirato en una cepa recombinante de *E coli* en cultivo en lote (**Tabla 6.4**). Aun así el sistema tiene muchas posibilidades de ser mejorado, utilizando diferentes estrategias de cultivo como lo son: control de oxígeno disuelto y cultivos alimentados con la finalidad de aumentar aún más la productividad del sistema. La productividad más cercana obtenida en un sistema de producción utilizando a *E coli*, ha sido el trabajo de Liu y colaboradores (2007) con $0.508 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en el cual se utilizaron los primeros dos genes de la vía de síntesis de los PHAs de *Ralstonia eutropha*, y además la sobreexpresión del gen *tesB* utilizando la cepa de *E. coli* BW25113. Aunque el valor sea muy similar al obtenido por nosotros, cabe destacar que su estrategia de cultivo fue diferente. En su estudio se utilizó cultivo del tipo lote alimentado, el cual fue suplementado con más de 60 g/L de la fuente de carbono (glucosa) y en completa condición aeróbica. Esto indica la posibilidad de alcanzar mayores títulos y productividades utilizando esa estrategia de cultivo (Liu et al., 2007).

Tabla 6.4: Tabla comparativa de las principales estrategias de producción de (R)-3-hidroxi butirato en diversos microorganismos.

Microorganismo	Estrategia de Producción	Tipo de Cultivo	Fuente de Carbono	Tiempo de cultivo (h)	Titulos de R3HB (gL ⁻¹)	Rendimiento (gR3HB/gS)	Productividad (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Referencias
<i>E. coli</i> XLI-Blue	<i>phaA</i> + <i>phaB</i> + <i>phaC</i> + <i>phaZi</i> de <i>R. eutropha</i>	Lote con etapa final de tratamiento termico y alcalino	GLC	51	9.6	0.48	0.19	Lee y Lee, 2003
<i>E. coli</i> DH5α	<i>phbA</i> + <i>phbB</i> de <i>R. eutropha</i> ; <i>buk</i> + <i>ptb</i> de <i>C. acetobutylicum</i>	Lote completamente aerobico	GLC + Ext. Levadura	48	12	0.2	0.25	Gao <i>et al.</i> , 2002
<i>E. coli</i> DH5α	<i>phbA</i> + <i>phbB</i> de <i>R. eutropha</i> ; <i>phaG</i> de <i>P. putida</i>	Lote	LB + GLC + Ac. Acrilico	72	0.7	0.035	0.01	Zhao <i>et al.</i> , 2003
<i>E. coli</i> JM 109	<i>phaCAB</i> + <i>phaZ7</i> de <i>R. eutropha</i>	Lote en anaerobiosis	LB + GLC	100	7.3	0.7	0.06	Shiraki <i>et al.</i> , 2006
<i>E. coli</i> BW25113	<i>phbA</i> + <i>phbB</i> de <i>R. eutropha</i> ; sobreexpresión de <i>tesB</i> de <i>E. coli</i>	Lote alimentado aerobico	GLC + Ext. Levadura	24	12.2	ND	0.508	Liu <i>et al.</i> , 2007
<i>E. coli</i> MG1655	<i>phbA</i> + <i>phbB</i> de <i>A. vinelandii</i> ; sobreexpresión de <i>tesB</i> de <i>E. coli</i>	Lote con limitación de oxigeno	GLC	18	10.4	0.27	0.59	Este estudio.
<i>E. coli</i> AV14N1	<i>phbA</i> + <i>phbB</i> de <i>A. vinelandii</i> ; sobreexpresión de <i>tesB</i> de <i>E. coli</i>	Lote con limitación de oxigeno	GLC	18	9.85	0.26	0.55	Este estudio.
<i>E. coli</i> MG1655	<i>phbA</i> + <i>phbB</i> de <i>A. vinelandii</i> ; sobreexpresión de <i>tesB</i> de <i>E. coli</i> y de <i>gapN</i> de <i>S. mutans</i> (pTrc-R3HB + pACYCgapN)	Lote en matraz	GLC	36	3.3	0.31	0.1	Este estudio.
<i>E. coli</i> MG1655	<i>phbA</i> + <i>phbB</i> de <i>A. vinelandii</i> ; sobreexpresión de <i>tesB</i> de <i>E. coli</i> y de <i>gapN</i> de <i>S. mutans</i> (pTrc-gapN-R3HB)	Lote en matraz	GLC	10	2.55	0.28	0.26	Este estudio.
<i>E. coli</i> BW25113	<i>phbA</i> + <i>phbB</i> de <i>R. eutropha</i> + <i>pct</i> de <i>C. propionicum</i> .	Lote en tubo de ensaye	GLC + Acetato + Ext. Levadura	24	5.2	ND	0.22	Matsumoto <i>et al.</i> , 2013
<i>A. latus</i> DSM 1123	Despolimerización in vivo.	Lote alimentado con etapa final de despolimerización en pH ácido.	Sacarosa	24	117.8	0.34	4.91	Lee <i>et al.</i> , 1999c
<i>Halomonas</i> sp. KM-1	Despolimerización in vivo.	Lote alimentado de nitrogeno de dos fases, condiciones aerobicas y microaerobicas	GLC	84	40.3	0.2	0.48	Kawata <i>et al.</i> , 2014
<i>B. cepacia</i> ATCC 17795	Bioingeniería de la fermentación.	Lote con limitación de nitrogeno	Hidrolizados de Ext. de madera.	208	16.8	ND	0.081	Wang y Liu, 2014
<i>M. rhodesianum</i>	Vías de asimilación de R-3HB mutadas	Lote con dos etapas	Metanol	192	3.2	0.009	0.017	Hölscher <i>et al.</i> , 2010
<i>P. putida</i> KT2442	Eliminación del operón <i>pha</i> y <i>fadBA</i> , con sobreexpresión de <i>tesB</i> de <i>P. putida</i>	Lote alimentado	GLC + Ac. laurico + Ext. Levadura	28	7.27 (3HDD)	0.184 (gC ^P /gC ^S)	0.26	Chung <i>et al.</i> , 2009

3HDD: 3-hidroxi dodecanoato; **gC^P/gC^S**: rendimiento en gramos de carbono del producto por gramos de carbono del sustrato. *phaA/phbA*, β-cetoliasa; *phaB/phbB*; acetoacetil reductasa; *phaC*: PHA sintetasa; *phaZi*: PHA despolimerasa I; *buk*: butirato cinasa; *ptb*: fosfotransbutirilasa; *phaG*: α/β hidrolasa; *phaZ7*: PHA despolimerasa 7; *tesB*: tioesterasa II; *gapN*: G-3-P deshidrogenasa dependiente de NADP⁺; *pct*: propionil-CoA transferasa; *fadBA*: operón de la δ-3-cis-δ-2-transenoil-CoA isomerasa y de la 3-hidroxiacil-CoA epimerasa. GLC, glucosa.

En otros trabajos se han alcanzado mayores rendimientos que los obtenidos en este estudio hasta 0.7 y 0.48 $\text{g}_{\text{R3HB}}/\text{g}_{\text{GLC}}$ (**Tabla 6.4**). Sin embargo, cabe destacar que la mayoría suele utilizar medios complejos o suplementados con extracto de levadura (Gao *et al.*, 2002; Shiraki *et al.*, 2006). En la condición con glucosa a 800 rpm se alcanzó el 47% del rendimiento máximo teórico (Y_{MaxT} , 0.578 $\text{g}_{\text{R3HB}}/\text{g}_{\text{GLC}}$) en medio mineral mínimo, éste es un rendimiento bueno pero aún con gran potencial para ser mejorado. Como se ha visto en los resultados obtenidos, la formación de biomasa, acetato y piruvato son las principales vías que compiten por el flujo de carbono. Por lo cual es necesario limitar la formación de biomasa como fue realizado en este estudio, mediante la limitación de oxígeno. Además, la conversión eficiente de piruvato a acetyl-CoA es un paso primordial en conjunto con la reincorporación del acetato formado, para mantener la poza de HSCoA en niveles inferiores a los inhibitorios para la vía de síntesis del R3HB (Oeding y Schlegel, 1973; Manchak y Page, 1994; Kessler y Witholt, 2001; Fernández-Sandoval *et al.*, 2012).

Cabe destacar que la vía utilizada para la formación de R3HB no está balanceada energéticamente hablando al utilizar glucosa como fuente de carbono, por lo cual se debe considerar como contender con el exceso de poder reductor (NADH) o en su defecto considerarse alguna fuente de carbono alternativa, basándose en el rendimiento máximo teórico energético dado por los grados de reductancia del sustrato entre los del producto (Dugar y Stephanopoulos, 2011). Para el caso específico del R3HB, a partir de glucosa este rendimiento es de 1.33 $\text{mol}_{\text{R3HB}}/\text{mol}_{\text{GLC}}$, mientras que el rendimiento máximo teórico estequiométrico es de 1 $\text{mol}_{\text{R3HB}}/\text{mol}_{\text{GLC}}$. Así entonces, el 25% restante de la energía presente en la glucosa es producida en forma de exceso de poder reductor (Dugar y Stephanopoulos, 2011).

La utilización de despolimerasas de PHAs es la vía más estudiada para la producción de R3HB y se han obtenido buenos resultados en rendimientos y títulos, pero suelen tener bajas productividades (Lee y Lee, 2003, Kawata *et al.*, 2014; Wang y Liu, 2014). Sin embargo, en el estudio de Lee y colaboradores en el año 1999 se reportaron títulos de hasta 117.8 g/L de R3HB, junto con una productividad muy alta, de 4.91 $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$, utilizando a *Azohydromonas lata* (o *Alcaligenes latus*) en un cultivo tipo lote alimentado y utilizando como fuente de carbono sacarosa. Cabe mencionar que en dicho estudio primero se realizó la producción y acumulación del polímero P3HB y en una etapa posterior de incubación a pH ácido (3 a 4) se logró una rápida despolimerización a R3HB, con un rendimiento de hasta el 85 % del polímero acumulado (Lee *et*

al., 1999). Siendo éste el único reporte que ha alcanzado títulos y productividades similares, se siguen evaluando estrategias alternas que puedan competir para la producción del monómero, entre la que destaca nuestra estrategia utilizada, la cual incluso se ha utilizado en el microorganismo *Pseudomonas putida* con el fin de obtener un monómero diferente el 3-hidroxiodecanoato, cuyas aplicaciones industriales son diversas e interesantes (Chung et al., 2009). Otra estrategia de reciente aplicación es la obtención de R3HB por medio de la propionil-CoA transferasa, la cual utiliza como sustrato donador al (*R*)-3-hidroxi-butiril-CoA y al acetato como receptor, formando R3HB y acetyl-CoA (Matsumoto *et al.*, 2013). Esta es una estrategia relevante tomando en cuenta nuestros resultados en los cuales el tener una vía de regeneración de acetyl-CoA como la vía de los genes *ackA* y *pta* le proporciona una ventaja al sistema para la producción de R3HB.

6.5- Determinación de la actividad enzimática de GapN y GapA en la cepa AV14N1.

Debido a la poca o nula diferencia entre las cepas AV14 y AV14N1 se planteó la posibilidad de que la construcción para la expresión conjunta de los genes *gapA* y *gapN*, tuviera algún problema. Por lo cual, se midió la actividad enzimática de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ o de NADP⁺ en extractos celulares de las cepas AV14 y AV14N1, dada por las enzimas GapA y GapN, respectivamente.

Los resultados de estos experimentos sugieren que hay diferencias significativas en las actividades tanto de GapA como de GapN entre ambas cepas. La actividad determinada de GapA para las cepas AV14 y AV14N1, fue de 269.87 ± 54.87 y de 112.79 ± 6.56 nmol min⁻¹ mg_{PROT}⁻¹, respectivamente (**Tabla 6.5**). A pesar de que no se ve un efecto desfavorable en el crecimiento de la cepa AV14N1 en condiciones aeróbicas, la actividad de GapA es reducida a la mitad en comparación con la cepa AV14. En relación a la actividad de GapN, ésta no fue apreciable en la cepa AV14 y en la cepa AV14N1 fue de 9.45 ± 0.77 nmol min⁻¹ mg_{PROT}⁻¹. La diferencia entre la actividad de GapN y GapA es de un orden de magnitud, esto explica la poca diferencia que existe entre las cepas, debido a una muy poca aportación de NADPH por medio de la actividad de GapN de la cepa AV14N1.

Se utilizó como control las cepas AV14 y AV14N1 transformadas con el vector pACYC*gapN*, el cual tiene clonado el gen *gapN* bajo el promotor *trc* inducible por IPTG. Las cepas AV14/pACYC*gapN* y AV14N1/pACYC*gapN* obtuvieron valores de 508.19 ± 146.40 y de 706.17

$\pm 87.87 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}_{\text{PROT}}^{-1}$, respectivamente. De acuerdo a lo anterior, se comprobó que el método de análisis funciona y que al sobreexpresar el gen *gapN*, se presenta una mayor actividad GapN que GapA, al menos 5 veces mayor, para el caso de la cepa AV14N1. Estos resultados son congruentes con los datos obtenidos en el trabajo previo de Centeno-Leija, utilizando el vector pACYC*gapN* en la cepa MG1655 Δ *gapA::gapN*, obteniendo $937 \pm 40 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}_{\text{PROT}}^{-1}$. Cabe destacar que las condiciones utilizadas para la determinación de la actividad GAPDH en el actual estudio son diferentes a las utilizadas en el trabajo previo, por lo que los valores no son estrictamente comparables, únicamente en el orden de magnitud obtenido (Centeno-Leija *et al.*, 2013).

Actividad específica por cantidad de proteína total ($\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}_{\text{PROT}}^{-1}$)				
	GapA (NAD ⁺)		GapN (NADP ⁺)	
AV14	269.87	<i>± 54.87</i>	NDT	
AV14N1	112.79	<i>± 6.56</i>	9.45	<i>± 0.77</i>
AV14/pACYC <i>gapN</i>	281.88	<i>± 56.55</i>	508.19	<i>± 146.40</i>
AV14N1/pACYC <i>gapN</i>	114.84	<i>± 17.57</i>	706.17	<i>± 87.87</i>

Tabla 6.5: Actividad enzimática específica por cantidad de proteína total de GAPDH dependiente de NAD⁺ y NADP⁺ en extractos celulares. Cepas: AV14, AV14N1, AV14/pACYC*gapN* y AV14N1/pACYC*gapN*. NDT: No detectado. Desviación estándar mostrada en cursiva en las columnas anexas al valor. Se presentan promedios de triplicados.

6.6- Evaluación de la producción de R3HB sobreexpresando *gapN*.

6.6.1- Evaluación de la producción de R3HB sobreexpresando *gapN* con un sistema de dos vectores a nivel de matraz.

De acuerdo a los resultados anteriores, se propone la sobreexpresión de *gapN*, mediante un sistema plasmídico, con el propósito de aumentar y modular los niveles de NADPH disponible para la producción de R3HB. Se planteó la utilización de otro vector para sobreexpresar *gapN* y así aumentar la cantidad de NADPH disponible en la célula. Se realizó una evaluación a nivel de matraz de las cepas MG1655, MS01, AV14N1 y MG1655 Δ *ackA-pta* transformadas con los vectores pTrc-R3HB y pACYC*gapN*, el cual tiene clonado el gen *gapN* de *Streptococcus mutans* bajo el control del promotor Trc inducible por IPTG (Centeno-Leija *et al.*, 2014). Los cultivos se realizaron en medio mineral mínimo AM2, suplementado con glucosa (10 g/L) como única fuente de carbono a 37 °C y 300 rpm en matraces de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo. Los

resultados se presentan en la **Figura 6.12** y en la **Tabla 6.6**. Los cultivos fueron inducidos con 0.1 mM de IPTG a una DO_{600} de 0.8-1 y puede observarse una reducción importante en la velocidad de crecimiento (hasta un 13% de la velocidad de crecimiento original) al momento de la inducción, posiblemente debido a una carga metabólica excesiva. La glucosa fue consumida en su totalidad alrededor de la hora 36 de cultivo, alcanzando una biomasa de 1.5 g/L para la cepa MG1655 y en promedio de 1.3 g/L para las cepas MS01, AV14N1 y MG1655 $\Delta ackA-pta$. A pesar de la reducción del crecimiento al final del cultivo se alcanzaron títulos de R3HB de 3.3, 2.94, 2.56, 2.99 g/L para las cepas MG1655, MS01, AV14N1 y MG1655 $\Delta ackA-pta$, respectivamente. Los títulos de R3HB son superiores a lo alcanzado en las mismas condiciones únicamente con el vector pTrc-R3HB, de tal forma que se logró aumentar la producción en un 44, 78, 77 y 106 % para las cepas MG1655, MS01, AV14N1 y MG1655 $\Delta ackA-pta$, respectivamente. De igual manera el rendimiento se vio incrementado llegando a valores de 0.31, 0.27, 0.24, 0.33 gr_{R3HB}/g_{GLC} con las cepas MG1655, MS01, AV14N1 y MG1655 $\Delta ackA-pta$, respectivamente. En esta evaluación fue alcanzado un rendimiento de hasta el 56% con respecto al rendimiento máximo teórico (Y_{MaxT} , 0.578 gr_{R3HB}/g_{GLC}), superando incluso la estrategia de limitación de oxígeno en biorreactor, donde se alcanzó el 47% del Y_{MaxT} . Esto indica la importancia del aumento del cofactor NADPH para alcanzar mayores rendimientos, como se plantea en la hipótesis de la presente tesis y que se ha reportado anteriormente para otros metabolitos que requieren de un mayor aporte de NADPH para ser reducidos (Centeno-Leija, 2013; Martínez *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2013; Boyd *et al.*, 1995).

Como controles para determinar la posible causa de la carga metabólica excesiva se transformó a la cepa MG1655 $\Delta ackA-pta$ con combinaciones de los vectores vacíos y de producción, ya que en un estudio anterior se utilizó la cepa MG1655 $\Delta ackA-pta$ también con un sistema de dos vectores similar al utilizado en este estudio con el fin de producir P3HB en *E. coli*. En ese trabajo se obtuvo una mayor acumulación de P3HB en la célula sin presentar el efecto de la disminución del crecimiento debido a la carga metabólica (Centeno-Leija *et al.*, 2014). Se obtuvieron las cepas MG1655 $\Delta ackA-pta$ / pTrc-R3HB / pACYC184 (Control vector pTrc-R3HB y vector pACYC184, C. R-A) y MG1655 $\Delta ackA-pta$ / pTrc992A/ pACYCgapN (Control vector pTrc992A y vector pACYCgapN, C. T-N). Además se realizó el cultivo de la cepa MG1655 $\Delta ackA-pta$ pTrc-R3HB/ pACYCgapN sin inductor y de la cepa MG1655 $\Delta ackA-pta$ con ambos vectores vacíos (pTrc992A/ pACYC184). En el cultivo de la cepa MG1655 $\Delta ackA-pta$ pTrc-R3HB/ pACYCgapN sin inductor, no se observa una reducción del crecimiento y llega a producir 1.88 g/L de R3HB debido a la

expresión basal que presentan los vectores. Esto confirma que existe un efecto de carga metabólica excesiva (atribuible al plásmido pTrc-R3HB) al momento de realizar la inducción con 0.1 mM de IPTG. En el cultivo de la cepa MG1655 $\Delta ackA-pta$ / pTrc992A/ pACYCgapN (C. T-N) no se presenta la disminución del crecimiento al inducir con la misma cantidad de IPTG. Sin embargo, en el cultivo de la cepa MG1655 $\Delta ackA-pta$ / pTrc-R3HB / pACYC184 (C. R-A) si se presenta la reducción en la velocidad de crecimiento posterior a la inducción (confirmando el efecto a la carga metabólica por la sobreexpresión de los genes codificados en el plásmido pTrc-R3HB), aunque no en el mismo grado de severidad que en la cepa MG1655 $\Delta ackA-pta$ pTrc-R3HB / pACYCgapN, ya que la primera alcanza una mayor biomasa (1.90 g/L) y su velocidad de crecimiento posterior a la inducción es de 0.09 h⁻¹ comparada contra 0.07 h⁻¹ de la cepa con ambos vectores de producción.

Los datos anteriores indican que en nuestro caso específico, la causa de la carga metabólica excesiva, puede ser debido a que la vía sintética de producción de R3HB (genes *phbA*, *phbB* y *tesB*), la cual causa una carga metabólica que rebasa la capacidad metabólica de la cepa, al utilizar dos vectores, comportamientos similares han sido reportados en la literatura (Ricci y Hernandez, 2000; Bhattacharya y Dubey, 1995; Bentley *et al.*, 1989; Ow *et al.*, 2006). En el estudio de Centeno-Leija, se observó que el reemplazo cromosomal de *gapA* por el de *gapN* silvestre de *S. mutans* causa efectos drásticos en el crecimiento de la cepa y solo mediante una co-expresión de los genes *gapA* y *gapN*, utilizando un vector plasmídico (pACYCgapN) para sobre expresar el gen *gapN*, fue posible un crecimiento favorable y el aumento del NADPH disponible en la célula (Centeno-Leija *et al.*, 2013). Sin embargo, no presentó el fenómeno de carga metabólica excesiva, esto puede suponerse que es principalmente debido a la sobreexpresión del gen *tesB* (la cepa utilizada en ambos casos fue la misma: MG1655 $\Delta ackA-pta$), ya que en comparación con el trabajo de Centeno-Leija, la única diferencia en los sistemas de producción es el intercambio del gen *phbC* por el gen *tesB*, siendo que en nuestro caso si se presenta una carga metabólica excesiva (Centeno-Leija *et al.*, 2014).

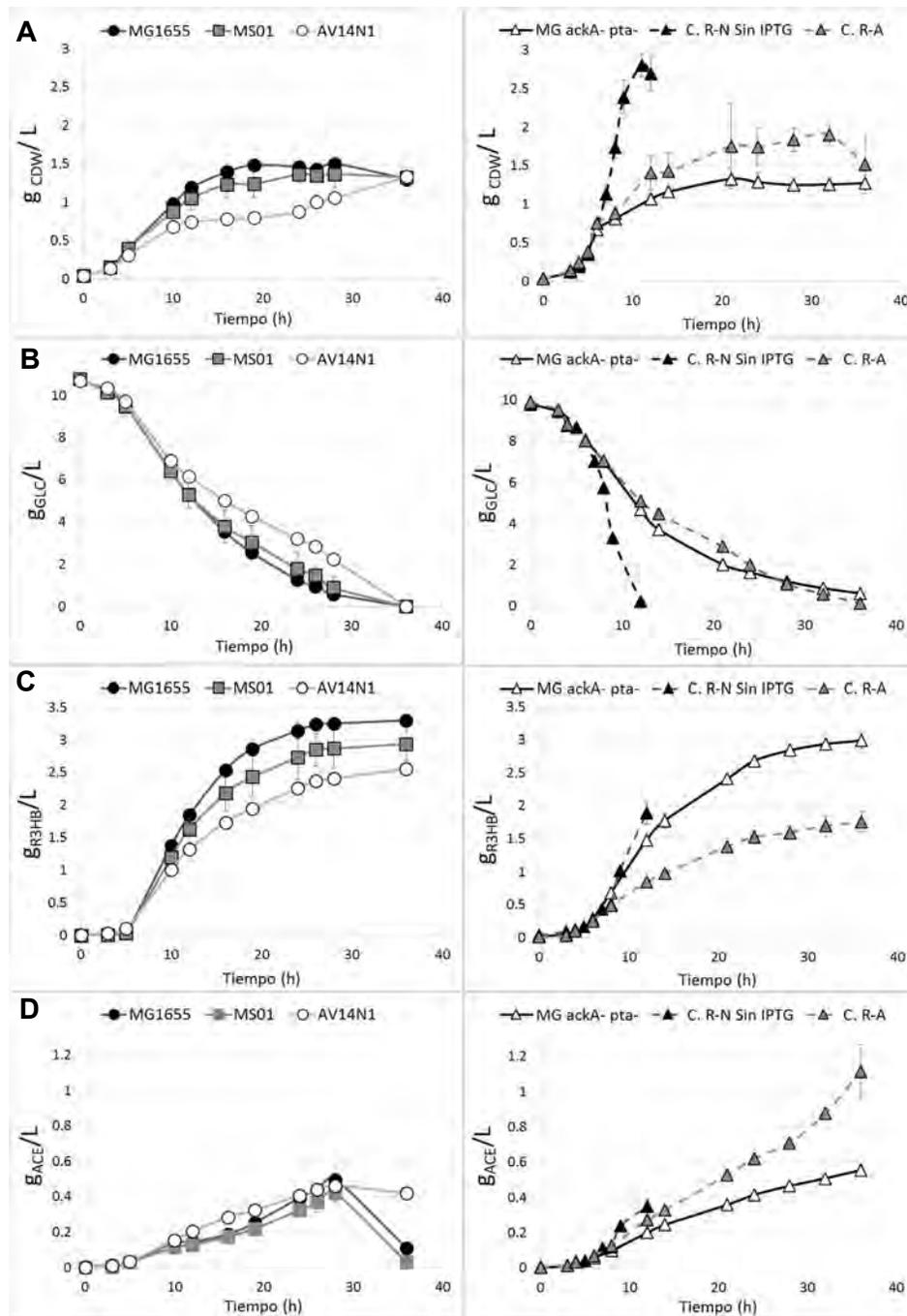


Figura 6.12: Cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y de producción de R3HB y acetato. Cepas evaluadas: MG1655 (círculos cerrados), MS01 (cuadrados cerrados), AV14N1 (círculos abiertos) y MG1655 Δ *ackA-pta* (triángulos abiertos) transformadas con los vectores pTrc-R3HB / pACYC*gapN* en matraz con glucosa (10 g/L), induciendo con 0.1 mM de IPTG, 300 rpm a 37°C. Así también se incluyen los controles con la cepa MG1655 Δ *ackA-pta*, transformada con los vectores pTrc-R3HB / pACYC*gapN*, sin inducir (C.R-N sin IPTG, línea discontinua triángulos negros) y al control de la cepa transformada con los vectores pTrc-R3HB / pACYC184 (C.R-A, sin gen *gapN*, línea discontinua triángulos grises). **A.** Peso celular seco (CDW). **B.** Consumo de glucosa (GLC). **C.** Producción del (*R*)-3-hidroxiбутирато (R3HB). **D.** Producción de acetato (ACE). Se presentan promedios de triplicados.

Organismo / plásmido	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)		Biomasa (g L ⁻¹)		Acetato (g L ⁻¹)		Piruvato (g L ⁻¹)		Fuente de carbono consumida (g _{GLC} L ⁻¹)		q _s ^{exp} (g _{GLC} g _{CDW} ⁻¹ h ⁻¹)		R3HB (g L ⁻¹)		Rendimiento del producto (g _{R3HB} /g _{GLC})		Productividad (g _{R3HB} L ⁻¹ h ⁻¹)		Rendimiento con respecto al Y _{MaxT} (%)
	<u>0.46</u>	±0.04	1.5	±0.06	0.11	±0.03	NDT	10.770	±0.03	1.59	±0.58	3.30	±0.09	0.31	±0.00	0.09	±0.003	53.04	
<i>E. coli</i> MG1655 pTrc-R3HB / pACYCgapN	0.06	±0.01																	
<i>E. coli</i> MS01 pTrc-R3HB / pACYCgapN	<u>0.47</u>	±0.02	1.37	±0.18	0.03	±0.06	NDT	10.775	±0.04	1.73	±0.42	2.94	±0.26	0.27	±0.03	0.08	±0.007	47.22	
	0.05	±0.02																	
<i>E. coli</i> AV14N1 pTrc-R3HB / pACYCgapN	<u>0.41</u>	±0.01	1.33	±0.05	0.42	±0.02	NDT	10.704	±0.02	1.52	±0.13	2.56	±0.05	0.24	±0.00	0.07	±0.001	41.32	
	0.03	±0.00																	
<i>E. coli</i> MG1655 ΔackA-pta pTrc-R3HB / pACYCgapN	<u>0.48</u>	±0.02	1.33	±0.13	0.56	±0.01	NDT	9.185	±0.05	1.32	±0.05	2.99	±0.12	0.33	±0.01	0.08	±0.003	56.29	
	0.07	±0.00																	
<i>E. coli</i> MG1655 ΔackA-pta pTrc-R3HB / pACYCgapN Sin Inducción	<u>0.48</u>	±0.01	2.80	±0.14	0.351	±0.03	NDT	9.563	±0.21	1.34	±0.08	1.89	±0.16	0.20	±0.01	0.05	±0.014	34.14	
<i>E. coli</i> MG1655 ΔackA-pta pTrc-R3HB / pACYC184	<u>0.48</u>	±0.03	1.90	±0.13	1.12	±0.15	NDT	9.793	±0.03	1.26	±0.06	1.75	±0.15	0.18	±0.02	0.05	±0.004	30.99	
	0.09	±0.02																	
<i>E. coli</i> MG1655 ΔackA-pta pTrc992A / pACYCgapN	<u>0.49</u>	±0.01	2.36	±0.11	0.107	±0.01	2.877	±0.01	8.314	±0.16	1.58	±0.05	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
<i>E. coli</i> MG1655 ΔackA-pta pTrc992A / pACYC184	<u>0.53</u>	±0.01	2.75	±0.17	0.914	±0.01	2.120	±0.10	9.039	±0.17	1.64	±0.09	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
<i>E. coli</i> MG1655 / pTrc-gapN-R3HB	<u>0.586</u>	±0.02	2.11	±0.38	0.28	±0.04	NDT	9.18	±0.65	1.86	±0.08	2.55	±0.25	0.28	±0.04	0.26	±0.02	48.14	
<i>E. coli</i> MS01 / pTrc-gapN-R3HB	<u>0.586</u>	±0.02	2.24	±0.24	0.13	±0.04	NDT	10.40	±0.38	1.96	±0.16	2.41	±0.08	0.23	±0.01	0.24	±0.008	40.13	
<i>E. coli</i> AV14N1 / pTrc-gapN-R3HB	<u>0.545</u>	±0.02	2.3	±0.13	0.43	±0.04	NDT	7.23	±0.20	1.52	±0.03	1.13	±0.04	0.17	±0.00	0.11	±0.004	28.66	
<i>E. coli</i> MG1655 ΔackA-pta / pTrc-gapN-R3HB	<u>0.527</u>	±0.01	2.32	±0.13	0.29	±0.03	NDT	10.33	±0.16	1.86	±0.01	3.01	±0.15	0.29	±0.04	0.30	±0.015	50.98	

Tabla 6.6: Parámetros cinéticos y estequiométricos de los cultivos de producción de R-3HB sobre expresando *gapN* en matraz con glucosa (10 g/L), 300 rpm a 37 °C, en cepas transformadas con los vectores pTrc-R3HB y pACYCgapN (0.1 mM de IPTG) o el vector pTrc-gapN-R3HB (10 μM de IPTG). NA = No aplicable. NDT = No detectado. Y_{MaxT}: Rendimiento máximo teórico (0.578 g_{R3HB}/g_{GLC}). Desviación estándar mostrada en cursiva en las columnas anexas al valor. El valor de la tasa de crecimiento subrayado corresponde al valor calculado en la fase exponencial, mientras el otro valor; al calculado en la fase de crecimiento posterior a la inducción. **exp**; valor en fase exponencial.

6.6.2- Evaluación de la producción de R3HB sobreexpresando *gapN* con un sistema de un vector a nivel de matraz.

De acuerdo a los resultados anteriores, la estrategia de generación del cofactor NADPH por medio de la sobreexpresión del gen *gapN* estimula la mayor producción y rendimiento del (*R*)-3-hidroxiбутирато. Sin embargo la utilización de un sistema con dos vectores le otorga a la célula una gran carga metabólica que le reduce de manera importante el crecimiento, afectando a la productividad del sistema. Debido a lo anterior se construyó el vector pTrc-*gapN*-R3HB (Figura 6.13), el cual se deriva del vector pTrc-R3HB incluyendo el gen *gapN* optimizado para el uso de codones de *E coli*, bajo la influencia del promotor Trc en un sistema de operón con la vía sintética de producción de R3HB, dando un vector con 4 genes expresándose de forma conjunta (*gapN*, *phbA*, *phbB* y *tesB*).

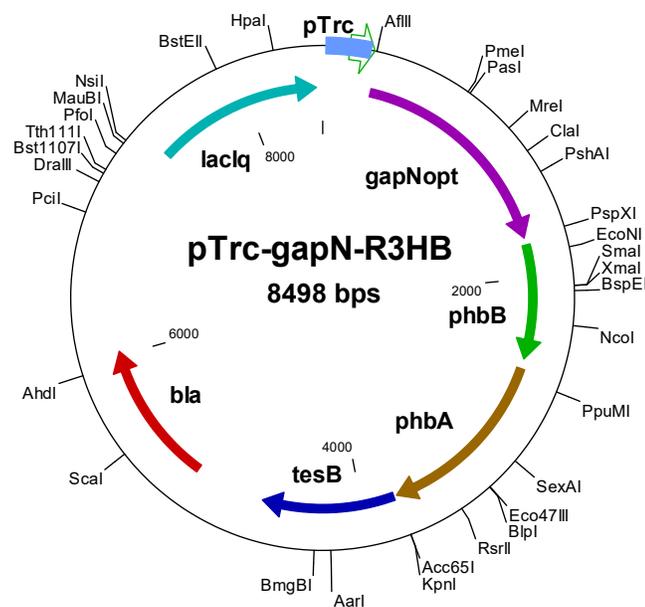


Figura 6.13: Vector construido para la síntesis del (*R*)-3-hidroxiбутирато junto con la sobreexpresión el gen *gapN*.

Se evaluó la producción de R3HB en las cepas MG1655, MS01, AV14N1 y MG1655 Δ *ackA-pta* transformadas con el vector pTrc-*gapN*-R3HB en matraces. Sin embargo, se volvió a observar un arresto en el crecimiento de las cepas al momento de la inducción con 0.1 mM de IPTG (datos no mostrados). Esto sugiere que la sobreexpresión del gen *gapN* junto con la expresión de los demás genes de la vía, es demasiada carga metabólica que afecta seriamente el crecimiento y la producción, sin la posibilidad de obtener altas productividades (Ricci y Hernández, 2000;

Bhattacharya y Dubey, 1995; Bentley *et al.*, 1989; Ow *et al.*, 2006). En consecuencia, se decidió reducir la cantidad utilizada del inductor, se evaluó la producción usando 10 μM de IPTG, lo cual es 10 veces menor a lo utilizado en los ensayos anteriores (**Figura 6.14**) (**Tabla 6.6**). El ensayo se realizó con las cepas mencionadas anteriormente, induciendo al inicio de la fase exponencial ($\approx 1 \text{ DO}_{600}$); no se detectó algún efecto desfavorable en el crecimiento de las cepas en el momento y posterior a la inducción (hasta las 8 horas de cultivo). Los cultivos llegaron a una menor biomasa máxima (alrededor de 2.2 g/L de peso celular seco) en comparación con los resultados obtenidos con las cepas transformadas con el vector pTrc-R3HB sin el gen *gapN* incluido en el operón (alrededor de 4 g/L de peso celular seco). Así mismo, aumentó la velocidad específica de consumo de la fuente de carbono, debido posiblemente a alguna limitación en ATP en las cepas evaluadas como se ha reportado anteriormente (Utrilla *et al.*, 2009). Con respecto a la producción de R3HB esta se ve favorecida alcanzando títulos de $\approx 2.5 \text{ g/L}$ para las cepas MG1655 y MS01, y de 3 g/L para la cepa MG1655 $\Delta\text{ackA-pta}$. Los títulos de la cepa AV14N1 son menores que lo alcanzados por las otras cepas, debido a que no logró consumir la fuente de carbono en su totalidad, aun así en rendimientos alcanzó valores similares ($0.21 \text{ gr}_{\text{R3HB}}/\text{g}_{\text{GLC}}$) en comparación con los obtenidos con las cepas AV14N1, MS01, MG1655 y MG1655 $\Delta\text{ackA-pta}$ (0.23 , 0.28 y $0.29 \text{ gr}_{\text{R3HB}}/\text{g}_{\text{GLC}}$, respectivamente). Estos valores representan un aumento del 27, 32, 55 y 119 % para las cepas MG1655, MS01, AV14N1 y MG1655 $\Delta\text{ackA-pta}$, respectivamente, en comparación con los ensayos utilizando únicamente el vector pTrc-R3HB sin sobreexpresar *gapN*. Aunque los rendimientos son ligeramente menores en comparación con utilizar el sistema de dos vectores (pTrc-R3HB/pACYC*gapN*) utilizando 0.1 mM de IPTG para inducir el cultivo, la productividad se mejora en al menos 3 veces (de 0.08 a $0.30 \text{ gr}_{\text{R3HB}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Esto utilizando el sistema de un vector (pTrc-*gapN*-R3HB). En cuanto a la producción de acetato se refiere, aún se observan la acumulación constante en las cepas carentes de las vías del metabolismo de acetato (AV14N1 y MG1655 $\Delta\text{ackA-pta}$), al contrario existe una acumulación y asimilación en las cepas que poseen intactas estas vías (MS01 y MG1655).

Los resultados anteriores demuestran que la sobreexpresión del gen *gapN* de *S. mutans* es una estrategia adecuada para aumentar la producción de R3HB. Sin embargo, la carga metabólica excesiva ocasionada por la sobreexpresión de los genes y producción de las enzimas necesarias es un problema y un punto importante a considerar, por lo cual es necesario modular la expresión de estos genes. Por los resultados obtenidos en este trabajo se debe poner énfasis especial en el control

de la expresión de los genes *tesB* y *gapN* (Ricci y Hernández, 2000; Bhattacharya y Dubey, 1995; Bentley *et al.*, 1989; Jones *et al.*, 2000). En este trabajo se utilizó la modulación mediante la reducción de la cantidad de inductor utilizado, aun así existen otras estrategias con capacidad de modulación más precisa (Yadav *et al.*, 2012; Jones *et al.*, 2000; Alper, *et al.*, 2005)

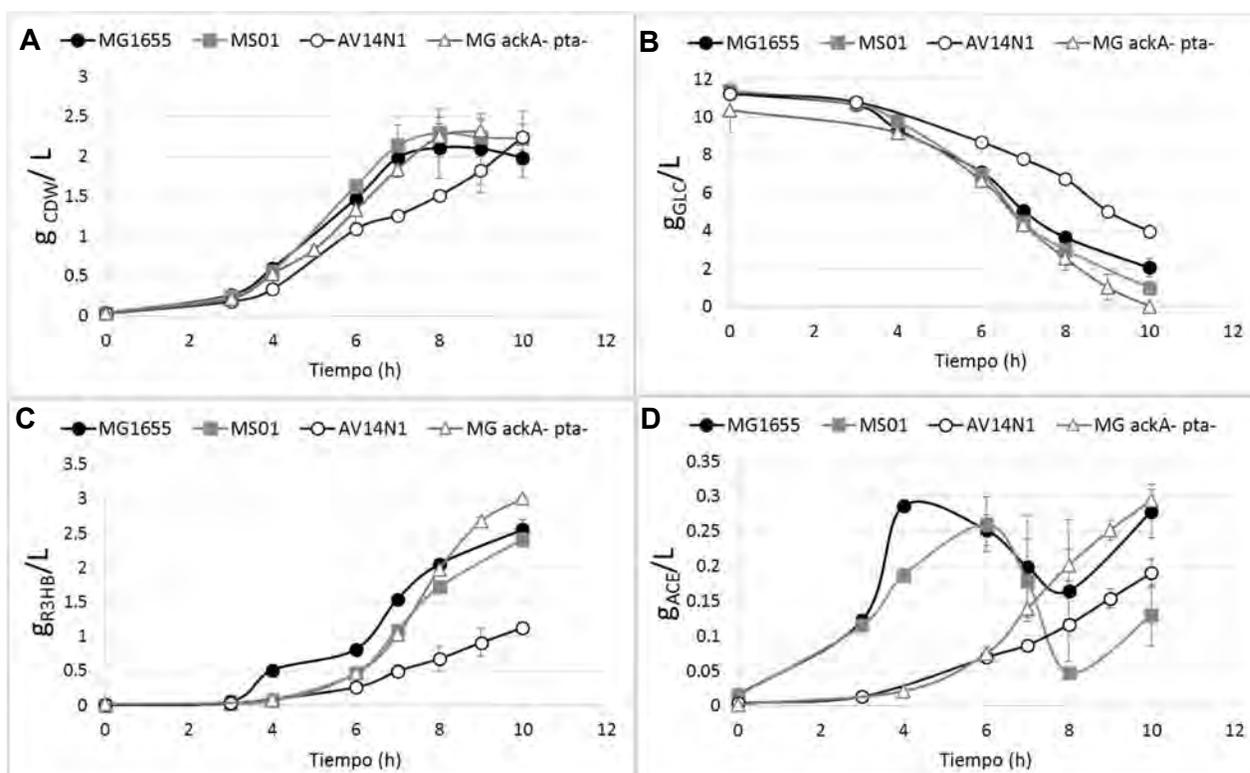


Figura 6.14: Cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y de producción de R3HB y acetato en matraz con glucosa (10 g/L), induciendo con 10 μ M de IPTG, 300 rpm a 37°C. Cepas evaluadas: MG1655 (círculos cerrados), MS01 (cuadrados cerrados), AV14N1 (círculos abiertos) y MG1655 Δ *ackA-pta* (triángulos abiertos) transformadas con el vector pTrC-*gapN*-R3HB. **A.** Peso celular seco (CDW). **B.** Consumo de glucosa (GLC). **C.** Producción del (*R*)-3-hidroxi butirato (R3HB). **D.** Producción de acetato (ACE). Se presentan promedios por triplicado.

VII- Conclusiones

- a. Las inactivaciones en los genes *poxB* y *pta* son efectivas para reducir la producción de acetato, sin afectar el crecimiento de *E. coli* en condiciones aeróbicas, en las cepas evaluadas. Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos en el contexto de generación de R3HB a partir de acetyl-CoA se encontró una ventaja en las cepas que poseen intactas estas vías, debido a una reincorporación del acetato generado por actividad de la tioesterasa II sobreexpresada.
- b. La integración del gen *gapN* río abajo del gen *gapA* no causó efectos negativos sobre el crecimiento de *E. coli* en condiciones aeróbicas. Así mismo, por los resultados obtenidos, es muy poca la aportación del NADPH generado con esta estrategia. Aunque se tuvieron en consideración todos los elementos relevantes para integrar en cromosoma de forma correcta a *gapN*, incluyendo la síntesis del gen con el uso preferencial de codones optimizado, posiblemente se generó una baja dosis génica o algún problema relacionado con la expresión del gen.
- c. De acuerdo a los resultados obtenidos en varios de los cultivos del presente trabajo, se sugiere que el genotipo $\Delta pflB$ de la cepa AV14 y AV14N1 afecta el flujo de carbono en la transición de piruvato hacia acetyl-CoA en condiciones microaeróbicas, al no ser suficiente la actividad residual del complejo piruvato deshidrogenasa para contender con un balance adecuado en la velocidad de formación de acetyl-CoA y de consumo de HSCoA, ocasionando que la poza de HSCoA se incremente e inhiba a la primera enzima de la vía sintética de producción de R3HB (PhbA) (Oeding y Schlegel, 1973; Manchak y Page, 1994; Kessler y Witholt, 2001).
- d. Se obtuvo una productividad volumétrica de R3HB en las cepas MG1655, AV14 y AV14N1 de *E. coli* en el intervalo de 0.55 a 0.59 g/L/h, utilizando medio mineral con glucosa en biorreactores de 0.75 L a 800 rpm y 0.5 vvm, logrando títulos de 9.85 a 10.4 g/L de R3HB. Las productividades alcanzadas son las más altas reportadas a la fecha para un proceso de producción de R3HB en cultivo lote, usando medio mineral y glucosa con una cepa recombinante de *E. coli*.
- e. Utilizando condiciones en las cuales se tiene limitación de oxígeno durante la etapa de producción (800 rpm y 0.5 vvm), se aumentó el rendimiento de R3HB respecto a glucosa de

0.14 y 0.22 $\text{g}_{\text{R3HB}}/\text{g}_{\text{GLC}}$, obtenidos en nivel de matraz, a 0.26 y 0.27 $\text{g}_{\text{R3HB}}/\text{g}_{\text{GLC}}$ para las cepas AV14N1 y MG1655 a nivel de biorreactor, respectivamente. Alcanzando el 47 % del rendimiento máximo teórico.

- f. Aumentando la disponibilidad de NADPH en la célula mediante la sobreexpresión del gen *gapN* de *S. mutans* utilizando un plásmido, se logró mejorar el rendimiento de producción de R3HB hasta alcanzar el 57 % del rendimiento máximo teórico. Así mismo, se aumentó en al menos un 30 % en comparación con los rendimientos obtenidos sin realizar la sobreexpresión del gen *gapN*. Por lo cual, esta hipótesis propuesta en esta tesis resultó ser verdadera, ya que la sobreexpresión de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP^+ de *S. mutans*, aumenta la producción de R3HB.
- g. La eliminación de todas las vías de fermentación en nuestras cepas evaluadas (AV14 y AV14N1) y en las condiciones de cultivo utilizadas no se logra canalizar eficientemente el flujo de carbono hacia la formación de acetil-CoA y R3HB a partir de glucosa o xilosa como fuente de carbono. Posiblemente este efecto sea, debido a un flujo limitado en la formación de acetil-CoA a partir de piruvato y al carecer de la posibilidad de reincorporar al metabolismo el acetato formado (posiblemente por la actividad de la tioesterasa II). Esto anula nuestra segunda parte de la hipótesis. Sin embargo, esta conclusión solo se limita a las condiciones utilizadas en este trabajo, ya que condiciones más controladas de transferencia de oxígeno, podrían dilucidar alguna ventaja de eliminar las vías de fermentación para la producción de R3HB.

VIII- PERSPECTIVAS.

- 1) Comprobación enzimática de la utilización de acetil-CoA como sustrato por la tioesterasa II de *E. coli*. A pesar de que se tiene evidencias de que el acetil-CoA puede ser utilizado como sustrato por otras tioesterasas de *E. coli* (Zuang *et al.*, 2008), no se ha comprobado enzimáticamente su utilización como sustrato por la tioesterasa II.
- 2) Implementación de un sistema de control de oxígeno disuelto para mejorar el proceso de producción de R3HB en biorreactores. Es probable que mediante un sistema de control del oxígeno disuelto se puedan mejorar los títulos alcanzados y los rendimientos de producción de R3HB. Existen diversos trabajos en los cuales mediante sistemas de control del oxígeno disuelto han mejorado sus producciones (Beronio y Tsao, 1993; Yegneswaran *et al.*, 1991, Kole *et al.*, 1988)
- 3) Reconstituir el gen *pflB* para mejorar el flujo de piruvato hacia acetil-CoA, esto mejoraría el crecimiento y el balance de la poza de acetil-CoA y HSCoA en condiciones microaeróbicas. De igual manera, la desregulación del complejo piruvato deshidrogenasa (PDHC) mediante un promotor constitutivo (como el promotor de *gapA*) podría aumentar la actividad de PDHC en condiciones limitantes de oxígeno (Munjaj *et al.*, 2012).
- 4) Sobreexpresar de manera modulada a los genes *tesB* y *gapN*, con el fin de evitar la excesiva carga metabólica que pudiesen generar. Esto puede llevarse a cabo mediante la utilización de promotores de menor fuerza de expresión, plásmidos con un menor número de copias, integrando en cromosoma ambos genes bajo un promotor regulable, usando sitios de unión a ribosomas (RBS) sintéticos e incluso realizando combinaciones de estas para encontrar la estrategia optima (Ingeniería metabólica modular multivariable; MMME) (Yadav *et al.*, 2012; Jones *et al.*, 2000; Alper, *et al.*, 2005).
- 5) Modelamiento a escala genómica de *E. coli* para determinar los niveles óptimos de expresión de las enzimas, de los cofactores y de la cantidad de oxígeno necesario para la producción de R3HB. El uso de modelos de escala genómica ha ido aumentando en gran escala, con las nuevas herramientas bioinformáticas y el aumento en la cantidad de información recabada a nivel

genómico y metabólico de diversos organismos. Esto hace posible su modelaje y determinación de modificaciones necesarias para el mejoramiento del organismo (Price et al., 2003; Bro *et al.*, 2006; Simeonidis y Price, 2015). Recientemente, se ha demostrado por medio de análisis *in silico* que el uso del gen *gapN* en *Saccharomyces cerevisiae* puede llegar a aumentar los rendimientos de producción de etanol hasta en un 25 % (Bro *et al.*, 2006).

- 6) Mediante ingeniería de proteínas modificar la enzima tioesterasa II para aumentar la especificidad hacia la utilización de (*R*)-3-hidroxi-butiril-CoA como sustrato. La estructura terciaria de la tioesterasa II ya se logró cristalizar y determinar, por lo cual un enfoque de ingeniería de proteínas pudiera ser adecuado para modificar su especificidad. Se han reportado una gran cantidad de trabajos en los cuales se han logrado cambiar o aumentar la especificidad de una proteína hacia algún sustrato o cofactor. (Li *et al.*, 2000; Yuan *et al.*, 1995; Bommareddy *et al.*, 2014).

- 7) Utilización de una vía alterna de regeneración de acetyl-CoA, como podría ser la transferencia de CoA del (*R*)-3-hidroxi-butiril-CoA hacia acetato, por medio de la propionil-CoA transferasa (Matsumoto *et al.*, 2013).

IX- BIBLIOGRAFÍA CITADA.

1. **Ahn WS, Park SJ, Lee SY.** 2001. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by cell recycle fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*. 23 (3): 235-240.
2. **Aldor IS, Keasling JD.** 2003. Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Current Opinion in Biotechnology*. 14: 475-483.
3. **Alper, H., Fischer, C., Nevoigt, E., Stephanopoulos, G.** 2005. Tuning genetic control through promoter engineering. *PNAS*. 102 (36): 12678-12683.
4. **Alva Munoz, L. E., Riley, M. R.** 2008. Utilization of cellulosic waste from tequila bagasse and production of polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastics by *Saccharophagus degradans*. *Biotechnology and Bioengineering*. 100(5): 882-888.
5. **Amara AA, Moawad H.** 2011. PhaC synthases and PHA depolymerases: the enzymes that produce and degrade plastic. *IJUM Engineering Journal*. 12.
6. **Angelo DP.** 1996. Chiral chemistry is still evolving, driven by techniques and business demands. *Genetic Engineering & Biotechnology News*. 6:15.
7. **Bentley, W., Mirjalili, N., Andersen, D., Davis, R., Kompala, D.S.** 1990. Plasmid-Encoded Protein: The Principal Factor in the "Metabolic Burden" Associated with Recombinant Bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*. 35: 668-681
8. **Beronio, P.B., Tsao, G.T.** 1993. Optimization of 2,3-Butanediol Production by *Klebsiella oxytoca* Through Oxygen Transfer Rate Control. *Biotechnology and Bioengineering*. 42: 1263-1269.
9. **Bhattacharya, S.K., Dubey, A.K.** 1995. Metabolic Burden as Reflected By Maintenance Coefficient of Recombinant *Escherichia coli* Overexpressing target gene. *Biotechnology Letters*. 17 (11): 1155-1160.
10. **Bhubalan K, Lee WH, Loo CY, Yamamoto T, Doi Y, Sudesh K.** 2007. Controlled biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) from mixtures of palm kernel oil y 3HV-precursors. *Polymer Degradation and Stability*. 93:17-23.
11. **Bommareddy, R.R., Chen, Z., Rappert, S., and Zeng, A.P.** 2014. A de novo NADPH generation pathway for improving lysine production of *Corynebacterium glutamicum* by rational design of the coenzyme specificity of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *Metabolic Engineering*. 25: 30–37.
12. **Boyd, D. A., Cvitkovitch, D. G., Hamilton, I. R.** 1995. Sequence, expression, and function of the gene for the nonphosphorylating, NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*. 177(10): 2622-2627.
13. **Bradford M.** 1976. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248–254.
14. **Bro, C., Regenberg, B., Förster, J., Nielsen, Jens.** 2006. In silico aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production. *Metabolic Engineering*. 8 (2): 102-111.
15. **Centeno-Leija, S., Huerta-Beristain, G., Giles-Gómez, M., Bolivar, F., Gosset, G., Martinez, A.** 2014. Improving poly-3-hydroxybutyrate production in *Escherichia coli* by combining the increase in the NADPH pool and acetyl-CoA availability. *Antonie van Leeuwenhoek*. 105(4): 687-696.
16. **Centeno-Leija, S., Utrilla, J., Flores, N., Rodriguez, A., Gosset, G., Martinez, A.** 2013. Metabolic and transcriptional response of *Escherichia coli* with a NADP⁺-dependent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 104(6): 913-924.
17. **Chang ACY, Cohen SN.** 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *Journal of Bacteriology*. 134:1141–1156.
18. **Chanprateep, S.** 2010. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 110(6): 621-632.
19. **Chen, GQ, Page, W.** 1997. Production of poly-b-hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* in a two-stage fermentation process. *Biotechnology Techniques*. 11(5): 347-350.
20. **Chen, GQ, Wu, Q.** 2005. Microbial production and applications of chiral hydroxyalkanoates. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 67(5): 592-599.

21. **Chen, X., Zhou, L., Tian, K., Kumar, A., Singh S., Prior, B.A., Wang, Z.** 2013. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: A sustainable industrial platform for bio-based chemical production. *Biotechnology Advances*. 31: 1200-1223.
22. **Choi, J, Lee, S. Y.** 1999. High-level production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(10): 4363-4368.
23. **Choi, J, Lee, S. Y.** 1997. Process analysis and economic evaluation for poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. *Bioprocess Engineering*. 17(6): 335-342.
24. **Choi, J, Lee, S. Y, Han, K.** 1998. Cloning of the *Alcaligenes latus* polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes and use of these genes for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(12): 4897-4903.
25. **Chung, A.; Liu, Q.; Ouyang, S.-P.; Wu, Q.; Chen, G.-Q.** 2009. Microbial production of 3-hydroxydodecanoic acid by *pha* operon and *fadBA* knockout mutant of *Pseudomonas putida* KT2442 harboring *tesB* gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 83: 513–519.
26. **Datsenko, K. A, Wanner, B. L.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97(12): 6640-6645.
27. **Doi, Y, Kitamura, S, Abe, H.** 1995. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules*. 28(14): 4822-4828.
28. **Dugar, D., Stephanopoulos, G.** 2001 Relative potential of biosynthetic pathways for biofuels and bio-based products. *Nature Biotechnology*. 29 (12): 1074-1078.
29. **Dwidar, M., Park, JY, Mitchell, R. J, Sang, BI.** 2012. The future of butyric acid in industry. *The Scientific World Journal*. 2012.
30. **Fernández-Sandoval, M. T., Huerta-Beristain, G.; Trujillo-Martinez, B.; Bustos, P.; Gonzalez, V.; Bolivar, F.; Gosset, G.; Martinez, A.** 2012. Laboratory metabolic evolution improves acetate tolerance and growth on acetate of ethanogenic *Escherichia coli* under non-aerated conditions in glucose-mineral medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 96(5): 1291-1300.
31. **Fernández, D.; Rodríguez, E.; Bassas, M.; Viñas, M.; Solanas, A. M.; Llorens, J.; Marqués, A. M.; Manresa, A.** 2005. Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the new strain *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 40045: Effect of culture conditions. *Biochemical Engineering Journal*. 26(2–3): 159-167.
32. **Fidler, S., Dennis, D.** 1992. Polyhydroxyalkanoate production in recombinant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Reviews*. 9(2-4): 231-235.
33. **Gao, H.-J., Wu, Q., Chen, G.-Q.** 2002. Enhanced production of d(-)-3-hydroxybutyric acid by recombinant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*. 213(1): 59-65.
34. **García, A., Segura, D., Espín, G., Galindo, E., Castillo, T., Peña, C.** 2014. High production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by an *Azotobacter vinelandii* mutant altered in PHB regulation using a fed-batch fermentation process. *Biochemical Engineering Journal*. 82(0): 117-123.
35. **González, R., Tao, H., Shanmugam, K.T., York, S.W., Ingram, L.O.** 2002. Global Gene Expression Differences Associated with Changes in Glycolytic Flux and Growth Rate in *Escherichia coli* during the Fermentation of Glucose and Xylose. *Biotechnology Progress*. 18: 6-20.
36. **Haas, R., Jin, B., Zepf, F. T.** 2008. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from waste potato starch. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 72(1): 253-256.
37. **Han, M. J., Yoon, S. S., Lee, S. Y.** 2001. Proteome analysis of metabolically engineered *Escherichia coli* producing poly(3-hydroxybutyrate). *Journal of Bacteriology*. 183(1): 301-308.
38. **Hasona, A., Kim, Y., Healy, F. G., Ingram, L. O., Shanmugam, K. T.** 2004. Pyruvate formate lyase and acetate kinase are essential for anaerobic growth of *Escherichia coli* on xylose. *Journal of Bacteriology*. 186(22): 7593-7600.
39. **Holms, H.** 1996. Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *FEMS microbiology reviews*. 19(2): 85-116.

40. **Hong, S. H., Park, S. J., Moon, S. Y., Park, J. P., Lee, S. Y.** 2003. In silico prediction and validation of the importance of the Entner–Doudoroff pathway in poly(3-hydroxybutyrate) production by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 83(7): 854-863.
41. **Hölscher, T., Breuer, U., Adrian, Lorenz., Harms, H., Maskow, T.** 2010. Production of the Chiral Compound (*R*)-3-Hydroxybutyrate by a Genetically Engineered Methylophilic Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. 76 (16): 5585-5591.
42. **Hua, Q., Yang, C., Baba, T., Mori, H., Shimizu, K.** 2003. Responses of the central metabolism in *Escherichia coli* to phosphoglucose isomerase and glucose-6-phosphate dehydrogenase knockouts. *Journal of Bacteriology*. 185(24): 7053-7067.
43. **Huang, T.-Y., Duan, K.-J., Huang, S.-Y., Chen, C. W.** 2006. Production of polyhydroxyalkanoates from inexpensive extruded rice bran and starch by *Haloferax mediterranei*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 33(8): 701-706.
44. **Jensen, K. F.** 1993. The *Escherichia coli* K-12 "Wild Types" W3110 and MG1655 Have an *rph* Frameshift Mutation That Leads to Pyrimidine Starvation Due to Low *pyrE* Expression Levels. *Journal of Bacteriology*. 175 (11): p 3401-3407.
45. **Jian, J., Zhang, S.-Q., Shi, Z.-Y., Wang, W., Chen, G.-Q., & Wu, Q.** 2010. Production of polyhydroxyalkanoates by *Escherichia coli* mutants with defected mixed acid fermentation pathways. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87(6): 2247-2256.
46. **Jiang, Y., Chen, Y., Zheng, X.** 2009. Efficient polyhydroxyalkanoates production from a waste-activated sludge alkaline fermentation liquid by activated sludge submitted to the aerobic feeding and discharge process. *Environmental Science & Technology*. 43(20): 7734-7741.
47. **Jones, J.A., Toparlak, Ö.D., Koffas, M.A.** 2015. Metabolic pathway balancing and its role in the production of biofuels and chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*. 33: 52-59.
48. **Joung, S.-M., Kurumbang, N., Sang, B.-I., Oh, M.-K.** 2011. Effects of carbon source and metabolic engineering on butyrate production in *Escherichia coli*. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 28(7): 1587-1592.
49. **Kawata, Y., Kawasaki, K., Shigeri, Y.** 2012, Efficient secreted production of (*R*)-3-hydroxybutyric acid from living *Halomonas sp.* KM-1 under successive aerobic and microaerobic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 96: 913-920.
50. **Keshavarz, T., Roy, I.** 2010. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*. 13(3): 321-326.
51. **Kessler, B., Witholt, B.** 2001. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *Journal of Biotechnology*. 86(2): 97-104.
52. **Khanna, S., Srivastava, A. K.** 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*. 40(2): 607-619.
53. **Kim, B. S., Lee, S. C., Lee, S. Y., Chang, H. N., Chang, Y. K., Woo, S. I.** 1994. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. *Biotechnology and Bioengineering*. 43(9): 892-898.
54. **Kim, S., Kim, P., Lee, H., & Kim, J.** 1996. High production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) from *Methylobacterium organophilum* under potassium limitation. *Biotechnology Letters*. 18(1): 25-30.
55. **Kole, M.M., Draper, I., Gerson, D.F.** 1988. Protease production by *Bacillus subtilis* in oxygen-controlled, glucose fed-batch fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 28: 404-408.
56. **Lee, H. C., Kim, J. S., Jang, W., Kim, S. Y.** 2010. High NADPH/NADP⁺ ratio improves thymidine production by a metabolically engineered *Escherichia coli* strain. *Journal of Biotechnology*. 149(1–2): 24-32.
57. **Lee, J.W., Kim, H.U., Choi, S., Yi J., Lee, S.Y.** 2011a. Microbial production of building block chemicals and polymers. *Current Opinion in Biotechnology*. 22: 758-767.
58. **Lee, J.W., Kim, T.Y., Jang, Y.S., Choi, S., Lee, S.Y.** 2011b. Systems metabolic engineering for chemicals and materials. *Trends in Biotechnology*. 29 (8):
59. **Lee S.Y.** 1995. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*. 49: 1-14

60. **Lee S.Y., Choi J., Wong H.H.** 1999a. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 25: 31-36.
61. **Lee, S. Y., Lee, Y., Wang, F.** 1999b. Chiral compounds from bacterial polyesters: Sugars to plastics to fine chemicals. *Biotechnology and Bioengineering*. 65(3): 363-368.
62. **Lee, S. Y., Wang, F., Lee, Y.** 1999c. A method for producing hydroxycarboxylic acids by auto-degradation of polyhydroxyalkanoates. (Google Patents).
63. **Lee, S. Y., Lee, Y.** 2003. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of enantiomerically pure (R)-(-)-hydroxycarboxylic acids. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(6): 3421-3426.
64. **Lee, W.-H., Kim, M.-D., Jin, Y.-S, Seo, J.-H.** 2013. Engineering of NADPH regenerators in *Escherichia coli* for enhanced biotransformation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97(7): 2761-2772.
65. **Li, J., Derewenda, U., Dauter, Z., Smith S., Derewenda, Z.S.** 2000. Crystal structure of the *Escherichia coli* thioesterase II, a homolog of the human Nef binding enzyme. *Nature Structural Biology*. 7 (7): 555-559.
66. **Li, R., Zhang, H., Qi, Q.** 2007. The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*. 98(12): 2313-2320.
67. **Lim, S.-J., Jung, Y.-M., Shin, H.-D., Lee, Y.-H.** 2002. Amplification of the NADPH-related genes *zwf* and *gnd* for the oddball biosynthesis of PHB in an *E. coli* transformant harboring a cloned *phbCAB* operon. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 93(6): 543-549.
68. **Liu, Q., Ouyang, S.-P., Chung, A., Wu, Q., Chen, G.-Q.** 2007. Microbial production of R-3-hydroxybutyric acid by recombinant *E. coli* harboring genes of *phbA*, *phbB*, and *tesB*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 76(4): 811-818.
69. **Manchak, J., Page, W.** 1994. Control of polyhydroxyalkanoate synthesis in *Azotobacter vinelandii* strain UWD. *Microbiology*. 140: 953-963.
70. **Madison, L. L., Huisman, G. W.** 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63(1): 21-53.
71. **Marangoni, C., Furigo Jr, A., de Aragão, G. M. F.** 2002. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding. *Process Biochemistry*. 38(2): 137-141.
72. **Marchal, S., Branlant, G.** 2002. Characterization of the amino acids involved in substrate specificity of nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Journal of Biological Chemistry*. 277(42): 39235-39242.
73. **Martínez, A., Grabar, T.B., Shanmugam, K.T., Yomano, L.P., York, S.W., Ingram, L.O.** (2007) Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. *Biotechnology Letters*. 29:397-404
74. **Martínez, I., Zhu, J., Lin, H., Bennett, G. N., San, K.-Y.** 2008. Replacing *Escherichia coli* NAD-dependent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) with a NADP-dependent enzyme from *Clostridium acetobutylicum* facilitates NADPH dependent pathways. *Metabolic Engineering*. 10(6): 352-359.
75. **Matsumoto, K., Okei, T., Honma, I., Ooi, T., Aoki, H., Taguchi, S.** 2013. Efficient (R)-3-hydroxybutyrate production using acetylCoA-regenerating pathway catalyzed by coenzyme A transferase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97:205-210.
76. **Mayer, C., Boos W.** 2005. Hexose/Pentose and Hexitol/ Pentitol Metabolism. *EcoSal Plus* 2013; doi:10.1128/ecosalplus.3.4.1.
77. **Munjal, N., Mattam, A.J., Pramanik, D., Srivastava, P.S., Yazdani, S.S.** 2012. Modulation of endogenous pathways enhances bioethanol yield and productivity in *Escherichia coli*. *Microbial Cells Factories*. 11:145.
78. **Muñoz-Gutiérrez, I.; Oropeza, R.; Gosset, G.; Martinez, A.** 2012. Cell surface display of a β -glucosidase employing the type V secretion system on ethanologenic *Escherichia coli* for the fermentation of cellobiose to ethanol. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 39:1141-1152.
79. **Naggert, J., Narasimhan, M.L., DeVeaux, L., Cho, H., Randhawa, Z.I, Cronan, J.E., Green, B.N., Smith. S.** 1991. Cloning, Sequencing, and Characterization of *Escherichia coli* Thioesterase II. *The Journal of Biological Chemistry*. 266 (17): 11044-11050.

80. **Nduko, J., Matsumoto, K. i., Ooi, T., Taguchi, S.** 2014. Enhanced production of poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate) from xylose in engineered *Escherichia coli* overexpressing a galactitol transporter. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98(6): 2453-2460.
81. **Nie, L., Ren, Y., Janakiraman, A., Smith, S., Schulz, H.** 2008. A Novel Paradigm of Fatty Acid β -Oxidation Exemplified by the Thioesterase-Dependent Partial Degradation of Conjugated Linoleic Acid That Fully Supports Growth of *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 47: 9618–9626
82. **Nikel, P. I., de Almeida, A., Melillo, E. C., Galvagno, M. A., Pettinari, M. J.** 2006. New recombinant *Escherichia coli* strain tailored for the production of poly (3-hydroxybutyrate) from agroindustrial by-products. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(6): 3949-3954.
83. **Nikel, P. I., Pettinari, M. J., Méndez, B. S., Galvagno, M. A.** 2005. Optimización estadística de un medio para producción de biomasa y poli (3-hidroxibutirato) por una cepa recombinante de *Escherichia coli* utilizando subproductos agroindustriales. *International Microbiology*. 8(4): 243-250.
84. **Oeding, V., Schlegel, H. G.** 1973. Beta-Ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly-beta-hydroxybutyrate metabolism. *The Biochemical Journal*. 134: 239-248.
85. **Ow, D. Nissom, P., Philp, R., Oh, S.K., Yap, M.** 2006. Global transcriptional analysis of metabolic burden due to plasmid maintenance in *Escherichia coli* DH5 α during batch fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 391–398.
86. **Palmeros, B., Wild, J., Szybalski, W., Le Borgne, S., Hernandez-Chavez, G., Gosset, G., Valle, F., Bolivar, F.** 2000. A family of removable cassettes designed to obtain antibiotic-resistance-free genomic modifications of *Escherichia coli* and other bacteria. *Gene*. 247: 255–264.
87. **Peralta-Gil, M., Segura, D., Guzmán, J., Servín-González, L., Espín, G.** 2002. Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic phbBAC operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. *Journal of Bacteriology*. 184(20): 5672-5677.
88. **Pettinari, M. J., Vázquez, G. J., Silberschmidt, D., Rehm, B., Steinbüchel, A., & Méndez, B. S.** 2001. Poly (3-hydroxybutyrate) synthesis genes in *Azotobacter sp.* strain FA8. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(11): 5331-5334.
89. **Preusting, H., van Houten, R., Hoefs, A., van Langenberghe, E. K., Favre-Bulle, O., Witholt, B.** 1993. High cell density cultivation of *Pseudomonas oleovorans*: Growth and production of poly(3-hydroxyalkanoates) in two-liquid phase batch and fed-batch systems. *Biotechnology and bioengineering*. 41(5): 550-556.
90. **Price, N.D., Papin, J.A., Schilling, C.H., Palsson, B.O.** 2003. Genome-scale microbial in silico models: the constraints-based approach. *TRENDS in Biotechnology*. 21 (4): 162-169.
91. **Prieto, M. A., Kellerhals, M. B., Bozzato, G. B., Radnovic, D., Witholt, B., Kessler, B.** 1999. Engineering of stable recombinant bacteria for production of chiral medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoates. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(8): 3265-3271.
92. **Reddy, C., Ghai, R., Kalia, V. C.** 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource technology*. 87(2): 137-146.
93. **Ren, Q., Ruth, K., Thöny-Meyer, L., Zinn, M.** 2010. Enantiomerically pure hydroxycarboxylic acids: current approaches and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87(1): 41-52.
94. **Ricci, J.C., Hernández, M.E.** 2000. Plasmid Effects on *Escherichia coli* Metabolism. *Critical Reviews in Biotechnology*, 20(2):79-108.
95. **Ryu, H. W., Hahn, S. K., Chang, Y. K., Chang, H. N.** 1997. Production of poly (3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation. *Biotechnology and Bioengineering*. 55(1): 28-32.
96. **Sánchez, A.M., Andrews, J., Hussein, I., Bennett, G.N., San, K-Y.** 2006. Effect of Overexpression of a Soluble Pyridine Nucleotide Transhydrogenase (UdhA) on the Production of Poly(3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*. 22 (2): 420-425.
97. **Saha, B. C.** 2003. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 30(5): 279-291.

98. **Sambrook, J. Russell, D.W.** 2001. Molecular cloning—a laboratory manual. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).
99. **Sawers, R.G., Clark, D.P.** 2004. Fermentative Pyruvate and Acetyl-Coenzyme A Metabolism. *EcoSal Plus* 2013. doi:10.1128/ecosalplus.3.5.3.
100. **Sharma, R.C., Schimke, R.T.** 1996. Preparation of electrocompetent *E. coli* using salt-free growth medium. *BioTechniques* 20: 42-44.
101. **Shiraki, M., Endo, T., Saito, T.** 2006. Fermentative Production of (R)-(-)-3-Hydroxybutyrate Using 3-Hydroxybutyrate Dehydrogenase Null Mutant of *Ralstonia eutropha* and Recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 102 (6): 529-534.
102. **Simeonidis, E., Price, N.** 2015. Genome-scale modeling for metabolic engineering. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 42: 327-338.
103. **Solaiman, D. K., Ashby, R. D., Foglia, T. A., Marmer, W. N.** 2006. Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly (hydroxyalkanoates). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71(6): 783-789.
104. **Steinbüchel, A., Lütke-Eversloh, T.** 2003. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal* 16: 81-96
105. **Stephanopoulos, G., Aristidou, A. A., & Nielsen, J.** 1998. *Metabolic engineering: principles and methodologies*: Academic press.
106. **Sudesh, K., Abe, H., Doi, Y.** 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in polymer science*. 25(10): 1503-1555.
107. **Sumiya, M., Davis, E. O., Packman, L. C., McDonald, T. P., & Henderson, P.** 1995. Molecular genetics of a receptor protein for D-xylose, encoded by the gene *xylF*, in *Escherichia coli*. *Receptors & channels*. 3(2): 117-128.
108. **Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M., & Shah, S.** 2007. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants—a review. *Biotechnology advances*. 25(2): 148-175.
109. **Tokiwa, Y., & Ugwu, C. U.** 2007. Biotechnological production of (R)-3-hydroxybutyric acid monomer. *Journal of biotechnology*. 132(3): 264-272.
110. **Tseng, H.-C., Martin, C. H., Nielsen, D. R., Prather, K. L. J.** 2009. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for enhanced production of (R)- and (S)-3-hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(10): 3137-3145.
111. **Utrilla, J., Licona-Cassani, C., Marcellin, E., Gosset, G., Nielsen, L. K., Martinez, A.** 2012. Engineering and adaptive evolution of *Escherichia coli* for d-lactate fermentation reveals GatC as a xylose transporter. *Metabolic engineering*. 14(5): 469-476.
112. **Vinuselvi, P., Lee, S. K.** 2012. Engineered *Escherichia coli* capable of co-utilization of cellobiose and xylose. *Enzyme and microbial technology*. 50(1): 1-4.
113. **Wang, F., Lee, S. Y.** 1997a. Poly (3-hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer content by a fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(9): 3703-3706.
114. **Wang, F., Lee, S. Y.** 1997b. Production of poly (3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of filamentation-suppressed recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(12): 4765-4769.
115. **Wang, Y., Liu, S.** 2014. Production of (R)-3-hydroxybutyric acid by *Burkholderia cepacia* from wood extract hydrolysates. *AMB Express*. 4(1): 28.
116. **Wegen, R. J., Ling, Y., Middelberg, A. P. J.** 1998. Industrial production of polyhydroxyalkanoates using *Escherichia coli*: an economic analysis. *Chemical Engineering Research and Design*. 76(3): 417-426.
117. **Xia, T., Eiteman, M. A., Altman, E.** 2012. Simultaneous utilization of glucose, xylose and arabinose in the presence of acetate by a consortium of *Escherichia coli* strains. *Microbial Cell Factories*. 11(77): 1475-2859.
118. **Yadav, V.G., De Mey, M., Lim, C.G., Ajikumar, P.K., Stephanopoulos, G.** 2012. The future of metabolic engineering and synthetic biology: Towards a systematic practice. *Metabolic Engineering*. 14: 233-241.
119. **Yang, Y.-T., Bennett, G. N., San, K.-Y.** 1998. Genetic and metabolic engineering. *Electronic Journal of Biotechnology*. 1(3): 20-21.

120. **Yegneswaran, P.K., Gray, M.R., Thompson, B.G.** 1991. Effect of Dissolved Oxygen Control on Growth and Antibiotic Production in *Streptomyces clavuligerus* Fermentations. *Biotechnology Progress*. 7: 246-250.
121. **York, G. M., Stubbe, J., Sinskey, A. J.** 2002. The *Ralstonia eutropha* PhaR protein couples synthesis of the PhaP phasin to the presence of polyhydroxybutyrate in cells and promotes polyhydroxybutyrate production. *Journal of Bacteriology*. 184(1): 59-66.
122. **Yu, J., Stahl, H.** 2008. Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. *Bioresource technology*. 99(17): 8042-8048.
123. **Yuan, L., Voelker, T.A., Hawkins, D.J.** 1995. Modification of the substrate specificity of an acyl-acyl carrier protein thioesterase by protein engineering. *PNAS*. 92: 10639-10643.
124. **Zhang, C., Yang, H., Yang, F., Ma, Y.** 2009a. Current progress on butyric acid production by fermentation. *Current microbiology*. 59(6): 656-663.
125. **Zhang, X., Luo, R., Wang, Z., Deng, Y., Chen, G. Q.** 2009b. Application of (*R*)-3-hydroxyalkanoate methyl esters derived from microbial polyhydroxyalkanoates as novel biofuels. *Biomacromolecules*. 10(4): 707-711.
126. **Zhao, K., Tina, G., Zheng, Z., Chen, J-C., Chen, G-Q.** 2003. Production of D-(3)-3-hydroxyalkanoic acid by recombinant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 218: 59-64.
127. **Zhuang, Z., Song, F., Zhao, H., Li, Ling., Cao, J., Eisenstein, E., Herzberg, O., Dunaway-Mariano, D.** 2008. Divergence of Function in the Hot Dog Fold Enzyme Superfamily: The Bacterial Thioesterase YciA. *Biochemistry*. 47: 2789–2796
128. **Zou, X.-H.; Li, H.-M.; Wang, S.; Leski, M.; Yao, Y.-C.; Yang, X.-D.; Huang, Q.-J.; Chen, G.-Q.** 2009. The effect of 3-hydroxybutyrate methyl ester on learning and memory in mice. *Biomaterials*. 30(8): 1532-1541.