



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Ingeniería metabólica de *Escherichia coli* para la producción de (R)-3-hidroxi-butirato utilizando glicerol como fuente de carbono

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
FIDEL OSWALDO RAMÍREZ AMADOR

DR. ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ
[Instituto de Biotecnología - UNAM](#)

DR. VÍCTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLÁN
[Instituto de Biotecnología - UNAM](#)

DR. DANIEL GENARO SEGURA GONZÁLEZ
[Instituto de Biotecnología - UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos. Septiembre, 2020.



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.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORIAL

Dr. Alfredo Martínez Jiménez	Instituto de Biotecnología-UNAM
Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán	Instituto de Biotecnología-UNAM
Dr. Daniel Genaro Segura González	Instituto de Biotecnología-UNAM

MIEMBROS DEL JURADO

Presidente:

Dra. Eida Guadalupe Espín Ocampo	Instituto de Biotecnología-UNAM
----------------------------------	---------------------------------

Secretario:

Dr. Carlos Felipe Peña Malacara	Instituto de Biotecnología-UNAM
---------------------------------	---------------------------------

Vocal:

Dr. Leobardo Serrano Carreón	Instituto de Biotecnología-UNAM
------------------------------	---------------------------------

Vocal:

Dra. María Teresa Ponce Noyola	CINVESTAV-Zacatenco
--------------------------------	---------------------

Vocal:

Dr. José Utrilla Carreri	CCG-UNAM
--------------------------	----------

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

Para su realización se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y de la Universidad Nacional Autónoma de México, a través de los proyectos PAPIIT-DGAPA-UNAM: IT201414 y IV100119.

Para este proyecto se contó con el apoyo de CONACyT a través de la beca de maestría con número de registro 887023.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alfredo Martínez Jiménez por su asesoría a lo largo de todo este proyecto, por permitirme la oportunidad de ser parte del Laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas en el que pude gozar de grandes aprendizajes. Por todos sus consejos dentro y fuera del área y principalmente por su enorme apoyo siempre. Le guardaré siempre una gran admiración como investigador y ser humano.

Al Dr. Víctor Bustamante y Dr. Daniel Segura, mi comité tutorial, por su guía e importantes observaciones que siempre nos ayudaron a enriquecer este proyecto.

A los investigadores del laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas. Al Dr. Guillermo Gosset Lagarda, Dr. Adelfo Escalante Lozada y especialmente al Dr. Luis Caspeta Guadarrama, por sus observaciones puntuales y sus consejos que fueron de gran utilidad durante el desarrollo de este proyecto.

Al personal académico del laboratorio, por su apoyo técnico y metodológico. A la M. en C. Georgina Hernández Chávez, por su paciencia y perseverancia hacia mí, por su colaboración incansable en los métodos de cuantificación por HPLC y sobre todo por regalarme su amistad. A la Q. I. Luz María Martínez Mejía y Dra. Noemí Flores Mejía, quienes amablemente me ayudaron con su experiencia para los experimentos de biología molecular.

Al personal de la Planta Piloto del Instituto de Biotecnología. En particular al M. en C. José Raunel Tinoco, por su apoyo técnico y sus invaluable esfuerzos en la búsqueda de una solución para los métodos de cuantificación por HPLC, un gran problema que con su experiencia logramos resolver pronto.

Al personal de apoyo. A la Sra. Aurelia González Guzmán y Biól. Manuel Saucedo; por el soporte que nos brindan todos los días, sin el cual no podríamos llevar a cabo nuestro trabajo de forma eficiente. Por regalarme además una buena charla cada vez que fue posible.

Al personal de la Unidad de Docencia los Lic. Antonio Guillén, Gloria Villa Herrera e Ing. Jalil Saab, por su amable atención en todos los procesos administrativos, solicitud de apoyos y constancias.

Agradezco el apoyo otorgado por el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) de la UNAM para la asistencia al XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, con sede en León, Gto., entre los días 23 – 28 de junio de 2019.

A todos mis amigos del laboratorio de IVM, quienes fueron clave para sobrellevar los días de trabajo arduo. Por sus consejos en el aspecto académico y fuera de él, su compañía en tantos momentos y lugares, los jueves deportivos, reuniones de fin de año, etc.

DEDICATORIAS

A mi familia. A mis padres Laurita y Fidel, quienes conforman el gran motor que me ha permitido tanto. Por su apoyo incondicional, su compañía aún desde muy lejos y el amor del que siempre me han colmado. A mi hermana Eréndira que no importa dónde o cómo me encuentre siempre está tan cerca. Y a Celita que llegó a darle un toque tan especial a nuestras vidas.

A Katy. Por el nuevo rumbo que le has dado a mi vida y lo que significas en ella, tu sinceridad, tu motivación diaria y el cariño que siempre me regalas a manos llenas. Por atreverte a viajar conmigo de la mano. Por la gran lista de viajes que están por comenzar.

“El regalo más bello de la Naturaleza es la alegría de contemplar y conocer.”

Albert Einstein

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	3
DEDICATORIAS	4
ÍNDICE GENERAL	5
ÍNDICE DE TABLAS	8
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	9
RESUMEN	11
I. INTRODUCCIÓN	13
II. ANTECEDENTES	16
2.1 (R)-3-hidroxiacetato	16
2.1.1 Generalidades y aplicaciones	16
2.1.2 Producción de (R)-3HB por métodos químicos y enzimáticos	18
2.1.3 Producción de (R)-3HB por ingeniería de vías metabólicas en <i>E. coli</i>	19
2.1.4 Disponibilidad del cofactor NADPH y acetil-CoA.....	21
2.2 Glicerol.....	24
2.2.1 Usos del glicerol y su metabolismo en <i>E. coli</i>	24
2.2.2 Biosíntesis de PHB a partir de glicerol.....	27
III. JUSTIFICACIÓN	28
IV. HIPÓTESIS	29
V. OBJETIVO	29
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	31
6.1 Inactivación cromosomal de genes en <i>E. coli</i> MG1655 (DE3)	31
6.2 Diseño, construcción y transformación con los vectores de expresión	33
6.3 Caracterización cinética de cepas en matraz.....	35
6.4 Evaluación de las cepas en fermentador bajo condiciones limitantes de O ₂	35
6.5 Métodos de cuantificación de crecimiento celular, glicerol, (R)-3HB y otros metabolitos.....	36
6.6 Análisis cualitativo de proteínas mediante SDS-PAGE.....	37
6.7 Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k _L a)	38
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
7.1 Eliminación del gen <i>pta</i> del cromosoma de <i>E. coli</i>	39
7.2 Caracterización de cepas Δ <i>pta</i> con glucosa y glicerol en matraz	40
7.3 Caracterización del consumo de glicerol en <i>E. coli</i> con el vector pACYCDuet-Gly bajo condiciones limitantes de oxígeno.....	45
7.3.1 Evaluación de la vía sintética de consumo de glicerol con la cepa MG1655 (DE3)/pACYCDuet-Gly	46
7.4 Producción de (R)-3HB con glicerol bajo condiciones limitantes de oxígeno utilizando <i>E. coli</i> /pTrc-R3HB	51

7.4.1 Evaluación cinética de la producción de R3HB con la cepa <i>E. coli</i> MG1655 (DE3)	55
7.4.2 La cepa FR01 (Δ pta) produce R3HB y formiato simultáneamente	55
7.4.3 La eliminación de pflB permite dirigir más carbono a (R)-3HB y otros productos de fermentación	57
7.4.4 La doble eliminación de pta y pflB prioriza la producción de (R)-3HB	58
7.4.5 Producción de (R)-3HB en una cepa sin vías fermentativas.....	59
7.4.6 La producción de (R)-3HB a partir de glicerol es comparable con otros estudios	61
7.4.7 Todas las mutantes distribuyen más carbono hacia (R)-3HB durante la fase de producción	62
7.4.8 Las mutantes evaluadas son más eficientes para la producción de (R)-3HB comparando con la silvestre MG1655 (DE3).....	63
7.5 Producción de (R)-3HB acoplando una ruta alterna de consumo de glicerol.....	66
7.5.1 Evaluación de las vías sintéticas de consumo de glicerol y producción de (R)-3HB en dos vectores independientes.....	66
7.5.2 Evaluación de la vía sintética de consumo de glicerol y producción de (R)-3HB en cepas transformadas con el vector pACYCDuet-Gly-R3HB	68
7.5.3 La participación de AlrD-AldH parece no tener efectos en la producción de (R)-3HB.....	72
7.5.4 La cepa FR01/pACYCDuet-Gly-R3HB produce bajos títulos de (R)-3HB.....	72
7.5.5 La tasa de consumo de glicerol no aumenta con el sistema AlrD-AldH.....	73
7.5.6 Las proteínas AlrD y AldH no son visibles por SDS-PAGE.....	73
7.5.7 La temperatura tiene un rol importante durante la producción de (R)-3HB con el vector pACYCDuet-Gly-R3HB	77
7.5.8 Disminuir la temperatura del cultivo implica el ajuste de otros parámetros.....	78
7.5.9 La producción de (R)-3HB se ve favorecida a menor temperatura	79
7.5.10 La eliminación de pta afecta la producción de (R)-3HB a 30°C	80
7.5.11 Variación en los balances de carbono cuando se combina el sistema AlrD-AldH con el de producción de (R)-3HB	82
7.5.12 Efectos en el rendimiento al implementar estrategias para mejorar la producción de (R)-3HB cuando se combinan el sistema AlrD-AldH y el de producción.....	84
VIII. CONCLUSIONES	87
IX. PERSPECTIVAS.....	88
X. REFERENCIAS.....	89
XI. ANEXOS	92
11.1 Mapa y características del vector pCP20.....	92
11.2 Secuencia nucleotídica del vector pACYCDuet-Gly (sistema AlrD-AldH)	93
11.3 Estequiometría y cálculo del potencial de vías metabólicas.	94
11.4 Características del método de HPLC.....	96
11.5 Efecto de la temperatura en coeficientes de transferencia de oxígeno (k_{La}) y velocidad específica de consumo de oxígeno (q_{O_2})	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Ruta de síntesis de (R)-3HB.....	21
Fig. 2. Rutas de síntesis de ácido acético en <i>E. coli</i>	23
Fig. 3. Metabolismo aerobio del glicerol en <i>E. coli</i>	26
Fig. 4. Metabolismo de glicerol en <i>E. coli</i> y vías heterólogas de consumo de glicerol y síntesis de (R)-3HB.....	30
Fig. 5. Confirmación de la sustitución del gen pta por casete de resistencia a kanamicina en <i>E. coli</i> MG1655 (DE3).....	40
Fig. 6. Caracterización del crecimiento, consumo de glucosa, glicerol y producción de metabolitos con las cepas MG1655 (DE3) y FR01 en matraz.....	41
Fig. 7. Vector pACYCDuet-Gly y patrones de digestión del plásmido purificado.....	45
Fig. 8. Evaluación de la cepa silvestre MG1655 (DE3) (WT) y la mutante Δ pta (FR01) transformadas con el vector pACYCDuet-Gly en fermentadores de 1 L bajo condiciones limitantes de oxígeno.....	47
Fig. 9. Vector pTrc-R3HB y patrones de digestión de plásmido purificado de las cepas <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) y FR01.....	51
Fig. 10. Evaluación de la cepa silvestre MG1655 (DE3) y Δ pta (FR01) transformadas con el vector pTrc-R3HB en fermentadores bajo condiciones limitantes de oxígeno.....	52
Fig. 11. Confirmación de la sustitución del gen pflB por un casete de resistencia kanamicina en <i>E. coli</i> MG1655 (DE3).....	57
Fig. 12. Distribución de los moles de carbono provenientes del glicerol durante la fase de producción en cepas transformadas con el vector pTrc-R3HB.....	63
Fig. 13. Velocidad volumétrica de producción de (R)-3HB (barras rojas) y eficiencia estequiométrica (cuadros negros, línea punteada) para las cepas evaluadas con el vector pTrc-R3HB.....	65
Fig. 14. Evaluación de la cepa silvestre MG1655 (DE3) y Δ pta (FR01) transformadas con los vectores pTrc-R3HB y pACYCDuet-Gly en fermentadores bajo condiciones limitantes de oxígeno.....	67
Fig. 15. Vector pACYCDuet-Gly-R3HB y patrones de digestión del vector purificado de <i>E. coli</i> DH5 α	69
Fig. 16. Evaluación de la cepa silvestre MG1655 (DE3) y Δ pta (FR01) transformadas con el vector pACYCDuet-Gly-R3HB en fermentadores bajo condiciones limitantes de oxígeno.....	70
Fig. 17. SDS-PAGE al 12% con proteína soluble de la cepa FR01 transformada con diferentes vectores.....	75
Fig. 18. Cuantificación de metabolitos mediante HPLC producidos por la cepa FR01 (Δ pta) transformada con diferentes vectores a diferentes temperaturas y concentraciones de IPTG (ver Tabla 9).....	75
Fig. 19. Evaluación de la cepa silvestre MG1655 (DE3) y Δ pta (FR01) transformadas con el vector pACYCDuet-Gly-R3HB en fermentadores a 0.5 vvm y 650 rpm con una temperatura de 30°C.....	81
Fig. 20. Distribución de los moles de carbono provenientes del glicerol durante la fase de producción con las cepas silvestre (Wt) y FR01 transformadas con el vector pACYCDuet-Gly-R3HB, con el sistema en dos vectores compuesto por pACYCDuet-Gly y pTrc-R3HB y con pACYCDuet-Gly-R3HB a menor temperatura 30°C y 650 rpm.....	82
Fig. 21. Velocidad volumétrica de producción de (R)-3HB con la cepa silvestre y FR01.....	86
Fig. 22. Comparación entre cromatogramas obtenidos con diferentes métodos.....	96
Fig. 23. Efecto de la velocidad de agitación (RPM) sobre el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{La}) manteniendo constante el flujo de aireación (0.5 vvm) a 30°C.....	97
Fig. 24. Diferencia entre los valores de k_{La} y q_{O_2} a 30°C con respecto a 37°C.....	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades físicas del Poli-3-hidroxi-butarato (PHB) y el Polipropileno (PP).....	18
Tabla 2. Cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados.	31
Tabla 3. Composición del medio mineral AM1.	36
Tabla 4. Parámetros cinéticos, estequiométricos y perfil de metabolitos obtenidos con las cepas MG1655 (DE3) y FR01 en matraz con glucosa o glicerol como fuente de carbono.	41
Tabla 5. Parámetros cinéticos y estequiométricos para las cepas MG1655 (DE3) y FR01 transformadas con el vector pACYCDuet-Gly.....	48
Tabla 6. Parámetros cinéticos, estequiométricos y perfil de metabolitos para las cepas MG1655 (DE3), Δpta (FR01), $\Delta pflB$ (FR02), $\Delta pta\Delta pflB$ (FR03) y AV14 transformadas con el vector pTrc-R3HB.....	54
Tabla 7. Eficiencias de las cepas transformadas con pTrc-R3HB con respecto al máximo teórico de la vía metabólica (Y^P).	64
Tabla 8. Parámetros cinéticos, estequiométricos y perfil de metabolitos para las cepas MG1655 (DE3) y Δpta (FR01) transformadas con el vector pACYCDuet-Gly-R3HB y con un sistema de dos vectores con pTrc-R3HB y pACYCDuet-Gly.	71
Tabla 9. Evaluación de la temperatura y efecto del IPTG en cultivos FR01 (Δpta) transformada con diferentes vectores.	74
Tabla 10. Eficiencias las cepas evaluadas con respecto al máximo teórico posible la estequiometría de la vía metabólica (Y^P) utilizando el vector pACYCDuet-Gly-R3HB y el sistema compuesto por los dos vectores pTrc-R3HB y pACYCDuet-Gly.	85

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

(R)-3HB	(R)-3-hidroxibutirato
(R)-3HB-CoA	(R)-3-hidroxibutiril-Coenzima A
1,3-BDO	1,3-Butanodiol
AAc-CoA	Acetoacetil-Coenzima A
Ac-CoA	Acetil-Coenzima A
<i>aceA</i>	Gen que codifica para la isocitrato liasa
AceA	Isocitrato liasa
<i>acs</i>	Gen que codifica para la acetil-CoA sintasa
Acs	Acetil-CoA sintasa
<i>actP</i>	Gen que codifica para el transportador de acetato ActP
ActP	Transportador de acetato tipo simporte
<i>aldH</i>	Gen que codifica para la enzima aldehído deshidrogenasa de <i>R. eutropha</i>
AldH	Aldehído deshidrogenasa de <i>R. eutropha</i>
<i>alrD</i>	Gen que codifica para la enzima aldehído reductasa de <i>R. eutropha</i>
AlrD	Aldehído reductasa de <i>R. eutropha</i>
cAMP	AMP-cíclico
CDW	Peso seco celular (en inglés: Cellular Dry Weight)
C_{LA}	Concentración de oxígeno en el seno del líquido (mmol O ₂ /L)
C_{LA}^*	Concentración de oxígeno en el seno del líquido en condiciones de saturación (mmolO ₂ /L)
CRP	Proteína receptora de cAMP
FRT	Sitio de reconocimiento para flipasa (en inglés: Flippase Recognition Target)
<i>gapA</i>	Gen que codifica para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de <i>E. coli</i>
GapA	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de <i>E. coli</i> (dependiente de NAD ⁺)
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<i>gapN</i>	Gen que codifica para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de <i>S. mutans</i>
GapN	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de <i>S. mutans</i> (dependiente de NADP ⁺)
Gnd	6-fosfogluconato deshidrogenasa
GPa	Gigapascales (1x10 ⁹ Pascales)
HA's	Ácidos (R)-hidroxialcanoicos
HAc	Ácido acético
HFor	Ácido fórmico
<i>idhA</i>	Gen que codifica para la isocitrato deshidrogenasa
IdhA	Isocitrato deshidrogenasa

IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
k_{La}	Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (h^{-1})
MPa	Megapascuales (1×10^6 Pascales)
NAD(H)	Nicotinamida adenina dinucleótido (reducida)
NADP(H)	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducida)
OTR	Velocidad de transferencia de oxígeno (en inglés: Oxygen Transfer Rate, $mmolO_2/Lh$)
OUR	Velocidad de consumo de oxígeno (en inglés: Oxygen Uptake Rate, $mmol O_2/Lh$)
PDH	Complejo de la piruvato deshidrogenasa
PF	Ruta de las pentosas fosfato
PFL	Piruvato:formiato liasa
<i>pfIA</i>	Gen que codifica para el activador de la piruvato:formiato liasa
PfIA	Activador de la piruvato:formiato liasa
<i>pfIB</i>	Gen que codifica para la piruvato:formiato liasa
PHB	Poli-3-hidroxibutirato
PhbA	β -cetotiolasa
<i>phbA</i>	Gen que codifica para la enzima β -cetotiolasa
PhbB	Acetoacetyl-Coenzima A reductasa
<i>phbB</i>	Gen que codifica para la enzima Acetoacetyl-Coenzima A reductasa
PhbC	PHB sintasa
<i>phbC</i>	Gen que codifica para la enzima PHB sintasa
<i>poxB</i>	Gen que codifica para la piruvato oxidasa
PoxB	Piruvato oxidasa
PPAR γ	Factor de transcripción receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma
q_{O_2}	Velocidad específica de consumo de oxígeno ($mmol O_2/g_{CDWh}$)
Q_P	Velocidad volumétrica de generación del producto ($g_{producto}/Lh$)
Q_S	Velocidad volumétrica de consumo de sustrato (g/Lh)
RpoS	Regulón de respuesta a estrés nutricional de <i>E. coli</i>
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
TesB	Tioesterasa II
<i>tesB</i>	Gen que codifica para la enzima Tioesterasa II
vvm	Volumen de aire por volumen de medio de cultivo por minuto (L aire/L medio*min)
$Y_{P/S}$	Rendimiento de generación de producto respecto al sustrato ($g_{producto}/g_{sustrato}$)
$Y_{X/S}$	Rendimiento de concentración celular con respecto al sustrato ($g_{CDW}/g_{sustrato}$)
Zwf	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
μ	Velocidad específica de crecimiento celular ($1/h$)

RESUMEN

El (R)-3-hidroxi-butirato (R-3HB) es uno de los cuerpos cetónicos producidos por mamíferos bajo condiciones de inanición con la finalidad de generar energía a partir de su oxidación en Acetil-CoA. En algunos microorganismos se lleva a cabo un proceso con el mismo propósito, el cual consiste en la polimerización de varias moléculas de (R)-3HB para dar lugar al polihidroxi-butirato (PHB), un polímero que es también empleado como reservorio de energía. El PHB, desde hace décadas, se ha propuesto como sustituto de los plásticos convencionales gracias a sus propiedades termofísicas. Por otro lado, la producción del monómero de (R)-3HB ha ganado importancia gracias a sus diversas aplicaciones, principalmente en las áreas médica y farmacéutica.

En este trabajo, se propuso la producción de (R)-3HB a través de ingeniería de vías metabólicas en el microorganismo modelo *E. coli* usando glicerol como fuente de carbono. Para este propósito, se generaron mutantes a partir de la cepa de *E. coli* MG1655 (DE3), a las que les fueron interrumpidas rutas que llevan a la producción de acetato (*pta*, FR01) y formiato (*pflB*, FR02). Así como una doble mutante ($\Delta pta \Delta pflB$, FR03), con la finalidad de incrementar la disponibilidad de carbono para la generación de (R)-3HB. La producción de (R)-3HB se promovió utilizando el vector pTrc-R3HB, que contiene a los genes *phbA* y *phbB* de *A. vinelandii*, así como la sobreexpresión del gen *tesB* de *E. coli* (García-Benítez, 2016). Así mismo, para este trabajo se diseñó una vía alternativa que acopla el consumo de glicerol con mayor generación de NADH y NADPH, siendo este último indispensable para la producción de (R)-3HB. Esta ruta secundaria se compone por los genes *alrD* y *aldH* de *R. eutropha*, en el vector pACYCDuet-Gly (sistema AlrD-AldH). Se probaron las cepas con las vías sintéticas de producción y consumo de glicerol de manera independiente; de igual manera, ambas rutas se evaluaron en conjunto utilizando un sistema de dos vectores y, por último, en un vector que contenía ambas vías (pACYCDuet-Gly-R3HB).

Al cultivar las cepas transformadas con el vector pTrc-R3HB bajo condiciones limitantes de oxígeno en fermentadores de 1 L, el rendimiento producto-sustrato incrementó del 12 al 30%, con respecto al máximo teórico, cuando se comparó la cepa silvestre MG1655 (DE3) con las mutantes FR01 y FR02, respectivamente. Similarmente, la productividad volumétrica fue más de dos veces mayor en las mutantes. Al comparar las cepas transformadas con el vector pTrc-R3HB, la doble mutante FR03/pTrc-R3HB produjo (R)-3HB como compuesto mayoritario (28.4% C-mol), presentando una concentración considerablemente menor de otros ácidos orgánicos. Sin embargo, en términos de productividad, la cepa FR02/pTrc-R3HB mostró mejores valores.

Sin embargo, cuando las cepas MG1655 (DE3) y FR01 transformadas con el vector pACYCDuet-Gly-R3HB se evaluaron, no se obtuvo el incremento en la velocidad de consumo de glicerol ni en la producción de (R)-3HB. De tal manera que se evaluó: (1) un sistema de producción transformando a estas cepas con dos vectores (pTrc-R3HB y pACYCDuet-Gly) y (2) disminuir las condiciones de temperatura y agitación, con el fin de promover una mejor actividad en las proteínas heterólogas manteniendo la limitación de oxígeno disuelto. El sistema de dos vectores permitió incrementar un 5% el rendimiento producto-sustrato en las cepas MG1655 (DE3) y FR01. Por otro lado, al disminuir la temperatura y agitación del cultivo se logró dirigir más del 70% del carbono disponible, en la fase de producción, hacia metabolitos de fermentación, de los cuales alrededor del 10% se utilizaron para la síntesis de (R)-3HB. No obstante, gran parte del carbono restante se acumuló en forma de piruvato. Los resultados observados permiten sugerir que es necesario realizar un estudio detallado de transferencia de oxígeno, el cual permita encontrar las condiciones de cultivo más favorables para maximizar la producción de (R)-3HB.

I. INTRODUCCIÓN

El (*R*)-3-hidroxi-butirato (*R*-3HB) es una molécula quiral de cuatro carbonos con un grupo hidroxilo y un carbonilo, distribuida ampliamente en células de mamíferos como cuerpo cetónico a bajos niveles de glucosa. Así mismo, varios microorganismos producen polihidroxi-butiratos (PHB), compuestos lipídicos biodegradables de alto peso molecular, formados por la esterificación intracelular de monómeros de 3HB como respuesta a un exceso de carbono y baja disponibilidad de otros nutrientes en el medio (Liu *et al.*, 2007). El estereoisómero (*R*)-3HB ha generado gran interés por su uso como precursor para producir compuestos ópticamente activos, gracias a que sus grupos -OH y -COOH pueden modificarse químicamente para dar lugar a diferentes compuestos, principalmente antibióticos y diversos fármacos (Seebach *et al.*, 1986; Ren *et al.*, 2010; Boaz, 2012). Así mismo, la esterificación del (*R*)-3HB con moléculas como 1,3-butanodiol ha despertado gran interés, ya que el éster resultante puede utilizarse en tratamientos de cetosis controlada para mejorar el rendimiento físico y cognitivo, además de significar una alternativa útil para diferentes desórdenes metabólicos (Murray *et al.*, 2016).

Se ha reportado la obtención de (*R*)-3HB a partir de la degradación *in vitro* del PHB por acidólisis, esterificación con metanol o digestión con enzimas despolimerasas. En cambio, en el caso de sistemas *in vivo* se han llevado a cabo estrategias para la producción de (*R*)-3HB en cepas recombinantes de *Escherichia coli*, con base en la expresión heteróloga de genes de las bacterias *Ralstonia eutropha* y *Azotobacter vinelandii*, entre otras. Una de las opciones es introducir la ruta de síntesis de (*R*)-3HB en *E. coli* mediante la condensación de dos moléculas de acetil-CoA (Ac-CoA), por la acción de una tiolasa, para generar acetoacetil-CoA (AAc-CoA), que posteriormente es reducida a (*R*)-3-hidroxi-butiril-CoA (*R*-3HB-CoA) por una deshidrogenasa dependiente de NADPH; por último, la remoción de CoA mediante una tioesterasa, para obtener (*R*)-3HB (Tseng *et al.*, 2009). Liu *et al.* (2007) construyeron un sistema de expresión con las enzimas β -cetotiolasa (*phbA*) y acetoacetil-CoA reductasa (*phbB*) de *R. eutropha* en *E. coli*, así como la

sobreexpresión de una tioesterasa II homóloga (*tesB*). Con el fin de obtener el monómero de (R)-3HB, se excluyó a la PHB sintasa (*phbC*), último componente del operón *phbABC* nativo de *R. eutropha*.

Por otro lado, se estima que en el cultivo de microorganismos para la producción de moléculas que funcionan como bloques de construcción, más del 50% de los costos de producción se atribuyen a la materia prima, por lo que el aprovechamiento de residuos provenientes de otros procesos podría disminuir estos costos. El glicerol es un subproducto de la generación de biodiesel, como resultado de la transesterificación de triglicéridos con metanol. Aproximadamente un 10% en peso del biodiesel corresponde a glicerol crudo, lo cual implica un gran problema para las compañías productoras de este biocombustible. A nivel laboratorio, el glicerol ha sido aprovechado como fuente de carbono en procesos de fermentación para obtener otros compuestos, tales como 1,3-propanodiol, dihidroxiacetona, bioetanol, ácido propiónico y succínico, entre otros (Dobson *et al.*, 2012).

Algunos microorganismos como *R. eutropha*, *Pseudomonas sp.*, o *Z. denitrificans* tienen la capacidad de consumir glicerol y acumular PHB intracelularmente, hasta un 70% de su peso seco, pero los métodos de lisis y purificación disminuyen los rendimientos y pueden representar hasta el 30% del costo total del proceso a escala industrial (Mothes *et al.*, 2007; Ibrahim & Steinbüchel, 2009; Levett *et al.*, 2016). Shah *et al.* (2014) obtuvieron una cepa recombinante de *E. coli* capaz de alcanzar hasta 30% en peso de PHB (g PHB/g células), luego de expresar las enzimas aldehído reductasa (AlrD) y aldehído deshidrogenasa (AldH) de *R. eutropha* para optimizar el consumo de glicerol. La proteína AlrD es una oxidoreductasa dependiente de NADPH, la cual reduce aldehídos a su alcohol correspondiente, así como la reacción reversible; mientras que AldH cataliza la oxidación de aldehídos a ácidos carboxílicos mediante la reducción de NAD⁺ a NADH. Sin embargo, no existen reportes de la síntesis biotecnológica de (R)-3HB utilizando glicerol como fuente de carbono.

En nuestro grupo de investigación, García-Benítez (2016) evaluó la producción de (R)-3HB comparando glucosa y xilosa como fuentes de carbono con diferentes cepas de *E. coli* modificadas por ingeniería de vías metabólicas. Considerando lo reportado anteriormente, García-Benítez construyó el vector pTrc-R3HB que contiene los genes *phbA* y *phbB* de *A. vinelandii*, así como el gen *tesB* de *E. coli*, sobreexpresando los tres genes bajo un mismo promotor inducible por IPTG. Al evaluar la cepa silvestre MG1655 (DE3)/pTrc-R3HB bajo condiciones limitantes de oxígeno, se obtuvo una productividad de 0.59 g/Lh, la más alta reportada hasta ese momento en *E. coli* a partir de glucosa. En reportes posteriores, García-Benítez clonó el gen *gapN* de *S. mutans* río arriba del operón mencionado en el plásmido pTrc99A, con base en lo reportado por Centeno *et al.* (2014), obteniendo una mayor disponibilidad de NADPH y por tanto mayores rendimientos de producción de (R)-3HB.

II. ANTECEDENTES

2.1 (R)-3-hidroxiacetato

2.1.1 Generalidades y aplicaciones

Los ácidos (R)-hidroxialcanoicos (HA's) en general son utilizados como precursores quirales de moléculas más complejas al contener al menos dos grupos funcionales como lo son sus grupos hidroxilo y carboxilo, así como por la facilidad técnica de modificarlos químicamente. El (R)-3-hidroxiacetato (R-3HB) es un hidroxialcanoato de cuatro carbonos que ha cobrado gran interés por su uso como precursor de compuestos ópticamente activos. Entre sus aplicaciones está su uso como precursor del anillo macrocíclico del antibiótico azalomicina B, cuya administración en dosis bajas ha mostrado efectos antitumorales en diversas líneas celulares (Seebach *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2015). El (R)-3HB se ha empleado también como tratamiento médico para choques hemorrágicos y quemaduras, hipoxia, anoxia e isquemia cerebral; además se ha reportado su efecto regenerador de energía en mitocondrias del tejido cardíaco y su efecto para reducir la tasa de muerte en modelos de células neuronales humanas inducidas con Parkinson o Alzheimer (Ren *et al.*, 2010).

En mamíferos, el (R)-3HB es uno de los cuerpos cetónicos producidos por el hígado como respuesta a bajos niveles de glucosa, fungiendo así como combustible alternativo para el cerebro, órgano que lleva a cabo sus requerimientos energéticos principalmente de cuerpos cetónicos bajo condiciones de inanición, así como otros tejidos extra-hepáticos como corazón y músculos. De este modo, el metabolismo de (R)-3HB puede promover el restablecimiento de los niveles de glucógeno y proteínas gluconeogénicas, situación que ha sido aprovechada al inducir el cuerpo humano a estados cetogénicos mediante periodos prolongados de ayuno. Sin embargo, se ha visto que estos periodos de ayuno pueden incrementar la concentración de colesterol y ácidos grasos libres en sangre, aumentando la predisposición de arteriosclerosis o la activación del factor de transcripción PPAR γ (el cual participa desacoplando proteínas del metabolismo

cardíaco) (Murray *et al.*, 2016). Con base en estos efectos, se ha estudiado la ingesta de un éster de etil-(R)-3HB y 1,3-butanodiol (conocido como éster cetona o (R)-3-hidroxi-butil-(R)-3-hidroxi-butirato); un compuesto que es hidrolizado por lipasas intestinales y metabolizado por células hepáticas a (R)-3HB y acetoacetato. Dicho éster cetona puede ser redirigido al torrente sanguíneo por medio de transportadores de monocarboxilatos (MCT) hasta la matriz mitocondrial, en donde es metabolizado a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), a cuatro moléculas de acetyl-CoA. Además, la alta concentración de estos cuerpos cetónicos en sangre inhibe al receptor PUMA-G, mismo que controla la adipólisis y por tanto la liberación de ácidos grasos en la circulación (Cox & Clarke, 2014).

Por otro lado, algunas bacterias producen poli-3-hidroxi-butirato (PHB), un polihidroxi-alcanoato de alto peso molecular formado por la esterificación de monómeros de (R)-3HB, como un almacén de energía generado por condiciones de carbono en exceso y baja disponibilidad de otros nutrientes en el medio, p. ej. nitrógeno (*Ralstonia eutropha*), fósforo (*Rhodospirillum rubrum*) o limitación de oxígeno (*Azotobacter vinelandii*) (Liu *et al.*, 2007; Lemos & Mina, 2015). El PHB se ha utilizado como un sustituto biodegradable de plásticos derivados del petróleo, tales como el polipropileno (PP; que tarda hasta cientos de años en ser degradado), y con el cual comparte varias propiedades termofísicas (Tabla 1). Por otra parte, el proceso de producción de PHB presenta ciertas limitaciones económicas debido principalmente a los altos costos de las fuentes de carbono y recuperación del polímero a gran escala. Además, el impacto ambiental en el proceso puede ser equiparable o superior a la producción de polímeros sintetizados químicamente, dados los requerimientos energéticos y residuos generados en las etapas de separación y purificación (Naranjo-Vasco, 2010; Chandani *et al.*, 2018).

Tabla 1. Propiedades físicas del poli-3-hidroxibutirato (PHB) y el polipropileno (PP) (Adaptado de Kessler & Witholt, 1999; Lemos & Mina, 2015).

PROPIEDAD	PHB	PP
Temperatura de fusión (°C)	177	176
Cristalinidad (%)	60	50-70
Módulo de Young (GPa)	3.5	1.7
Fuerza de tensión (MPa)	43	38
Extensión al quiebre (%)	5	400

2.1.2 Producción de (R)-3HB por métodos químicos y enzimáticos

La obtención de enantiómeros puros, como es el caso del (R)-3HB, es de especial importancia por su uso como bloques de construcción en diversos sectores industriales, p. ej. en la producción de suplementos alimenticios, fármacos, cosméticos, fragancias y saborizantes (Ren *et al.*, 2010). En el caso de fármacos, la obtención de compuestos con mezclas racémicas puede implicar un aumento de las dosis requeridas, ocasionado por la reducida o nula actividad de alguno de los estereoisómeros, que incluso podría llevar a la manifestación de efectos adversos. Por ende, la producción de moléculas quirales ópticamente puras cobra gran atención en este rubro. No obstante, un proceso químico estereoselectivo generalmente requiere de catalizadores quirales costosos, al igual que el establecimiento de condiciones físicas fuertes y el uso de solventes, métodos que no garantizan la ausencia de productos secundarios no deseables (Tseng *et al.*, 2009). Además de la síntesis, se han reportado métodos químicos para la obtención de (R)-3HB a partir de la degradación de PHB con solventes a altas temperaturas y alcoholisis ácidas, seguidas por procesos de purificación con bases fuertes o destilación fraccionada que complican el proceso, además de elevar el costo de producción (Seebach *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2000; de Roo *et al.*, 2002).

A diferencia de los procesos químicos, las reacciones enzimáticas son altamente estereoselectivas y pueden realizarse en soluciones acuosas bajo condiciones suaves (Tseng *et al.*, 2009). De esta forma se han hecho estudios como el realizado por Lee *et al.* (1999), quienes, a partir del metabolismo de *A. latus* para producción y degradación de PHB, aprovecharon las enzimas despolimerasas de

dicho microorganismo para obtener hasta 117 g/L de (R)-3HB, correspondiente a un rendimiento producto-glucosa de 0.84 g/g.

2.1.3 Producción de (R)-3HB por ingeniería de vías metabólicas en *E. coli*

Otra estrategia que se ha utilizado para la producción de (R)-3HB, como la de muchos otros productos de interés, ha sido la ingeniería de vías metabólicas de microorganismos. Esta área puede conceptualizarse como el análisis sistemático de los flujos metabólicos en un organismo con base en técnicas de biología molecular para mejorar sus propiedades celulares, implementando modificaciones genéticas racionales tales que constituyan un marco de datos de expresión génica, proteínas presentes y la distribución de flujos metabólicos *in vivo* (Koffas *et al.*, 1999).

Bajo este concepto, Lee & Lee (2003) expresaron las rutas de biosíntesis y degradación de PHB de *R. eutropha* H16 en una cepa de *E. coli* XL1-Blue. Para esto emplearon un sistema de dos plásmidos: uno conteniendo a los genes de síntesis *phbA* (β -cetotiolasa), *phbB* (AAc-CoA reductasa) y *phbC* (PH3B sintasa) (Figura 1); mientras que el otro plásmido incluía al gen *phbZ* (PHB depolimerasa). Los autores obtuvieron títulos de 9.9 g/L de (R)-3HB, una productividad volumétrica de 0.18 g/Lh y un rendimiento producto/sustrato de 0.495 g/g (85.6% del máximo teórico, $Y_{Max-t} = 0.578$ g/g) en un fermentador bajo condiciones aerobias con 20 g/L de glucosa como fuente de carbono, y un tratamiento alcalino final para hidrolizar los dímeros de (R)-3HB resultantes (NaOH 10 N, 95 °C, 2 h).

Posteriormente, Liu *et al.* (2007) propusieron sustituir el sistema de biosíntesis-degradación de PHB por una ruta de síntesis directa de (R)-3HB. Para esto transformaron una cepa de *E. coli* BW25113 con un plásmido que contenía los genes *phbA*, *phbBy*, en lugar del gen *phbC_{Re}* (PHB sintasa), sobreexpresaron *tesB* de la propia *E. coli* (Figura 1). El gen *tesB_{Ec}* codifica para una tioesterasa II de acil-CoA capaz de transformar al (R)-3-hidroxitubiril-CoA en su ácido graso de cadena corta, (R)-3HB. Con esta cepa consiguieron producir 12.2 g/L de (R)-3HB, con una productividad volumétrica de 0.51 g/Lh y rendimiento producto/sustrato de 0.32 g/g

(55% del máximo teórico), usando un cultivo aerobio en fermentador con 20 g/L de glucosa. Utilizando la misma ruta metabólica, Tseng *et al.* (2009) compararon la capacidad de producción del monómero en las cepas *E. coli* MG1655 (DE3) y BL21Star (DE3) a nivel matraz en condiciones aerobias con 20 g/L de glucosa. Estos investigadores encontraron que MG1655 (DE3) produjo 2.93 g/L de (R)-3HB, mientras que BL21Star (DE3) 2.08 g/L. También reportan que la primera cepa mostró menor cantidad de acetato residual en el medio de fermentación, sugiriendo que un mayor flujo de acetyl-CoA se estaba dirigiendo a la biosíntesis de (R)-3HB; además enfatizan que una mayor relación de los equivalentes reductores NADPH/NADP⁺ con respecto a NADH/NAD⁺ resulta en una mayor reducción del AAc-CoA por la enzima PhaB_{Re} y por tanto una mayor síntesis de (R)-3HB.

Recientemente, en nuestro grupo de investigación, García-Benítez (2016) acopló los genes *phbA* y *phbB* de *Azotobacter vinelandii* con la sobreexpresión de *tesB* en *E. coli* MG1655 y, bajo limitaciones de oxígeno en fermentador de 1 L con 40 g/L de glucosa, alcanzó títulos de 10.4 g/L de (R)-3HB, 0.59 g/Lh y 0.27 g/g (47% del máximo teórico), lo que corresponde a la productividad volumétrica más alta reportada para una cepa de *E. coli*. Posteriormente, García-Benítez consiguió incrementar estos títulos cerca de un 50% luego de integrar el gen *gapN* de *Streptococcus mutans* en el mismo plásmido conteniendo su operón de síntesis de (R)-3HB. El gen *gapN* codifica para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Centeno-Leija, 2013), enzima que acopla una reacción de óxido-reducción a la generación de NADPH y no NADH (como lo hace la enzima nativa en *E. coli*), incrementando así los niveles de NADP⁺ reducido y favoreciendo la generación de (R)-3HB.

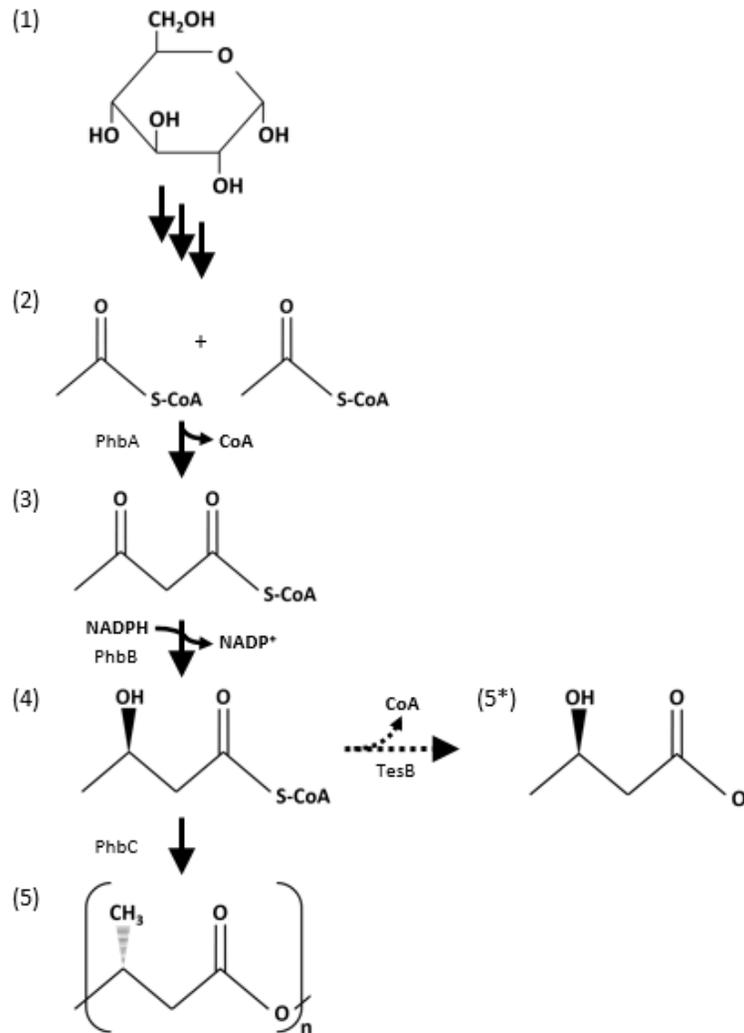


Fig. 1. Ruta de síntesis de (R)-3HB (Modificado de Lee & Lee (2003) y Liu et al., 2007)

(1) Glucosa; (2) Acetil-CoA; (3) Acetoacetyl-CoA; (4) (R)-3-hidroxi-butiril-CoA; (5) Poli-(R)-3-hidroxi-butirato; (5*) (R)-3-hidroxi-butirato (línea punteada); PhbA: β-cetotiolasa; PhbB: Acetoacetyl-CoA reductasa; PhbC: PHB sintasa; TesB: Tioesterasa II.

2.1.4 Disponibilidad del cofactor NADPH y acetil-CoA

La generación de poder reductor durante el metabolismo de *E. coli* es indispensable para mantener las reacciones anabólicas y catabólicas, pues se requiere NADH (nicotinamida adenina dinucleótido) o NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) dependiendo de la reacción de óxido-reducción. El NADH es producido mayoritariamente durante la glucólisis y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, por acción de la enzima GAPDH y posteriormente por el complejo

piruvato deshidrogenasa (PDH), generándose 4 moléculas por mol de glucosa. Posteriormente, se forman 3 moléculas de NADH por cada Ac-CoA en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). Este cofactor tiene diferentes papeles dependiendo si la bacteria crece en condiciones aerobias o anaerobias, ya que en presencia de oxígeno el NADH participa en la transferencia de electrones durante la fosforilación oxidativa, impulsando la generación de ATP; mientras que en anaerobiosis es utilizado para mantener el equilibrio redox, transfiriendo los electrones a productos de fermentación como ácido láctico o etanol para regenerar el NAD⁺ que se requiere en las reacciones de la glucólisis.

El NADPH, por su parte, es generado mayormente en la vía oxidativa de las pentosas fosfato (PF) por las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*Zwf*) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (*Gnd*). Otra fracción de NADPH resulta del TCA por acción de la enzima isocitrato deshidrogenasa (*Icd*) de *E. coli* (Centeno-Leija, 2013). De igual modo *E. coli* cuenta con las enzimas transhidrogenasas PntAB y UdhA; la primera ubicada en membrana y la segunda en el citosol. Ambas proteínas constituyen un sistema de interconversión entre NAD(H) y NADP(H), según los requerimientos biosintéticos (Romero-Pérez, 1998). Dicho lo anterior, una insuficiencia en la cantidad de NADPH (utilizado en anabolismo de lípidos, aminoácidos y nucleótidos) tiende a afectar los rendimientos en la obtención de metabolitos de interés cuya vía de síntesis requiera de este cofactor, por lo que se han seguido diferentes estrategias para incrementar su disponibilidad. Por ejemplo, con la expresión de una GAPDH heteróloga (*gapN*) que genera NADPH, utilizado por la AAc-CoA reductasa en la síntesis de PHB y (R)-3HB, se han reportado mayores rendimientos con respecto a la cepa silvestre *E. coli* MG1655 (Centeno-Leija, 2013; García-Benítez 2016). Otros enfoques han propuesto la modulación de la ruta de pentosas fosfato al sobreexpresar *zwf* y/o *gnd*, o bien, modulando el sistema de transhidrogenasas con la sobreexpresión de UdhA (Lee *et al.*, 2013).

Además del NADPH, la concentración del acetyl-CoA es un factor limitante en la producción de (R)-3HB al tratarse de un intermediario directo que es también indispensable para numerosas rutas de biosíntesis y regulación (Centeno-Leija,

2013). En algunos estudios se ha observado que la capacidad limitada del metabolismo oxidativo de *E. coli* puede ser la responsable de desviar la transformación de acetil-CoA hacia metabolitos de sobreflujo como ácido acético (Figura 2), ya que altas tasas de crecimiento y la demanda en los requerimientos anabólicos y catabólicos exceden la capacidad del metabolismo celular, de modo que el microorganismo utiliza esta ruta para intentar reestablecer sus niveles de ATP y NADH (Han *et al.*, 1992).

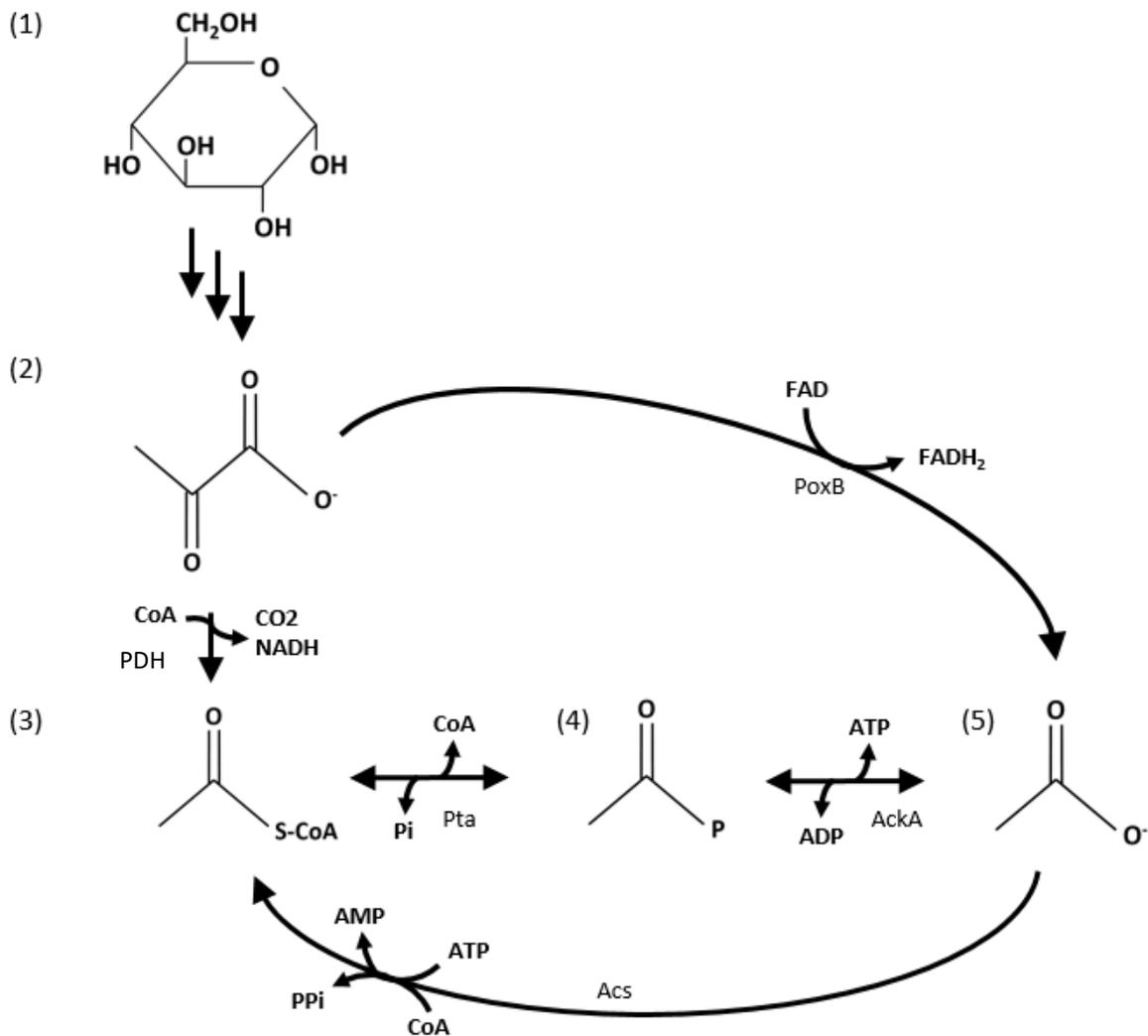


Fig. 2. Rutas de síntesis de ácido acético en *E. coli*.

(1) Glucosa; (2) Piruvato; (3) Acetil-CoA; (4) Acetil fosfato, $P = PO_3$; (5) Acetato; Pta: Fosfato acetil transferasa; AckA: Acetato cinasa; Acs: Acetil-CoA sintetasa; PoxB: Piruvato oxidasa; PDH: Piruvato deshidrogenasa.

Sin embargo, el acetato es uno de los mayores subproductos en aquellos bioprocesos que utilizan *E. coli* como sistema de producción. Su excreción y acumulación en cultivos aerobios con glucosa como fuente de carbono puede llevar a numerosos efectos negativos como inhibición del crecimiento, pérdida de carbono, disminución en la producción de proteínas recombinantes, etcétera (Castaño *et al.*, 2009). Utilizando glucosa como fuente de carbono, se ha visto que la vía Pta-AckA, ruta principal en la síntesis de acetato, juega un papel central en el flujo bidireccional *in vivo* de acetato en *E. coli*, comparado con la segunda ruta más importante controlada por PoxB (Enjalbert *et al.*, 2017). Una opción para redireccionar el flujo de Ac-CoA hacia la producción de (R)-3HB podría ser la eliminación de la ruta Pta-AckA, aunque se ha encontrado que los parámetros de velocidad específica de crecimiento (μ) y rendimiento de biomasa-sustrato pueden verse afectados, así como posibles incrementos en la formación de lactato y formiato (Peebo *et al.*, 2014). No obstante, Centeno-Leija (2013) reporta cantidades despreciables de acetato luego de eliminar el operón *pta-ackA* del cromosoma de *E. coli* MG1655 para impulsar el flujo de Ac-CoA, a partir de glucosa, hacia la producción de PHB en cultivo aerobio. En otro trabajo, Castaño *et al.* (2009) analizó la relevancia del gen *pta* en el nodo acetato/acetil-CoA, para lo cual eliminaron dicho gen del cromosoma de *E. coli* y, luego de cultivar la cepa con glucosa en condiciones aerobias, observaron una tasa prácticamente nula en la producción de acetato (7.70 mmol/gh vs 0.52 mmol/gh en Δ *pta*), sin verse afectada la velocidad específica de crecimiento.

2.2 Glicerol

2.2.1 Usos del glicerol y su metabolismo en *E. coli*

El glicerol es un alcohol viscoso, inoloro e incoloro que presenta tres grupos hidroxilo, volviéndolo un líquido altamente soluble en agua. Este compuesto es el mayor componente de los triglicéridos presentes en grasas animales y aceites vegetales, aunque es mayormente conocido por ser el principal subproducto en la producción de biodiesel, jabón y ácidos grasos (Quispe *et al.*, 2013). Es por esta

razón que ha cobrado mayor atención en la última década, pues comprende hasta el 10% en peso del biodiesel que se produce como biocombustible. Por cada 3 moléculas de metil-ésteres se obtiene 1 mol de glicerol. Para el año 2016 la producción mundial de biodiesel llegó a más 34 millones de toneladas, siendo EUA el país con mayor capacidad productora al generar casi 20% del total a partir de aceites vegetales principalmente. Por este motivo, el costo del glicerol ha disminuido rápidamente conforme se han desarrollado más industrias productoras de biodiesel en varios países; de modo que actualmente alcanza valores de 0.088 USD/kg para glicerol crudo (~80% pureza) y 1.04 USD/kg para el glicerol refinado (99.7% pureza) (Oleoline, 2020). Por consecuencia, el glicerol representa un gran obstáculo desde el punto de vista económico para las compañías productoras de biodiesel, de manera que ha sido propuesto como materia prima para su transformación en productos de mayor valor agregado, primordialmente en el área química (Anitha *et al.*, 2016; UFOP, 2017; Oleoline, 2018).

El uso del glicerol en procesos de biosíntesis no es la excepción, pues se ha estudiado su eficiencia como fuente de carbono para la obtención de alcoholes (etanol, propanol, 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol), hidrógeno y ácido succínico por microorganismos como *Enterobacter aerogenes*, *Clostridium butyricum*, *Actinobacillus succinogenes* y *Escherichia coli*, principalmente (Anitha *et al.*, 2016). Dado que el glicerol es una molécula con un alto grado de reducción (4.67 para glicerol en comparación de 4.00 para la glucosa), *E. coli* puede metabolizarlo para obtener más equivalentes reductores (Figura 3), lo cual tiene un efecto directo en el metabolismo al llevar el flujo de carbono hacia la síntesis de productos más reducidos para mantener un balance redox (Van Briesen, 2002; De Almeida *et al.*, 2010).

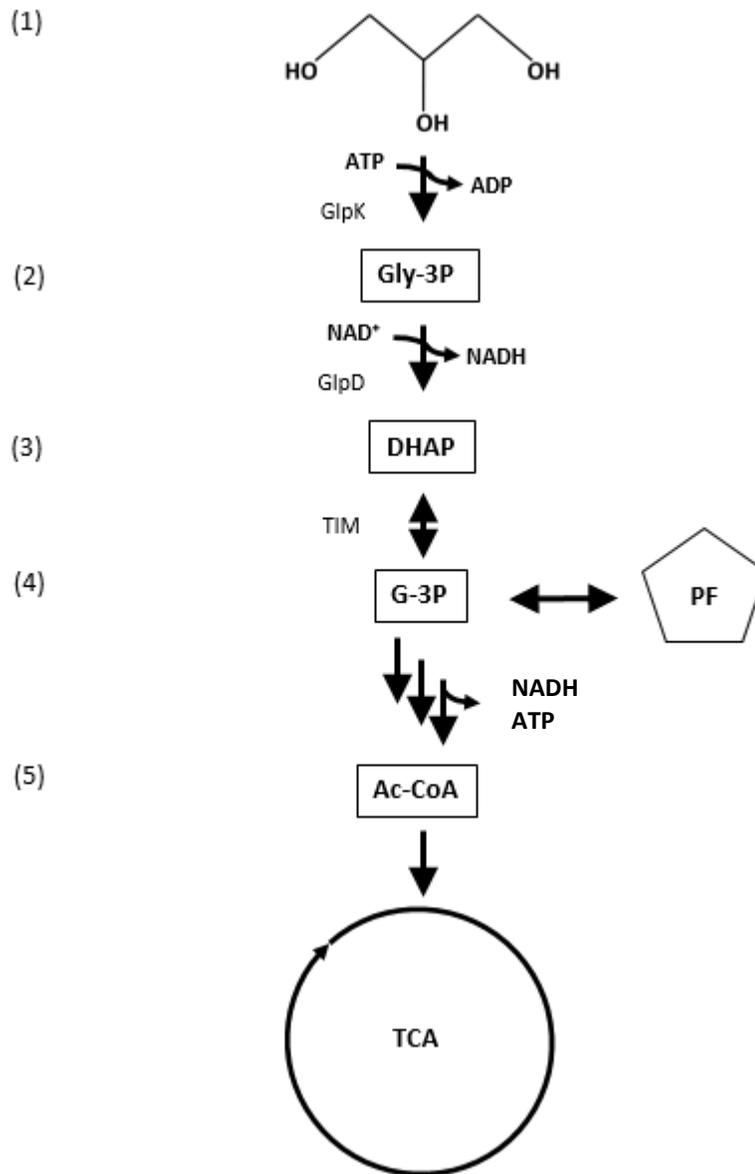


Fig. 3. Metabolismo aerobio del glicerol en *E. coli*.

(1) Glicerol; (2) Glicerol-3-fosfato; (3) Dihidroxiacetona-fosfato; (4) Gliceraldehído-3-fosfato; (5) Acetil-CoA; PF: Ruta de las pentosas fosfato; TCA: Ciclo de los ácidos tricarboxílicos; GlpK: Glicerol-fosfato-cinasa; GlpD: Glicerol-fosfato-deshidrogenasa; TIM: Triosa-fosfato-isomerasa.

2.2.2 Biosíntesis de PHB a partir de glicerol

Existen numerosos estudios sobre bacterias capaces de asimilar el glicerol como fuente de carbono para acumular PHB intracelular de forma natural, entre los que se encuentran *R. eutropha*, *Pseudomonas sp.* y *Zobellella denitrificans*, así como cepas recombinantes de *E. coli* con los mecanismos necesarios para sintetizar este polímero por las vías mostradas en las Figuras 1 y 3 (Ibrahim & Steinbüchel, 2009).

Shah *et al.*, (2014) diseñaron una cepa recombinante de *E. coli* con la capacidad de producir PHB y etanol de manera simultánea a partir de glicerol crudo. En este estudio se acoplaron las enzimas AlrD (aldehído reductasa) y AldH (aldehído deshidrogenasa) de *R. eutropha* para consumo de glicerol, incorporándolo como 2-fosfoglicerato en la glucólisis. De igual manera, se expresó el operón *phbABC* de este mismo microorganismo para la síntesis del (R)-3HB. Lo interesante de este sistema heterólogo es que AlrD cataliza la oxidación de un alcohol a su forma aldehído, en una reacción que además genera NADPH (ver Figura 4 más adelante). Esto es ventajoso dado que, como ya se ha mencionado anteriormente, la disponibilidad de NADPH es un factor clave en la síntesis de PHB y (R)-3HB al ser requerido por la enzima PhbB (AAc-CoA reductasa). Estos autores llevaron a cabo un cultivo aerobio con 30 g/L de glicerol crudo (80% pureza) utilizando un sistema de dos plásmidos: uno con los genes *alrD* y *aldH* y otro con el operón *phABC*. El título de PHB obtenido al acoplar la vía de consumo heteróloga aumentó al doble con respecto al que se obtuvo sin acoplar dicha ruta (1.95 g/L vs 0.87 g/L). De igual manera observaron que cuando *E. coli* expresaba esta ruta heteróloga conseguía incorporar prácticamente todo el glicerol presente en el medio (98.2%), mientras que de forma nativa apenas consumía más de la mitad del glicerol (59.73%).

III. JUSTIFICACIÓN

El glicerol es un subproducto abundante en la industria de producción de jabón y biodiesel. Debido al crecimiento de este sector en los últimos años, se ha propuesto al glicerol como fuente de carbono para la obtención de moléculas de interés industrial, mediante diversas estrategias de ingeniería de vías metabólicas con un microorganismo modelo, como *E. coli*. Entre estas moléculas se encuentra el (R)-3HB, un monómero quiral con potencial para utilizarse como bloque de construcción de moléculas más complejas, así como por sus características energéticas.

Considerando lo anterior, y con base en diversos estudios, se propuso la construcción de una cepa recombinante de *E. coli* capaz de incorporar glicerol de forma eficiente para la síntesis de (R)-3HB. Para esto se planteó emplear un operón con los genes *phbA_{AV}*, *phbB_{AV}* y *tesB_{EC}* (obtenido previamente) para la síntesis de (R)-3HB, acoplado a un sistema heterólogo con los genes *alrD_{Re}* y *aldH_{Re}*, donde el glicerol se incorpora a la glucólisis a partir del 2-fosfoglicerato. Esta ruta tiene el potencial de generar mayor concentración de NADPH intracelular, cuya disponibilidad es clave durante la síntesis de (R)-3HB. Además, se plantea la inactivación del gen *pta* del cromosoma, involucrado en la ruta Pta-AckA de síntesis y consumo de acetato; así como el gen *pflB*, a fin de evitar la coproducción de formiato. Estas eliminaciones permitirán aumentar la disponibilidad de precursores como acetyl-CoA y piruvato para la producción de (R)-3HB.

IV. HIPÓTESIS

La integración del sistema heterólogo AlrD-AldH favorecerá el consumo y metabolismo de glicerol, así como la producción de (R)-3HB en cepas de *E. coli*. Además, inactivando vías de producción de acetato y formiato se incrementará la disponibilidad de carbono para la producción de (R)-3HB.

V. OBJETIVO

Evaluar la producción de (R)-3HB y otros productos de fermentación en cepas de *E. coli*, utilizando glicerol como fuente de carbono, en cultivos bajo condiciones limitantes de oxígeno; minimizando, además, la generación de formiato y acetato para incrementar la disponibilidad de precursores.

Objetivos específicos:

- I. Disminuir el flujo de carbono hacia la generación de acetato y/o formiato en una cepa de *E. coli*, mediante la eliminación de los genes *pta* y *pflB* del cromosoma, respectivamente. Generar, además, una doble mutante $\Delta pta \Delta pflB$ y evaluar su efecto en el metabolismo.
- II. Evaluar una vía heteróloga para metabolismo de glicerol mediante la expresión en plásmido de los genes *alrD_{Re}* y *aldH_{Re}* de *R. eutropha*.
- III. Acoplar en un mismo sistema de expresión la vía heteróloga de consumo de glicerol, compuesta por *AlrD_{Re}* y *AldH_{Re}* y la vía de producción de (R)-3HB, que contiene *PhbA_{AV}*, *PhbB_{AV}* y *TesB_{EC}*.
- IV. Evaluar el crecimiento celular, consumo de glicerol y perfil de metabolitos en cultivos por lote bajo condiciones de limitación de oxígeno con todas las cepas obtenidas.

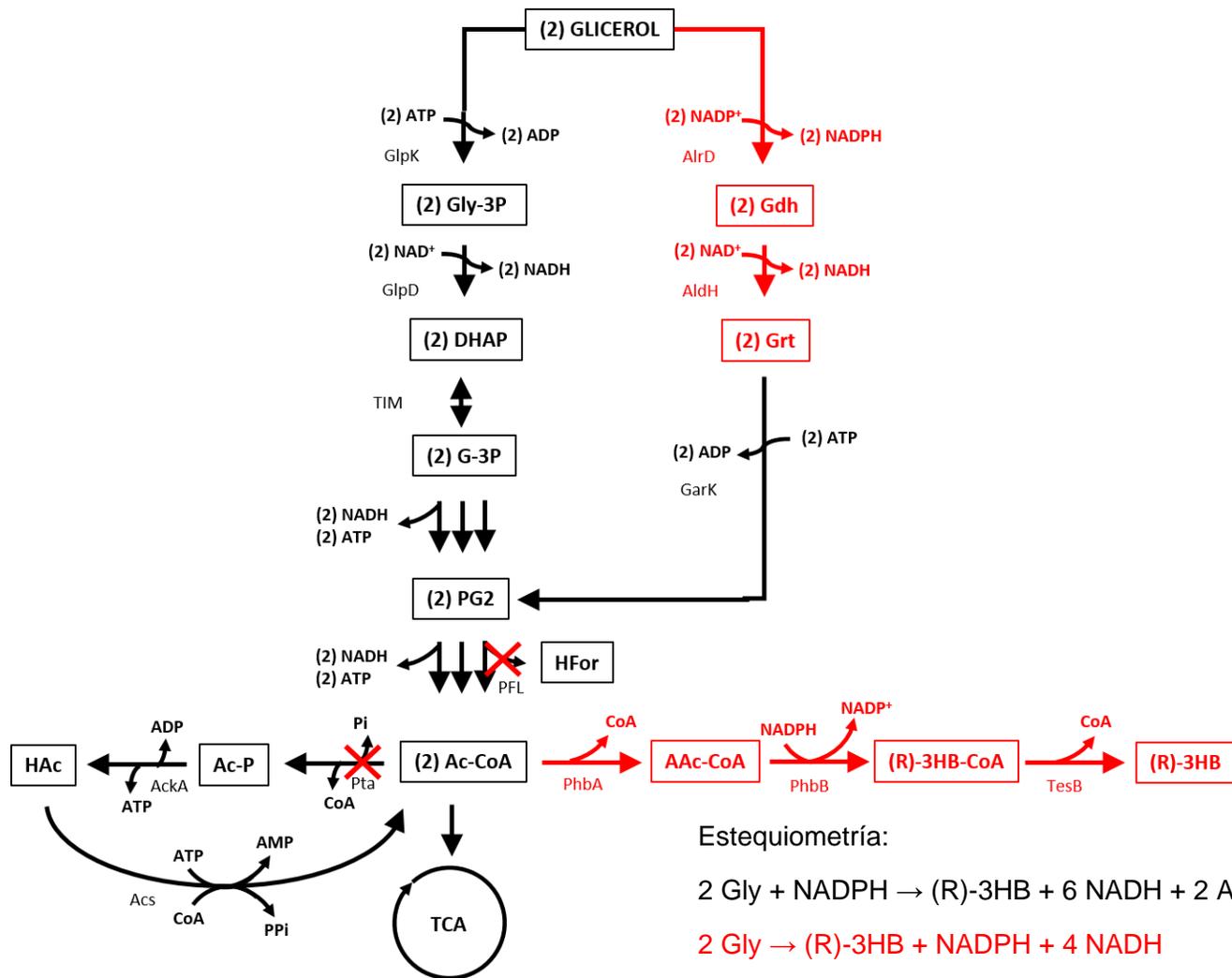


Fig. 4. Metabolismo de glicerol en *E. coli* y vías heterólogas de consumo de glicerol y síntesis de (R)-3HB

En color negro se muestra la vía de incorporación de glicerol al metabolismo central y la vía Pta-AckA. En rojo se muestran la vía heteróloga para favorecer el consumo de glicerol acoplado a la generación del cofactor NADPH (arriba) y la vía para producción de (R)-3HB (abajo). Gdh: Gliceraldehído; Grt: Glicerato; PG2: 2-fosfoglicerato; GarK: Glicerato-2-cinasa-1. AlrD: aldehído reductasa; AldH: aldehído deshidrogenasa.

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

6.1 Inactivación cromosomal de genes en *E. coli* MG1655 (DE3)

A partir de la cepa silvestre *E. coli* MG1655 (DE3) se inactivaron los genes *pta* y *pflB* con base en el protocolo de transducción con el bacteriófago P1, en el que se sustituye un gen de interés por un casete de resistencia a kanamicina flanqueado por sitios FRT. Brevemente, se infectaron cepas de la colección Keio (Datsenko & Wanner, 2000; Baba *et al.*, 2006), específicamente las cepas *pta::Km* y *pflB::Km* (cepas donadoras), obteniendo bacteriófagos cuyo fondo genético presenta dichas sustituciones. Luego, se utilizaron los bacteriófagos para infectar la cepa *E. coli* MG1655 (DE3) (cepa receptora), y así eliminar los genes mencionados por recombinación homóloga. Para comprobar las mutantes, se seleccionaron colonias capaces de crecer en agar con medio LB y kanamicina (30 µg/mL). La eliminación se comprobó por PCR con oligonucleótidos externos (Tabla 2), los cuales hibridan aproximadamente a 200 pb de los extremos del locus blanco, así como con los oligonucleótidos K1 y K2 que hibridan en la región interna del casete de resistencia.

Tabla 2. Cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados.

Nombre	CEPAS Genotipo	Referencia
MG1655 (DE3)	<i>E. coli</i> K-12, λDE3, <i>F</i> ⁻ , λ ⁻ , <i>ilvG</i> , <i>rfb-50</i> , <i>rph-1</i>	Studier & Mofatt (1985)
DH5α	<i>E. coli</i> <i>F</i> ⁻ , <i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>deoR</i> , <i>nupG</i> , <i>purB20</i> , <i>φ80dlacZΔM15</i> , <i>Δ(lacZYA-argF)U169</i> , <i>hsdR17(rK-mK+)</i> , λ ⁻	Grant <i>et al.</i> (1990)
JM101	<i>E. coli</i> <i>glnV44 thi-1 Δ(lac-proAB) F'[lacIqZΔM15 traD36 proAB+]</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
FR01	<i>E. coli</i> MG1655 (DE3) <i>Δpta::Km</i>	Este trabajo
FR02	<i>E. coli</i> MG1655 (DE3) <i>ΔpflB::Km</i>	Este trabajo
FR03	<i>E. coli</i> MG1655 (DE3) <i>Δpta::FRT</i> , <i>ΔpflB::Km</i>	Este trabajo
AV14	<i>E. coli</i> MG1655 <i>ΔpflB</i> , <i>ΔadhE</i> , <i>ΔfrdA</i> , <i>ΔxyIFGH</i> , <i>Δreg</i> 27.3 kb, <i>gatC S184L</i> , <i>ΔldhA</i> , <i>ΔpoxB</i> , <i>Δpta</i>	García-Benítez (2016)

Tabla 2. (Continuación)

PLÁSMIDOS		
Nombre	Descripción	Referencia
pCP20	Contiene genes que codifican para Amp ^R (resistencia a ampicilina) Cm ^R (resistencia a cloranfenicol), FLP (flipasa) y Rep101 (A56V) (Ver Anexo 11.1)	Datsenko & Wanner (2000)
pTrc-R3HB	pTrc99A con el promotor fuerte <i>trp/lac</i> UV5 inducible por IPTG, contiene los genes <i>phbA_{Av}</i> , <i>phbB_{Av}</i> y <i>tesB_{Ec}</i> para síntesis de (R)-3HB.	García-Benítez (2016)
pACYCDuet-Gly	pACYC-Duet1 con promotor fuerte T7/lac inducible por IPTG, contiene los genes <i>aldR_{Re}</i> y <i>aldH_{Re}</i> optimizados para uso preferencial de codones en <i>E. coli</i> para consumo heterólogo de glicerol.	Este trabajo
pACYCDuet1-Gly-R3HB	pACYCDuet1-Gly con los operones para consumo heterólogo de glicerol y síntesis de (R)-3HB, clonados en diferentes sitios de clonación múltiple, cada uno con expresión inducible por IPTG bajo promotores T7/lac.	Este trabajo

OLIGONUCLEÓTIDOS		
Nombre	Secuencia (5→3')	Referencia
Fw_ackA_US	GCA GCC TGA AGG CCT AAG TAG	Centeno-Leija (2014)
Rv_pta_DS	CGG GCA TTG CCC ATC TTC TTG	Centeno-Leija (2014)
K1	GCC GAT TGT CTG TTG TGC CC	Centeno-Leija (2014)
K2	CGG TGC CCT GAA TGA ACT GC	Centeno-Leija (2014)
pfIB_Fw	ACG ATC GGC AAC ATT ATC GG	Vargas-Tah (2014)
pfIB_Rv	ACA TTG CGG TGT TTC TCC AG	Vargas-Tah (2014)

Para obtener la doble mutante $\Delta pta\Delta pfIB$ se eliminó el casete de resistencia a kanamicina de la cepa FR01 (*pta::Km*), antes de una segunda infección con bacteriófagos *pfIB*. De manera que se transformó la cepa Δpta con el vector pCP20 (Cb^R), que expresa una flipasa de *S. cerevisiae*. Esta enzima tiene la capacidad de reconocer y escindir en los sitios FRT que flanquean el casete de resistencia a kanamicina. Las transformantes se cultivaron a 30°C para promover la expresión de la flipasa y, después de comprobar que no sobrevivían en agar LB con kanamicina,

las candidatas se sembraron a 42°C para promover la pérdida del vector (Datsenko & Wanner, 2000; Anexo 11.1).

6.2 Diseño, construcción y transformación con los vectores de expresión

La síntesis de los genes *alrD* y *aldH* con el uso optimizado de codones para *E. coli* se solicitó a la compañía Genewiz (South Plainfield, NJ, US). Las secuencias de ambos genes se obtuvieron de lo reportado por Shah *et al.* (2014) y se colocaron en tándem, dentro del segundo sitio de clonación múltiple (MCS-2) del plásmido pACYCDuet-1, bajo el control de un promotor T7/lac (Anexo 11.2). La secuencia se diseñó con los sitios de restricción NdeI y Acc65I a los extremos y PglI entre ambos genes y antes de un segundo sitio de unión a ribosoma (RBS). El RBS se obtuvo del catálogo de iGEM (http://parts.igem.org/Ribosome_Binding_Sites). Se utilizaron los softwares UTR Designer y RBS Calculator, seleccionando la secuencia con mayor nivel de expresión en unidades arbitrarias de acuerdo con lo reportado por Reeve *et al.* (2014).

Para la producción de (R)-3HB se utilizó el vector pTrc-R3HB previamente construido (García-Benítez, 2016), el cual posee los genes *phbB*, *phbA* y *tesB* en el plásmido pTrc99A bajo el control de un promotor *trp/lac*. Mediante el protocolo de miniprep por lisis alcalina y purificación con etanol (Bimboim & Dolly, 1979; Sambrook *et al.*, 1989), el vector fue extraído y purificado a partir de la cepa de *E. coli* MG1655/pTrc-R3HB construida por García-Benítez (2016). El vector pTrc-R3HB se comprobó por patrones de restricción al digerir con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*.

Se transformaron células electrocompetentes de la cepa silvestre MG1655 (DE3) y las mutantes Δpta (FR01), $\Delta pflB$ (FR02) y $\Delta pta\Delta pflB$ (FR03) con el plásmido pACYCDuet1-Gly y/o pTrc-R3HB utilizando un Electroporator 2510 (Eppendorf, Hamburgo, DE) aplicando dos pulsos de 2500 Volts. Las transformaciones se comprobaron por digestión con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* para pTrc-R3HB, y con *NdeI* y *Acc65I* para pACYCDuet1-Gly.

Finalmente, se construyó el vector pACYCDuet1-Gly-R3HB clonando el operón compuesto por los genes *phbA*, *phbB* y *tesB* desde el vector pTrc-R3HB hasta el primer sitio de clonación múltiple (MCS-1) del vector pACYCDuet1-Gly. Para esto se purificaron ambos vectores, a partir de 5 mL de células, utilizando el kit de QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN, Hilden, DE) según las instrucciones del proveedor. Luego, se digirieron 4 µg de ambos vectores con *EcoRI* y *HindIII*, y se cargaron en gel preparativo de electroforesis a 70 Volts. Antes de cargar en el gel, se defosforilaron los extremos del vector pACYCDuet1-Gly con 1 U de fosfatasa alcalina de camarón (SAP, ThermoScientific, Waltham, US), siguiendo las recomendaciones del proveedor. Posteriormente, las bandas obtenidas se cortaron cuidadosamente y se purificaron utilizando el kit GeneJET Gel Extraction (ThermoScientific, Waltham, US), se disolvieron en 1 mL de amortiguador de unión ("binding buffer") con 10 µL de acetato de sodio 3 M (pH 4.8), sin agregar más amortiguador a las columnas de purificación y eluyendo con amortiguador de elución ("elution buffer") a temperatura ambiente después de dos minutos de incubación. Para ligar el operón al vector pACYCDuet1-Gly, se utilizó una relación vector-inserto de 1:6 (vol:vol) y 10 U de ligasa T4 (ThermoScientific, Waltham, US) en una reacción de 20 µL, la cual se incubó las primeras 6 h a 16°C y por 144 h más en refrigeración (4°C). Por último, se transformaron 4 µL del producto de ligación en 50 µL de células quimiocompetentes de *E. coli* DH5α por choque térmico a 42°C durante 90 segundos, previa incubación por 30 minutos en hielo.

Las células quimiocompetentes se prepararon partiendo de 5 mL de un cultivo en LB sin antibiótico hasta alcanzar entre 0.8 y 1 DO. De este cultivo se tomó 1 mL que fue centrifugado por 2 min a 12,000 rpm y 4°C. Se hizo un primer lavado de la pastilla celular con 500 µL de agua fría estéril y un segundo lavado con 500 µL de CaCl₂ 0.1 M frío, ambos por 5 minutos a 5000 rpm y 4°C. La pastilla celular se resuspendió en 50 µL de CaCl₂ 0.1 M. Las transformantes candidatas se comprobaron por digestión con *EcoRI* y *HindIII*.

6.3 Caracterización cinética de cepas en matraz

Para evaluar el crecimiento celular, consumo de glicerol, producción de (R)-3HB, acetato y otros metabolitos la cepa silvestre *E. coli* y la mutante FR01 se sembraron en agar con medio LB a partir de muestras crioconservadas en glicerol al 40% y almacenadas a -70°C. Se seleccionaron y sembraron 3 colonias aisladas de cada cepa para realizar preinóculos en 5 mL de medio LB en tubos de ensayo incubados por 12 h (“overnight”) a 37°C y 300 rpm. Se tomó 1 mL del cultivo anterior y se prepararon inóculos en matraces de 250 mL con 25 mL de medio mineral AM1 con MOPS (0.1 M) (Tabla 3) y ajustado a pH 7, conteniendo glucosa (control) o glicerol (5 g/L), y 100 mg/L de ácido cítrico. Se monitoreó el crecimiento hasta alcanzar 2-3 densidades ópticas a 600 nm (DO_{600}) y se inocularon 50 mL de medio fresco en matraces de 250 mL con la cantidad necesaria de células para iniciar el cultivo a 0.1 DO_{600} . Las condiciones del cultivo fueron 37°C a 300 rpm y se realizaron triplicados de cada cultivo. Para la cepa FR01 se agregó kanamicina (30 $\mu\text{g/mL}$) al medio como marcador de selección.

6.4 Evaluación de las cepas en fermentador bajo condiciones limitantes de O_2

Se realizaron cultivos en fermentadores de 1 L (Applikon, Delft, NL), operando al 75% de su volumen, para evaluar el crecimiento celular, consumo de glicerol, producción de (R)-3HB y otros metabolitos. Se utilizó medio mineral AM1 suplementado con 40 g/L de glicerol y los antibióticos correspondientes. A no ser que se indique otra condición, los cultivos se mantuvieron a 37 °C y pH 7, con una agitación de 800 rpm y 0.5 vvm. Se ha reportado que con los parámetros anteriores es posible alcanzar condiciones limitantes de oxígeno ($OTR = 5.87 \text{ mmolO}_2/\text{Lh}$, García-Benítez 2016). Los inóculos se prepararon en 50 mL de medio AM1-MOPS (0.1 M) con 5 g/L de glicerol en matraces de 250 mL a 300 rpm y 37 °C. Se inoculó con la cantidad necesaria de células para comenzar los cultivos con 0.1 DO_{600} . La expresión se indujo con IPTG 0.01 mM cuando los cultivos se encontraban en la fase exponencial temprana (0.8-1 DO_{600}). La espuma generada durante el crecimiento celular se controló alimentando pulsos cortos (4 s) cada 20 min de una

dilución 1:25 de aceite de silicón durante la fase de crecimiento exponencial. Los cultivos se realizaron al menos por duplicado, tomando muestras a diferentes tiempos para cada repetición.

Tabla 3. Composición del medio mineral AM1.

MEDIO AM1			
Componente	mM	Componente	mM
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	19.92*	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.24
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	7.56*	H_3BO_3	1.21
KCl	2.00	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2.50
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.50	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	8.88
Betaína • KCl	1.00	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.26
Ác. Cítrico	0.52	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.88
		ZnCl_2	2.20

(*) Las sales de fosfatos de amonio se utilizaron a una concentración tres veces mayor con respecto al original (Martínez *et al.*, 2006).

6.5 Métodos de cuantificación de crecimiento celular, glicerol, (R)-3HB y otros metabolitos

El crecimiento celular se cuantificó con respecto a su densidad óptica a 600 nm utilizando un espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis (Thermo Scientific, Waltham, US), considerando 1 DO_{600} como 0.42 g/L de peso seco celular para *E. coli* MG1655 (Centeno-Leija, 2013). En lo que respecta a las mediciones de consumo de carbono, (R)-3HB y otros metabolitos secundarios (piruvato, etanol, formiato, lactato y succinato), éstos se cuantificaron con un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Waters U6K (Millipore Co., Milford, US). Para esto se recuperó el sobrenadante de cada muestra (1 mL) centrifugando a 13,000 rpm por 1 minuto, para posteriormente filtrar con membranas de 0.45 μm , e inyectar 20 μL al equipo utilizando H_2SO_4 5 mM como fase móvil con un flujo de 0.4 mL/min, todo esto en un sistema de dos columnas Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules,

US) conectadas en serie y a una temperatura interna de 30°C (para más detalles ver Anexo 11.4). Para la detección se utilizó un detector UV de arreglo de diodos Waters 996 (Millipore Co., Milford, US) y otro de índice de refracción Waters 2410 (Millipore Co., Milford, US) (Liu *et al.*, 2007; García-Benítez, 2016).

6.6 Análisis cualitativo de proteínas mediante SDS-PAGE

Un análisis cualitativo de las proteínas PhbA, PhbB y TesB (vía de producción de (R)-3HB), así como de AlrD y AldH (vía de consumo de glicerol), se llevó a cabo mediante SDS-PAGE. Para esto se realizaron cultivos de 24 h en matraces de 250 mL con 50 mL de medio AM1-MOPS (0.1 M) suplementados con 10 g/L de glicerol. Se cultivaron las cepas FR01/pTrc-R3HB y FR01/pACYCDuet-Gly-R3HB hasta una DO₆₀₀ de 0.8 – 1. En este punto del crecimiento se indujo con diferentes concentraciones de IPTG (0, 0.01 y 0.05 mM), para evaluar su efecto en la cantidad de proteína obtenida. Se utilizó la mutante FR01 (Δpta) transformada con los vectores vacíos pTrc99A y pACYCDuet como control. Al final del cultivo se centrifugaron las células correspondientes a 1 DO₆₀₀, a las condiciones descritas anteriormente, para separar el sobrenadante que se utilizó para cuantificación de metabolitos en HPLC, de igual manera se conservó la pastilla celular. Esta última fue resuspendida en 400 μ L de amortiguador de lisis (100 mM KPO₄; 10 mM CaCl₂; 10 U/mL DNAsa; y 0.75 g/L lisozima) y luego se incubó por 60 min a 37°C. Pasado este tiempo se centrifugaron las muestras por 2 min a 12,000 rpm.

Al sobrenadante, que contenía la proteína soluble, se le agregó amortiguador de carga para condiciones reductoras (10% glicerol; 2% SDS; 5% β -mercaptoetanol; 0.002% azul de bromofenol; 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8) y la solución se desnaturizó durante 10 minutos a 95°C. Finalmente se tomó una alícuota de 5 μ L para cargar un gel de SDS con poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%. Al final de la corrida se tiñó dicho gel con azul brillante de Coomasie (Jalomo-Khayrova, comunicación personal).

6.7 Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{LA})

Para determinar el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{LA}) en diferentes condiciones de temperatura y agitación se llevó a cabo el método de “gassing-out”. Se alimentó un flujo de aireación constante de 0.5 vvm hasta alcanzar la saturación de oxígeno (de acuerdo con lo cuantificado por el sensor de oxígeno disuelto del equipo). En este punto se alimentó N_2 gaseoso hasta desplazar al oxígeno presente en el líquido, para después burbujear aire nuevamente. Se tomaron los datos del incremento en la tensión de oxígeno disuelto (TOD) en el medio y el valor de k_{LA} se obtuvo como la pendiente de la recta que resulta de graficar la diferencia de varios puntos en el tiempo ($t_2 - t_1$) contra $\ln ((C_{LA}^* - C_{LA1}) / (C_{LA}^* - C_{LA2}))$. Donde C_{LA}^* representa la concentración de oxígeno disuelto a saturación (solubilidad del oxígeno en el medio) y C_{LA} la concentración de oxígeno en el seno del líquido, ambos en $\text{mmol O}_2/\text{L}$, para las condiciones evaluadas. Se utilizó el medio mínimo mineral AM1, empleado en los cultivos, y se consideró la solubilidad del oxígeno en agua a las temperaturas evaluadas (0.2155 $\text{mmol O}_2/\text{L}$ a 37°C ; 0.2388 $\text{mmol O}_2/\text{L}$ a 30°C).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Eliminación del gen *pta* del cromosoma de *E. coli*

Utilizando como cepa donadora a la mutante *E. coli* K12 *pta*::Km de la colección de Keio y como receptora a la silvestre *E. coli* MG1655 (DE3) (WT) se consiguió eliminar del cromosoma al gen que codifica para la enzima fosfoacetiltransferasa. El objetivo de esta eliminación fue reducir la generación de acetato e incrementar la poza de acetil-CoA disponible para la producción de (R)-3HB.

Después de seleccionar fenotípicamente colonias candidatas capaces de crecer en LB-agar con kanamicina (30 µg/mL) se hizo una extracción de ADN cromosomal por el método de ebullición a 96 °C y una amplificación de productos de PCR con oligos externos al locus *ackA-pta*, para comprobar la sustitución de *pta* por el casete de resistencia a kanamicina. En la Figura 5 se muestra el gel de electroforesis que confirma dicha sustitución en las candidatas seleccionadas. El producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos externos Fw_ackA_US y Rv_pta_DS tiene tamaño de 3,886 pb cuando en el locus *ackA-pta* el gen *pta* se encuentra intacto. Aquellas mutantes que en cambio han sufrido la sustitución de dicho gen por el casete de resistencia a Km, deben presentar un tamaño de 3,262 pb. Para corroborar la inserción del casete en el locus donde se ubicaba *pta* se hicieron PCR con la combinación de los oligos Fw_ackA_US - K1 y K2 - Rv_pta_DS, obteniendo los fragmentos esperados de 2,024 pb y 1,167 pb, respectivamente. K1 y K2 son oligonucleótidos que hibridan con regiones internas del gen Tn5 niomicina fosfotransferasa (Tn5-Nm-PT), el cual confiere resistencia al antibiótico.

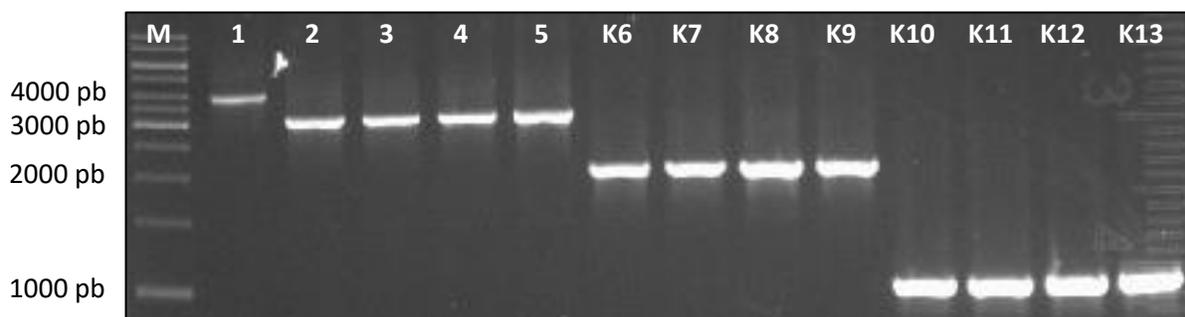


Fig. 5. Confirmación de la sustitución del gen *pta* por casete de resistencia a kanamicina en *E. coli* MG1655 (DE3).

Amplificaciones por PCR del locus ackA-pta con oligonucleótidos externos en cepa silvestre (carril 1); Keio pta⁻ (carril 2); candidatas pta⁻ (carriles 3 – 5); fragmentos obtenidos con oligonucleótidos externos (carriles K6 – 9) e internos (carriles K10 – 13) al casete de kanamicina, respectivamente.

7.2 Caracterización de cepas Δpta con glucosa y glicerol en matraz

Una vez eliminado el gen *pta* en la cepa MG1655 (DE3) (FR01) se evaluó su crecimiento, consumo de sustrato y producción de acetato con respecto a su progenitora MG1655 (DE3), comparando dichos parámetros al crecer con glucosa y glicerol (Figura 6 y Tabla 4). En el cultivo con glucosa, se alcanzaron concentraciones de peso seco celular (CDW, por sus siglas en inglés) de 1.53 g/L y 2.23 g/L para la cepa silvestre MG1655 (DE3) y FR01, respectivamente. La glucosa se consumió en 8 h en ambos casos. La velocidad específica de crecimiento (μ) fue muy similar en los dos cultivos, 0.46 h^{-1} para la cepa silvestre y de 0.43 h^{-1} en FR01. Se ha reportado que no hay variación entre los valores de μ para la cepa *E. coli* BW35113 (derivada de MG1655) y su mutante Δpta en medio mínimo suplementado con 3.6 g/L de glucosa (Castaño *et al.*, 2009). Esto coincide con los parámetros obtenidos en este estudio. Además, la cepa silvestre mostró un rendimiento biomasa/sustrato (Y_{xs}) de 0.29 g/g y FR01 0.40 g/g, lo que significa que una mayor cantidad del carbono consumido se canaliza a la generación de biomasa con esta mutante. En el estudio de Castaño *et al.* (2009), se menciona además una alta producción de lactato durante la fase exponencial, lo cual no se observó en nuestros experimentos. En cambio, la cepa silvestre produjo una ligera cantidad de etanol durante la fase exponencial (0.83 g/L), aunque éste no se generó en la mutante.

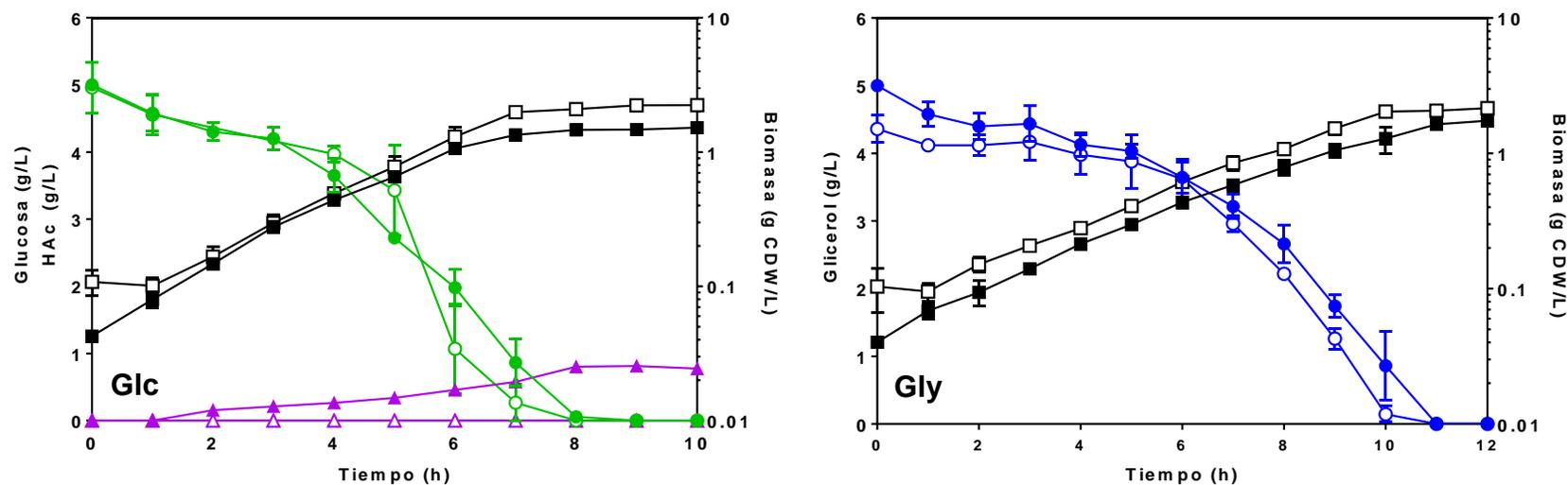


Fig. 6. Caracterización del crecimiento, consumo de glucosa (izquierda), glicerol (derecha) y producción de metabolitos con las cepas *E. coli* MG1655 (DE3) y FR01 en matraz.

MG1655 (DE3): símbolos cerrados; *FR01:* símbolos abiertos; *Biomasa:* recuadros; *Glucosa (Glc):* círculos verdes; *Glicerol (Gly):* círculos azules; *Acetato:* triángulos violetas.

Tabla 4. Parámetros cinéticos, estequiométricos y perfil de metabolitos obtenidos con las cepas MG1655 (DE3) y FR01 en matraz con glucosa o glicerol como fuente de carbono (FC).

Todos los cultivos se llevaron a cabo al menos por duplicado, se muestra el promedio \pm desviación estándar.

FC	Cepa	μ^{exp} (h ⁻¹)	Biomasa (g L ⁻¹)	Y_{xs} (g cél g FC ⁻¹)	Q_s (g FC L ⁻¹ h ⁻¹)	Ace (g/L)	For (g/L)	Suc (g/L)
Glucosa	WT	0.46 \pm 0.002	1.52 \pm 0.045	0.29 \pm 0.024	0.62 \pm 0.009	0.77 \pm 0.021	0.54 \pm 0.094	0.19 \pm 0.004
	Δpta	0.43 \pm 0.020	2.23 \pm 0.026	0.40 \pm 0.034	0.69 \pm 0.059	ND	0.06 \pm 0.001	ND
Glicerol	WT	0.32 \pm 0.001	1.74 \pm 0.095	0.34 \pm 0.019	0.42 \pm 0.031	ND	0.21 \pm 0.045	ND
	Δpta	0.32 \pm 0.021	2.11 \pm 0.086	0.46 \pm 0.032	0.42 \pm 0.038	ND	0.31 \pm 0.018	ND

Con la cepa silvestre se obtuvo un título residual de 0.77 g/L de acetato, el cual, como puede observarse en la Figura 6 (izquierda), comienza a ser consumido cuando se agotó la glucosa en el medio. Es muy probable que este comportamiento sea consecuencia del aumento en la disponibilidad de cAMP celular, cuya concentración depende a su vez de la represión catabólica originada durante el consumo de glucosa (Gosset, 2005). La acumulación de cAMP lleva a la expresión de genes regulados por la proteína receptora de cAMP (CRP), entre los que se encuentran componentes del metabolismo de acetato (Bernal *et al.*, 2016). La cepa mutante, por su parte, no produjo niveles de acetato detectables a lo largo del cultivo, por lo cual la eliminación del gen *pta* presentó el fenotipo que se buscaba. Además, al mostrar mayor concentración y rendimiento de biomasa, así como menos formación de metabolitos, se sugiere que existe una mayor disponibilidad de carbono y de precursores metabólicos, p. ej. acetil-CoA, lo cual permite que se genere mayor cantidad de biomasa. Otros metabolitos como formiato (0.54 g/L) y succinato (0.19 g/L) también fueron producidos por la cepa silvestre, pero no por la cepa mutante. Como consecuencia de la eliminación de *pta*, Castaño *et al.* (2009) encontraron una menor expresión del gen *pflA*, el cual codifica para el activador de la piruvato:formiato liasa. Estos autores también observaron que la actividad de la enzima isocitrato deshidrogenasa (*idhA*) en la mutante Δpta era casi 30 veces superior con respecto a la isocitrato liasa (*aceA*), enzima que genera glioxilato y succinato en el ciclo del glioxilato, cuando la glucosa ya no está en exceso y el catabolismo busca seguir dirigiendo carbono a la síntesis de biomasa.

Cuando se suplementó el medio con 5 g/L de glicerol, se observó un crecimiento celular de 1.74 g/L para la cepa silvestre y 2.11 g/L para FR01 en el momento en el cual se agotó la fuente de carbono (Figura 6, derecha), una tendencia similar a la observada con glucosa. La μ con ambas cepas fue igual a 0.32 h^{-1} , lo cual es 30% menor en comparación con los cultivos en glucosa. Por su parte, los rendimientos de biomasa/sustrato resultaron de 0.34 g/g y 0.46 g/g para la cepa silvestre y mutante, respectivamente. Esto indica que, en comparación con glucosa, ambas cepas distribuyen una mayor cantidad de glicerol a la síntesis de biomasa, principalmente la mutante que destina el 46% de carbono para este fin.

De modo similar a los cultivos con glucosa, se produjo formiato (0.21 g/L) y etanol (0.83 g/L) en bajas cantidades con la cepa silvestre, mientras que la mutante sólo generó formiato (0.31 g/L). Se sabe que ambos metabolitos son generados en condiciones anaerobias, por lo que se sugiere que en estos cultivos en matraz se alcanzaron condiciones de limitación de oxígeno durante algún periodo. Interesantemente, ninguna de las cepas generó cantidades detectables de acetato durante el cultivo con glicerol.

En cuanto al comportamiento de los cultivos observado con glicerol, puede tomarse como referencia lo reportado por Martínez *et al.* (2012), quienes realizaron un perfil transcriptómico y proteómico para analizar la expresión diferencial de diversos genes en *E. coli* cuando crece con glicerol como única fuente de carbono. La sobreexpresión de los genes *glpF* (principal transportador de glicerol) y *glpK* (glicerol fosfato cinasa) corresponderían con lo esperado, pues al no existir glucosa en el medio los niveles de cAMP intracelular, y por ende su acoplamiento a la proteína CRP, aumentan, incrementando la expresión de genes para consumo de fuentes de carbono alternas, en este caso el glicerol. El transportador de acetato, ActP, también es activado por cAMP-CRP. No obstante, algunas de las conclusiones más resaltables de este estudio se refieren a cómo el glicerol podría ser reconocido como una fuente de carbono menos eficiente que la glucosa. De manera que vías de reciclamiento compuesta por los genes *poxB*, *acs*, *pta* y *actP*, todos elementos de la vía de metabolismo y transporte de acetato, podrían activarse; así como *acnAB*, *aceAB* y *glcB*, de la vía del glioxilato, la cual se activa generalmente cuando la concentración de glucosa en el medio es crítica.

En lo que a las vías de acetato se refiere, se ha visto que la sobreexpresión de *poxB* se relaciona con la de *acs*, por lo que, si bien una mayor proporción de acetato provendría de la oxidación de piruvato, esto es parte de un ciclo fútil donde dicho producto puede ser coutilizado con el glicerol. Los genes mencionados anteriormente son parte del regulón *RpoS*. *RpoS* es importante en la adaptación y mantenimiento de un balance adecuado durante el crecimiento en glicerol como

fuente de carbono, debido a que regula principalmente la expresión de genes involucrados en el catabolismo durante estrés nutricional (Martínez *et al.*, 2012).

Otros reportes atribuyen la generación de acetato como un subproducto generado cuando *E. coli* sobrepasa una μ crítica, estimada de 0.35 h^{-1} en medios de cultivo definidos (Paalme *et al.*, 1989; Lee, 1996). Aunque se sabe que este valor varía según la cepa y el medio utilizados, es semejante con los datos experimentales observados con la cepa silvestre *E. coli* MG1655 (DE3) en matraz. La μ en dicho cultivo con glucosa fue de 0.46 h^{-1} , mientras que la del cultivo crecido en glicerol fue 0.32 h^{-1} , observándose la producción de acetato (0.77 g/L) sólo cuando se utiliza glucosa como fuente de carbono.

7.3.1 Evaluación de la vía sintética de consumo de glicerol con la cepa MG1655 (DE3)/pACYCDuet-Gly

Se evaluó el crecimiento de la cepa silvestre MG1655 (DE3) y perfil de metabolitos en fermentadores bajo condiciones limitantes de oxígeno (OTR = 5.87 mmoles_{O2}/L.h) (Figura 8, Tabla 5). Esta cepa mostró un aumento en su capacidad de crecimiento, con una μ de 0.35 h⁻¹, ligeramente mayor con respecto al crecimiento de la cepa sin transformar en matraz, al igual que el rendimiento biomasa/sustrato con un valor de 0.36 g/g. En comparación con el resultado obtenido en matraz, la Q_s se duplicó, alcanzando un valor de 1.74 g/Lh. Este incremento se atribuiría principalmente a la cantidad elevada de células que se genera bajo las condiciones controladas que conlleva el uso de un fermentador, ya que la biomasa máxima alcanzada fue de 6.44 g CDW/L (>15 DO₆₀₀). Aunque, en parte podría ser consecuencia de una mayor generación de poder reductor (NAD(P)H) proporcionado por la vía sintética de consumo de glicerol. Los metabolitos producidos por la cepa silvestre fueron acetato (6.18 g/L), formiato (1.56 g/L) y lactato (1.87 g/L), los cuales se produjeron a partir de que la concentración del oxígeno disuelto en el medio disminuyó a 0%, que además coincide con el inicio de la fase estacionaria del cultivo.

Al analizar la productividad volumétrica de acetato en la fase estacionaria (0.39 g/Lh), esta coincide con la etapa de mayor consumo volumétrico de glicerol (Q_s , 2.76 g/Lh). La alta tasa de consumo de glicerol pudo haber generado un evento de sobreflujo metabólico, de manera que el metabolismo de carbono podría dirigir el carbono hacia acetato mediante el sistema *ackA-pta* (Castaño *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2012). Llama la atención que, al agotarse el glicerol, el acetato generado no fue reinternalizado, como si se observó en el experimento en matraz. En cuanto al formiato y lactato, su producción aumentó significativamente.

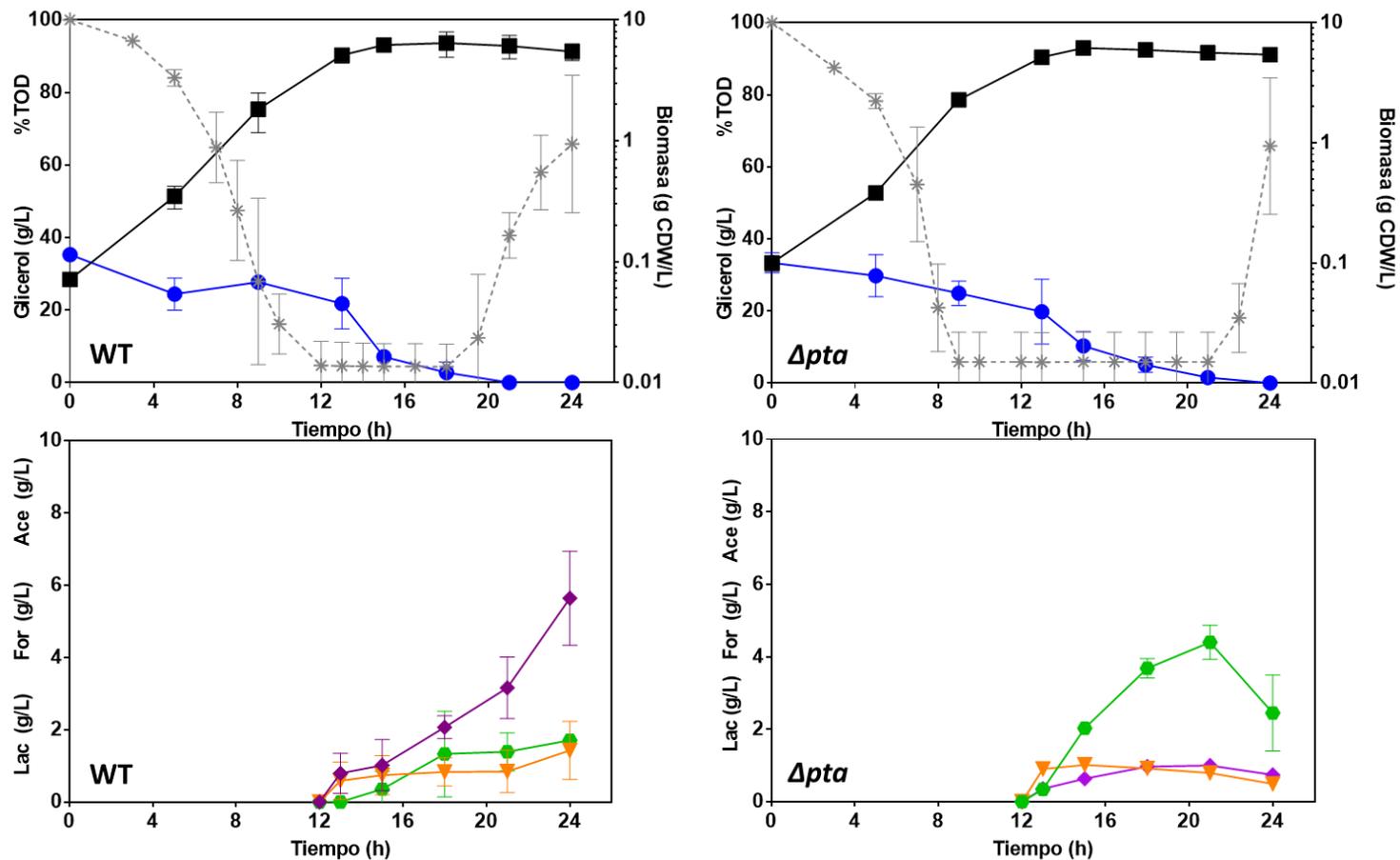


Fig. 8. Evaluación de la cepa silvestre MG1655 (DE3) (WT) y la mutante Δpta (FR01) transformadas con el vector pACYCDuet-Gly en fermentadores de 1 L bajo condiciones limitantes de oxígeno

En la parte superior se muestra la curva de crecimiento (cuadros negros), consumo de glicerol (círculos azules) y perfil de oxígeno disuelto (asteriscos, línea punteada). En la parte inferior se muestra la producción de metabolitos como formiato (triángulos invertidos naranjas), acetato (diamantes violetas), y lactato (hexágonos verdes).

Tabla 5. Parámetros cinéticos y estequiométricos para las cepas MG1655 (DE3) y FR01 transformadas con el vector pACYCDuet-Gly.

Todos los cultivos se llevaron a cabo al menos por duplicado, se muestra el promedio \pm desviación estándar.

Cepa	μ^{exp} (h ⁻¹)	Biomasa (g CDW/L)	Y_{xs} (g cél g Gly ⁻¹)	Q_s (g Gly L ⁻¹ h ⁻¹)	Formiato (g/L)	Acetato (g/L)	Lactato (g/L)
- <i>E. coli</i> MG1655 (DE3)/pACYCDuet-Gly [<i>alrD</i> , <i>aldH</i> (<i>R. eutropha</i>)]	0.35 \pm 0.012	6.44 \pm 1.514	0.36 \pm 0.085	1.74 \pm 0.061	1.56 \pm 0.802	6.18 \pm 2.1.35	1.87 \pm 0.083
- <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) Δ <i>pta</i> /pACYCDuet-Gly [<i>alrD</i> , <i>aldH</i> (<i>R. eutropha</i>)]	0.40 \pm 0.001	6.17 \pm 0.015	0.35 \pm 0.135	1.63 \pm 0.155	0.52 \pm 0.071	0.79 \pm 0.128	2.58 \pm 1.047

7.3.2 La eliminación del gen *pta* genera cambios en el perfil de metabolitos producidos

Con la cepa FR01 transformada con el vector pACYCDuet-Gly, se observa un crecimiento similar al de la cepa silvestre (Figura 8, Tabla 5). Su μ es la más alta obtenida para las cepas evaluadas durante este trabajo, con un valor de 0.40 h^{-1} . El rendimiento biomasa/sustrato fue de 0.35 g/g y el valor de Q_s de 1.63 g/Lh . Al contrario de la cepa silvestre, en este caso el metabolito más abundante es lactato (2.58 g/L), seguido por acetato (0.79 g/L) y formiato (0.52 g/L). El lactato se sintetizó a una mayor tasa (0.43 g/Lh) cuando se alcanzaron las condiciones limitantes de oxígeno, que coincide con el consumo volumétrico máximo de glicerol (2.19 g/Lh). Es posible que el catabolismo de glicerol en la mutante Δpta se haya dirigido a la generación de lactato, como estrategia para reoxidar el NADH generado, y así mantener el balance redox en la célula. De hecho, lo que se observa es una generación constante de lactato hasta alcanzar un título de 4.64 g/L . Parte del lactato se consumió una vez que el glicerol se agotó y aumentó la tensión de oxígeno disuelto en el medio.

Considerando que la ruta heteróloga de metabolismo de glicerol (AlrD-AldH) funciona del modo propuesto, se generaría una molécula de NADPH por cada molécula de glicerol consumido. Un excedente de NADPH es benéfico durante el intercambio de electrones para proveer de poder reductor a numerosas reacciones anabólicas, responsables de la biosíntesis de componentes celulares importantes como lípidos y ácidos nucleicos (Spaans *et al.*, 2015). En caso de un excedente de NADPH, generado por la vía heteróloga de consumo, éste podría ser interconvertido en NADH por la transhidrogenasa UdhA presente en *E. coli*

Con ambas cepas se produjo formiato, aunque teóricamente la enzima piruvato:formiato liasa (PFL) tiene su máximo de actividad en condiciones sin oxígeno, la generación de formiato indica que si hay cierta actividad. Esta enzima genera formiato y acetyl-CoA a partir del piruvato en anaerobiosis, mientras que la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH) cataliza la conversión de piruvato en acetyl-CoA y CO_2 en condiciones aerobias.

El formiato generado en las condiciones de limitación de oxígeno resulta consistente con lo reportado por Sauter & Sawers (1990), quienes demostraron que el gen *pfIB* puede expresarse tanto en condiciones aerobias como anaerobias en cepas de *E. coli*.

Además de formiato, la cepa silvestre produjo un título final de 6.18 g/L de acetato, 7.8 veces mayor a lo generado con FR01 (0.79 g/L). Probablemente, en el caso de la cepa silvestre, el exceso de NADPH producido pudo inhibir a la isocitrato deshidrogenasa en el TCA, generando una mayor disponibilidad de Acetil-CoA y/o piruvato, los cuales a partir de AckA-Pta y PoxB podrían sintetizar acetato (Centeno *et al.*, 2014).

7.4 Producción de (R)-3HB con glicerol bajo condiciones limitantes de oxígeno utilizando *E. coli*/pTrc-R3HB

Para comprobar que las cepas de *E. coli* MG1655 (DE3) y FR01 fueron transformadas con el vector pTrc-R3HB se hicieron digestiones con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, como se describió en la estrategia experimental (Figura 9). El vector tiene un tamaño de 7,011 pb, de los cuales 2,886 pb corresponden al operón conformado por *phbA_{AV}*, *phbB_{AV}*, y *tesB_{EC}*.

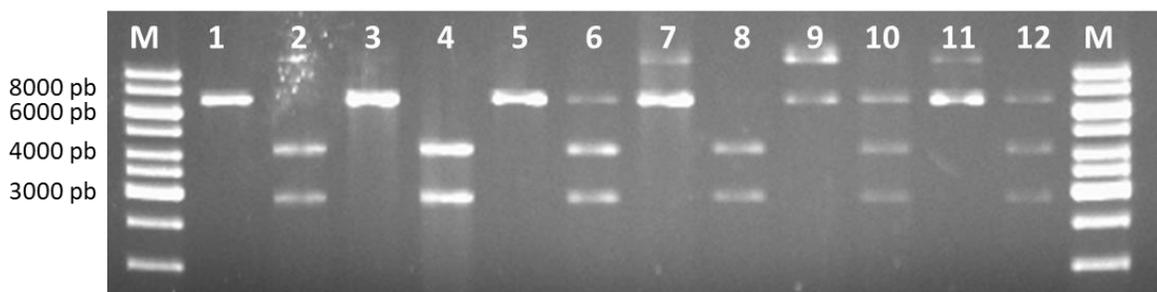
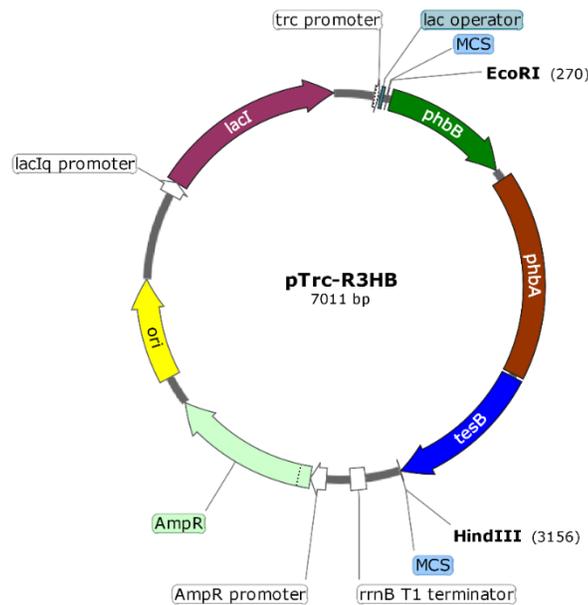


Fig. 9. Vector pTrc-R3HB y patrones de digestión de plásmido purificado de las cepas *E. coli* MG1655 (DE3) y FR01.

Arriba: representación esquemática del vector pTrc-R3HB (García-Benítez, 2016); Abajo: gel de agarosa al 1%.

Carriles 1, 3 y 5: *EcoRI* en MG1655 (DE3); carriles 2, 4 y 6: *EcoRI* y *HindIII* con MG1655 (DE3); carriles 7, 9 y 11: *EcoRI* en FR01; carriles 8, 10 y 12: *EcoRI* y *HindIII* en FR01.

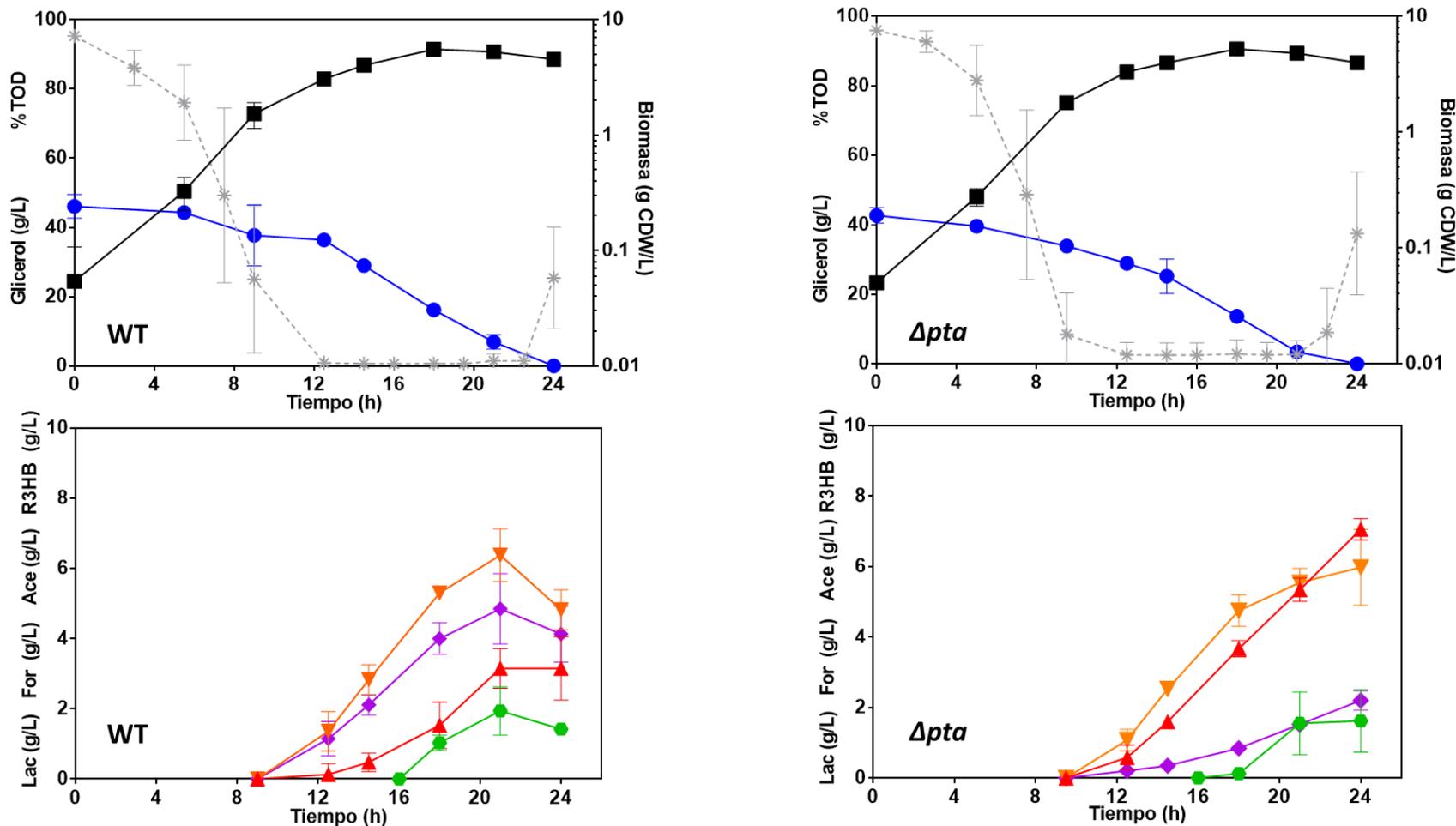


Fig. 10. Evaluación de la cepa silvestre MG1655 (DE3) y Δpta (FR01) transformadas con el vector pTrc-R3HB en fermentadores bajo condiciones limitantes de oxígeno

En la parte superior se muestra la curva de crecimiento (cuadros negros), consumo de glicerol (círculos azules) y perfil de oxígeno disuelto (asteriscos, línea punteada). En la parte inferior se muestra la producción de metabolitos como formiato (triángulos invertidos naranjas), acetato (diamantes violetas), (R)-3HB (triángulos rojos) y lactato (hexágonos verdes).

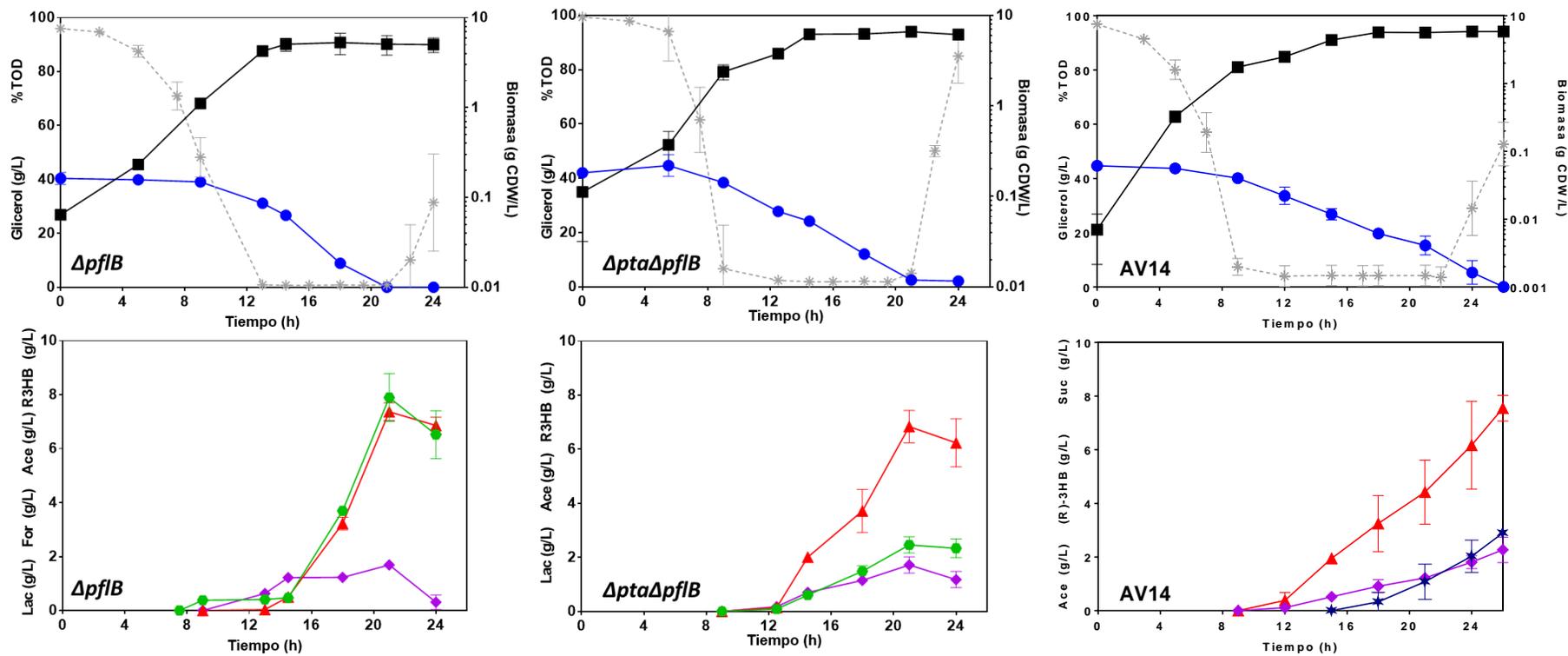


Fig. 10. (Continuación)

En la parte superior se muestra la curva de crecimiento (cuadros negros), consumo de glicerol (círculos azules) y perfil de oxígeno disuelto (asteriscos, línea punteada). En la parte inferior se muestra la producción de metabolitos como formiato (triángulos invertidos naranjas), acetato (diamantes violetas), (R)-3HB (triángulos rojos), lactato (hexágonos verdes) y succinato (estrellas azules).

Tabla 6. Parámetros cinéticos, estequiométricos y perfil de metabolitos para las cepas MG1655 (DE3), Δpta (FR01), $\Delta pflB$ (FR02), $\Delta pta\Delta pflB$ (FR03) y AV14 transformadas con el vector pTrc-R3HB.

Todos los cultivos se llevaron a cabo al menos por duplicado, se muestra el promedio \pm desviación estándar. Y_{PS} (máx. Teórico) = 0.565 g (R)-3HB/g glicerol; Est = productividad volumétrica durante la fase estacionaria bajo condiciones limitantes de O_2 . ND = no detectado.

Medio y condiciones de cultivo	Cepa/vector	μ^{exp} (h ⁻¹)	Biomasa máx (gCDW/L)	Y_{XS} (g cél g Gly ⁻¹)	Q_s (g Gly L ⁻¹ h ⁻¹)	Suc (g/L)	For (g/L)	Ace (g/L)	Lac (g/L)	(R)-3HB (g/L)	Y_{PS} (g (R)-3HB g FC ⁻¹)	Q_p (g (R)-3HB L ⁻¹ h ⁻¹)
Glicerol 40 g/L 3X NH ₄ Lim. O ₂ .	- <i>E. coli</i> MG1655 (DE3)/pTrc-R3HB [<i>phbA</i> , <i>phbB</i> (<i>A. vinelandii</i>), <i>tesB</i> (<i>E. coli</i>)]	0.35 \pm 0.008	5.55 \pm 0.282	0.38 \pm 0.042	1.57 \pm 0.092	ND	4.82 \pm 0.567	4.13 \pm 0.844	1.94 \pm 0.687	3.15 \pm 0.921	0.070 \pm 0.044 (12.38%)	0.13 \pm 0.075 (Est = 0.31 \pm 0.136)
	- <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) Δpta /pTrc-R3HB [<i>phbA</i> , <i>phbB</i> (<i>A. vinelandii</i>), <i>tesB</i> (<i>E. coli</i>)]	0.33 \pm 0.016	6.06 \pm 0.446	0.30 \pm 0.147	1.61 \pm 0.084	ND	5.98 \pm 1.081	2.20 \pm 0.271	1.62 \pm 0.890	7.06 \pm 0.303	0.165 \pm 0.002 (29.22%)	0.29 \pm 0.015 (Est = 0.44 \pm 0.006)
	- <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) $\Delta pflB$ /pTrc-R3HB [<i>phbA</i> , <i>phbB</i> (<i>A. vinelandii</i>), <i>tesB</i> (<i>E. coli</i>)]	0.34 \pm 0.014	5.29 \pm 0.572	0.36 \pm 0.064	1.69 \pm 0.198	ND	ND	1.69 \pm 0.052	7.90 \pm 0.886	7.37 \pm 0.329	0.175 \pm 0.009 (31.13%)	0.26 \pm 0.025 (Est = 0.84 \pm 0.062)
	- <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) $\Delta pta\Delta pflB$ /pTrc-R3HB [<i>phbA</i> , <i>phbB</i> (<i>A. vinelandii</i>), <i>tesB</i> (<i>E. coli</i>)]	0.29 \pm 0.014	6.19 \pm 0.125	0.35 \pm 0.028	1.83 \pm 0.111	ND	ND	1.72 \pm 0.125	2.46 \pm 0.083	6.84 \pm 0.721	0.16 \pm 0.019 (28.82%)	0.33 \pm 0.051 (Est = 0.76 \pm 0.058)
	- <i>E. coli</i> AV14/pTrc-R3HB [<i>phbA</i> , <i>phbB</i> (<i>A. vinelandii</i>), <i>tesB</i> (<i>E. coli</i>)]	0.31 \pm 0.018	6.05 \pm 0.376	0.24 \pm 0.022	1.70 \pm 0.084	2.90 \pm 0.184	ND	2.27 \pm 0.476	ND	7.55 \pm 0.478	0.169 \pm 0.013 (29.92%)	0.27 \pm 0.018 (Est = 0.47 \pm 0.13)

7.4.1 Evaluación cinética de la producción de R3HB con la cepa *E. coli* MG1655 (DE3)

La cepa silvestre MG1655 (DE3) (Figura 10, Tabla 6) mostró una μ igual a 0.35 h^{-1} , un rendimiento biomasa/sustrato de 0.38 g/g y una Q_s de 1.57 g/Lh . Una vez alcanzada la fase estacionaria, comenzó la generación de productos como formiato (4.82 g/L), acetato (4.13 g/L), lactato (1.94 g/L) y (R)-3HB (3.15 g/L). La producción de estos metabolitos coincide con el inicio de la fase estacionaria de crecimiento, y a su vez con la limitación de oxígeno. Se esperaba que la mayor parte del acetil-CoA se dirigiera a la generación de metabolitos, entre ellos el (R)-3HB, y una mínima proporción al TCA para generar sólo energía de mantenimiento. De manera que a esta fase del cultivo se le denominó como “fase de producción”. Por lo observado, las condiciones de agitación y aireación utilizadas en el cultivo con glicerol (800 rpm , 0.5 vvm) son idóneas para alcanzar condiciones limitantes de oxígeno en fermentador ($\text{OTR} = 5.87 \text{ mmolO}_2/\text{Lh}$), como se reportó antes en cultivos con glucosa (García-Benítez, 2016).

Para el (R)-3HB, se calculó una productividad global de 0.13 g/Lh y 0.31 g/Lh en la fase de producción, así como un rendimiento producto/sustrato de 0.07 g/g , equivalente a 12.4% del máximo teórico ($0.565 \text{ g R3HB/g glicerol}$). Sin embargo, al no contar con ninguna ruta de fermentación eliminada, la cepa silvestre distribuyó más del 20% del carbono hacia formiato y lactato, ambos productos del metabolismo anaerobio de *E. coli*, así como a acetato (13%) que también es indeseable como producto en este proyecto.

7.4.2 La cepa FR01 (Δ pta) produce R3HB y formiato simultáneamente

La cepa FR01 transformada con el vector pTrc-R3HB se cultivó bajo las mismas condiciones que la cepa silvestre (Figura 10, Tabla 6), aunque mostró una disminución de la μ y rendimiento biomasa/sustrato, cuyos valores fueron de 0.33 h^{-1} y 0.30 g/g , respectivamente. Por su parte, la Q_s no cambió de forma significativa (1.61 g/Lh).

La cepa FR01/pTrc-R3HB produjo formiato (5.98 g/L), acetato (2.20 g/L), lactato (1.62 g/L) y (R)-3HB (7.08 g/L). En comparación con la silvestre, resalta una disminución del 50% en el título de acetato y un incremento del 55% en el de (R)-3HB; así como un incremento de 2.23 veces en la productividad volumétrica global y de 2.35 veces en el rendimiento (R)-3HB/sustrato, que equivale al 29.22% del máximo teórico.

El acetato residual pudo producirse por diversas vías. Una de ellas es la actividad de la piruvato oxidasa (PoxB), que permanece activa y cuya eliminación en conjunto con *pta* como estrategia para erradicar la producción de este metabolito ha mostrado afectaciones en el crecimiento de *E. coli* en otros trabajos (García-Benítez, 2016). Así mismo, la eliminación de alguno de los genes involucrados en el metabolismo de acetato podría tener efectos negativos, como podría ser la actividad de *actP* y *acs*, involucrados en la reinternalización y transformación de acetato en Acetil-CoA (Castaño *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2012). Cabe mencionar la sobreexpresión de *tesB* como parte del operón inducible por el promotor *trc* en el vector pTrc-R3HB. Si bien no se tiene clara su participación en el metabolismo de *E. coli*, la promiscuidad de la enzima TesB para hidrolizar el residuo de CoA de diferentes cadenas carbonadas ha sido ya discutida. Por lo que, a pesar de mostrar mayor afinidad por sustratos de más de ocho carbonos (C8), hay reportes de su participación sobre Acetil-CoA (C2), de tal manera que la generación de acetato se vería favorecida (Nie *et al.*, 2008; McMahon *et al.*, 2014).

En conjunto con el acetato, se obtuvo un título de lactato muy similar al observado con la cepa silvestre, que es generado de forma tardía con respecto al resto de los metabolitos. Esto da pie a pensar que la síntesis de estos productos se ve favorecida en un ambiente de limitación de oxígeno. Esto coincide con reportes previos, donde se utilizó la cepa MG1655 para demostrar cómo el regulador ArcA se encuentra fosforilado y presenta más del 70% de su actividad aún en condiciones de aireación, favoreciendo el flujo de carbono hacia productos de fermentación (Henkel *et al.*, 2014).

El título de formiato fue muy similar al de (R)-3HB. En una reacción catalizada por PFL, se produce un mol de formiato y uno de Acetil-CoA por cada mol de piruvato consumido. Dado que para producir un mol de (R)-3HB son necesarios dos moles de Acetil-CoA, entonces se producirían también dos moles de formiato, resultando en una relación (R)-3HB:formiato de 1:2 (mol:mol). Con los datos experimentales se calculó una relación de 1:1.92, por lo que la síntesis de (R)-3HB parece depender de la producción de formiato en la cepa FR01/pTrc-R3HB.

7.4.3 La eliminación de *pfIB* permite dirigir más carbono a (R)-3HB y otros productos de fermentación

Con el objetivo de impulsar el flujo de piruvato hacia acetil-CoA sin la generación de formiato, se inactivó el gen *pfIB* (Figura 11) mediante la técnica de transducción por fagos como se explica en la estrategia experimental.

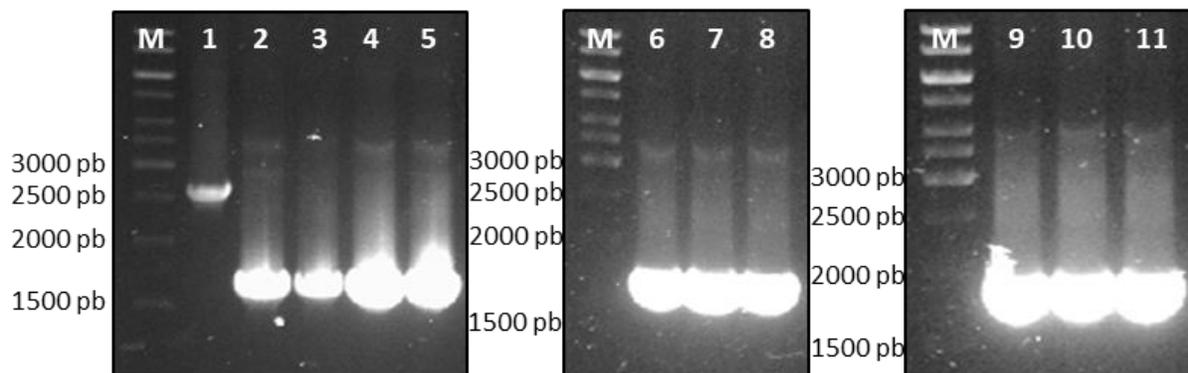


Fig. 11. Confirmación de la sustitución del gen *pfIB* por un casete de resistencia kanamicina en *E. coli* MG1655 (DE3)

Amplificaciones por PCR de la región externa al gen pfIB en ADN cromosomal de la cepa silvestre (carril 1); Keio pfIB (carril 2); candidatas pfIB (carriles 3 – 5); candidatas ΔptaΔpfIB (carriles 6 – 8); confirmación del genotipo Δpta en fondo genético ΔptaΔpfIB (carriles 9 – 11).

Luego de comprobar la mutante $\Delta pfIB$ por PCR, se transformó con el vector pTrc-R3HB y se cultivó en fermentador a las mismas condiciones anteriores (Figura 10, Tabla 6). La μ para la cepa FR02/pTrc-R3HB fue de 0.34 h^{-1} , con un rendimiento biomasa/sustrato igual a 0.38 g/g y Q_s de 1.69 g/Lh .

El aumento en el consumo de sustrato ya ha sido reportado en cepas de *E. coli* $\Delta pflB$ modificadas para la producción de PHB, cuando se utiliza glucosa como fuente de carbono (Wei *et al.*, 2015).

La producción de formiato es nula ya que, contrario a la generación de acetato, no existe otro gen en *E. coli* que exprese la maquinaria necesaria para sintetizar este metabolito. Por otro lado, el título de acetato fue de 1.69 g/L, mientras que de lactato y (R)-3HB se obtuvieron 7.90 g/L y 7.37 g/L, respectivamente. Como puede observarse, la generación de lactato se da de forma simultánea con el (R)-3HB (Figura 10). Los altos títulos de lactato en FR02 son congruentes con la generación de acetyl-CoA por PDH, dada la ausencia de PFL, ya que la generación de un mol de NADH por cada mol de piruvato oxidado promovería la producción de lactato. Esto puede observarse más claramente al calcular las relaciones molares de lactato con respecto a (R)-3HB para las cepas evaluadas, donde la cepa FR02 presenta hasta 58% más de lactato por cada mol de (R)-3HB en la silvestre, así como 21% al compararla con FR01.

La cepa FR02/pTrc-R3HB mostró un valor de productividad volumétrica global de (R)-3HB (0.26 g/Lh), bastante similar al de la cepa FR01 (0.29 g/Lh). No obstante, cuando el análisis es visualizado únicamente en la fase de limitación de oxígeno, la cepa FR02 (0.84 g/Lh) casi duplica a lo obtenido por FR01 (0.44 g/Lh). En cuanto al rendimiento producto/sustrato, éste alcanza un valor de 0.17 g/g, equivalente al 31.13% del máximo teórico.

7.4.4 La doble eliminación de *pta* y *pflB* prioriza la producción de (R)-3HB

Después de observar que la mutante FR01 (Δpta) transformada con pTrc-R3HB producía (R)-3HB con rendimientos cercanos al 30% del máximo teórico, se consideró la generación de una doble mutante $\Delta pta\Delta pflB$ (FR03). Lo anterior con el objetivo de minimizar el carbono que es dirigido hacia la producción de formiato, mostrado por la cepa FR01, y así canalizar el flujo hacia (R)-3HB. En la Figura 11 se muestran las bandas obtenidas para las candidatas $\Delta pta\Delta pflB$, donde la sustitución de *pflB*::Km presenta un tamaño de 1,853 pb y la región *ackA* – *pta* sin

el casete de resistencia a Km, en este último locus, muestra un tamaño de 1,915 pb. Después de comprobar las mutaciones en el cromosoma, se transformó la doble mutante con el vector pTrc-R3HB, lo cual se confirmó al digerir con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*.

Al evaluar la cepa FR03/pTrc-R3HB en fermentador (Figura 10, Tabla 6), se obtuvo una μ de 0.29 h^{-1} , 18% menor al comparar con la cepa silvestre transformada con el mismo vector. Por el contrario, la Q_s fue de 1.83 g/Lh , de manera que aunque la doble eliminación de *pta* y *pfIB* repercute en la μ , también ocasiona que se consuma el carbono a mayor velocidad con respecto a la silvestre, FR01 y FR02 transformadas con pTrc-R3HB. El rendimiento biomasa/sustrato resultó de 0.35 g/g , por lo que no hay diferencias significativas con el resto de las cepas evaluadas.

Por otro lado, el perfil de metabolitos producidos mostró títulos de 1.72 g/L de acetato, 2.46 g/L de lactato y 6.84 g/L de (R)-3HB, muy similar al obtenido con la cepa FR02, aunque el título final de lactato disminuyó 3.2 veces, siendo el (R)-3HB el producto mayoritario con un rendimiento producto/sustrato de 0.16 g/g (28.82% del máximo teórico); así como una productividad volumétrica global de 0.33 g/Lh , 14% mayor que la cepa FR02. Si se analiza la producción de (R)-3HB sólo durante la fase de producción, esta productividad es de 0.76 g/Lh , es decir, 6% menos que FR02. Considerando lo anterior, la cepa FR03 no muestra cambios relevantes durante la fase de crecimiento, pero si una mayor distribución de carbono hacia (R)-3HB durante la fase de producción.

7.4.5 Producción de (R)-3HB en una cepa sin vías fermentativas

Para explorar el comportamiento de la vía de producción de (R)-3HB en una cepa incapaz de generar productos de fermentación, se utilizó la cepa de *E. coli* AV14, la cual se generó en nuestro grupo de trabajo a partir de la cepa MG1655 (García-Benítez, 2016). Se eliminaron primeramente los genes $\Delta pfIB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$ y el transportador de xilosa $\Delta xyIFGH$. Posteriormente, la cepa fue sometida a un proceso de evolución adaptativa en laboratorio (EAL), con la finalidad de mejorar su crecimiento en xilosa como única fuente de carbono. Así se obtuvo la cepa JU15

(Utrilla *et al.*, 2012), en la cual se eliminaron después los genes $\Delta ldhA$, $\Delta poxB$ y Δpta , dando lugar a un genotipo carente de las principales vías fermentativas, lo cual puede ser aprovechado para la obtención de compuestos derivados del piruvato, como (R)-3HB.

Al cultivar la cepa AV14/pTrc-R3HB (Figura 10, Tabla 6), la μ (0.31 h^{-1}), Q_s (1.70 g/Lh) y rendimiento biomasa/sustrato (0.24 g/g) no son muy distintos de lo observado con las otras mutantes evaluadas. El perfil de metabolitos, sin embargo, mostró acetato (2.27 g/L), succinato (2.90 g/L) y (R)-3HB (7.55 g/L). El título de (R)-3HB es el mayor reportado en este trabajo, aunque no representa una diferencia significativa con respecto a las cepas FR01 y FR02 transformadas con pTrc-R3HB. El rendimiento producto/sustrato fue de 0.169 g/g , es decir, 29.92% del máximo teórico. La productividad volumétrica global para esta cepa fue de 0.27 g/Lh , o bien 0.47 g/Lh , si se contempla la fase de producción únicamente. La similitud de parámetros entre las cepas AV14 y FR02, transformadas con pTrc-R3HB, resalta la importancia en la eliminación del gen *pflB*.

Además de (R)-3HB, llama la atención la producción de succinato, puesto que a la cepa AV14 le fue eliminado el gen *frdA*, componente del clúster *frdABCD* que codifica para la enzima fumarato reductasa (QFR), misma a su vez lleva a cabo la reducción de una molécula de fumarato a succinato en la cadena transportadora de electrones, bajo condiciones anaerobias. Sin embargo, aún podría producirse succinato por diferentes medios, como la ruta del glioxilato. Esta ruta funciona como un desvío (“bypass”) en el metabolismo, el cual reduce la pérdida de carbono en forma de CO_2 durante el TCA mediante la enzima isocitrato liasa (ICL), que a partir de isocitrato da lugar a succinato y glioxilato, siendo este último transformado en malato (Dolan & Welch, 2018). Aunque no se estudió la expresión o actividad de dicha ruta en este trabajo, se ha discutido anteriormente su relevancia cuando *E. coli* consume glicerol como única fuente de carbono. Además de esta vía, existen varios reportes sobre la similitud estructural y funcional entre la enzima SQR (succinato deshidrogenasa) y QFR de *E. coli*, al punto en que, bajo condiciones

anaerobias, SQR puede llegar a sustituir la actividad de QFR (Maklashina *et al.*, 1998; Yankovskaya *et al.*, 2003).

Si bien en este proyecto la producción de succinato no es parte de los objetivos, diferentes investigaciones se han enfocado en la coproducción de PHB y succinato como un sistema integrado de biorrefinería para el aprovechamiento de recursos y energía (Nieder *et al.*, 2019), por lo que los títulos obtenidos con la cepa AV14/pTrc-R3HB podrían funcionar para una plataforma de este tipo con (R)-3HB.

7.4.6 La producción de (R)-3HB a partir de glicerol es comparable con otros estudios

Tseng *et al.* (2009) evaluaron la producción de (R)-3HB en *E. coli* MG1655 (DE3) mediante diferentes vías, entre las que se encuentra una ruta similar a la utilizada en este trabajo (*phbA-phbB-tesB*). A partir de LB suplementado con 20 g/L de glucosa, estos autores reportaron un rendimiento producto/biomasa de (R)-3HB de 3.63 g/g. Por su parte, García-Benítez (2016) obtuvo un rendimiento producto/biomasa de 1.64 g/g, 66% menor al obtenido por Tseng *et al.*, pero empleando medio mínimo AM1 con 40 g/L de glucosa. En el presente trabajo, se obtuvieron rendimientos producto/biomasa de 0.568 g/g, 1.17 g/g, 1.39 g/g y 1.04 g/g con las cepas MG1655 (DE3), FR01, FR02 y FR03, respectivamente, utilizando el medio AM1 con 40 g/L de glicerol. Estos rendimientos son significativos si se comparan con reportes donde se utilizaron medios enriquecidos (0.844 g PHB/g por Wei *et al.*, 2015) o cultivos por lote alimentado (0.731 g (R)-3HB/g por Liu *et al.*, 2007; 0.860 g PHB/g por Lin *et al.* 2015) como estrategias para incrementar la concentración de células y, por tanto, los títulos de (R)-3HB o PHB.

También existen reportes sobre la producción de PHB a partir de glucosa donde se utilizaron cepas de *E. coli* Δ *pta*, buscando un mejor aprovechamiento de acetil-CoA. Wei *et al.* (2015) obtuvieron una productividad volumétrica global y un rendimiento producto/sustrato de 0.208 g/Lh y 0.17 g/g, respectivamente, con la cepa JW2294 Δ *pta* y la ruta de producción de *R. eutropha*. Por su parte, Centeno-

Leija (2014) alcanzó un rendimiento producto/sustrato 4.6 veces superior al de Wei *et al.*, así como una productividad 1.8 veces mayor. Centeno-Leija, además de emplear la ruta de producción de PHB de *A. vinelandii*, sobreexpresó el gen *gapN* de *S. mutans* para incrementar el NADPH disponible, demostrando que una mayor disponibilidad de este cofactor es benéfica para la actividad de acetoacetyl-CoA reductasa (PhbB). Para este trabajo, con la cepa FR01 transformada con pTrc-R3HB, se obtuvo una productividad de 0.29 g/Lh y un rendimiento producto/sustrato de 0.17 g/g de (R)-3HB. Se propone que acoplar el consumo de glicerol con la producción de NADPH (Sección 7.5) favorecería los títulos de (R)-3HB, de acuerdo con lo reportado en estudios previos.

7.4.7 Todas las mutantes distribuyen más carbono hacia (R)-3HB durante la fase de producción

A partir de los datos experimentales obtenidos con las cepas transformadas con el vector pTrc-R3HB, se observa que en promedio el 50% de los moles de carbono disponibles durante la fase de producción son dirigidos hacia ácidos orgánicos (Figura 12).

Comparando los resultados con la cepa silvestre y FR02, transformadas con pTrc-R3HB, se observó un incremento en los moles de carbono dirigidos a (R)-3HB y lactato, que incrementaron de 11.84% a 25.90% y de 8.94% a 23.58%, respectivamente. Mientras tanto, la distribución de carbono hacia acetato entre las mismas cepas disminuyó de 13.13% a 2.59%, mostrando un posible aumento en el acetyl-CoA disponible, aparentemente aprovechado para producir (R)-3HB.

En cuanto a la producción de formiato, se encontró una leve disminución entre la cepa silvestre (11.54%) y FR01 (10.62%), mientras que FR02 no sintetizó este compuesto. De hecho, pareciera que FR02 dirige parte del piruvato a la producción de lactato; quizás por el reciclaje del NADH generado por PDH, como se explicó antes. En la cepa FR03, fue posible erradicar la producción de formiato y

minimizar el flujo de carbono hacia acetato y lactato, canalizando una mayor parte del carbono a (R)-3HB (28.37%).

De todas las cepas evaluadas con el vector pTrc-R3HB, únicamente AV14 produjo succinato, dirigiendo 12.07% del carbono disponible hacia este metabolito.

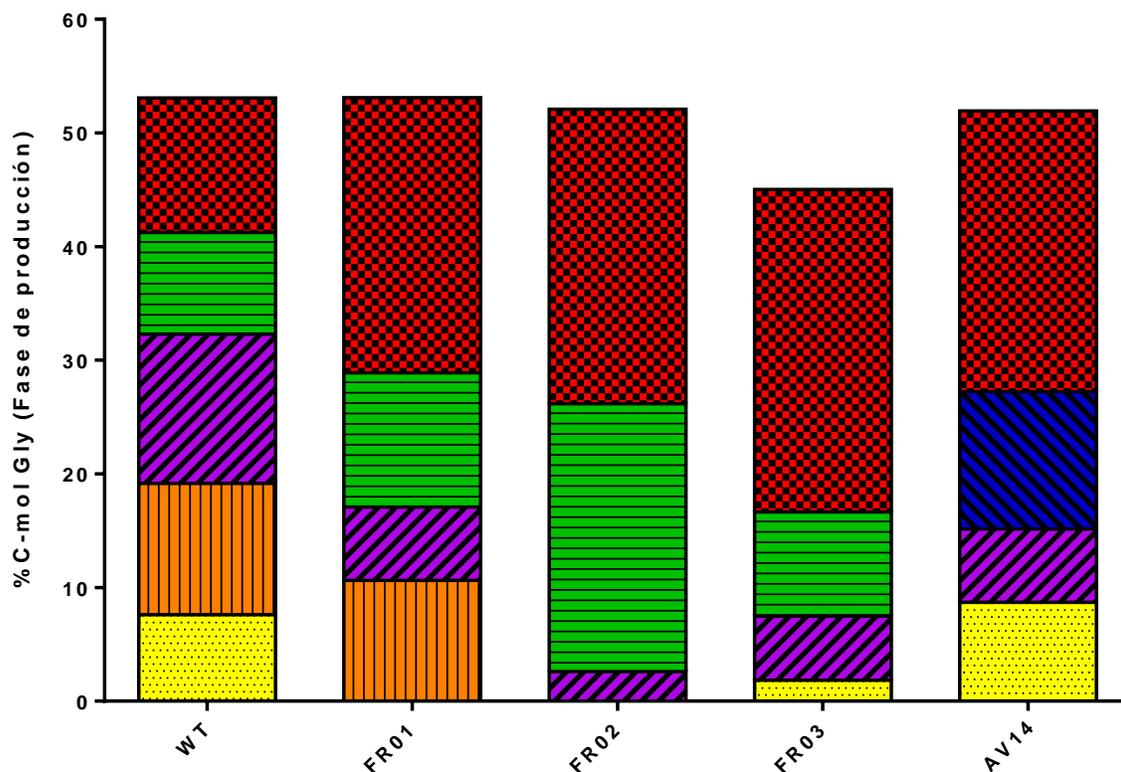


Fig. 12. Distribución de los moles de carbono provenientes del glicerol durante la fase de producción en cepas transformadas con el vector pTrc-R3HB

Simbología: (R)-3HB, cuadros fondo rojo; lactato, líneas horizontales fondo verde; acetato, líneas diagonales fondo violeta; formiato, líneas verticales fondo naranja; piruvato, puntos fondo amarillo; succinato, líneas diagonales fondo azul.

7.4.8 Las mutantes evaluadas son más eficientes para la producción de (R)-3HB comparando con la silvestre MG1655 (DE3)

Dugar & Stephanopoulos (2011) reportaron una manera sencilla de calcular el potencial de una ruta metabólica para la producción de compuestos de interés, con base en la estequiometría de la reacción y sus componentes.

En el Anexo 11.3 se muestran a detalle cómo se calcularon los rendimientos máximos y la eficiencia, considerando los datos experimentales con las cepas evaluadas. Si toda la energía aportada por el glicerol fuera destinada hacia (R)-3HB, el rendimiento máximo de producción (Y^*), independientemente de la ruta metabólica, sería de 0.88 g/g. En cambio, si se considera la vía sintética aportada por el vector pTrc-R3HB (que requiere 1 mol de NADPH por cada mol de (R)-3HB generado), el rendimiento máximo de la ruta es de 0.38 g/g (Y^P), con una eficiencia (η) igual a 42.84% con respecto a Y^* .

Aplicando lo anterior en los rendimientos globales de todas las cepas transformadas con pTrc-R3HB, se obtuvieron las eficiencias con base en Y^P (Figura 13, Tabla 7). La mayor eficiencia aparente se obtuvo con la cepa FR02, que presentó el mayor rendimiento global al finalizar el cultivo (Tabla 6). Sin embargo, ya que todas las mutantes mostraron valores de eficiencia cercanos al 45%, mediante un análisis estadístico ANOVA de una vía se determinó que no había diferencias significativas entre ellas ($p > 0.05$). No obstante, al comparar estas eficiencias con respecto a la cepa silvestre (18.57%), si puede verse un aumento considerable.

En la Figura 13 se muestran las productividades volumétricas obtenidas para cada cultivo. Las cepas FR02 y FR03 transformadas con el vector pTrc-R3HB, produjeron (R)-3HB a mayor velocidad volumétrica. Esto refuerza la capacidad de estas dos cepas para producir este metabolito, aunque FR02 coproduce un título alto de lactato; mientras que FR03 sintetiza (R)-3HB como producto mayoritario.

Tabla 7. Eficiencias de las cepas transformadas con pTrc-R3HB con respecto al máximo teórico de la vía metabólica (Y^P).

Cepa	Eficiencia (%)
MG1655 (DE3)	18.57
FR01	43.77
FR02	46.42
FR03	42.44
AV14	44.83

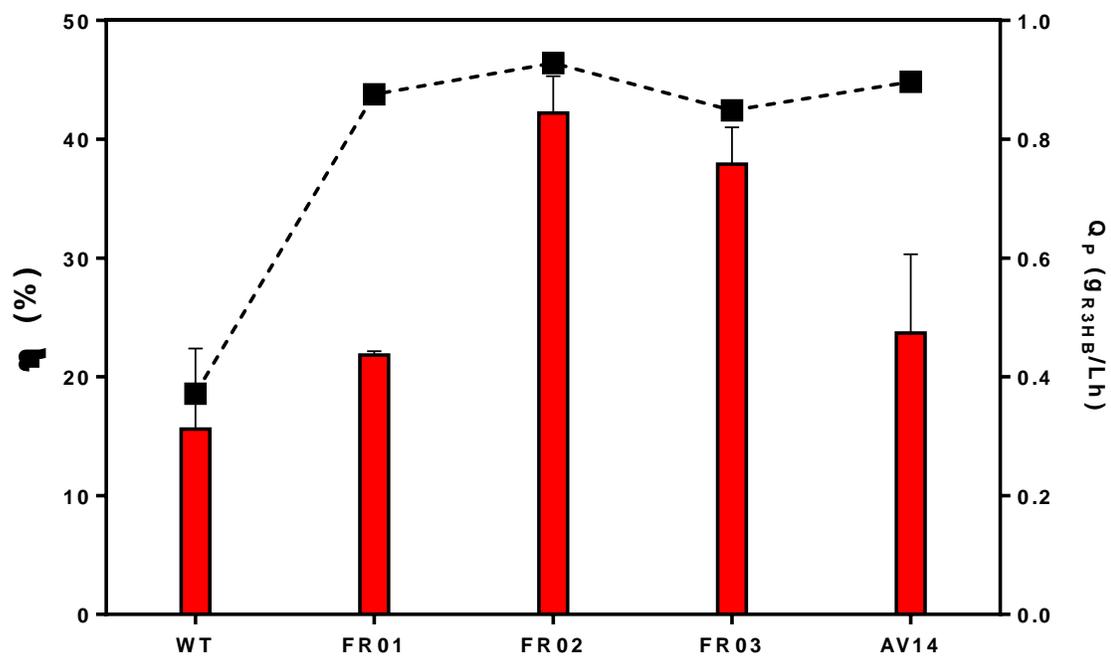


Fig. 13. Velocidad volumétrica de producción de (R)-3HB (barras rojas) y eficiencia estequiométrica (cuadros negros, línea punteada) para las cepas evaluadas con el vector pTrc-R3HB.

7.5 Producción de (R)-3HB acoplado una ruta alterna de consumo de glicerol

7.5.1 Evaluación de las vías sintéticas de consumo de glicerol y producción de (R)-3HB en dos vectores independientes

Se transformaron las cepas silvestre MG1655 (DE3) y FR01 con los vectores pTrc-R3HB y pACYCDuet-Gly. La transformación con ambos vectores se comprobó fenotípicamente por la resistencia a carbenicilina y cloranfenicol, marcadores de selección del vector pTrc-R3HB y pACYCDuet-Gly, respectivamente. Así mismo, se comprobó por digestión con las enzimas *EcoRI* y *Acc65I*.

En el caso de la cepa MG1655 (DE3)/pTrc-R3HB + pACYCDuet-Gly, se obtuvo una μ igual a 0.33 h^{-1} , así como una Q_s de 1.43 g/Lh (Figura 14, Tabla 8). Si bien, los parámetros de crecimiento de la cepa no se afectaron de forma significativa, la velocidad a la cual el glicerol fue consumido fue 15% menor con respecto a la de la cepa MG1655 (DE3)/pTrc-R3HB, y 24% cuando se comparó con MG1655 (DE3)/pACYCDuet-Gly.

Se esperaba un incremento en la Q_s , según lo reportado en otros estudios (Shah *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2018). Probablemente la replicación de dos vectores durante el crecimiento conlleva un costo metabólico, reflejado en la reducción de la velocidad de consumo de glicerol. Los metabolitos formados fueron formiato (4.05 g/L), acetato (3.59 g/L), lactato (2.19 g/L) y (R)-3HB (3.42 g/L), los cuales fueron similares a los obtenidos con la cepa MG1655 (DE3) transformada únicamente con el vector pTrc-R3HB (Figura 10). El rendimiento producto/sustrato (0.091 g/g) y la productividad volumétrica (0.13 g/Lh) de (R)-3HB, tampoco difieren cuando la cepa fue transformada con uno o dos vectores.

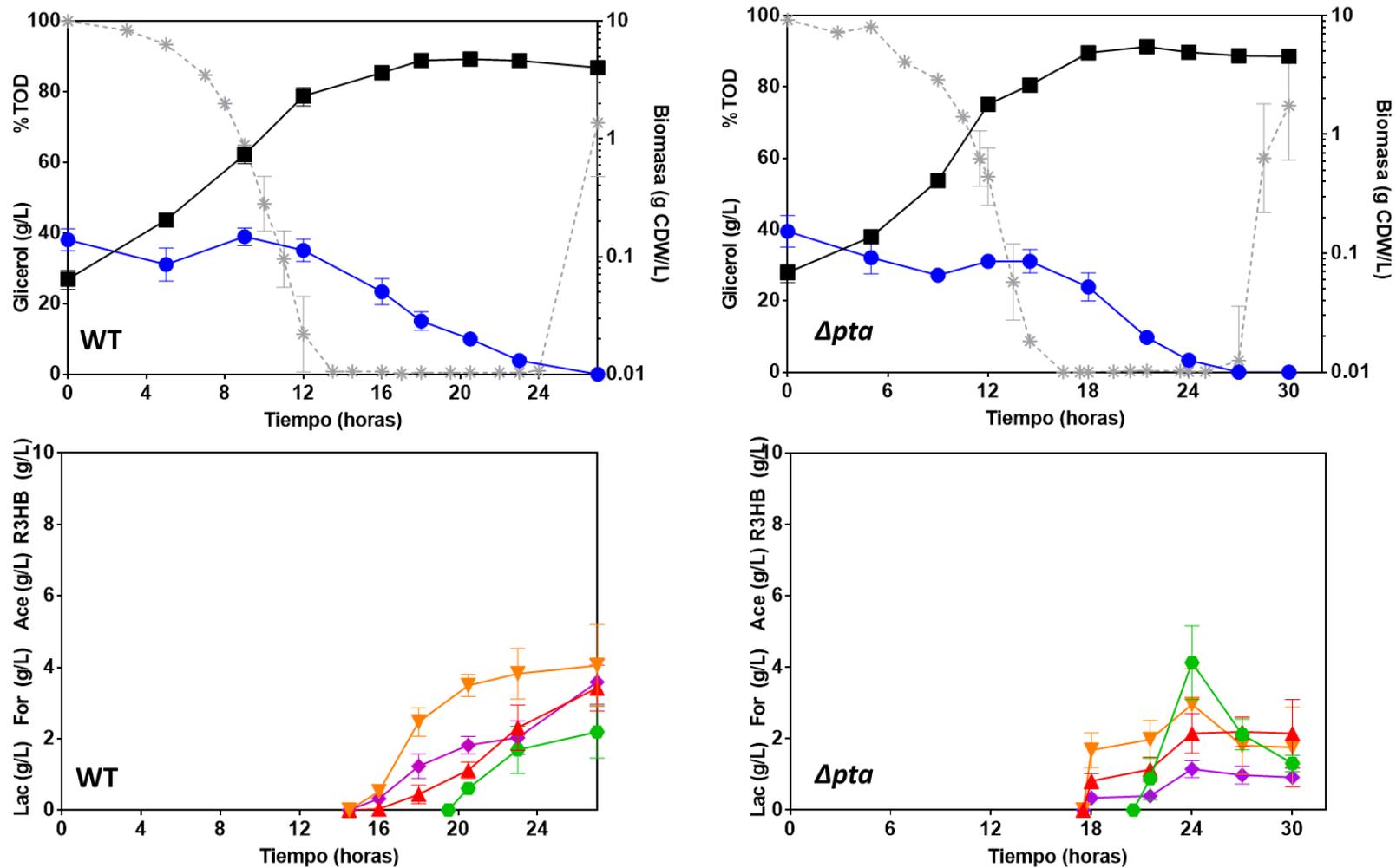


Fig. 14. Evaluación de la cepa silvestre MG1655 (DE3) y Δpta (FR01) transformadas con los vectores pTrc-R3HB y pACYCDuet-Gly en fermentadores bajo condiciones limitantes de oxígeno

En la parte superior se muestra la curva de crecimiento (cuadros negros), consumo de glicerol (círculos azules) y perfil de oxígeno disuelto (asteriscos, línea punteada). En la parte inferior se muestra la producción de metabolitos como formiato (triángulos invertidos naranjas), acetato (diamantes violetas), (R)-3HB (triángulos rojos) y lactato (hexágonos verdes).

En comparación con la cepa FR01/pTrc-R3HB, en la cepa FR01 transformada con ambos vectores también se reduce la μ (0.30 h^{-1}) y Q_s (1.32 g/Lh). La velocidad volumétrica de consumo de glicerol fue la más baja reportada en este trabajo. Por su parte, los títulos de los metabolitos producidos por esta mutante no fueron similares a lo observado en la cepa con pTrc-R3HB, sino que disminuyeron considerablemente; formiato (1.76 g/L), acetato (0.92 g/L), lactato (1.31 g/L) y (R)-3HB (2.15 g/L). Con respecto a (R)-3HB, los valores de rendimiento producto/sustrato (0.056 g/g) y productividad volumétrica (0.09 g/Lh) se ven de igual forma afectados.

7.5.2 Evaluación de la vía sintética de consumo de glicerol y producción de (R)-3HB en cepas transformadas con el vector pACYCDuet-Gly-R3HB

En la Figura 15 se muestra el patrón de digestión obtenido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*, para comprobar la ligación del operón compuesto por los genes *phbA_{AV}*, *phbB_{AV}* y *tesB_{EC}*, en el vector pACYCDuet-Gly bajo el primer sitio múltiple de clonación, regulado también por el promotor T7/lac. La construcción se realizó en *E. coli* DH5 α , donde se comprobó antes de transformar en las cepas MG1655 (DE3) y FR01. En la Figura 15 se muestran bandas de 9,087 pb para el vector linealizado y el patrón de bandas correspondientes al operón *phbA_{AV}-phbB_{AV}-tesB_{EC}* (2,892 pb), así como el resto del vector pACYCDuet1 que ya incluía a los genes *aldD_{Re}* y *aldH_{Re}* (6,195 pb).

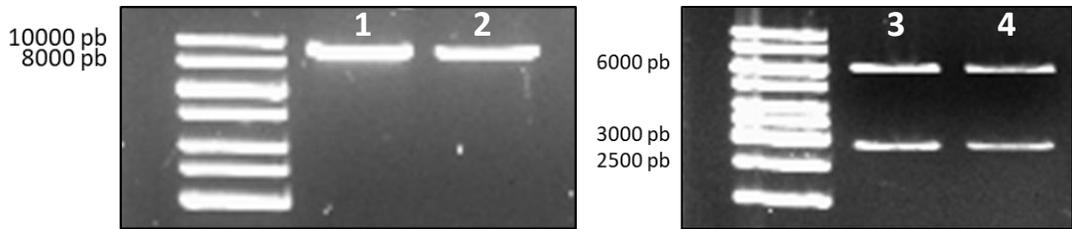
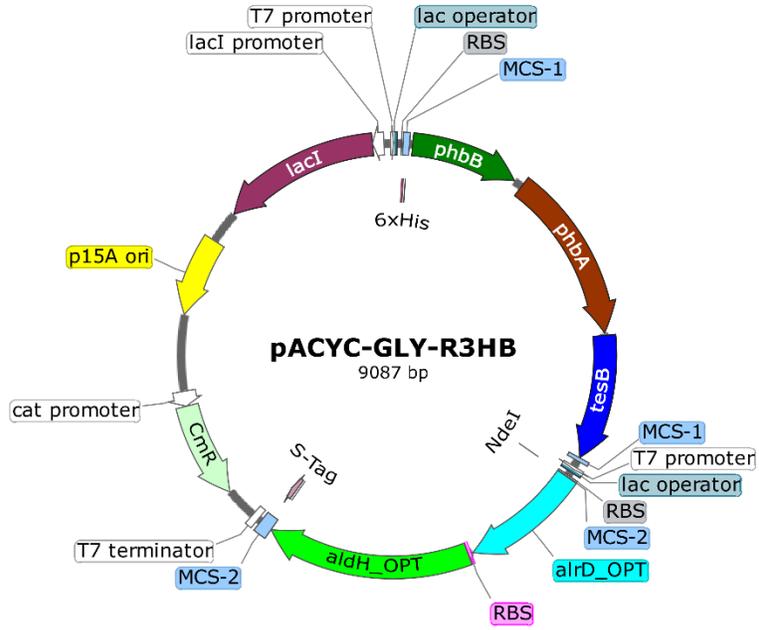


Fig. 15. Vector pACYCDuet-Gly-R3HB y patrones de digestión del vector purificado de *E. coli* DH5 α

Arriba: representación esquemática del vector pACYCDuet-Gly; abajo: gel de agarosa al 1%. Carriles 1 - 2: vector linealizado con *EcoRI*; Carriles 3 – 4: vector digerido con *EcoRI* y *HindIII*.

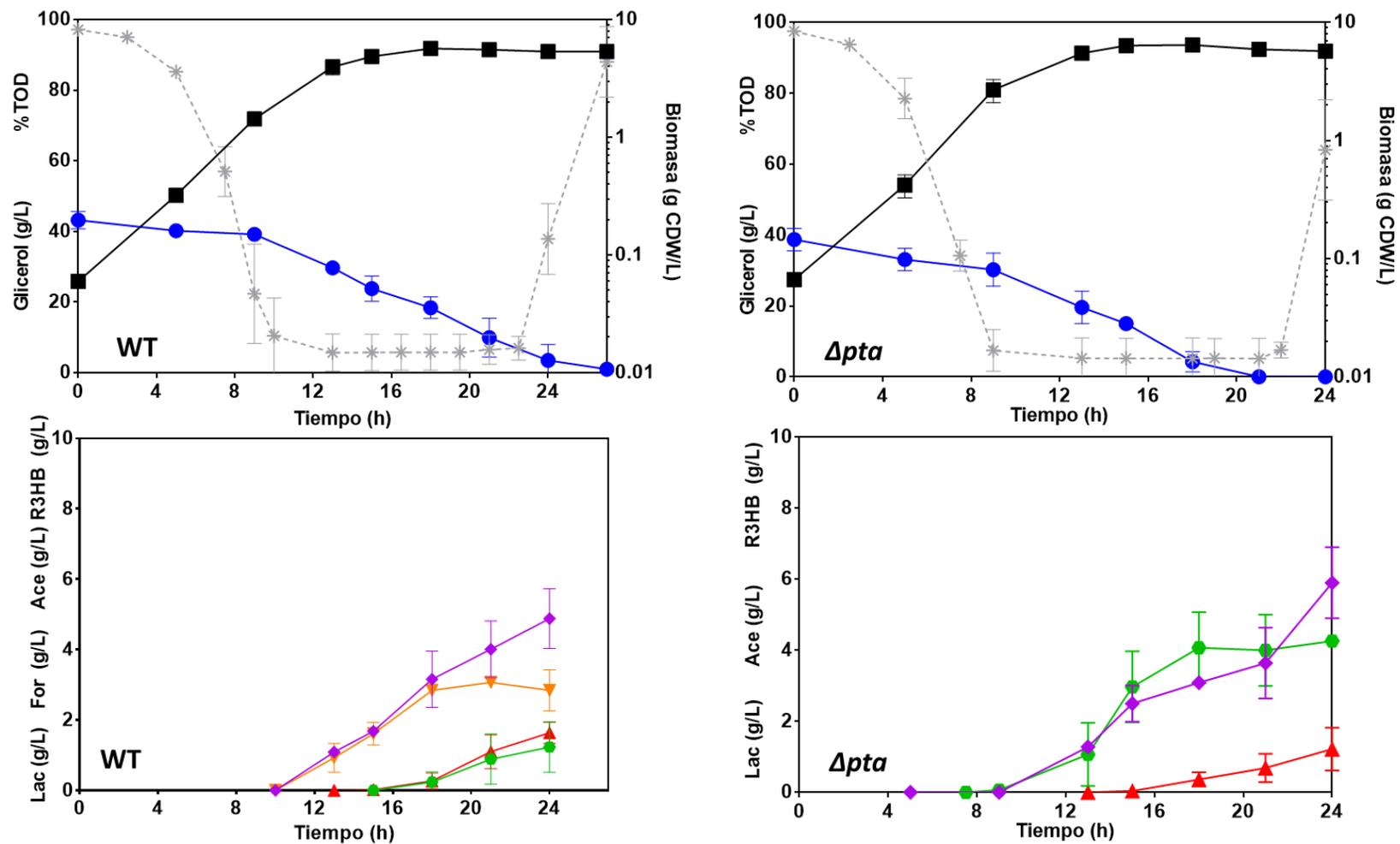


Fig. 16. Evaluación de la cepa silvestre MG1655 (DE3) y Δpta (FR01) transformadas con el vector pACYCDuet-Gly-R3HB en fermentadores bajo condiciones limitantes de oxígeno

En la parte superior se muestra la curva de crecimiento (cuadros negros), consumo de glicerol (círculos azules) y perfil de oxígeno disuelto (asteriscos, línea punteada). En la parte inferior se muestra la producción de metabolitos: formiato (triángulos invertidos naranjas), acetato (diamantes violetas), (R)-3HB (triángulos rojos) y lactato (hexágonos verdes).

Tabla 8. Parámetros cinéticos, estequiométricos y perfil de metabolitos para las cepas MG1655 (DE3) y Δpta (FR01) transformadas con el vector pACYCDuet-Gly-R3HB y con un sistema de dos vectores con pTrc-R3HB y pACYCDuet-Gly.

Todos los cultivos se llevaron a cabo al menos por duplicado, se muestra el promedio \pm desviación estándar. Y_{PS} (máx. Teórico) = 0.565 g (R)-3HB/g glicerol; Est = productividad volumétrica durante la fase estacionaria bajo condiciones limitantes de O_2 . ND = no detectado.

Medio y condiciones de cultivo	Cepa/vector	μ^{exp} (h ⁻¹)	Biomasa máx (gCDW/L)	Y_{ps} (g cél g Gly ⁻¹)	Q_s (g Gly L ⁻¹ h ⁻¹)	Pir (g/L)	For (g/L)	Ace (g/L)	Lac (g/L)	(R)-3HB (g/L)	Y_{PS} (g (R)-3HB g FC ⁻¹)	Q_p (g (R)-3HB L ⁻¹ h ⁻¹)
Glicerol 40 g/L 3X NH ₄	- <i>E. coli</i> MG1655 (DE3)/pACYCDuet-Gly-R3HB [<i>alrD</i> , <i>aldH</i> (<i>R. eutropha</i>) y <i>phbA</i> , <i>phbB</i> (<i>A. vinelandii</i>), <i>tesB</i> (<i>E. coli</i>)]	0.34 \pm 0.016	5.68 \pm 0.193	0.20 \pm 0.056	1.61 \pm 0.108	ND	2.88 \pm 0.462	5.39 \pm 0.90	1.29 \pm 0.413	2.45 \pm 0.271	0.06 \pm 0.003 (9.99%)	0.091 \pm 0.011 (Est = 0.19 \pm 0.038)
	- <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) Δpta /pACYCDuet-Gly-R3HB [<i>alrD</i> , <i>aldH</i> (<i>R. eutropha</i>) y <i>phbA</i> , <i>phbB</i> (<i>A. vinelandii</i>), <i>tesB</i> (<i>E. coli</i>)]	0.31 \pm 0.019	6.42 \pm 0.074	0.35 \pm 0.084	1.78 \pm 0.007	ND	ND	5.90 \pm 0.942	4.26 \pm 0.044	1.22 \pm 0.615	0.03 \pm 0.033 (5.29%)	0.045 \pm 0.051 (Est = 0.12 \pm 0.136)
Lim. O ₂ (37°C, 0.5 vvm, 800 rpm)	- <i>E. coli</i> MG1655 (DE3)/pTrc-R3HB [<i>phbA</i> , <i>phbB</i> (<i>A. vinelandii</i>), <i>tesB</i> (<i>E. coli</i>)] + pACYCDuet-Gly [<i>alrD</i> , <i>aldH</i> (<i>R. eutropha</i>)]	0.33 \pm 0.001	4.77 \pm 0.015	0.25 \pm 0.019	1.43 \pm 0.117	ND	4.05 \pm 1.147	3.59 \pm 0.623	2.19 \pm 0.735	3.42 \pm 0.643	0.091 \pm 0.027 (15.8%)	0.13 \pm 0.026 (Est = 0.26 \pm 0.050)
	- <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) Δpta /pTrc-R3HB [<i>phbA</i> , <i>phbB</i> (<i>A. vinelandii</i>), <i>tesB</i> (<i>E. coli</i>)] + pACYCDuet-Gly [<i>alrD</i> , <i>aldH</i> (<i>R. eutropha</i>)]	0.30 \pm 0.024	5.46 \pm 0.267	0.32 \pm 0.090	1.32 \pm 0.162	ND	1.76 \pm 1.122	0.92 \pm 0.252	1.31 \pm 0.230	2.15 \pm 0.945	0.056 \pm 0.178 (9.96%)	0.09 \pm 0.025 (Est = 0.22 \pm 0.060)
Glicerol 40 g/L 3X NH ₄ (30°C, 0.5 vvm, 650 rpm)	- <i>E. coli</i> MG1655 (DE3)/pACYCDuet-Gly-R3HB [<i>alrD</i> , <i>aldH</i> (<i>R. eutropha</i>) y <i>phbA</i> , <i>phbB</i> (<i>A. vinelandii</i>), <i>tesB</i> (<i>E. coli</i>)]	0.20 \pm 0.001	5.33 \pm 0.015	0.33 \pm 0.001	0.61 \pm 0.006	4.69 \pm 1.352	ND	3.70 \pm 1.791	2.73 \pm 0.077	4.21 \pm 0.181	0.12 \pm 0.006 (20.45%)	0.054 \pm 0.003 (Est = 0.07 \pm 0.005)
	- <i>E. coli</i> MG1655 (DE3) Δpta /pACYCDuet-Gly-R3HB [<i>alrD</i> , <i>aldH</i> (<i>R. eutropha</i>) y <i>phbA</i> , <i>phbB</i> (<i>A. vinelandii</i>), <i>tesB</i> (<i>E. coli</i>)]	0.21 \pm 0.000	4.45 \pm 0.014	0.21 \pm 0.032	0.60 \pm 0.022	5.72 \pm 0.352	ND	5.97 \pm 0.844	3.91 \pm 0.985	2.91 \pm 0.260	0.081 \pm 0.011 (14.38%)	0.048 \pm 0.002 (Est = 0.05 \pm 0.002)

7.5.3 La participación de *AlrD-AldH* parece no tener efectos en la producción de (R)-3HB

El comportamiento de la cepa silvestre MG1655 (DE3) con el vector pACYCDuet-Gly-R3HB fue muy similar al de la misma cepa transformada con el vector pTrc-R3HB (Figura 16, Tabla 8). La μ fue de 0.34 h^{-1} con una Q_s de 1.61 g/Lh . Sin embargo, el rendimiento biomasa/sustrato fue 0.20 g/g , aproximadamente 50% menor que el obtenido con la cepa silvestre transformada con dos vectores (Sección 7.5.3). Los metabolitos producidos fueron formiato (2.88 g/L), acetato (5.39 g/L), lactato (1.29 g/L) y (R)-3HB (2.45 g/L). La productividad volumétrica global para (R)-3HB fue 0.091 g/Lh , además de un rendimiento producto/sustrato de 0.06 g/g , que corresponde al 10% del rendimiento máximo teórico. Estos valores no variaron significativamente a los obtenidos con la cepa MG1655 (DE3) sin expresar los genes *alrD* y *aldH*; considerando sólo la fase de producción, la productividad volumétrica de (R)-3HB disminuye cerca del 40%. Contrasta que la cepa tardó más tiempo (27 horas) en consumir totalmente los 40 g/L de glicerol. Como se mencionó antes, en otros reportes donde se utilizó el sistema *AlrD-AldH*, se observaron mejoras en la velocidad de consumo de glicerol (Shah *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2018).

7.5.4 La cepa FR01/pACYCDuet-Gly-R3HB produce bajos títulos de (R)-3HB

La cepa FR01 (Δpta) transformada con pACYCDuet-Gly-R3HB comparte algunas similitudes en cuanto al crecimiento y producción de metabolitos (Figura 16 y Tabla 8) al comparar con la misma cepa transformada únicamente con pTrc-R3HB (Sección 7.4.2). La μ observada fue de 0.31 h^{-1} , muy similar a FR01/pTrc-R3HB (0.33 h^{-1}), aunque menor que con pACYCDuet-Gly (0.40 h^{-1}). En cuanto al consumo de glicerol, el rendimiento biomasa/sustrato fue de 0.35 g/g y Q_s de 1.78 g/Lh . El perfil de metabolitos presentó acetato (5.9 g/L), lactato (4.26 g/L) y el título más bajo de (R)-3HB (1.22 g/L) al comparar con las cepas evaluadas hasta este punto. El rendimiento producto/sustrato y productividad volumétrica global, para (R)-3HB, fueron de 0.03 g/g (5.29% del máximo teórico) y 0.045 g/Lh , respectivamente.

Con base en lo anterior, se observa que la producción de (R)-3HB baja un 82% con respecto a la cepa FR01 transformada con el vector pTrc-R3HB. Es importante resaltar que, en este caso, no se redujo la generación de acetato aun cuando la cepa tiene eliminado el gen *pta*, lo cual si se observó con la cepa FR01/pTrc-R3HB. Esto se observa con una relación 8:1 (mol:mol) entre acetato y (R)-3HB.

7.5.5 La tasa de consumo de glicerol no aumenta con el sistema AlrD-AldH

Comparando las Qs globales, la cepa silvestre consume glicerol 2.6% más rápido con el vector pACYCDuet-Gly-R3HB con respecto a pTrc-R3HB. Por su parte, FR01 aumentó 10.7% en el mismo parámetro. Este aumento llevó a pensar que el consumo de carbono estaría actuando conforme a lo propuesto, es decir, generar mayor cantidad de NADPH y, por tanto, promover la generación de (R)-3HB.

Sin embargo, durante la fase de limitación de oxígeno, la velocidad volumétrica de consumo se comporta diferente. La Qs de la cepa silvestre MG1655 (DE3)/pACYCDuet-Gly-R3HB, que contiene al sistema AlrD-AldH, es 45% menor a la transformada únicamente con pTrc-R3HB; mientras que FR01 mantiene el consumo volumétrico prácticamente igual (97%), sin importar la participación de AlrD-AldH.

7.5.6 Las proteínas AlrD y AldH no son visibles por SDS-PAGE

Debido a que no se observaron los resultados esperados con el vector pACYCDuet-Gly-R3HB, se realizó un SDS-PAGE con la proteína soluble obtenida de cultivar la cepa FR01 en matraz a diferentes condiciones (Tabla 9, Figuras 17 y 18), de acuerdo con lo descrito en la estrategia experimental.

Tabla 9. Evaluación de la temperatura y efecto del IPTG en cultivos con la cepa FR01 (*Δpta*) transformada con diferentes vectores.

Cultivos realizados en matraz con medio AM1 suplementado con glicerol (10 g/L) a 300 rpm. C: Control; (-): sin adición de IPTG.

Experimento	IPTG (mM)	Temperatura (°C)	Plásmido
C-pTrc	0.01	37	pTrc99A
C-pACYC	0.01	37	pACYCDuet-1
HB1	-	37	pTrc-R3HB
HB2	0.01	37	pTrc-R3HB
G-HB1	-	37	pACYCDuet-Gly-R3HB
G-HB2	0.01	37	pACYCDuet-Gly-R3HB
G1	0.01	30	pACYCDuet-Gly
G-HB	0.01	30	pACYCDuet-Gly-R3HB

El SDS-PAGE mostró diferentes patrones de proteínas, obtenidas a partir de las cepas evaluadas (Figura 17 y Tabla 9). Las proteínas de mayor interés son las expresadas por los vectores pTrc-R3HB y pACYCDuet-Gly-R3HB, que se identificaron de acuerdo con su peso molecular.

Las proteínas que componen la ruta de producción de (R)-3HB son PhbA (41 kDa), PhbB (26.7 kDa) y TesB (32 kDa). Mientras que las enzimas que conforman la vía heteróloga de consumo de glicerol son AlrD (31 kDa) y AldH (50.6 kDa). Los pesos moleculares se obtuvieron de la información depositada en Uniprot (uniprot.org).

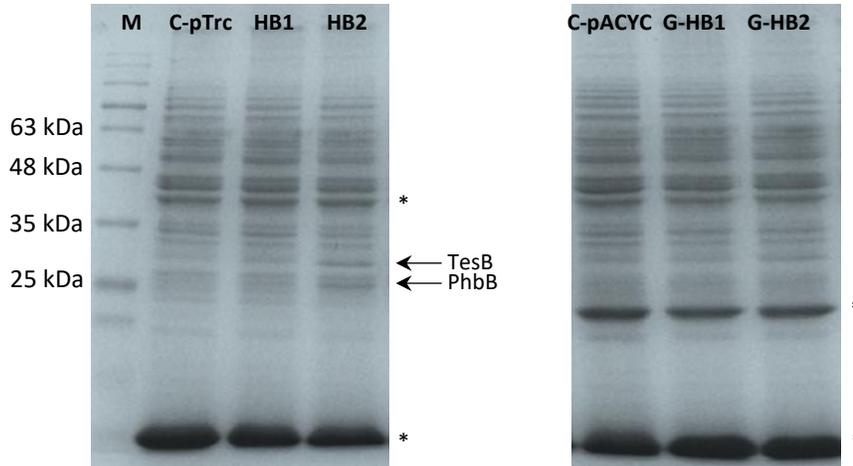


Fig. 17. SDS-PAGE al 12% con proteína soluble de la cepa FR01 transformada con diferentes vectores.

Se evaluó la cepa FR01 transformada con diferentes vectores y variando la concentración de IPTG (ver Tabla 9). Con flechas se muestran las proteínas TesB y PhbB expresadas en pTrc-R3HB. M: marcador de peso molecular; (*): proteínas inespecíficas

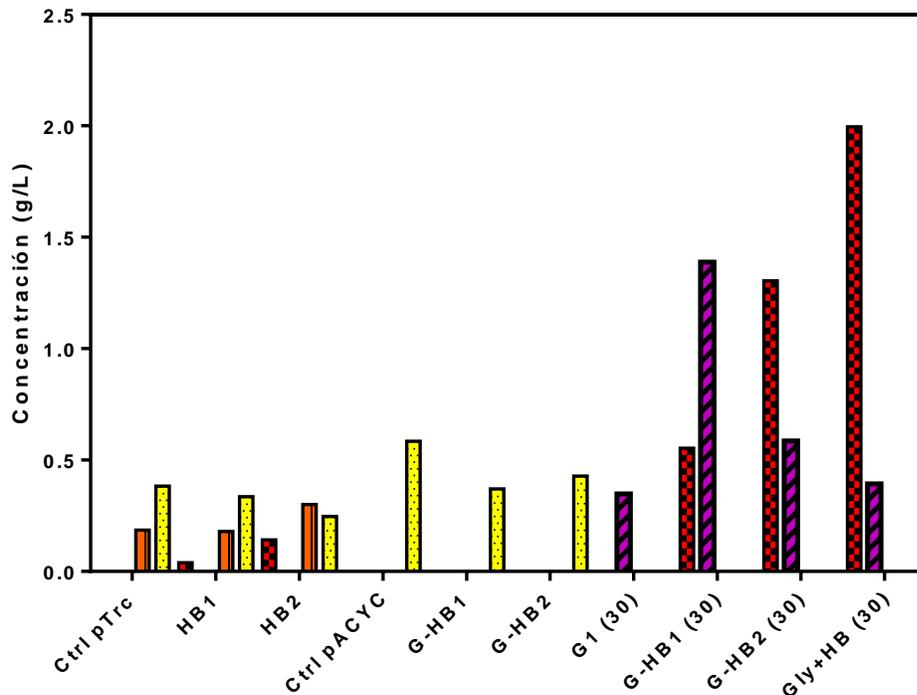


Fig.18. Cuantificación de metabolitos mediante HPLC producidos por la cepa FR01 (Δpta) transformada con diferentes vectores a diferentes temperaturas y concentraciones de IPTG (ver Tabla 9).

(30): cultivos realizados a 30°C (aquellos sin esta etiqueta se realizaron a 37°C); Gly+HB: pACYCDuet-Gly + pTrc-R3HB, cepa transformada con ambos vectores. Simbología: (R)-3HB, cuadros fondo rojo; Lactato, líneas horizontales fondo verde; Acetato, líneas diagonales fondo violeta; Formiato, líneas verticales fondo naranja; Piruvato, puntos fondo amarillo.

En los primeros carriles (Figura 17), no se muestran patrones diferentes entre C-pTrc y HB1 (sin inductor). No obstante, al analizar el sobrenadante de HB1 por HPLC, se obtuvo un título de 0.04 g/L de (R)-3HB, 0.179 g/L de formiato y 0.336 g/L piruvato (Figura 18). El control con vector vacío, C-pTrc, sólo mostró títulos similares de formiato y piruvato.

Por lo anterior, pareciera que los genes *phbA*, *phbB* y *tesB* tienen expresión de fondo, aunque el nivel de proteína es muy bajo para poder observarlo por SDS-PAGE. Las bandas correspondientes a PhbB y TesB son más notables en HB2 con respecto a HB1, sugiriendo una mayor concentración. Por su peso, PhbA migra cerca de otras bandas inespecíficas cerca de 41 kDa; sin embargo, se propone que si se expresa con base en la producción obtenida de (R)-3HB (0.142 g/L). En HB2 también se obtuvo formiato (0.301 g/L) y piruvato (0.247 g/L). Al inducir los cultivos con 0.05 mM de IPTG no se obtuvieron niveles de (R)-3HB detectables (datos no mostrados), por lo que agregar esta cantidad de IPTG parece tener un efecto negativo en la producción de (R)-3HB a partir de glicerol bajo las condiciones evaluadas.

Los cultivos de FR01/pACYCDuet-Gly-R3HB mostraron un comportamiento diferente con respecto a pTrc-R3HB, ya que no se observó variación en el patrón de proteínas a las diferentes concentraciones de IPTG evaluadas con respecto al control (C-pACYC). En el gel de proteínas no se observaron bandas que correspondan con las enzimas PhbA, PhbB o TesB. Tampoco se observaron bandas de las proteínas AlrD y AldH, sino sólo una banda inespecífica de aproximadamente 20 kDa. En este caso, los resultados de HPLC tampoco mostraron algún efecto por la adición de IPTG, siendo el piruvato el único metabolito cuantificado en el control (0.584 g/L) y en las muestras con 0 mM y 0.01 mM de IPTG, con títulos de piruvato cercanos a 0.4 g/L, en ambos casos.

7.5.7 La temperatura tiene un rol importante durante la producción de (R)-3HB con el vector pACYCDuet-Gly-R3HB

Aunque el SDS-PAGE no mostró bandas que correspondan a las proteínas esperadas (Figura 17), los metabolitos cuantificados por HPLC (Figura 18) muestran que al disminuir la temperatura a 30°C se elevan los títulos de (R)-3HB hasta 1.304 g/L, con la cepa FR01/pACYCDuet-Gly-R3HB, y 1.995 g/L en la misma cepa transformada con ambos vectores pACYCDuet-Gly y pTrc-R3HB (Gly+HB). Se observó la generación de acetato en estos cultivos, que disminuyó al inducir con IPTG (HB2) y aún más al utilizar el sistema de dos vectores. De manera que, aparentemente, el sistema AlrD-AldH sí permite incrementar la producción de (R)-3HB a 30°C.

La temperatura óptima de crecimiento reportada para *R. eutropha* H16 es de 30°C, con numerosos estudios sobre la producción de PHA's a esta temperatura (Chanprateep *et al.*, 2008; Beeby *et al.*, 2011; Miyahara *et al.*, 2020). Así mismo, existen reportes donde se utilizó *E. coli* para expresar proteínas de *R. eutropha* a 37°C, con resultados positivos tanto sobre la producción de (R)-3HB (Shiraki *et al.*, 2006) como consumo de glicerol (Shah *et al.*, 2014). No obstante, es necesario evaluar la actividad de las proteínas a diferentes intervalos de temperatura.

Además, la optimización en el uso de codones solicitada durante el diseño del vector pACYCDuet-Gly podría tener efectos adversos. Se sabe que, durante la síntesis de proteínas *E. coli* utiliza codones más frecuentes que otros para la traducción de elementos estructurales más ordenados (p. e., alfa-hélices), mientras que segmentos de unión ("loops") requieren de codones menos frecuentes. La separación entre estas regiones estructurales requiere de un control temporal muy fino para promover el plegamiento correcto, lo cual a su vez minimiza el riesgo de agregación, precipitación y/o degradación de estructuras mal plegadas en el citosol (Angov *et al.*, 2008). Por esta razón, se recomienda la expresión de proteínas heterólogas a temperaturas más bajas (Liponska *et al.*, 2017).

Entre los esfuerzos de este estudio por evaluar el funcionamiento del sistema AlrD-AldH, no se realizaron ensayos sobre el efecto de la temperatura en la producción de (R)-3HB con las cepas transformadas con pACYCDuet-Gly-R3HB en fermentador. Sin embargo, los resultados mostrados en la Figura 18, donde se aprecia como a 30°C se promueve la síntesis de (R)-3HB, sugieren que es necesario evaluar la producción de (R)-3HB a esa u otras temperaturas por debajo de 37 °C.

7.5.8 Disminuir la temperatura del cultivo implica el ajuste de otros parámetros

Se propuso evaluar a la cepa silvestre MG1655 (DE3) y FR01 (Δpta) transformadas con pACYCDuet-Gly-R3HB a 30°C. Sin embargo, al mantener las mismas condiciones de aireación y agitación utilizadas anteriormente (0.5 vvm y 800 rpm), no pudieron alcanzarse las condiciones limitantes de oxígeno como a 37°C (datos no mostrados). Es decir, la tensión de oxígeno disuelto no bajó a cero, ya que tanto la velocidad específica de crecimiento como la velocidad específica de consumo de oxígeno son menores a 30°C en comparación con las de 37°C.

La limitación de oxígeno disuelto implica que la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) es igual a velocidad de consumo de éste (OUR), por el microorganismo presente en el cultivo, de manera que:

$$\text{OTR} = \text{OUR}$$

$$k_{La} (C_{LA}^* - C_{LA}) = q_{O_2} X$$

Donde k_{La} es el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (h^{-1}), C_{LA}^* es la concentración de oxígeno en el líquido en saturación (mmol O_2/L , en este caso la solubilidad del oxígeno en el medio), C_{LA} la concentración de oxígeno en el seno del líquido (mmol O_2/L), q_{O_2} es la velocidad específica de consumo de oxígeno (mmol $O_2/g_{CDW} h$) y X es la concentración de biomasa celular seca (g_{CDW}/L).

Se sabe que la solubilidad del oxígeno (C_{LA}^*) disminuye conforme aumenta la temperatura, por lo que este parámetro difiere entre 37°C (0.2175 mmol O_2/L) y

30°C (0.2388 mmol O₂/L). No obstante, el valor de OUR también se ve afectado al disminuir la temperatura, como efecto de una ralentización general en el metabolismo de *E. coli*. Así mismo, cambios en la aireación o agitación del sistema genera cambios en el k_{LA}, lo cual tiene como consecuencia variaciones en OTR.

En el Anexo 11.5 se muestra cómo el valor del k_{LA} no se ve afectado de forma considerable, pero q_{O2} disminuye prácticamente a la mitad al cambiar la temperatura de 37°C (1.97 mmol O₂/g CDW h) a 30°C (1.07 mmol O₂/g CDW h). De manera que, a 30°C y 800 rpm, el valor de OTR es aproximadamente 70% superior a OUR. Se determinó que, con la misma aireación (0.5 vvm) y una agitación de 650 rpm, se podrían igualar ambas tasas (3.78 mmolO₂/Lh, variación ≈ 10%) y así alcanzar condiciones limitantes de oxígeno a 30°C.

7.5.9 La producción de (R)-3HB se ve favorecida a menor temperatura

Al evaluar la cepa silvestre MG1655 (DE3) transformada con pACYCDuet-Gly-R3HB a 30°C y 650 rpm (OTR = 3.78 mmolO₂/Lh), el primer efecto fue una disminución en la μ , que resultó de 0.20 h⁻¹, es decir, 42% menor con respecto a la obtenida a 37°C y 800 rpm (5.87 mmolO₂/Lh). La Q_s también disminuyó a 0.61 g/Lh, casi una tercera parte si se compara con el cultivo de la misma cepa a 37°C y 800 rpm. En cuanto a la biomasa máxima (5.33 g/L) y al rendimiento biomasa/sustrato (0.33 g/g), estos no sufrieron variación con las modificaciones al cultivo.

Aunque la TOD disminuyó constantemente las primeras 24 horas, el cultivo con la cepa silvestre llegó a un punto donde no fue posible mantener la limitación de oxígeno disuelto, el cual comenzó a incrementar hasta el final del cultivo, cuando se agotó el glicerol (Figura 19). Se obtuvo un título considerable de piruvato (4.69 g/L), además de acetato (3.70 g/L), lactato (2.73 g/L) y (R)-3HB (4.21 g/L). Considerando un rendimiento (R)-3HB/sustrato de 0.12 g/g (20.45% del máximo teórico), disminuir la temperatura en el cultivo resultó determinante, pues los títulos finales de (R)-3HB se duplicaron con respecto a las condiciones anteriores (OTR = 5.87 mmolO₂/Lh) con el vector pACYCDuet-Gly-R3HB. La productividad volumétrica

global disminuyó a 0.054 g/Lh, como consecuencia de una menor velocidad de consumo de glicerol (se agotó hasta las 72 horas).

7.5.10 La eliminación de *pta* afecta la producción de (R)-3HB a 30°C

En el caso de la cepa FR01 (Δpta) transformada con pACYCDuet-Gly-R3HB, la μ fue de 0.21 h⁻¹ y la Q_s resultó de 0.60 g/Lh, ambos valores muy similares a los de la cepa silvestre bajo las mismas condiciones. El rendimiento biomasa/glicerol disminuyó a 0.21 g/g, con una biomasa máxima de 4.45 g/L.

Aunque la fase de limitación de oxígeno se mantuvo durante más tiempo que el cultivo con la cepa silvestre (aproximadamente 18 horas), la TOD tampoco se estabilizó, al punto en que comenzó a incrementar de forma escalonada hasta el final del cultivo. Considerando lo anterior, se produjo piruvato (5.72 g/L), además de acetato (5.97 g/L), lactato (3.91 g/L) y (R)-3HB (2.91 g/L). Como se observó también a 37°C en esta cepa con pACYCDuet-Gly-R3HB, los títulos de acetato y lactato incrementaron con respecto a la cepa silvestre, algo que no se observó en FR01 transformada con los dos vectores. Así mismo, el título de (R)-3HB incrementó 2.7 veces con respecto a las condiciones de mayor temperatura (37°C) y agitación (800 rpm), implicando un rendimiento producto/sustrato de 0.081 g/g (14.38% del máximo teórico). Si bien el tiempo de cultivo de FR01 fue de 58 horas, esto no se vio reflejado en la productividad volumétrica (0.048 g/Lh), que se mantuvo igual que a las condiciones anteriores con el vector pACYCDuet-Gly-R3HB. Sin embargo, la eliminación de *pta* ocasionó un decremento en la producción de (R)-3HB, de 4.21 a 2.91 g/L, al comparar con la cepa MG1655 (DE3)/pACYCDuet-Gly-R3HB cultivada en las mismas condiciones. La producción de una mayor cantidad de acetato (5.97 g/L) con la cepa Δpta , en comparación con el acetato (3.70 g/L) generado con la cepa silvestre, indican un sistema complejo de regulación en las vías que dan origen a la formación de acetato. Este comportamiento, y por tanto el abasto o consumo de acetil-CoA (precursor del (R)-3HB), requiere ser estudiado más a detalle en futuros trabajos.

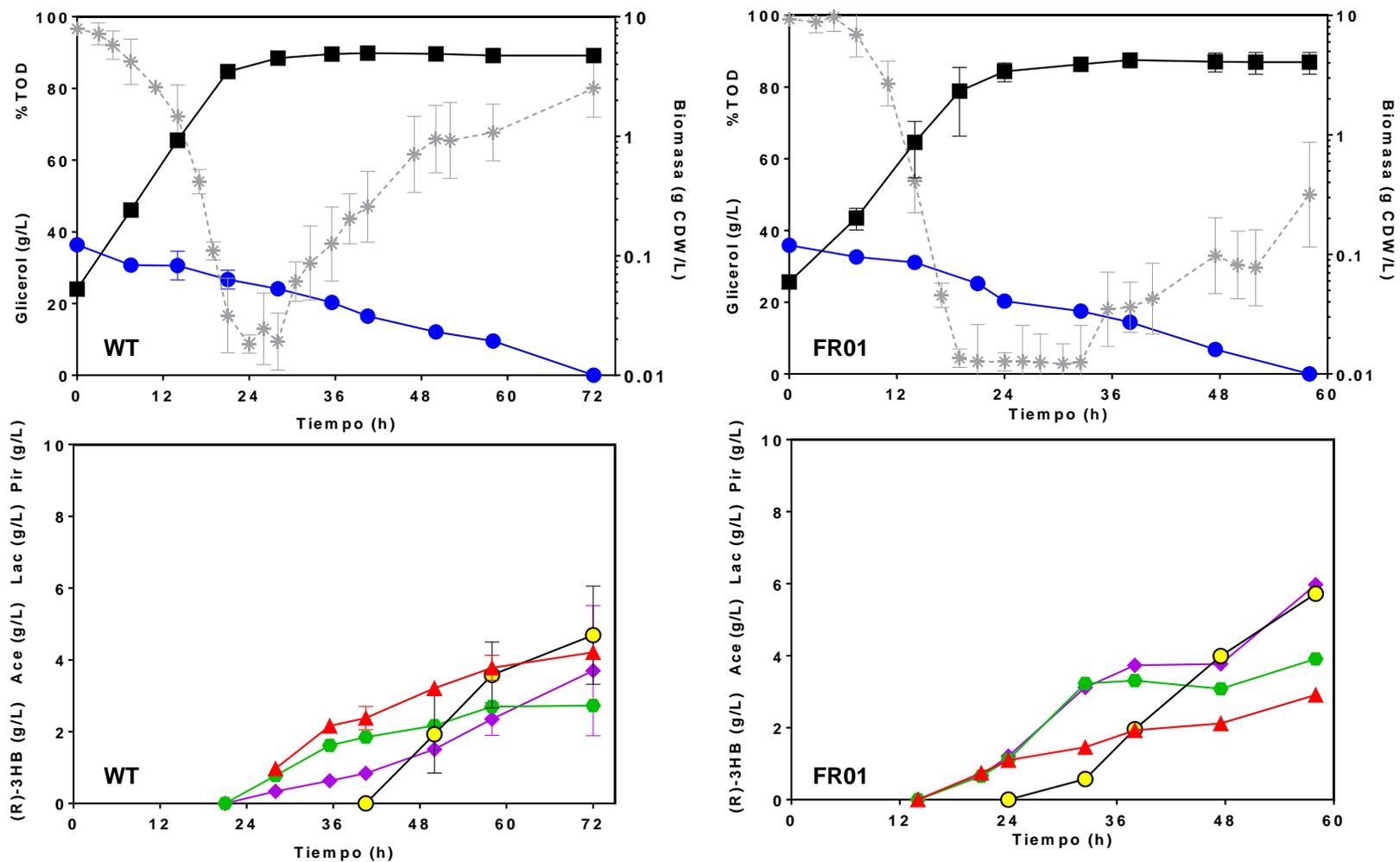


Fig. 19. Evaluación de la cepa silvestre MG1655 (DE3) y Δ pta (FR01) transformadas con el vector pACYCDuet-Gly-R3HB en fermentadores a 0.5 vvm y 650 rpm con una temperatura de 30°C.

En la parte superior se muestra la curva de crecimiento (cuadros negros), consumo de glicerol (círculos azules) y perfil de oxígeno disuelto (asteriscos, línea punteada). En la parte inferior se muestra la producción de metabolitos como acetato (diamantes violetas), (R)-3HB (triángulos rojos), lactato (hexágonos verdes) y piruvato (círculos amarillos).

7.5.11 Variación en los balances de carbono cuando se combina el sistema *AlrD-AldH* con el de producción de (*R*)-3HB

La distribución de moles de carbono hacia metabolitos, para las cepas silvestre MG1655 (DE3) y FR01 con el vector pACYCDuet-Gly-R3HB a diferentes temperaturas y agitación, así como con el sistema de dos vectores, se dio de forma diferente para cada cultivo (Figura 20).

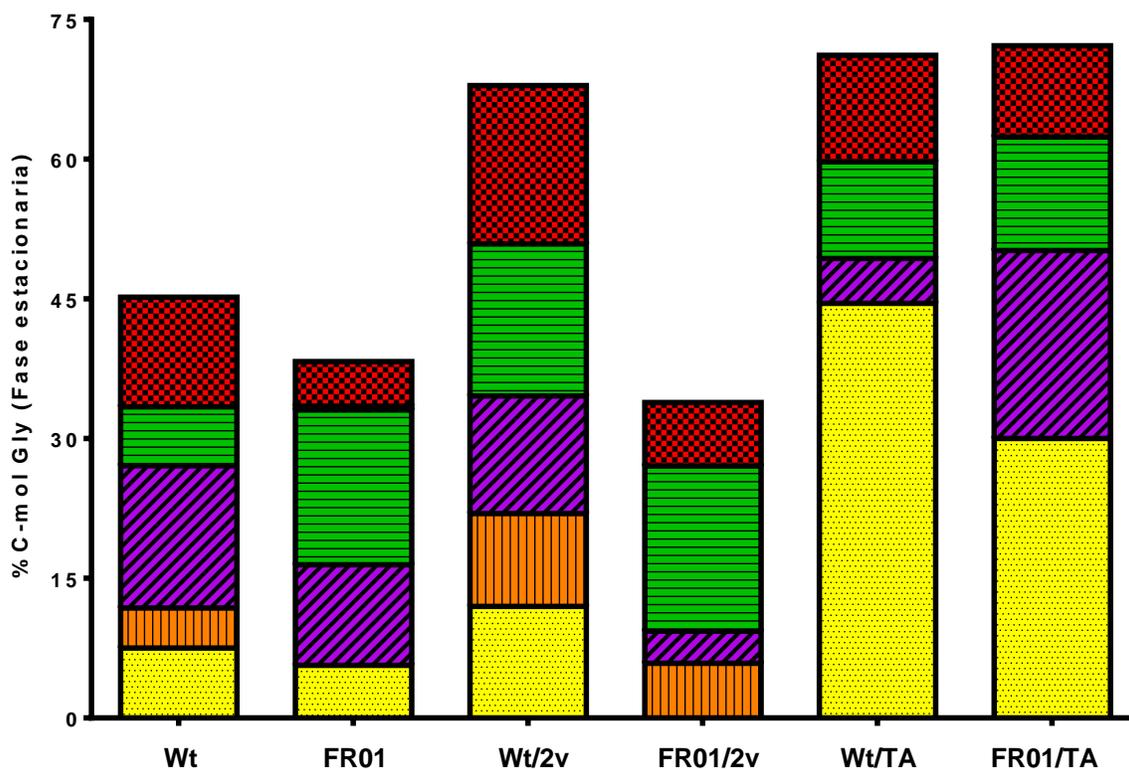


Fig. 20. Distribución de los moles de carbono, provenientes del glicerol, durante la fase de producción con las cepas silvestre (Wt) y FR01 transformadas con el vector pACYCDuet-Gly-R3HB; con el sistema en dos vectores (2v) compuesto por pACYCDuet-Gly y pTrc-R3HB y con pACYCDuet-Gly-R3HB a menor temperatura 30°C y 650 rpm (TA).

Simbología: (*R*)-3HB, cuadros fondo rojo; lactato, líneas horizontales fondo verde; acetato, líneas diagonales fondo violeta; formiato, líneas verticales fondo naranja; piruvato, puntos fondo amarillo.

En los cultivos a 37°C y 800 rpm, la cepa silvestre transformada con pACYCDuet-Gly-R3HB dirige el mismo porcentaje de moles de carbono hacia (*R*)-3HB (11.77%) que cuando se transforma con el vector pTrc-R3HB (11.84%).

Sin embargo, puede observarse cómo en la cepa FR01/pACYCDuet-Gly-R3HB no se favoreció la producción de (R)-3HB durante la fase de producción a 37°C y 800 rpm, pues sólo el 4.78% de los moles de carbono se dirigen a este producto; este valor es 5 veces menor con respecto a la cepa FR01 transformada con el vector pTrc-R3HB (24.22%).

A 37°C y 800 rpm, la cepa silvestre MG1655 (DE3) transformada con ambos vectores (pACYCDuet-Gly y pTrc-R3HB) destina más moles de carbono hacia metabolitos, observando un aumento del 45 al 67%, al comparar con la misma cepa transformada con pACYCDuet-Gly-R3HB. Esto se reflejó en un menor crecimiento durante la fase de producción, pero mayor aprovechamiento hacia productos, con 17% del carbono disponible hacia (R)-3HB y 16.33% para lactato. También se utilizó más carbono para formiato y piruvato, mientras que el valor para acetato se mantuvo prácticamente constante.

Cuando se analizó a FR01 con el sistema de dos vectores (pACYCDuet-Gly y pTrc-R3HB), a 37°C, 800 rpm y 0.5 vvm, se observó un comportamiento diferente. Cuando esta cepa se transformó con el vector pACYCDuet-Gly-R3HB, logró dirigir 38.26% de los moles de carbono a metabolitos, mientras que cuando posee ambos vectores este porcentaje disminuyó a 33.88%. De este último, un 6.83% corresponde a la generación de (R)-3HB, ligeramente mayor al 4.78% destinado por esta misma cepa transformada sólo con pACYCDuet-Gly-R3HB. Una de las mayores diferencias, entre estos dos sistemas, fue una disposición de carbono hacia acetato tres veces menor cuando FR01 fue evaluada con dos vectores; en ese caso el formiato también se vio disminuido. El lactato, por su parte, se mantuvo constante.

Al reducir temperatura y agitación a 30°C y 650 rpm, respectivamente, los balances de carbono resultaron distintos. En estas condiciones ambas cepas transformadas con el vector pACYCDuet-Gly-R3HB dirigen cerca del 72% del carbono disponible hacia metabolitos. El balance para estos cultivos se hizo a partir del punto en cual la TOD alcanza su mínimo (al no mantenerse estables las condiciones de limitación de oxígeno).

Considerando lo anterior, las cepas silvestre y FR01 transformadas con pACYCDuet-Gly-R3HB dirigen porcentajes similares de carbono hacia (R)-3HB, 11.43% y 9.8%, respectivamente. Lo mismo sucede con respecto al lactato. No obstante, el carbono dirigido hacia acetato aumenta más de cuatro veces en FR01 (20.18%) con respecto a la cepa silvestre (4.79%). Como puede observarse, la producción de acetato no disminuye y hasta parece incrementar conforme se acumula el piruvato. Esto coincide con estudios donde se reporta que cepas de *E. coli pta* pueden mantener o incluso incrementar la actividad de la piruvato oxidasa (PoxB), generando acetato a partir del piruvato (Dittrich *et al.*, 2005; Castaño *et al.*, 2009).

En los cultivos a 30°C y 650 rpm, se acumula una gran cantidad de carbono en forma de piruvato. La cepa silvestre desvía hasta 44.54% y FR01 30% hacia este producto. Al observar las curvas de producción para las cepas transformadas con pACYCDuet-Gly-R3HB (Figura 19), puede notarse cómo conforme la TOD comienza a aumentar, la síntesis de productos de fermentación como (R)-3HB y lactato se desacelera, y al mismo tiempo se incrementa la producción de piruvato. Este comportamiento cobra más notoriedad con la cepa FR01. Existen reportes con respecto a la inhibición del complejo PDH, como consecuencia de la eliminación del sistema Pta-AckA y, por tanto, la acumulación de acetil-CoA (Vadali *et al.*, 2004; Castaño *et al.*, 2009). De manera que lo anterior, en conjunto con las condiciones de transferencia de oxígeno, pareciera beneficiar la generación de piruvato que no es oxidado en otros productos.

7.5.12 Efectos en el rendimiento al implementar estrategias para mejorar la producción de (R)-3HB cuando se combinan el sistema *AirD-AldH* y el de producción

Como se realizó en la sección 7.4.8, se calculó el rendimiento máximo de la ruta metabólica al transformar las cepas con el vector pACYCDuet-Gly-R3HB, considerando los 2 moles de NADPH generados por cada mol de glicerol consumido y el aprovechamiento de una de estas moléculas en la producción de (R)-3HB. El

rendimiento máximo de esta ruta (Y^P) (Dougar & Stephanopoulos, 2011) es de 0.565 g/g (ver Anexo 11.3), el cual es 1.5 veces mayor a lo calculado con la vía metabólica utilizando el vector pTrc-R3HB, además de corresponder con el máximo teórico estequiométrico.

En la Tabla 10 se muestra la eficiencia con respecto al Y^P , que corresponde con lo mostrado en la Tabla 8 como Y_{PS} (máximo teórico). Además, de acuerdo con estos datos, la eficiencia obtenida al acoplar las vías sintéticas de consumo de glicerol y producción de (R)-3HB en la cepa silvestre MG1655 (DE3) y FR01 fue baja, si se compara con lo obtenido con pTrc-R3HB (Tabla 7 y Figura 13).

Tabla 10. Eficiencias de producción de (R)-3HB generado por las cepas evaluadas con respecto al máximo teórico posible debido a la estequiometría de la vía metabólica (Y^P) utilizando el vector pACYCDuet-Gly-R3HB y el sistema compuesto por los dos vectores (2V) pTrc-R3HB y pACYCDuet-Gly.

Cepa/Experimento	Eficiencia (%)
MG1655 (DE3)	9.99
FR01	5.29
MG1655 (DE3)/ 2V	15.8
FR01/ 2V	9.96
MG1655 (DE3)/ 30°C-650 rpm	20.45
FR01/ 30°C-650 rpm	14.38

Es rescatable como las eficiencias incrementaron conforme se aplicaron las estrategias planteadas. Tanto la cepa silvestre como FR01 aumentan su eficiencia un 5% entre el sistema con pACYCDuet-Gly-R3HB y cuando se transformaron con los dos vectores (pACYCDuet-Gly y pTrc-R3HB). Adicionalmente, ambas cepas presentaron otro 5% de aumento cuando se disminuyó la temperatura a 30°C y la agitación a 650 rpm. Considerando el potencial de la ruta metabólica propuesta, se propone que estas eficiencias pudieran incrementar aún más ajustando la transferencia de oxígeno para lograr las condiciones de limitación de oxígeno requeridas.

Además, al comparar las velocidades volumétricas de producción de (R)-3HB (Figura 21), se aprecia como en la cepa silvestre este valor aumentó al ser transformada con dos vectores por separado (2v), pero disminuyó cuando se llevó a cabo el cultivo a 30°C (TA). Por su parte, con la cepa FR01 se observó el mismo comportamiento.

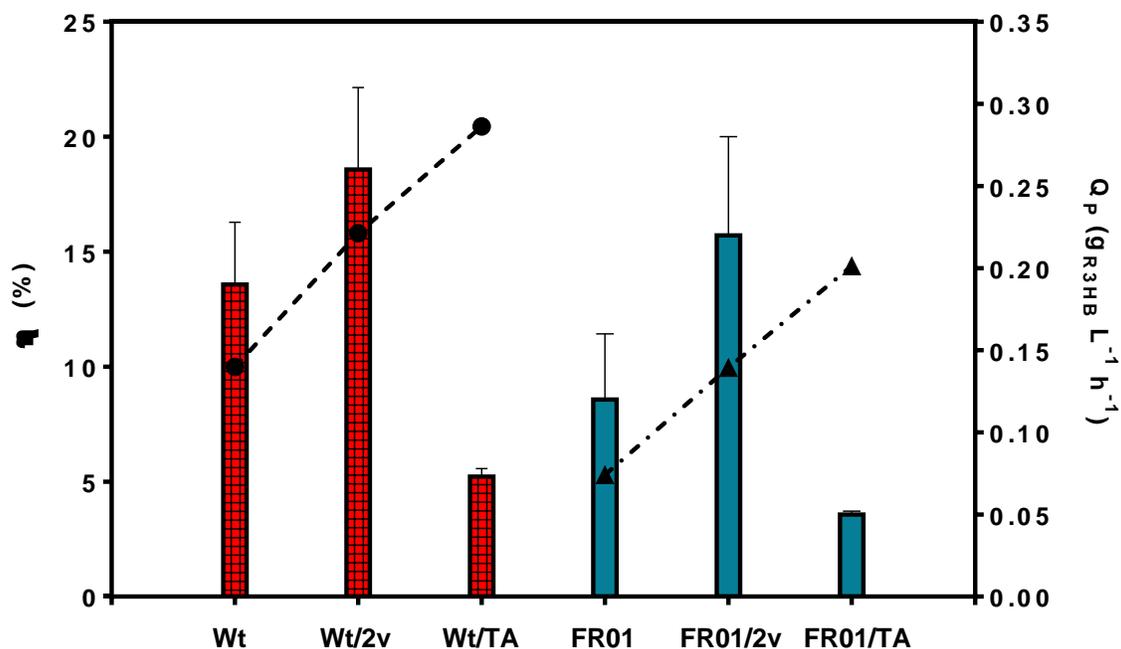


Fig. 21. Velocidad volumétrica de producción de (R)-3HB con la cepa silvestre (barras rojas con recuadros) y FR01 (Δpta , barras azules lisas). Se muestra también la eficiencia estequiométrica para la cepa silvestre (Wt, círculos negros, línea punteada) y FR01 (Δpta , triángulos negros, línea punteada).

2v: sistema de dos vectores *pTrc-R3HB* y *pACYCDuet-Gly*; TA: temperatura (30°C) y agitación (650 rpm).

VIII. CONCLUSIONES

La eliminación de los genes *pta* (FR01) y *pf1B* (FR02) del cromosoma de *E. coli* MG1655 (DE3), en cultivos bajo condiciones de limitación de oxígeno, permitió incrementar la producción de (R)-3HB en las mutantes transformadas con el vector pTrc-R3HB. Esto sugiere que evitar la producción de acetato y formiato, por estas vías, aumenta la disponibilidad de acetyl-CoA y piruvato para la generación de (R)-3HB.

Parámetros como el rendimiento de (R)-3HB con respecto al glicerol y la productividad volumétrica, fueron similares para las mutantes FR01, FR02, FR03 y AV14 transformadas con el vector pTrc-R3HB. Estos resultados sugieren que se alcanzó un máximo en los títulos de (R)-3HB bajo las condiciones evaluadas. Es decir, la producción podría estar limitada por factores metabólicos como el NADPH disponible, asociado a su vez con el balance de óxido-reducción; la transferencia de oxígeno, de la cual depende la producción de este metabolito y otros ácidos orgánicos; o bien, la activación o represión de puntos de regulación clave en el metabolismo de *E. coli*, como consecuencia de la fuente de carbono empleada, respiración, vías metabólicas utilizadas, o el balance de óxido-reducción, entre otros.

Al evaluar las cepas MG1655 (DE3) y FR01 transformadas con el vector pACYCDuet-Gly-R3HB, expresando la vía heteróloga de consumo de glicerol, disminuyeron los títulos de (R)-3HB y la velocidad volumétrica de consumo de glicerol, en comparación con las cepas transformadas con el vector pTrc-R3HB. Sin embargo, disminuyendo la temperatura (37 a 30°C) y la velocidad de transferencia de oxígeno (5.87 a 3.78 mmolO₂/Lh) se consiguió duplicar el valor de estos parámetros. Se considera que una menor temperatura permitió una mejor expresión de las proteínas AlrD y AldH, aunque es necesario realizar ensayos de actividad enzimática y la cuantificación de NAD(P)H para confirmar esta hipótesis.

Disminuir la temperatura de incubación a 30°C fue positivo para la producción de (R)-3HB con las cepas transformadas con el vector pACYCDuet-Gly-R3HB. Sin embargo, no fue posible mantener la limitación de oxígeno usando un valor de k_{La} igual a 15.84 h⁻¹. Estos datos sugieren que es necesario evaluar diferentes velocidades de transferencia de oxígeno en el cultivo a 30°C, ya que, en las condiciones evaluadas, se acumuló una gran cantidad de piruvato, además de (R)-3HB.

IX. PERSPECTIVAS

Realizar estudios de transferencia de oxígeno a 30°C con cepas de *E. coli* transformadas con el vector pACYCDuet-Gly-R3HB. Estandarizar las condiciones de aireación y agitación necesarias para alcanzar condiciones de limitación de oxígeno en el medio, lo cual podría mejorar la producción de (R)-3HB a partir de glicerol.

Cuantificar la concentración intracelular de cofactores NAD⁺, NADP⁺, NADH y NADPH en cultivos con las cepas evaluadas en este trabajo, bajo condiciones limitantes de oxígeno a 30 y 37°C. Lo anterior con el propósito de confirmar si las diferencias en la relación NAD(P)H/NAD(P)⁺ tienen un efecto en los títulos obtenidos de (R)-3HB.

Evaluar las actividades enzimáticas de AlrD y AldH en las cepas que expresan el vector pACYCDuet-Gly y pACYCDuet-Gly-R3HB, con el fin de determinar la actividad enzimática intracelular de ambas proteínas. Adicionalmente, caracterizar el comportamiento cinético de las proteínas AlrD y AldH. A partir de extractos crudos obtenidos de cepas transformadas con pACYCDuet-Gly, es posible realizar ensayos de actividad y determinar las constantes catalíticas (K_M , $V_{m\acute{a}x}$ y k_{cat}) con glicerol y gliceraldehído como sustratos, respectivamente.

Implementar estrategias que favorezcan el plegamiento correcto de las proteínas AlrD y AldH a 37°C, en cepas transformadas con pACYCDuet-Gly-R3HB. Se ha reportado que la sobreexpresión de chaperonas y co-chaperonas propias de *E. coli* pueden mejorar los niveles de actividad y concentración de proteína soluble (Bui *et al.*, 2019).

Evaluar la cepa AV14 como plataforma para la producción de succinato a partir de glicerol, al considerarse un compuesto químico de alto interés industrial actualmente. Realizar cultivos en condiciones de limitación de oxígeno para incrementar el fosfoenolpiruvato disponible, o bien, la expresión de una piruvato carboxilasa (Pyc), son algunas de las estrategias que se han propuesto para este fin (Blankschien *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2010; Martínez-Valenzuela, 2018; Heitmann *et al.*, 2019).

X. REFERENCIAS

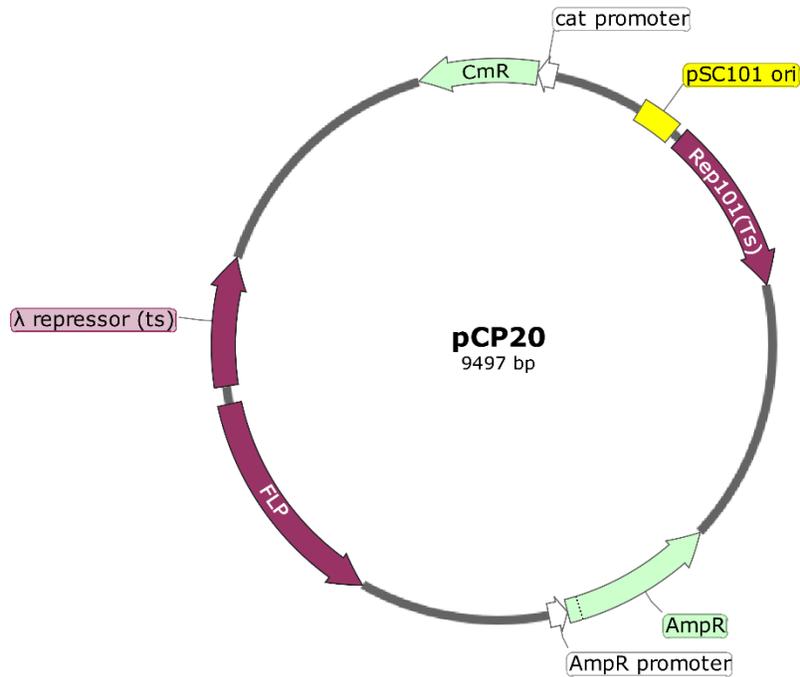
- Anitha, M., Kamarudin, S. K., & Kofli, N. T. (2016). The potential of glycerol as a value-added commodity. *Chemical Engineering Journal*, 295, 119-130.
- Beeby, M., Cho, M., Stubbe, J., & Jensen, G. J. (2012). Growth and localization of polyhydroxybutyrate granules in *Ralstonia eutropha*. *Journal of bacteriology*, 194(5), 1092-1099.
- Bentley, W. E., Mirjalili, N., Andersen, D. C., Davis, R. H., & Kompala, D. S. (1990). Plasmid-encoded protein: the principal factor in the "metabolic burden" associated with recombinant bacteria. *Biotechnology and bioengineering*, 35(7), 668-681.
- Blankschien, M. D., Clomburg, J. M., & Gonzalez, R. (2010). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of succinate from glycerol. *Metabolic engineering*, 12(5), 409-419.
- Boaz, N. W. (2012). *U.S. Patent No. 8,329,938*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Castaño-Cerezo, S., Pastor, J. M., Renilla, S., Bernal, V., Iborra, J. L., & Cánovas, M. (2009). An insight into the role of phosphotransacetylase (pta) and the acetate/acetyl-CoA node in *Escherichia coli*. *Microbial cell factories*, 8(1), 54.
- Cecchini, G., Schröder, I., Gunsalus, R. P., & Maklashina, E. (2002). Succinate dehydrogenase and fumarate reductase from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1553(1-2), 140-157.
- Centeno, 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.
- Centeno-Leija, S. (2013). *Generación de NADPH mediante la vía de Embden-Meyerhof-Parnas y su efecto sobre la síntesis de Poli-3-hidroxibutirato en E. coli*. (PhD dissertation). Recuperado de TESIUNAM.
- Chandani, N., Mazumder, P. B., & Bhattacharjee, A. (2018). Biosynthesis of biodegradable polymer by a potent soil bacterium from a stress-prone environment. *Journal of Applied Biology & Biotechnology Vol*, 6(2), 54-60.
- Chanprateep, S., Katakura, Y., Visetkoop, S., Shimizu, H., Kulpreecha, S., & Shioya, S. (2008). Characterization of new isolated *Ralstonia eutropha* strain A-04 and kinetic study of biodegradable copolyester poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) production. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 35(11), 1205-1215.
- Cox, P. J., & Clarke, K. (2014). Acute nutritional ketosis: implications for exercise performance and metabolism. *Extreme physiology & medicine*, 3(1), 17.
- Cox, P. J., Kirk, T., Ashmore, T., Willerton, K., Evans, R., Smith, A., ... & King, M. T. (2016). Nutritional ketosis alters fuel preference and thereby endurance performance in athletes. *Cell metabolism*, 24(2), 256-268.
- 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*, 97(12), 6640-6645.
- de Almeida, A., Giordano, A. M., Nikel, P. I., & Pettinari, M. J. (2010). Effects of aeration on the synthesis of poly (3-hydroxybutyrate) from glycerol and glucose in recombinant *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 76(6), 2036-2040.
- de Roo, G., Kellerhals, M. B., Ren, Q., Witholt, B., & Kessler, B. (2002). Production of chiral R-3-hydroxyalkanoic acids and R-3-hydroxyalkanoic acid methylesters via hydrolytic degradation of polyhydroxyalkanoate synthesized by pseudomonads. *Biotechnology and bioengineering*, 77(6), 717-722.
- Delgado, A. C. L., & Cordoba, A. M. (2015). Polihidroxialcanoatos (PHA's) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Informador Técnico*, 79(1), 83-101.
- Dittrich, C. R., Bennett, G. N., & San, K. Y. (2005). Characterization of the acetate-producing pathways in *Escherichia coli*. *Biotechnology progress*, 21(4), 1062-1067.
- Dobson, R., Gray, V., & Rumbold, K. (2012). Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 39(2), 217-226.
- Dolan, S. K., & Welch, M. (2018). The glyoxylate shunt, 60 years on. *Annual review of microbiology*, 72, 309-330.
- Enjalbert, B., Millard, P., Dinclaux, M., Portais, J. C., & Létisse, F. (2017). Acetate fluxes in *Escherichia coli* are determined by the thermodynamic control of the Pta-AckA pathway. *Scientific Reports*, 7, 42135.
- García-Benítez, M. (2016). *Ingeniería metabólica de Escherichia coli para la producción de (R)-3-hidroxibutirato aumentando la disponibilidad de NADPH* (Master dissertation). Recuperado de TESIUNAM.
- Gosset, G. (2005). Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Microbial Cell Factories*, 4:14.

- Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R., & Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4645-4649.
- Han, K., Lim, H. C., & Hong, J. (1992). Acetic acid formation in *Escherichia coli* fermentation. *Biotechnology and bioengineering*, 39(6), 663-671.
- Ibrahim, M. H., & Steinbüchel, A. (2009). Poly (3-hydroxybutyrate) production from glycerol by *Zobellella denitrificans* MW1 via high-cell-density fed-batch fermentation and simplified solvent extraction. *Applied and environmental microbiology*, 75(19), 6222-6231.
- Ithayaraja, M., Janardan, N., Wierenga, R. K., Savithri, H. S., & Murthy, M. R. N. (2016). Crystal structure of a thiolase from *Escherichia coli* at 1.8 Å resolution. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 72(7), 534-544.
- Kang, Z., Gao, C., Wang, Q., Liu, H., & Qi, Q. (2010). A novel strategy for succinate and polyhydroxybutyrate co-production in *Escherichia coli*. *Bioresource technology*, 101(19), 7675-7678.
- Kessler, B., Witholt, B. (1999). Polyhydroxyalkanoates. In: Flickinger, M. C., Drew, S. W. Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis & Bioseparation. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2024–2040.
- Koffas, M., Roberge, C., Lee, K., & Stephanopoulos, G. (1999). Metabolic engineering. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 1(1), 535-557.
- Lee, S. Y. (1996). High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in biotechnology*, 14(3), 98-105.
- 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.
- Lee, S. Y., Ha, S. C., Hong, Y. S., Hong, S. D., & Lee, J. J. (1997). Production of elaiophyllin by the strain MCY-846 in a submerged culture. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7(4), 278-281.
- Lee, S. Y., Lee, Y., & Wang, F. (1999). Chiral compounds from bacterial polyesters: sugars to plastics to fine chemicals. *Biotechnology and Bioengineering*, 65(3), 363-368.
- 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.
- Lee, Y., Park, S. H., Lim, I. T., Han, K., & Lee, S. Y. (2000). Preparation of alkyl (R)-(-)-3-hydroxybutyrate by acidic alcoholysis of poly-(R)-(-)-3-hydroxybutyrate. *Enzyme and microbial technology*, 27(1-2), 33-36.
- Levett, I., Birkett, G., Davies, N., Bell, A., Langford, A., Laycock, B., ... & Pratt, S. (2016). Techno-economic assessment of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production from methane—The case for thermophilic bioprocessing. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4(4), 3724-3733.
- Lin, Z., Zhang, Y., Yuan, Q., Liu, Q., Li, Y., Wang, Z., ... & Zhao, X. (2015). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for poly (3-hydroxybutyrate) production via threonine bypass. *Microbial cell factories*, 14(1), 1-12.
- 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.
- Maklashina, E., Berthold, D. A., & Cecchini, G. (1998). Anaerobic expression of *Escherichia coli* succinate dehydrogenase: functional replacement of fumarate reductase in the respiratory chain during anaerobic growth. *Journal of bacteriology*, 180(22), 5989-5996.
- Martínez-Valenzuela, M. (2018). *Ingeniería metabólica en una cepa de Escherichia coli no fermentativa para la producción de ácido succínico a partir de glucosa*. (Master dissertation). Recuperado de TESIUNAM.
- Miyahara, Y., Yamamoto, M., Thorbecke, R., Mizuno, S., & Tsuge, T. (2020). Autotrophic biosynthesis of polyhydroxyalkanoate by *Ralstonia eutropha* from non-combustible gas mixture with low hydrogen content. *Biotechnology Letters*.
- Mothes, G., Schnorpfel, C., & Ackermann, J. U. (2007). Production of PHB from crude glycerol. *Engineering in Life Sciences*, 7(5), 475-479.
- Murray, A. J., Knight, N. S., Cole, M. A., Cochlin, L. E., Carter, E., Tchabanenko, K., ... & Deacon, R. M. (2016). Novel ketone diet enhances physical and cognitive performance. *The FASEB Journal*, 30(12), 4021-4032.
- Naranjo-Vasco, J. (2010). *Producción de polihidroxibutirato a partir de residuos agroindustriales* (Master dissertation). Retrieved from bdigital Repositorio Institucional UN (ID 2315).
- Nieder-Heitmann, M., Haigh, K., & Görgens, J. F. (2019). Process design and economic evaluation of integrated, multi-product biorefineries for the co-production of bio-energy, succinic acid, and polyhydroxybutyrate (PHB) from sugarcane bagasse and trash lignocelluloses. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 13(3), 599-617.

- Oleoline. (2020). *Glycerine Market Report 2017*. Recuperado de <http://www.hbint.com/datas/media/590204fd077a6e381ef1a252/sample-quarterly-glycerine.pdf>
- Paalme, T., Tiisma, K., Kahru, A., Vanatalu, K., & Vilu, R. (1990). Glucose-limited fed-batch cultivation of *Escherichia coli* with computer-controlled fixed growth rate. *Biotechnology and bioengineering*, 35(3), 312-319.
- Peebo, K., Valgepea, K., Nahku, R., Riis, G., Õun, M., Adamberg, K., & Vilu, R. (2014). Coordinated activation of PTA-ACS and TCA cycles strongly reduces overflow metabolism of acetate in *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(11), 5131-5143.
- Quispe, C. A., Coronado, C. J., & Carvalho Jr, J. A. (2013). Glycerol: production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 475-493.
- 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.
- Romero-Pérez, D. (1998). *Caracterización, clonación y expresión del gen udhA que codifica para una transhidrogenasa soluble en E. coli* (Bachelor dissertation). Recuperado de TESIUNAM.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- Seebach, D., Beck, A. K., Breitschuh, R., & Job, K. (1992). Direct Degradation of the Biopolymer Poly [(R)-3-Hydroxybutyric Acid] to (R)-3-Hydroxybutanoic Acid and its Methyl Ester. *Organic Syntheses*, 39-39.
- Seebach, D., Chow, H. F., Jackson, R. F., Sutter, M. A., Thaisrivongs, S., & Zimmermann, J. (1986). (+)-11, 11'-Di-O-methylelaiofyllidene-preparation from elaiophyllin and total synthesis from (R)-3-hydroxybutyrate and (S)-malate. *European Journal of Organic Chemistry*, 1986(7), 1281-1308.
- Shah, P., Chiu, F. S., & Lan, J. C. W. (2014). Aerobic utilization of crude glycerol by recombinant *Escherichia coli* for simultaneous production of poly 3-hydroxybutyrate and bioethanol. *Journal of bioscience and bioengineering*, 117(3), 343-350.
- 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.
- Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen E. V. (2017). *UFOP Report on Global Market Supply 2017/2018*. Recuperado de https://www.ufop.de/files/3515/1515/2657/UFOP_Report_on_Global_Market_Supply_2017-2018.pdf
- 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.
- Vadali, R. V., Bennett, G. N., & San, K. Y. (2004). Applicability of CoA/acetyl-CoA manipulation system to enhance isoamyl acetate production in *Escherichia coli*. *Metabolic engineering*, 6(4), 294-299.
- Van Briesen, J. M. (2002). Evaluation of methods to predict bacterial yield using thermodynamics. *Biodegradation*, 13(3), 171-190.
- Wei, X. X., Zheng, W. T., Hou, X., Liang, J., & Li, Z. J. (2015). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for poly (3-hydroxybutyrate) production under microaerobic condition. *BioMed Research International*.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene*, 33(1), 103-119.
- Yankovskaya, V., Horsefield, R., Törnroth, S., Luna-Chavez, C., Miyoshi, H., Léger, C., ... & Iwata, S. (2003). Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science*, 299(5607), 700-704.
- Yu, Y., Zhu, X., Xu, H., & Zhang, X. (2019). Construction of an energy-conserving glycerol utilization pathways for improving anaerobic succinate production in *Escherichia coli*. *Metabolic engineering*, 56, 181-189.
- Zhao, X., Fang, Y., Yang, Y., Qin, Y., Wu, P., Wang, T., & Lu, X. (2015). Elaiophyllin, a novel autophagy inhibitor, exerts antitumor activity as a single agent in ovarian cancer cells. *Autophagy*, 11(10), 1849-1863.

XI. ANEXOS

11.1 Mapa y características del vector pCP20



- pSC101 ori: origen de replicación de bajo número de copias. Requiere de la proteína Rep101.
- Rep101: gen *rep101* que codifica para la una versión termosensible de la proteína RepA (A56V). Necesaria para la replicación del origen pSC101.
- AmpR: β-lactamasa. Confiere resistencia a ampicilina, carbenicilina y antibióticos relacionados. Incluye promotor.
- FLP: Recombinasa sitio-específica de *S. cerevisiae*. La recombinación tiene lugar en las secuencias FRT.
- Represor λ (ts): Variante termosensible del represor del fago λ (A67T).
- CmR: Cloranfenicol acetiltransferasa. Confiere resistencia al cloranfenicol. Incluye promotor.

11.2 Secuencia nucleotídica del vector pACYCDuet-Gly (sistema *AlrD-AldH*)

CATATGAAGCAAGTCACCCTGCCGACGGCGAGCGCATCCCGGCGCTCGGCATGGGAACGTGGAATAT
GGGCGAGTCGCGCGCCGCGCGCCGAAGAAATCGCCACGCTGCGCCTGGGCCTGGACCTTGGCCTG
CGGCTGATCGATACCGCCGAGATGTATGGCGAGGGCCAGTCCGAGGAGATGATCGGGCAGGCCATCGC
CGGGCGCCGCGACGAGGCCTTCCCTCGTCAGCAAGGTCTATCCCTTCAACGCCAGCCGGCGCGGCACCG
TGCAAGCCTGCGAGCGCAGCCTGAAGCGGCTGCGCACCGACCGCATCGACCTCTATTTATTGCACTGGC
GCGGGCGCGTGCCGCTGGAAGAGACCGTGCAGGCCATGGAGGCGCTGCAGCGCGACCGGCAAGATCCG
CCGCTGGGGCGTGAGCAACCTGGACCTGTCCGATATGCAGGAGTTGTGGGACGCGACCGGGCGCGACC
GGCTGGCCATCAACCAGTTGCTGTACAACCTGGGCCGCGCGGCATCGAATGGGACCTGCTGCCGTGG
CTGCGCCAGCGCGCGTGCCGGTATGGCCTATTCGCCGATCGAGCAGTCACGCCTGCTGGGCAACCC
CGGTCTGAAGCGCTTTGCGCGCGACCACGGCATGACGGCGGCACAGGCGGCGCTGGCCTGGCTGCTG
GCGCAGGACGGCGTCATCGCCATCCCAAGACCAGCCGGCGCGAGCGCCTGCTGGAGAACCTGGGCG
CGCTGTGCGATACGCTGTGCGGCCAGCTGGCCGAGCTCGACCGCATCTTCCCGCCGCCGACGGC
CCGGCCCGCTGGAAATGCTT**TGATCATG**ATCTAGAG**ATTAAGAGGAGAAA**TACTAG**ATG**CGAGAAGT
CCCCGACCTGTGTCGGTCTTTGGCGCCATGCACGCCGCGTCCGCGCGCGACCGAGCTGCCCGCCTGGG
CCGTGCGTGCCGACCGCCTGCAGCGCCTGCGCCGGCTGGTGACAGAGAACGAGGCTGCCATTGCCGCG
GCCATTCACGCGGACTTCAACAACCGGCCGCGGCAGGAAACCGCGCTGCTGGAGGTATTCCCGAGCCT
CGGCGGCATCGACGACGCGCTGCGCCACGGCAAGCGCTGGATGCGCGTGCGCCGCGCCGCCACCGGC
TTCTGGTTCCGCCCCGGCCGCTCGCGGCTGGTGCCGACCGCTGGGAGTGGTGGGCATCGTGGTGCC
CTGGAATATCCGCTGTACCTGACGGTAGGGCCGCTGGCCGGCGCGCTGGCGGGGGCAACCGCGCCA
TGGTGAAGCTGTGGAATACACGCCGCGCTTTGCGGCCTTGTTCGCGCAACTGGTGCCGACGACTTTG
CGCCGGACGAGATCATGGTGGTCAATGGCGATGCCGAGGTGGCGAGCGCCTTTACCGCGTGCCCTTC
GACCACCTGCTGTTACCGGCTCGACCGCGGTGCGCCACCATGTGATGCGCGCGGCAGCCGCCAACCT
GACCCCGGTGACGCTGGAACCTCGGCGCAAATCGCCGGCGATTATCGGCGCGGCGCTGACCTGCCGCG
GTGCGGTGGAACGCATCCTGGTGGGCAAGCTGATGAACGCGGGCCAGACCTGCATCGCGCCAGACTAC
GTGCTGGTGCCGGAAGACCTGCGCGGGCAGCTGGTGGAGCCGGCACGCCGGTGCCTTGACCGGCTCTA
TCCGGACCTGGCGCGCAACCGGGACTACACCAGCATCATCAGCCCCGCGCCACTTCGCGCGGCTGGCGG
CGCTGGTGGACGAAGCCGCGGCGCAAGGCGCGACCGTGGTGCCGCTGTCCGATGCGCAGCCGGACGC
GCACGCGCGGCGCCTGCCACCGGTGCTGCTGCTGGATGTGCCCGAAGGCGTCACGGCGATGCGCGAG
GAGATCTTCGGGCGGTAAGTCCCGTGGTACCGTACCGCACCTGGACGAGGCGGTGGACTACATCAAT
GCGCGCCCGCGGCGCTGGCGCTATACCTGTTGAGCGCGACCGCGGCGCCATCGGCCATGTGATGAA
GCAGACCGTTGCCGCGGCGTACGGTCAACGACACCCTGTTCCATATCGCCCAGGACGGCCTGCCCTT
CGGCGGGGTGCGCGCCAGCGGCATGGGCGCCTATCACGGCCAGGCGGGCTTCGACACCTTCTCCAAG
TGAAGCCGGTGTTCACCGAGCCGGCCTGAACGGCGCAGGACTGCTCAAGCCGCCTTACGGCAAGACC
TTCGAAACCATGTTGCGCCTGCTTCTGCGT**TGAGGTACC**

Código de color:

Sitios de corte para comprobar: *NdeI*, *PagI* y *Acc65I* (en orden)

Codones de inicio y de paro

Secuencia nucleotídica de *alrD* con uso de codones optimizado para *E. coli*

Secuencia nucleotídica de *aldH* con uso de codones optimizado para *E. coli*

Sitio de unión a ribosoma ó RBS (secuencia Shine-Dalgarno)

11.3 Estequiometría y cálculo del potencial de vías metabólicas (Dugar & Stephanopoulos, 2011).

Grados de reducción de elementos:

$$\begin{aligned}C &= 4 \\H &= 1 \\O &= -2\end{aligned}$$

Grados de reducción del sustrato y producto (γ):

$$\text{Glicerol (C}_3\text{H}_8\text{O}_3) = (3 \times 4) + (8 \times 1) + (3 \times (-2)) = \underline{14}$$

$$\text{(R)-3-hidroxi butirato (C}_4\text{H}_4\text{O}_3) = (4 \times 4) + (8 \times 1) + (3 \times (-2)) = \underline{18}$$

Rendimiento máximo:

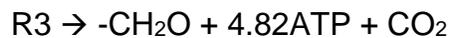
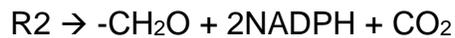
Y^E = Cantidad máxima de producto asumiendo que toda la energía generada a partir del sustrato es dirigida a dicho producto.

$$Y^E = \gamma_S / \gamma_P = 14/18 =$$

$$\underline{\underline{0.78 \text{ mol R3HB/ mol Gly [=} 0.88 \text{ g R3HB/ g Gly}}}$$

Rendimiento de la vía metabólica:

Considerando las reacciones:



Y^P = Cantidad máxima de producto dependiente de la vía metabólica, considerando su estequiometría (R1, R2, R3).

$$Y^P = \frac{Y}{R1+R2+R3} = \frac{Y}{1 + \frac{a}{2} - \frac{c}{4.82} \text{ if } c < 0 \text{ else } c=0}$$

Al no haber producción de NADPH ni ATP, el valor de Y es igual al rendimiento con base en R1 solamente.

La vía metabólica balanceada para las cepas transformadas con el vector pTrc-R3HB es:



De manera que:

$$Y^P = \frac{(1 \text{ mol R3HB}) / (2 \text{ mol Gly})}{1 + (\frac{1}{2})} =$$

$$\mathbf{0.33 \text{ mol R3HB} / \text{mol Gly} [=] \mathbf{0.38 \text{ g R3HB} / \text{g Gly}}$$

Con una eficiencia (η) con respecto al rendimiento máximo Y^E :

$$\mathbf{\eta = 42.84 \%}$$

La vía metabólica general balanceada de las cepas transformadas con el vector pACYCDuet-Gly-R3HB por moles de C de glicerol:



De manera que:

$$Y^P = \frac{(1 \text{ mol R3HB}) / (2 \text{ mol Gly})}{1 + (\frac{0}{2})} =$$

$$\mathbf{0.5 \text{ mol R3HB} / \text{mol Gly} [=] \mathbf{0.565 \text{ g R3HB} / \text{g Gly}}$$

Con una eficiencia (η) con respecto al rendimiento máximo Y^E :

$$\mathbf{\eta = 64.22 \%}$$

11.4 Características del método de HPLC.

- Fase móvil: Ácido sulfúrico 5 mM.
- Fase estacionaria: 2 columnas Aminex HPX-87H conectadas en serie.
- Flujo: 0.4 mL/min.
- Temperatura: 30°C.
- Generalidades del equipo:
 - Detector UV de arreglo de diodos Waters 996 (PDA).
 - Detector de índice de refracción Waters 717 (IR).
- Esquema general:

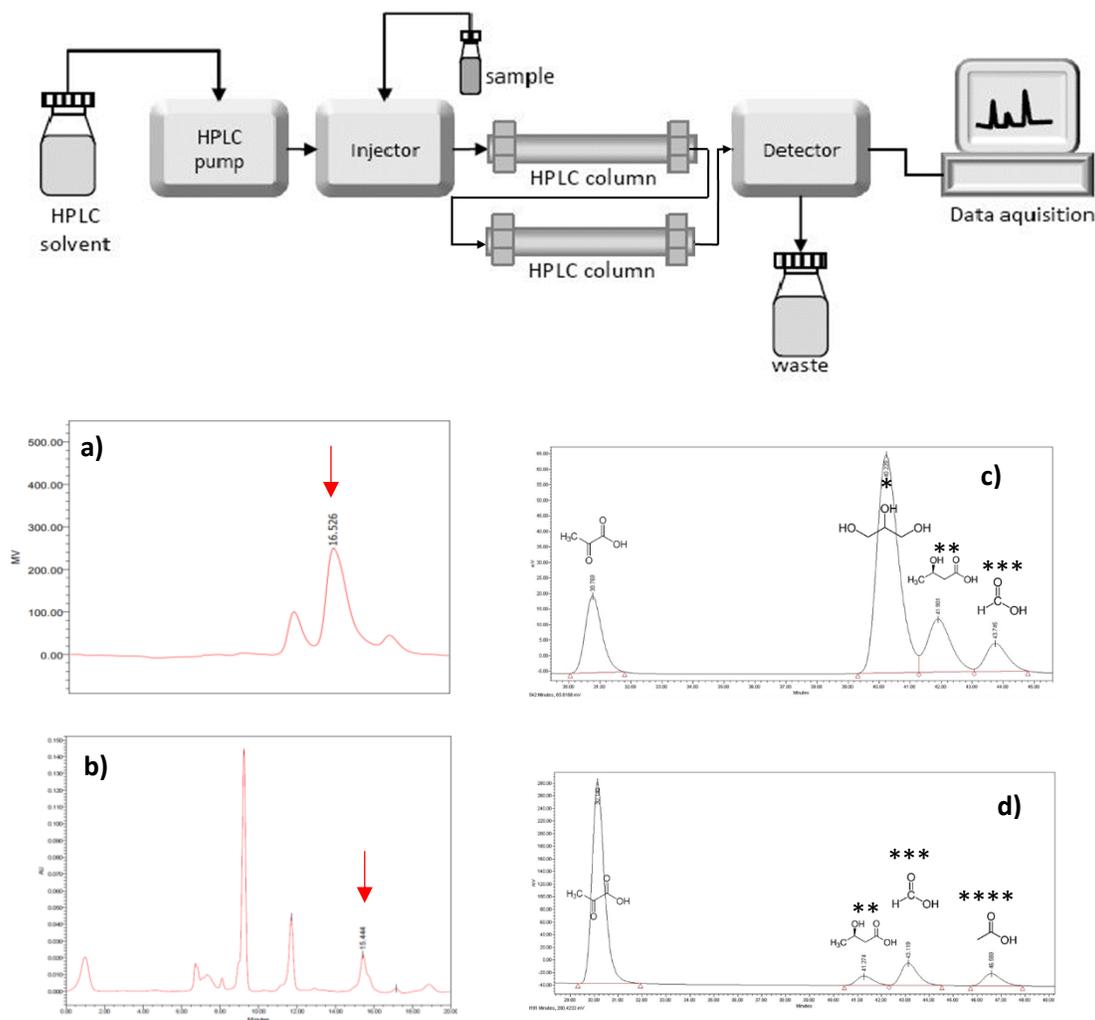


Fig. 22. Comparación entre cromatogramas obtenidos con diferentes métodos (Arriba: IR; Abajo: PDA).

a y b) Método: Ácido sulfúrico 5 mM (fase móvil), 50°C y 0.5 mL/min. Columna Aminex HPX-87H. No hay resolución entre picos de glicerol, (R)-3HB y formiato (flechas).

c y d) Método: Ácido sulfúrico 5 mM (fase móvil), 30°C y 0.4 mL/min. Dos columnas Aminex HPX-87H. Se resuelven eficientemente los picos para glicerol, (R)-3HB y formiato.

Compuestos evaluados (de izquierda a derecha): Piruvato, succinato, lactato, glicerol (*), (R)-3HB (**), formiato (***) y acetato (****).

11.5 Efecto de la temperatura en coeficientes de transferencia de oxígeno (k_La) y velocidad específica de consumo de oxígeno (q_{O_2})

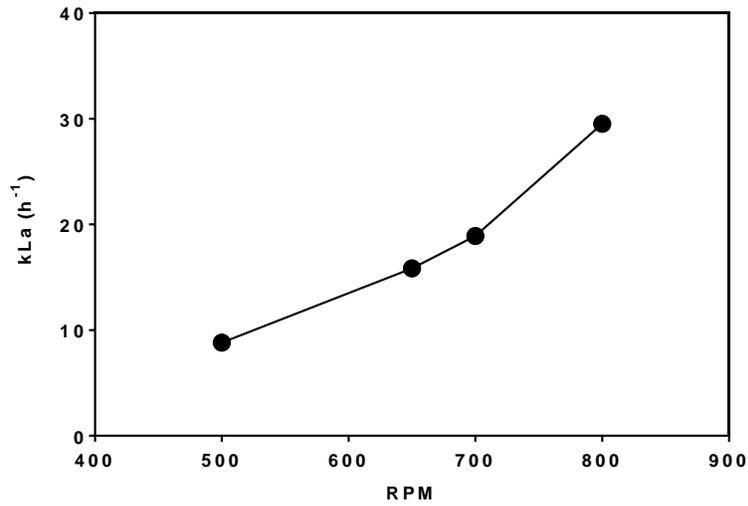


Fig. 23. Efecto de la velocidad de agitación (RPM) sobre el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_La) manteniendo constante el flujo de aireación (0.5 vvm) a 30°C.

El experimento se realizó utilizando una solución con 40 g/L de glicerol, simulando al medio mínimo mineral AM1 empleado en este trabajo.

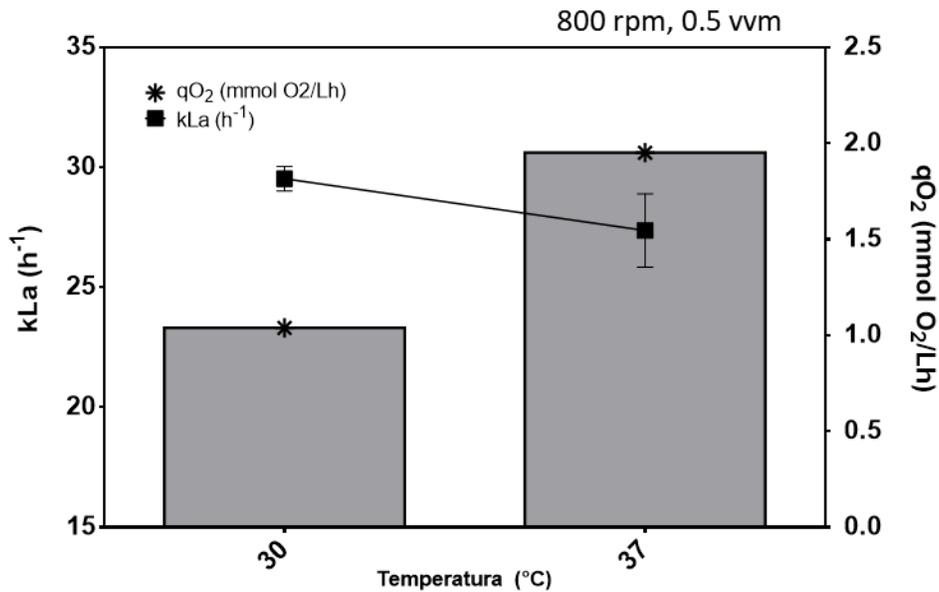


Fig. 24. Diferencia entre los valores de k_La y q_{O_2} a 30°C con respecto a 37°C.

Se mantuvo la misma agitación (800 rpm) y aireación (0.5 vvm). k_La se mantiene casi constante, en cambio, q_{O_2} baja al 50% cuando la temperatura cambia de 37°C a 30°C.

Para calcular q_{O_2} se utilizó la siguiente expresión, bajo la suposición de condiciones limitantes de oxígeno. Los valores de $C_{LA}^{(*)}$ se ajustaron considerando una altura de 1,510 msnm para la ciudad de Cuernavaca, Mor.

$$OTR = OUR$$

$$k_{La} (C_{LA}^* - C_{LA}) = q_{O_2} X$$

A 37°C:

$$k_{La} = 27.36 \text{ h}^{-1}$$

$$C_{LA}^* = 0.2155 \text{ mmol O}_2/\text{L}$$

$$C_{LA} = 0 \text{ mmol O}_2/\text{L}$$

X → Promedio de la biomasa alcanzada por las cepas a 37°C durante limitación de oxígeno.

$$X = 3 \text{ g/L}$$

Despejando

$$\underline{q_{O_2} = 1.97 \text{ mmol O}_2/\text{g CDW h}}$$

A 30°C:

$$k_{La} = 29.52 \text{ h}^{-1}$$

$$C_{LA}^* = 0.2388 \text{ mmol O}_2/\text{L}$$

$$C_{LA} = 0.0937 \text{ mmol O}_2/\text{L} \text{ (siendo 40\% el valor más bajo de TOD alcanzado)}$$

X → Promedio de la biomasa alcanzada por las cepas silvestre y FR01 a 30°C para alcanzar el punto mínimo de TOD (datos no mostrados).

$$X = 4 \text{ g/L}$$

Despejando

$$\underline{q_{O_2} = 1.069 \text{ mmol mmol O}_2/\text{g CDW}}$$



Sociedad Mexicana de
Biotecnología y Bioingeniería

León, Guanajuato
23 al 28 de junio
2019

Otorga la presente

CONSTANCIA

A:

FIDEL OSWALDO RAMIREZ AMADOR

Por su asistencia al XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería
23 al 28 de junio de 2019 en León, Guanajuato, México.

Dr. Adelfo Escalante Lozada
Presidente de la SMBB

Dr. Jaime Ortega López
Presidente del Comité Organizador

Dra. Sylvie LeBorgne
Presidente del Comité Certificador



leon-mexico.com