



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS DE RESERVA EN  
*ACINETOBACTER BAYLYI* ADP1 CON VARIAS FUENTES DE CARBONO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Karina Jasmin Salcedo Vite

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Alfredo Martínez Jiménez  
[Instituto de Biotecnología UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Juan Carlos Sigala Alanís  
[Universidad Autónoma Metropolitana](#)  
Dr. Daniel Genaro Segura González  
[Instituto de Biotecnología UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos. Diciembre, 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.







# Instituto de Biotecnología

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

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

Para su realización, se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de su Programa de Becas para Estudios de Posgrado, del proyecto apoyado por el FONCICYT: SMIBIO - ERANet-LAC Número C0013 – 248192 y de la UNAM con el proyecto PAPIIT – DGAPA – IV100119.



## **Miembros del jurado**

**Presidente:** Dr. Mario Soberón Chávez

**Secretario:** Dr. Carlos Felipe Peña Malacara

**Vocal:** Dra. María del Refugio Trejo Hernández

**Vocal:** Dra. Wendy Xolalpa Villanueva

**Vocal:** Dr. José Alberto Hernández Eligio





*A ti, mamá, por cuidarme y por enseñarme que, en la vida la mejor presentación es el  
trabajo*

*A ti, Darío, mi mejor compañía, mi más grande amor....*



## **Agradecimientos Institucionales**

A los miembros del jurado por su valiosa labor en la revisión de esta tesis.

A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Juan Carlos Sigala Alanís y Dr. Daniel Genaro Segura González, por contribuir al desarrollo de este proyecto y a mi formación.

A las técnicas académicas del laboratorio No. 04: Q. I. Luz María Martínez Mejía, por su apoyo en la generación de la cepa *ΔAtfA* y M. en C. Georgina Teresa Hernández Chávez, por su participación en la cuantificación de metabolitos por HPLC.

A la auxiliar de laboratorio Aurelia González Guzmán y al Biol. Manuel Saucedo Ramírez, por facilitar mis labores experimentales.

A Juan Manuel Hurtado Ramírez de la Unidad de cómputo por el soporte técnico.

## **Agradecimientos personales**

A mi tutor, el Dr. Alfredo Martínez, por la comprensión, amistad y soporte académico.

A los que fueron mis compañeros y amigos en el laboratorio No. 04, por compartir un espacio tan pequeño en armonía: Alejandra Vargas, Andy, Andrés, Juan Carlos, Jesús, Susy, Fabián, Carlos, Estefanía, Ángeles, Fidel, Karla, Paty y todos los que haya olvidado debido a mi Alzheimer juvenil.

A mi amiga Dulce, que me ha acompañado durante todo el doctorado y que ha sido mi soporte académico y personal.

A Luz María, Georgina, Rubí y Aure, por todo el cariño y por compartir su sabiduría conmigo.

A los Doctores Adelfo Escalante, Luis Caspeta y Guillermo Gosset, por su soporte académico y por su amistad.

A mis compañeros y amigos de mis equipos de fútbol y basquetbol (Panquecitos, Endorfinas, Panteras, Pumas y UCIM), porque junto a ellos pasé muchos de mis mejores momentos en el IBt.

A mis amigos, resultado de tantos años en el IBt: Jimena, Joaquín Ramírez, Mabel Rodríguez, Rosa Román, Brenda, Adriana Milena y Susy Rodríguez.

A mi familia, especialmente a mi mamá por ayudarme a alcanzar esta meta.



## RESUMEN

En este trabajo se evaluaron el crecimiento y la producción de lípidos de reserva en *Acinetobacter baylyi* ADP1 a partir de compuestos que, por su disponibilidad y costo, pueden ser utilizados como fuente de carbono (FC) en procesos a nivel industrial. Adicionalmente, estos compuestos poseen diferentes estados de reducción, este parámetro tiene un efecto directo en los rendimientos de biomasa a sustrato consumido ( $Y_{x/s}$ ), de productos de interés y de subproductos de un cultivo. ADP1 mostró altas tasas de crecimiento específico ( $\mu$ ) en FCs gluconeogénicas (etanol, acetato y piruvato:  $0.94 \pm 0.18$ ,  $0.93 \pm 0.06$  y  $0.61 \pm 0.01$  h<sup>-1</sup>, respectivamente) y un valor bajo en glucosa ( $0.25 \pm 0.01$  h<sup>-1</sup>). El valor de  $\mu$  se mantuvo en un amplio intervalo de concentraciones de glucosa ( $0.5$ – $50$  g L<sup>-1</sup>) y de piruvato ( $3$ – $10$  g L<sup>-1</sup>). Cabe mencionar que en cultivos con xilosa o glicerol no se observó crecimiento. Por otro lado, se observó lisis al inicio de los cultivos en medio mineral, lo que sugirió que ADP1 es sensible a cambios osmóticos ascendentes, no obstante, se adapta a concentraciones de sustrato relativamente altas, como lo indican las concentraciones mínimas inhibitorias determinadas en cultivos de 24 h: 350, 50, 80 y 15 g L<sup>-1</sup> para glucosa, etanol, piruvato y acetato, respectivamente. Los  $Y_{x/s}$  no mostraron una relación directa con el estado de reducción de las FCs (estado de reducción de 6, 4, 4 y 3.3 para etanol, glucosa, acetato y piruvato, respectivamente): se observaron rendimientos similares en cultivos con acetato y glucosa ( $10.88 \pm 0.55$  y  $10.84 \pm 0.54$  g biomasa / C-mol, respectivamente), y  $12.54 \pm 1.32$  y  $14.14 \pm 1.59$  g biomasa / C-mol para piruvato y etanol, respectivamente. Los valores de concentración de biomasa y productividad (biomasa producida por volumen en el tiempo) más altos, al igual que el  $Y_{x/s}$ , se hallaron en cultivos con etanol,  $0.83$  g L<sup>-1</sup> y  $0.18$  g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente. En condiciones limitantes de nitrógeno, ADP1 es capaz de acumular lípidos durante aproximadamente 24 h. Por esta razón, la producción de lípidos de reserva con las FCs metabolizables fue evaluada en cultivos limitados en nitrógeno durante 12 h. En cultivos con glucosa, ADP1 acumuló  $4.1 \pm 0.0$  y  $1.5 \pm 0.3$  % CDW (peso celular seco, *cell dry weight*) en forma de ceras éster (CEs) y triacilgliceroles (TAGs), respectivamente; con piruvato,  $10.0 \pm 0.9$  y  $1.2 \pm 0.3$  % CDW, como CEs y TAGs, respectivamente; con acetato,  $4.9 \pm 0.9$  % CDW como CEs y no fue posible detectar la producción de TAGs; en cultivos con etanol no se produjeron lípidos de reserva aún después de 36 h de cultivo. Con todas las FCs se sintetizaron los mismos ácidos grasos (C12:0, C14:0, C16:0, C16:1, C18:0 y C18:1) y

alcoholes grasos (C16:0, C16:1, C18:0 y C18:1). El porcentaje de acumulación de lípidos de reserva observado con piruvato es el valor más alto reportado a la fecha para una cepa ADP1 silvestre. Adicionalmente, se identificó la co-utilización de glucosa, acetato, etanol y piruvato en ADP1 y su, aparentemente, baja resistencia a antibióticos; se evaluaron carbenicilina, espectinomicina y cloranfenicol, y únicamente se observó resistencia a carbenicilina.

## ABSTRACT

In this work, growth performance and reserve lipids production in *Acinetobacter baylyi* ADP1 were evaluated using compounds that, due to their availability and low cost, can be used as a carbon source (FC) in industrial processes. In addition, these compounds have different degree of reduction, this parameter directly affects biomass, products and by-products to consumed-substrate yields. ADP1 showed higher specific growth rate ( $\mu$ ) in gluconeogenic FCs (ethanol, acetate and pyruvate:  $0.94 \pm 0.18$ ,  $0.93 \pm 0.06$  and  $0.61 \pm 0.01$   $\text{h}^{-1}$ , respectively) than in glucose ( $0.25 \pm 0.01$   $\text{h}^{-1}$ ). These values remained in a wide range of glucose ( $0.5\text{--}50$   $\text{g L}^{-1}$ ) and pyruvate ( $3\text{--}10$   $\text{g L}^{-1}$ ) concentrations. In cultures with xylose or glycerol no growth was observed. On the other hand, lysis was detected at the beginning of cultures in mineral medium, suggesting that ADP1 is sensitive to osmotic upshifts. However, ADP1 was able to adapt to relatively high substrate concentrations, as indicated by minimal inhibitory concentrations determined in 24 h cultures: 350, 50, 80 and 15  $\text{g L}^{-1}$  for glucose, ethanol, pyruvate and acetate, respectively. Biomass yields ( $Y_{x/s}$ ) found with the different FCs didn't show direct relation with their degree of reduction (degree of reduction: 6, 4, 4 and 3.3 for ethanol, glucose, acetate and pyruvate, respectively): similar yields were observed in cultures with acetate and glucose ( $10.88 \pm 0.55$  and  $10.84 \pm 0.54$   $\text{g biomass/C-mol}$ , respectively), and  $12.54 \pm 1.32$  and  $14.14 \pm 1.59$   $\text{g biomass/C-mol}$  for pyruvate and ethanol, respectively. The highest biomass concentration and productivity (biomass produced by volume over time) values, like  $Y_{x/s}$ , were found using ethanol,  $0.83$   $\text{g L}^{-1}$  and  $0.18$   $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ , respectively. Under nitrogen limitation, ADP1 was able to accumulate lipids for approximately 24 h. For this reason, reserve lipids production with metabolizable FCs was assessed in nitrogen-limited cultures for 12 h. In cultures with glucose, ADP1 accumulated  $4.1 \pm 0.0$  and  $1.5 \pm 0.3$  % CDW (cell dry weight) as wax esters (CEs) and triacylglycerols (TAGs), respectively; with pyruvate,  $10.0 \pm 0.9$  and  $1.2 \pm 0.3$  % CDW as CE and TAG, respectively; with acetate,  $4.9 \pm 0.9$  % CDW as CE, we were not able to detect TAGs production; in cultures with ethanol no reserve lipids were produced even after 36 h of culture. With all FCs, the same fatty acids (C12:0, C14:0, C16:0, C16:1, C18:0 and C18:1) and fatty alcohols (C16: 0, C16: 1, C18: 0 and C18: 1) were synthesized. The accumulated reserve lipids observed using pyruvate as FC represent the highest value reported to date for the wild type ADP1 strain. In addition, glucose, acetate, ethanol and pyruvate co-utilization in ADP1 and its apparently low resistance to antibiotics were identified; carbenicillin, spectinomycin and chloramphenicol were evaluated, only resistance to carbenicillin was observed.

# Índice general

<b>1. Introducción</b>	3
<b>2. Marco Teórico</b>	4
2.1. <i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	4
2.1.1. Generalidades	4
2.1.2. Metabolismo	5
2.1.3. Represión catabólica del carbono	10
2.1.4. Modificación genética	13
2.2. Síntesis de CEs y TAGs en bacterias	14
2.3. Las CEs y TAGs como metabolitos de interés	21
2.4. Importancia de la FC en la generación de metabolitos de interés	22
<b>3. Antecedentes</b>	23
<b>4. Hipótesis</b>	27
<b>5. Objetivo general</b>	27
<b>6. Objetivos particulares</b>	27
<b>7. Materiales y métodos</b>	28
7.1. Cepa, medios y condiciones de cultivo	28
7.2. Crecimiento de ADP1 con FCs únicas: capacidad de crecimiento y tolerancia	29
7.3. Crecimiento de ADP1 con FCs únicas: determinación de la velocidad de crecimiento específica ( $\mu$ ) con las FCs metabolizables	30
7.4. Crecimiento de ADP1 con FCs únicas: determinación del rendimiento de biomasa ( $Y_{x/s}$ ) con las FCs metabolizables	30
7.5. Determinación del uso simultáneo de las FCs metabolizables: etanol, glucosa, acetato y piruvato	31
7.6. Eliminación del gen <i>AtfA</i>	31
7.6.1. Amplificación de la <i>secuencia de inserción</i>	31
7.6.2. Transformación	33
7.7. Cinética de producción de lípidos en las cepas ADP1 y $\Delta$ AtfA	34
7.8. Producción de lípidos en la cepa ADP1 con las FCs metabolizables	34
7.9. Extracción de lípidos totales	35
7.10. Evaluación de la resistencia de ADP1 a antibióticos	36
7.11. Métodos analíticos	36
7.11.1. Cuantificación de crecimiento	36
7.11.2. Cuantificación de metabolitos	36



7.11.3.	Análisis de lípidos	36
7.12.	<b>Análisis estadístico</b>	37
<b>8.</b>	<b>Resultados</b>	38
8.1.	<b>Crecimiento de ADP1 con FCs únicas</b>	38
8.2.	<b>Cinética de producción de lípidos en ADP1</b>	44
8.3.	<b>Producción de lípidos en ADP1 con las FCs metabolizables</b>	47
8.4.	<b>Investigación adicional</b>	54
8.4.1.	Efecto de la eliminación del gen <i>AtfA</i> en la producción de alcoholes grasos de ADP1	54
8.4.2.	Utilización simultánea de etanol, glucosa, acetato y piruvato en ADP1	55
8.4.3.	Lisis de ADP1 al inicio de su cultivo en medio mineral	57
8.4.4.	Resistencia de ADP1 a antibióticos	58
<b>9.</b>	<b>Discusión de resultados</b>	59
<b>10.</b>	<b>Conclusiones</b>	64
<b>11.</b>	<b>Perspectivas</b>	64
<b>12.</b>	<b>Contribuciones</b>	64
<b>13.</b>	<b>Bibliografía</b>	65
<b>14.</b>	<b>Apéndices</b>	71
	<b>Apéndice A. Cálculo del estado de reducción de acetato, glucosa, etanol y piruvato</b>	71
	<b>Apéndice B. Cálculo de los rendimientos de vías metabólicas de CEs y TAGs en <i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1</b>	72
<b>15.</b>	<b>Anexos</b>	77
	<b>Anexo A. Comprobantes de participación en congresos</b>	77
	<b>Anexo B. Actividad docente desarrollada en la Universidad Politécnica del Estado de Morelos</b>	78
	<b>Anexo C. Publicación</b>	79

## Índice de figuras

Figura 1 Micrografías de ADP1 que muestran a. inclusiones lipídicas, barra, 0.2 $\mu\text{m}$ (Wältermann and Steinbüchel 2005), b. <i>pilus</i> grueso indicado por la flecha, barra, 0.2 $\mu\text{m}$ (Gohl et al. 2006) y c. cápsula celular, barra, 10 $\mu\text{m}$ (Juni y Janik, J. Bacteriol.,1969).....	5
Figura 2 Vías metabólicas principales en ADP1. ACIAD2984: Porina sensible a glucosa. GDH: Glucosa deshidrogenasa. GnT: Gluconato transferasa.....	9
Figura 3 Síntesis de CEs y TAGs en bacterias.....	15
Figura 4 Vías de síntesis de CEs y TAGs en bacterias. AtfA: Aciltransferasa A. ACS: Acilo-CoA sintasa. Acr1: Acilo-CoA reductasa. ADH: alcohol deshidrogenasa. PAP: Ácido fosfatídico fosfatasa. CoA-SH: Coenzima A. Pi: fósforo inorgánico. ....	16
Figura 5 Cultivos de ADP1 realizados en tubos de ensayo con medio mineral adicionado con glucosa, etanol, piruvato o acetato a diferentes concentraciones donde se observa la concentración mínima para la inhibición del crecimiento de ADP1 con cada sustrato.....	38
Figura 6 Cultivos representativos de ADP1 en medio mineral suplementado con diferentes concentraciones de a. acetato, b. glucosa o c. piruvato.....	40
Figura 7. Efecto de la concentración de sustrato en la cinética de crecimiento de ADP1. a. Etapa de adaptación, el tiempo de adaptación aumenta de forma directa con la concentración de sustrato. b. Crecimiento exponencial, se observan concentraciones óptimas de sustrato para el crecimiento de ADP1.....	41
Figura 8 Velocidad específica de crecimiento (eje y) en cultivos de ADP1 realizados en matraces con medio mineral adicionado con etanol a 1, 5, 10 y 20 g L <sup>-1</sup> (eje x). ....	42
Figura 9 Relación entre la concentración de biomasa en peso seco y la densidad óptica en cultivos de <i>A. baylyi</i> ADP1.....	43
Figura 10 Cultivos de ADP1 para la producción de biomasa y lípidos de reserva realizados en matraces con medio mineral adicionado con glucosa a 20 g/L. Etapa I: etapa de producción de biomasa. Etapa II: etapa de producción de lípidos. Las flechas indican los puntos donde se analizó el contenido de lípidos en la biomasa y el medio de cultivo.....	45
Figura 11 Perfil lipídico de la biomasa de ADP1 durante la etapa II de los cultivos mostrados en la figura 10, obtenido por a. TLC y b. GC-FID. CEs: ceras éster. TAGs: triacilgliceroles. COOHs: Ácidos grasos libres. OHs: Alcoholes grasos libres. Std: Estándares. COOHs totales: ácidos grasos totales. OHs totales: alcoholes grasos totales.....	45
Figura 12 Etapa de producción de lípidos evaluada en cultivos en matraces alimentados con una solución de glucosa a 200 g L <sup>-1</sup> cada 7-9 h: a. Curvas de biomasa, concentración de la FC y velocidad de consumo de la FC. b. Perfil lipídico de la biomasa a diferentes tiempos (0, 12, 24 y 36 h) obtenido por TLC. CEs: ceras éster. TAGs: triacilgliceroles. COOHs: Ácidos grasos libres. OHs: Alcoholes grasos libres. Std: Estándares. ....	46

Figura 13 Perfil lipídico del caldo de cultivo de la cepa ADP1 obtenido por TLC.a. Evaluación por TLC. b. Evaluación por GC-FID. CEs: ceras éster. TAGs: triacilgliceroles. COOHs: Ácidos grasos libres. OHs: Alcoholes grasos libres. Std: Estándares. COOHs totales: ácidos grasos totales. OHs totales: alcoholes grasos totales. ....	47
Figura 14 Cultivos en la etapa II. Consumo de sustrato y aumento de biomasa en cultivos en medio mineral limitado en nitrógeno y suplementado con a. acetato, b. piruvato, c. etanol y d. glucosa ...	48
Figura 15 a. Lípidos totales de biomasa separados por TLC. I: Lípidos totales de la biomasa al final del cultivo I. II: Lípidos totales de la biomasa al final de los cultivos II adicionados con piruvato (IIP), glucosa (IIG), acetato (IIA) o etanol (IIE). b. Lípidos totales de biomasa derivada de cultivos con etanol donde se observa que a través del tiempo no existe aumento en la concentración de lípidos. Std: estándares. OHs: alcoholes grasos libres. COOHs: ácidos grasos libres. TAGs: triacilgliceroles. CEs: ceras éster.....	49
Figura 16 Ácidos y alcoholes grasos identificados en la biomasa al final de la etapa I (biomasa inicial) y de la etapa II en cultivos con etanol, glucosa, piruvato y acetato. ....	53
Figura 17 Perfil lipídico de a. biomasa y b. medio de cultivo de la cepa <i>ΔAtfA</i> a las 0, 12, 24 y 36 h de la etapa II obtenidos por TLC. CEs: ceras éster. TAGs: triacilgliceroles. COOHs: ácidos grasos libres. OHs: alcoholes grasos libres. Std: estándares .....	55
Figura 18 a. Cultivo de ADP1 en medio AM1-MOPS suplementado con una mezcla acetato-etanol-piruvato-glucosa a 2 g L <sup>-1</sup> cada uno, crecimiento y consumo de las FCs b. Utilización simultánea de acetato y etanol en cultivo con una mezcla acetato-etanol.....	56
Figura 19 Cultivo de ADP1 en AM1-MOPS suplementado con una mezcla acetato-glucosa a 2 g L <sup>-1</sup> cada uno, utilizando como inóculo: a. Un cultivo en AM1-MOPS con acetato o b. Un cultivo en AM1-MOPS con glucosa. ....	56
Figura 20 Cultivos de ADP1 en medio mineral AM1 adicionado con a. acetato a 4 g L <sup>-1</sup> o b. glucosa 4 g L <sup>-1</sup> , donde se observa la lisis al inicio de los cultivos .....	57
Figura 21 a. Cultivos de ADP1 en medio AM1-MOPS adicionado con: glucosa 4.5 g L <sup>-1</sup> ; glucosa 5.0 g L <sup>-1</sup> y MOPS 100 mM; o, glucosa 4.5 g L <sup>-1</sup> y extracto de levadura 0.5 g L <sup>-1</sup> . Se observa que la adición de MOPS y extracto de levadura previenen la lisis inicial en cultivos con glucosa. b. cultivos en AM1-MOPS adicionado con etanol, acetato o piruvato, a 3 g L <sup>-1</sup> cada uno, donde aún se observa la lisis al inicio de los cultivos.....	58

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1</b> Clasificación taxonómica de ADP1.....	4
<b>Tabla 2</b> Producción de CEs y TAGs en Gammaproteobacterias.....	17
<b>Tabla 3</b> Producción de CEs y TAGs en Actinobacterias.....	19
<b>Tabla 4</b> Cepas sobreproductoras de LR derivadas de ADP1.....	24
<b>Tabla 5</b> Compuestos que han sido utilizados como FC para el cultivo de ADP1. ....	25
<b>Tabla 6</b> Mezclas de reacción utilizadas para la amplificación por PCR de las secuencias necesarias para eliminación del gen <i>AtfA</i> .....	32
<b>Tabla 7</b> Programas de temperatura utilizados para la amplificación por PCR de las secuencias necesarias para eliminación del gen <i>AtfA</i> .....	32
<b>Tabla 8</b> Secuencia y tamaño de los <i>oligos</i> utilizados para la eliminación del gen <i>AtfA</i> .....	33
<b>Tabla 9</b> Comparación de $\mu_{\text{máx}}$ observada en cultivos de ADP1 con glucosa, acetato, etanol y piruvato en dos sistemas: microplacas y matraces. ....	42
<b>Tabla 10</b> Parámetros de producción de biomasa evaluada con varias FCs a 3 g L <sup>-1</sup> .....	43
<b>Tabla 11</b> Parámetros de producción de TAGs y CEs en los cultivos de ADP1 con acetato, glucosa y piruvato como FCs únicas.....	51
<b>Tabla 12.</b> Resistencia a antibióticos de ADP1 en medio LB líquido. ....	59

## Índice de abreviaturas

<b><math>\mu_{\text{máx}}</math>:</b>	Velocidad específica de crecimiento máxima
<b><math>\mu</math>:</b>	Velocidad específica de crecimiento
<b>ACIAD:</b>	Prefijo asignado a los genes de <i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1
<b>ADP1:</b>	<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1
<b>AM1-MOPS:</b>	Medio mineral AM1 adicionado con MOPS
<b>ARNm:</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ATP:</b>	Trifosfato de adenosina
<b>CCR:</b>	<i>Carbon catabolite repression</i> , represión catabólica del carbono
<b>CDW:</b>	<i>Cell dry weight</i> , peso celular seco
<b>CEs:</b>	Ceras éster
<b>COOHs:</b>	Ácidos grasos libres
<b>Crc:</b>	Proteína de control de represión catabólica
<b>DAG:</b>	1,2-diacilglicerol
<b>DO<sub>600</sub>:</b>	Densidad óptica a 600 nm
<b>DO<sub>630</sub>:</b>	Densidad óptica a 630 nm
<b>Eb:</b>	Matraces Erlenmeyer con baffles
<b>ED:</b>	Entner-Doudoroff, vía glucolítica
<b>EPS:</b>	Exopolisacárido
<b>ET:</b>	Eficiencia de transformación
<b>FAMEs:</b>	<i>Fatty acid methyl esters</i> , ésteres metílicos de ácidos grasos
<b>FC:</b>	Fuente de carbono
<b>FCs:</b>	Fuentes de carbono
<b>g:</b>	Unidades de gravedad
<b>G3P:</b>	Gliceraldehído 3-fosfato
<b>GC-FID:</b>	<i>Gas chromatography - flame ionization detector</i> , cromatografía de gases con un detector de ionización de llama
<b>GDH:</b>	Glucosa deshidrogenasa
<b>MOPS:</b>	Ácido 3- (n-morfolino) propanosulfónico
<b>NADH:</b>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
<b>NADPH:</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>OAA:</b>	Oxalacetato
<b>OHs:</b>	Alcoholes grasos libres
<b>PEP:</b>	Fosfoenolpiruvato
<b>TAGs:</b>	Triacilgliceroles
<b>TLC:</b>	<i>Thin layer chromatography</i> , cromatografía en capa fina
<b>UFCs:</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>Y<sub>x/s</sub>:</b>	Rendimiento de biomasa por sustrato consumido

## Glosario

**De novo:** hace referencia a compuestos sintetizados a partir de moléculas con una estructura química muy distinta, a partir de varios pasos metabólicos

**Etapa I:** etapa de cultivo donde se produce la biomasa

**Etapa II:** etapa de cultivo donde se acumulan los lípidos de reserva

**Ex novo:** hace referencia a compuestos sintetizados a partir de moléculas con una estructura química muy similar, a partir de uno o pocos pasos metabólicos

**Exopolisacárido:** polisacárido de L-ramnosa, D-glucosa, ácido D-glucurónico y D-manosa que forma la cápsula celular y es excretado al medio de cultivo por algunas cepas de *Acinetobacter*

**Medio mineral AM1:** Medio de cultivo con una baja concentración de sales

**Pili:** Estructuras en forma de pelo, más cortas y finas que los flagelos que se encuentran en la superficie de muchas bacterias

**Pilus:** plural de Pili

**Relación C/N:** valor numérico que determina la proporción peso/peso de Carbono a Nitrógeno

**x g:** Fuerza g o fuerza centrífuga relativa (*relative centrifugal force*, RCF), es la cantidad de aceleración que se aplicará a la muestra en un proceso de centrifugación y depende de las revoluciones por minuto (rpm) y del radio del rotor.

## 1. Introducción

*Acinetobacter baylyi* ADP1 es una bacteria gramnegativa que fue aislada de suelo en 1961 por Juni y colaboradores (Taylor and Juni 1961a). A través de su caracterización bioquímica (Dolin and Juni 1978) y la secuenciación de su genoma (Barbe et al. 2004), se ha observado que ADP1 es capaz de utilizar un número importante de compuestos como fuente de carbono (FC) y/o energía (Taylor and Juni 1961b; Kannisto et al. 2015), produce ceras éster (CEs) y triacilgliceroles (TAGs) como reserva de carbono (Santala et al. 2011b; Kannisto et al. 2014) y su modificación genética es sencilla (Palmen et al. 1993). Debido a estas características, ADP1 es un modelo de investigación con potencial para ser utilizado en procesos de biorremediación y de generación de compuestos de interés comercial, p. ej. ceras éster, que son empleadas en la formulación de cosméticos y productos de cuidado personal (Abdel-El-Haleem 2004). Si bien existe un conocimiento general del metabolismo de ADP1, la disponibilidad de datos cuantitativos y cinéticos tanto de su crecimiento como de su producción de lípidos con diversas FCs es escasa. Por lo que en este trabajo se propuso determinar cuantitativa y sistemáticamente la capacidad de ADP1 para crecer y almacenar lípidos a partir de compuestos que se encuentran en materias primas de costo bajo como FCs únicas: glicerol, un residuo en la industria del biodiesel (Dharmadi et al. 2006); glucosa y xilosa, los azúcares más abundantes en los materiales lignocelulósicos (Zhao et al. 2012); y, acetato, piruvato y etanol, productos de fermentación de diferentes microorganismos. En ADP1, las CEs están formadas por residuos de ácidos y alcoholes grasos C16:0, C16:1, C18:0 y C18:1; y los TAGs por residuos de ácidos grasos C12:0, C14:0, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1n9, C18:1n9+11. El producto de la transesterificación de estos compuestos con metanol generaría una mezcla de metil ésteres y alcoholes grasos de 12 a 19 átomos de carbono que puede ser utilizada como biodiesel. Adicionalmente, en este trabajo se propuso generar una cepa acumuladora de alcoholes grasos, que son intermediarios de la vía de síntesis de CEs; estos, sumado a su potencial como biocombustibles, son precursores de surfactantes y tienen propiedades emolientes y emulsificantes, por lo que son utilizados en las industrias farmacéutica, cosmética y de detergentes (Mudge et al. 2008). Adicionalmente, se consideró importante evaluar si en ADP1 existe un uso preferencial de las FCs que es capaz de metabolizar. Cabe mencionar que la represión catabólica de carbono puede disminuir la

velocidad de crecimiento global de un microorganismo debido a fases de latencia intermedias relacionadas con la adaptación a las diferentes FCs.

## 2. Marco Teórico

### 2.1. *Acinetobacter baylyi* ADP1

#### 2.1.1. Generalidades

ADP1 es una Gammaproteobacteria (**Tabla 1**, clasificación taxonómica) que fue obtenida por mutación con luz ultravioleta de la cepa *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 y se nombró *Acinetobacter calcoaceticus* BD413 (Juni and Janik 1969). Debido a la dificultad para discernir entre las especies de *Acinetobacter*, su designación fue cambiada a *Acinetobacter* sp. ADP1 y finalmente a *Acinetobacter baylyi* ADP1, por lo que en la literatura pueden encontrarse reportes con las tres designaciones (Vanechoutte et al. 2006).

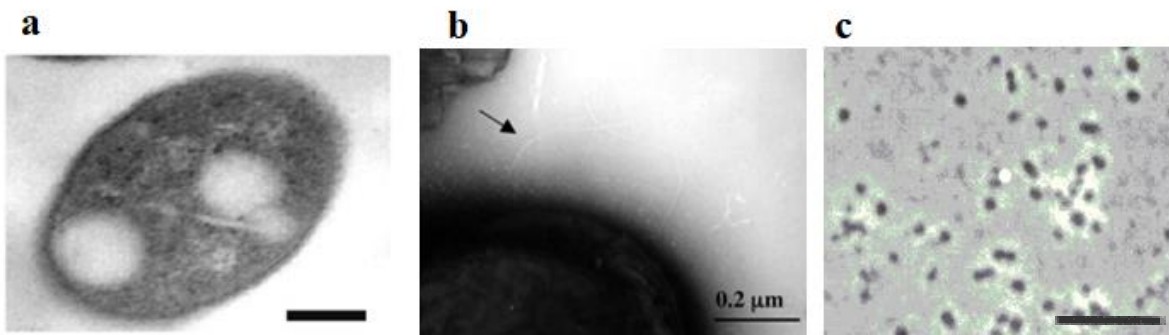
**Tabla 1** Clasificación taxonómica de ADP1.

<b>Taxón</b>	<b>Nombre</b>
Dominio	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Pseudomonadales
Familia	Moraxellaceae
Género	<i>Acinetobacter</i>
Especie	<i>baylyi</i>
Cepa	ADP1

ADP1 produce inclusiones lipídicas formadas por TAGs y CEs que pueden fungir como reserva de carbono (Reiser and Somerville 1997) y una cápsula celular formada por un exopolisacárido (EPS) de L-ramnosa, D-glucosa, ácido D-glucurónico y D-manosa en una relación molar 4:1:1:1 (Kaplan and Rosenberg 1982a; Kaplan et al. 1985). Dicho EPS también es liberado al medio de cultivo donde, en asociación iónica con un componente proteico no caracterizado, se comporta como emulsificante (Kaplan et al. 1987). Los polisacáridos de la cápsula celular son importantes para la colonización, la adherencia y la prevención de desecación; además, el EPS suspendido en el medio de cultivo proporciona una ventaja nutricional porque promueve la absorción de compuestos hidrofóbicos (Barbe et al. 2004). Adicionalmente, ADP1 posee dos tipos de *pili*, gruesos y delgados; los *pili* gruesos



le confieren adhesión a superficies bióticas y abióticas, y los *pili* delgados movilidad por desplazamiento o *twitching motility*, Figura 1 (Gohl et al. 2006).



**Figura 1** Micrografías de ADP1 que muestran **a.** inclusiones lipídicas, barra, 0.2 µm (Wältermann and Steinbüchel 2005), **b.** *pilus* grueso indicado por la flecha, barra, 0.2 µm (Gohl et al. 2006) y **c.** cápsula celular, barra, 10 µm (Juni y Janik, J. Bacteriol.,1969).

Cabe señalar que ADP1 ha sido reportado como un microorganismo inocuo debido a que carece de factores de virulencia como toxinas, invasinas y sistemas de secreción (Barbe et al. 2004). Hasta nuestro conocimiento, la patogenicidad de la cepa ADP1 no ha sido evaluada, sin embargo, en la literatura puede encontrarse información que indica la necesidad de realizar dicha evaluación. Se ha reportado el aislamiento de cepas de la especie *A. baylyi* en pacientes inmunocomprometidos, adquiridas principalmente vía intrahospitalaria, ningún caso fue fatal (Chen et al. 2008). Adicionalmente, ADP1 posee varios rasgos que sugieren su potencial como patógeno: sintetiza una cápsula de polisacárido; tiene una frecuencia de transformación alta que le facilita la adquisición de genes de resistencia a antibióticos; y, según la anotación de su genoma (Barbe et al. 2004), posee proteínas de membrana OmpA, que inducen apoptosis en células eucariotas y han sido reportadas como un factor de virulencia clave en *Acinetobacter baumannii* (Cerqueira and Peleg 2011), además en su genoma posee 10 genes que codifican para hemolisinas, enzimas que inducen la lisis de eritrocitos y otras células.

### 2.1.2. Metabolismo

ADP1 es un aerobio estricto con requerimientos nutricionales simples, es decir, puede crecer en un medio mineral adicionado con una FC sin factores de crecimiento especiales (Taylor and Juni 1961a). Es un organismo ubicuo, se encuentra abundantemente

en suelo, agua y en pieles de animales, incluida la del humano (Juni 1978; Barbe et al. 2004), de modo que, cuenta con un metabolismo versátil.

A través de su caracterización bioquímica y la secuenciación de su genoma, se sabe que ADP1 posee la capacidad de utilizar un amplio número de compuestos como FCs (ácidos carboxílicos aromáticos, ácidos orgánicos, ácidos dicarboxílicos, alcanos, nucleótidos, etc), nitrógeno (nucleótidos, urea, nitratos, nitritos y amidas) y azufre (alcanosulfonatos y ésteres sulfúricos). De forma muy interesante, los genes que codifican para estas vías metabólicas están agrupados en una cuarta parte del genoma, lo que se ha nombrado archipiélago de diversidad catabólica, formado por cinco grupos de genes llamados islas de diversidad catabólica (Barbe et al. 2004).

Como en otros miembros de *Acinetobacter* (Elliot 1978; Sigala et al. 2017), en ADP1 el catabolismo de carbohidratos es limitado; solamente puede crecer con glucosa o gluconato como únicas FCs y de energía (Taylor and Juni 1961a) y consume xilosa y arabinosa, aparentemente, como fuentes de energía cuando hay otras FCs disponibles (van Schie et al. 1987; Kannisto et al. 2015).

Esta bacteria carece de varias enzimas necesarias para la glucólisis tradicional, Embden–Meyerhof–Parnas: glucoquinasa, hexoquinasa, 6-fosfofructoquinasa 1 y piruvato quinasa. Además, están ausentes las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconolactona, que forman la fase oxidativa de la vía de las pentosas fosfato (Taylor and Juni 1961b; Barbe et al. 2004).

En cuanto al transporte de glucosa, ADP1 no posee el sistema fosfotransferasa (*phosphotransferase system*, PTS). El único gen identificado que puede ser relacionado con el transporte de glucosa es ACIAD2984, que codifica para una porina sensible a glucosa (Barbe et al. 2004). Sin embargo, la eliminación de este gen genera una mutante capaz de alcanzar la misma biomasa que la cepa parental cuando es cultivada con glucosa (De Berardinis et al. 2008), lo que sugiere que existen otros transportadores de glucosa que aún no han sido identificados.

El catabolismo de glucosa y gluconato se lleva a cabo a través de la glucólisis de Entner-Doudoroff (ED) (Figura 2). En periplasma, la glucosa se oxida a gluconato mediante

la glucosa deshidrogenasa (GDH). Esta enzima canaliza los equivalentes de reducción de la glucosa a la ubiquinona, esta última es un transportador soluble en la membrana interna involucrado en la fosforilación oxidativa. De esta manera, la oxidación de la glucosa está directamente relacionada con la síntesis de ATP. La GDH no es específica, además de glucosa, puede oxidar xilosa y arabinosa (Kannisto et al. 2015). En *A. calcoaceticus* LMD 79-39, GDH se encuentra asociada a la membrana citoplasmática y en forma soluble, esta segunda es la forma activa (Beardmore-Gray and Anthony 1986).

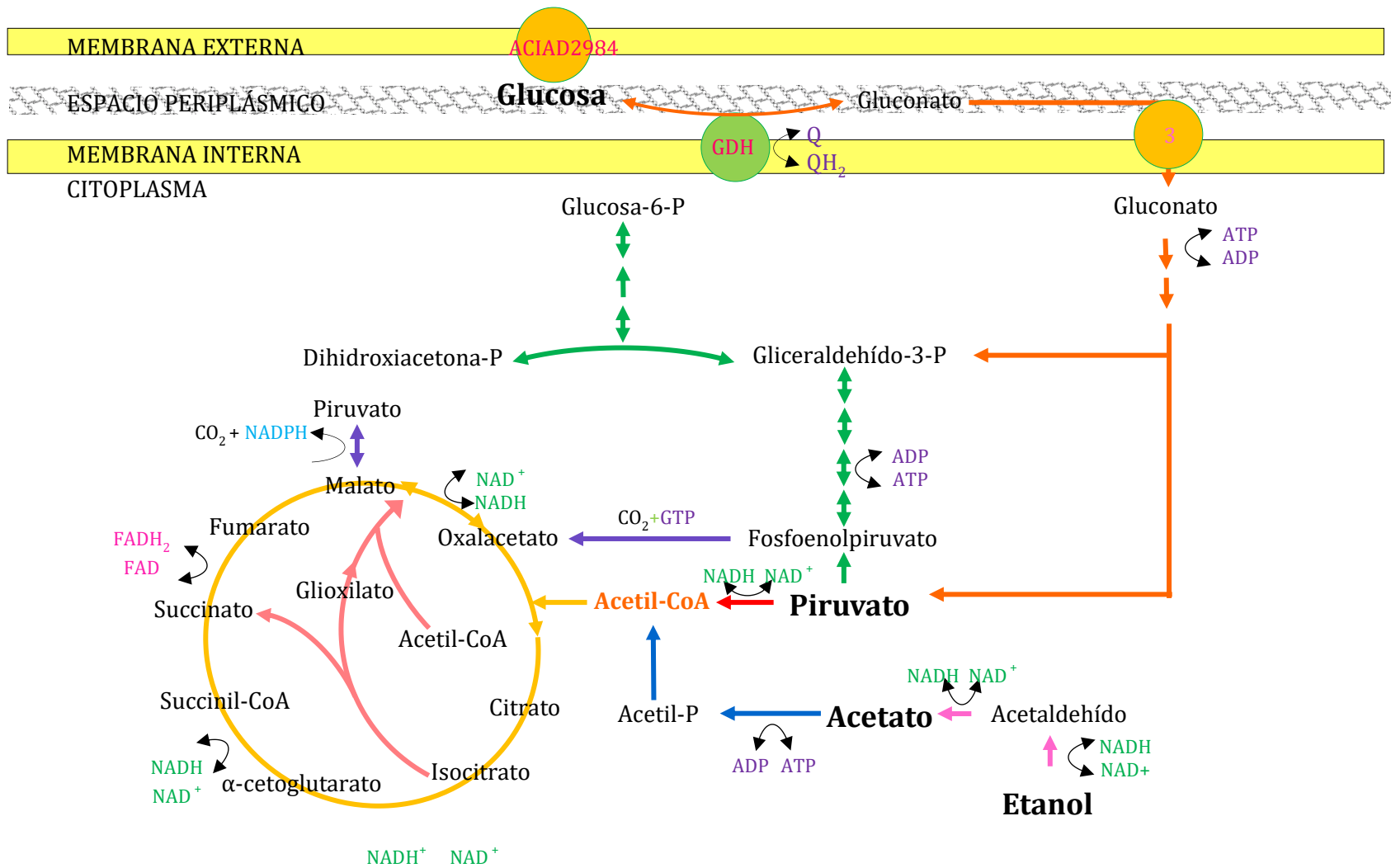
El gluconato se transporta al citosol mediante una gluconato transferasa de alta afinidad, *gntT*; se fosforila por la gluconoquinasa, *gntK*; y se procesa a través de la vía ED. Los genes para el catabolismo del gluconato se agrupan en el genoma, de ACIAD0542 a ACIAD0546 (Barbe et al. 2004).

En la vía de ED se producen un gliceraldehído 3-fosfato (G3P) y un piruvato a partir de cada molécula de glucosa o gluconato. En ensayos realizados con células de ADP1 en estado estacionario con glucosa marcada radioactivamente se ha observado que casi todo el piruvato (91 %) y sólo el 25 % de G3P se oxidan a dióxido de carbono. El G3P se dirige principalmente al EPS que forma la cápsula celular o es excretado (Taylor and Juni 1961). Por otro lado, se ha sugerido que, debido a la falta de una piruvato quinasa, la oxidación de GP3 es llevada a cabo mediante la carboxilación de fosfoenolpiruvato (PEP) a oxalacetato (OAA), reducción a malato y, finalmente, descarboxilación a piruvato (Taylor and Juni 1961).

Los compuestos de dos y tres carbonos, como el acetato, etanol y piruvato, forman acetil-CoA y son asimilados a través de la vía del glioxilato (Herman and Bell 1970). El etanol se oxida a acetaldehído y, posteriormente, a acetato. El acetato puede ser activado a acetil-CoA de dos formas: se fosforila por la acetoquinasa, *ack*, y se transfiere a la coenzima A (Co-A) por la fosfato acetiltransferasa, *pta*; o bien, es directamente activado por la acetil-CoA sintetasa, *acs* (Barbe et al. 2004). El piruvato se descarboxila a acetil-CoA por el complejo de la piruvato deshidrogenasa (Barbe et al. 2004) y también puede ser asimilado por la PEP sintetasa que forma PEP (Herman and Bell 1970).

El malato, producto del ciclo del glioxilato, y otros intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos ( $\alpha$ -cetoglutarato, citrato y succinato, TCA) se oxidan a OAA (Dolin and Juni

1978) que se descarboxila a PEP o piruvato para la gluconeogénesis (Taylor y Juni 1961b). Todas las enzimas necesarias para la gluconeogénesis y el ciclo de los TCA se encuentran presentes en ADP1 (Taylor and Juni 1961b; Barbe et al. 2004).



**Figura 2** Vías metabólicas principales en ADP1. ACIAD2984: Porina sensible a glucosa. GDH: Glucosa deshidrogenasa. GnT: Gluconato transferasa.

### 2.1.3. Represión catabólica del carbono

En la naturaleza, las FCs disponibles suelen ser diversas y con disponibilidad variable. Por esta razón, la mayoría de los microorganismos han desarrollado procesos regulatorios que les permiten hacer un uso selectivo de las FCs presentes, este fenómeno se conoce como represión catabólica de carbono (*carbon catabolite repression*, CCR) (Görke and Stülke 2008). La CCR no se limita a la inhibición de la expresión de las vías para el metabolismo de compuestos no preferidos, también pueden generar la reorganización del metabolismo global (Rojo 2010).

En ADP1 se ha observado la disminución del consumo de compuestos aromáticos debido a la presencia de acetato y/o succinato (Dal et al. 2002; Fischer et al. 2008); otros ácidos orgánicos han sido evaluados (piruvato, lactato y gluconato), sin embargo, ejercen poco o nulo efecto represivo (Bleichrodt et al. 2010). Compuestos como, p-hidroxibenzoato, quinato, bencil éster, antranilato, benzoato, vanilato, hidroxicinamato, dicarboxilatos y salicilato, son metabolizados a través de la vía del  $\beta$ -cetoadipato, a la cual convergen a través de su conversión a catecol o protocatechuato, catalizada por pequeños grupos de enzimas codificadas por los genes *pob*, *qui*, *are*, *ant*, *ben*, *van*, *hca*, *dca* y *sal*, respectivamente. En la vía del  $\beta$ -cetoadipato, el catecol y el protocatechuato son dirigidos, por vías paralelas, a succinil-CoA y acetil-CoA a través de enzimas codificadas por los genes *cat* y *pca*, respectivamente. Cabe mencionar que los genes *pca* y *qui* forman parte de un solo operón, *pca-qui* (Fischer et al. 2008).

El conocimiento del mecanismo de represión catabólica en ADP1 es aún limitado. Se sabe que la proteína de control de represión catabólica (Crc) participa reprimiendo la expresión de los genes para el metabolismo de FCs secundarias a nivel transcripcional y post-transcripcional. Crc está involucrada en la represión de la transcripción de todos los operones que codifican para el consumo de compuestos aromáticos, excepto *catA* (Bleichrodt et al. 2010), y disminuye la estabilidad del ARNm del operón *pca-qui*. Aunque se desconoce si la degradación del ARNm se debe a la actividad directa o indirecta de Crc (Zimmermann et al. 2009).

En *Pseudomonas*, organismos cercanos filogenéticamente a ADP1 (Barbe et al. 2004), Crc es un regulador global de la CCR, y está involucrada en la jerarquización del consumo de aminoácidos. En un medio de cultivo con los 20 aminoácidos comunes, Crc favorece el consumo de un conjunto de aminoácidos (prolina, alanina, glutamato, glutamina, histidina, arginina, lisina, aspartato y asparagina) y evita el transporte y consumo de otros (valina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, treonina, glicina y serina). Adicionalmente, en presencia de aminoácidos, Crc reprime el metabolismo de compuestos aromáticos y alcanos; y en presencia de succinato o acetato, reprime consumo de glucosa y manitol (Rojo 2010). En *Pseudomonas*, Crc regula la expresión genética a nivel post-transcripcional, se ha mostrado que Crc se une al extremo 5' de los ARNm blanco, específicamente, a una secuencia corta, no apareada, rica en adenina, ubicada cerca o superpuesta al sitio de inicio de traducción, AUG. De esta forma, Crc inhibe la formación de un complejo de iniciación de la traducción productivo: puede competir con la subunidad 30S del ribosoma para unirse al ARN, o bien, permitir la unión y secuestrar al ribosoma en un complejo no productivo (Moreno et al. 2009).

Como se mencionó anteriormente, en ADP1 se ha identificado la disminución de la estabilidad del transcrito *pca-qui* relacionada con la presencia de Crc. Esta proteína presenta similitud con las proteínas de la familia de endonucleasas-exonucleasas-fosfatasa que tienen dos residuos altamente conservados en su sitio catalítico. La modificación de estos residuos en Crc no afecta su función en *Pseudomonas* por lo que se ha sugerido que Crc es una proteína de unión y no con actividad de nucleasa (Moreno et al. 2009). En ADP1, Crc también podría ser una proteína de unión a ARNm y la degradación de operón *pca-qui* podría deberse a su actividad indirecta (Rojo 2010).

En *Pseudomonas*, la actividad de Crc parece estar regulada por un ARN pequeño (*small* RNA, sRNA) llamado CrcZ. Dicho sARN contiene cinco motivos AANAANAA no apareados que, *in vitro*, se unen con alta afinidad a Crc y su abundancia concuerda con la fuerza de represión catabólica, es mayor en presencia de los 20 aminoácidos comunes, seguido de succinato y finalmente manitol. Por lo tanto, parece que CrcZ modula los niveles Crc libre en la célula, controlando así la fuerza del efecto CCR dependiente de Crc. El gen *crcZ* se localiza río abajo de los genes que codifican el sistema sensor-regulador de dos componentes CbrA/CbrB (Rojo 2010). Este sistema está relacionado con la regulación de

CrcZ y controla la utilización de varias FCs y nitrógeno, probablemente manteniendo el balance C/N, aunque las señales que desencadenan su actividad todavía no están claras (Li and Lu 2007).

La CCR en *Pseudomonas*, además de Crc, es organizada por los reguladores globales citocromo *o* ubiquinol oxidasa (Cyo) y el sistema fosfotransferasa Ntr (PTS<sup>Ntr</sup>).

Cyo está codificada por el *cluster cyoABCDE*, es una oxidasa terminal de la cadena de transporte electrones. La mayoría de las bacterias contienen varias oxidasas terminales, cada una de ellas generalmente con diferente afinidad por O<sub>2</sub>, potencial redox y eficiencia como bomba de protones. Las células cuidadosamente coordinan la composición de la cadena de transporte de electrones, y en particular, los niveles de cada oxidasa terminal, de acuerdo con las condiciones de crecimiento y las necesidades metabólicas. La eliminación de *cyo* disminuye la represión inducida por succinato o aminoácidos de la degradación de alcanos y fenol, y modifica la concentración de ARNm de más de 100 genes relacionados con el transporte y metabolismo. Por lo tanto, Cyo es una oxidasa terminal de la cadena de transporte de electrones que detecta y transmite información sobre la actividad de la cadena de transporte de electrones e influye en la regulación global del metabolismo de carbono y nitrógeno. Los regulones de Crc y Cyo se superponen muy poco, lo que indica que son sistemas de regulación global independientes. Por otro lado, el sistema PTS<sup>Ntr</sup> está formado por las proteínas PtsP (o EINtr), PtsO (o NPr) y PtsN (o EIIANtr), homólogas a EI, NPr y EIIA del sistema PTS, encargado de la fosforilación, transporte y regulación del consumo de carbohidratos en *Escherichia coli*. En *E. coli* el fosfato se transfiere secuencialmente de PEP a EI, NPr y EIIABC. A diferencia, las proteínas PTS<sup>Ntr</sup> no están involucradas en el transporte de azúcares y no se conocen componentes de membrana equivalentes a EIIABC a los que PtsN pueda transferir el fosfato. Se cree que las proteínas PtsP, PtsO y PtsN funcionan exclusivamente en la transducción de señales y que el estado de fosforilación de PtsN proporciona alguna señal reguladora (Rojo 2010).

En la anotación del genoma de ADP1 fueron identificados: el gen *crc*, el *cluster cyoABCDE* que codifica para la oxidasa terminal Cyo y los genes *ptsO* y *ptsP* del sistema PTS<sup>Ntr</sup>. Sin embargo, no se identificaron los genes *crcZ*, *cbrA* y *crbB* (involucrados en la regulación de Crc) ni *ptsN* del sistema PTS<sup>Ntr</sup>.



#### 2.1.4. Modificación genética

Otro rasgo conveniente de ADP1 es que puede transformarse de forma natural, lo cual facilita su manipulación genética (Juni 1972).

La transformación es un proceso de transferencia horizontal de genes donde el material genético pasa de una bacteria a otra a través del medio, sin necesidad de un contacto directo. Este fenómeno implica la unión, la internalización en células no comprometidas fisiológicamente y la integración del ADN donador al material genético de las células receptoras. La internalización del material genético requiere que las células expresen los receptores y componentes para tomar y procesar el ADN, esta condición se conoce como estado de competencia. En la transformación natural, la competencia se desarrolla bajo condiciones fisiológicas, es decir, no requiere ser inducida por algún agente físico o químico y ha sido observada en organismos gramnegativos, grampositivos y arqueas. Las condiciones ambientales que inducen la competencia y el desarrollo del mecanismo de transformación son distintas en los microorganismos caracterizados hasta la fecha, por lo que se cree que la función de este fenómeno también es distinta. En ADP1, la competencia está relacionada con la disponibilidad de nutrientes. La competencia es inducida al transferir las células de un cultivo en estado estacionario, en el que hay al menos un compuesto limitante del crecimiento, a un medio fresco (Palmen et al. 1994).

En ADP1, la eficiencia de transformación (ET) depende de la longitud de las secuencias homólogas del ADN donador, disminuye de forma importante cuando las secuencias homólogas son menores a 1 kb (Metzgar et al. 2004), sin embargo, se ha logrado la construcción de una biblioteca de más de 1000 cepas a las que se les ha eliminado un gen, utilizando ADN donador con secuencias homólogas de alrededor de 300 pb (De Berardinis et al. 2008). Por otro lado, la transformación requiere iones  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  o  $Ca^{2+}$ , un pH mayor a 6.5 (Palmen et al. 1993) y no existe consenso acerca de si es distinta en medio complejo o medio mineral adicionado con distintas FCs (Palmen et al. 1993; De Berardinis et al. 2008).

Cabe señalar que ADP1 es capaz de internalizar tanto ADN homólogo como heterólogo y presenta recombinación ilegítima, que es una recombinación que se da con

secuencias sin o con baja homología, aunque lo hace con baja ET (de Vries and Wackernagel 2002).

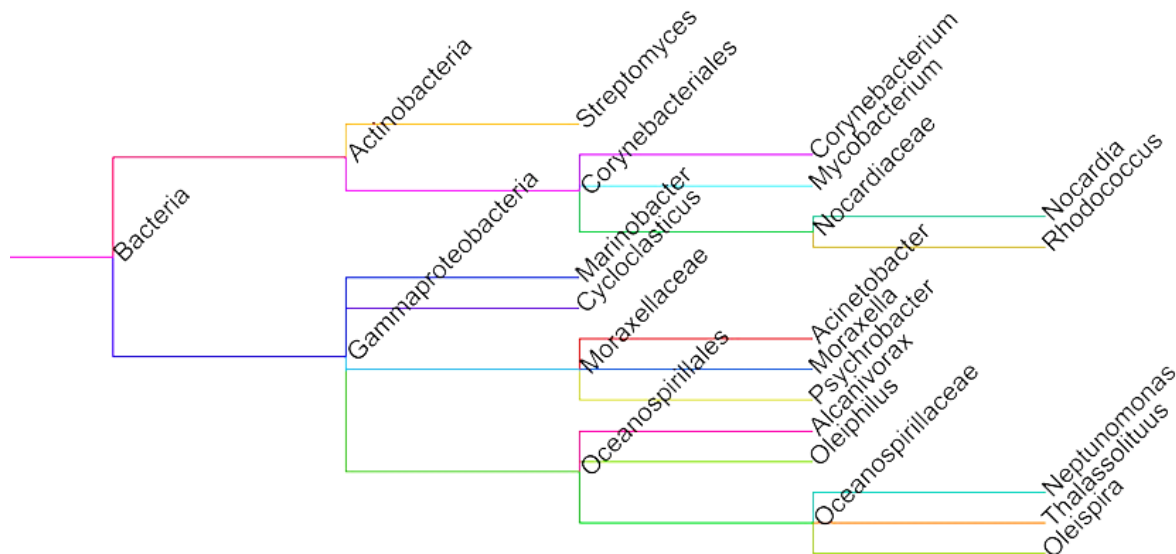
También existen vectores de expresión diseñados para replicarse como plásmidos (pMI1440, pMI1441, pMI1442, pMI1444 y pMI1445) o para integrarse al cromosoma de ADP1 en una secuencia profago (pMI1463) (Murin et al. 2012).

A su capacidad de transformación natural se debe que ADP1 sea considerado un miembro de la especie *baylyi*. Otras integrantes de esta especie son las cepas 93A2, B2<sup>T</sup>, C5 y C7, y aunque todas ellas tienen una ET en el mismo orden de magnitud, ADP1 es de 2 a 8 veces más transformable. En otras especies del género *Acinetobacter* la ET transformación es de 100 a 1,000 veces menor que en ADP1 (Vanechoutte et al. 2006).

## 2.2. Síntesis de CEs y TAGs en bacterias

La capacidad de almacenamiento de compuestos lipídicos está ampliamente distribuida en la naturaleza. En bacterias, la clase más común de estos compuestos son los polihidroxicanoatos (poliésteres de ácidos grasos hidroxilados), mientras que la acumulación de TAGs (trioxeésteres de glicerol y ácidos grasos de cadena larga) y CEs (ésteres de ácidos grasos primarios de cadena larga y alcoholes primarios de cadena larga) es una propiedad de unas pocas bacterias (Wältermann and Steinbüchel 2005). Estos compuestos funcionan como depósitos de carbono, pues son sintetizados, principalmente, cuando una FC está disponible pero el crecimiento es limitado por algún otro nutriente, como nitrógeno. Adicionalmente, se ha sugerido que son un reservorio de agua (su oxidación implica la deshidratación de las moléculas) y un mecanismo para regular la concentración de sus precursores tóxicos (ácidos grasos y 1,2-diacilglicerol (DAG)); y se ha mostrado que juegan un papel importante en el suministro de carbono y energía en el proceso infeccioso de *Mycobacterium tuberculosis* (Wältermann and Steinbüchel 2005; Röttig et al. 2016).

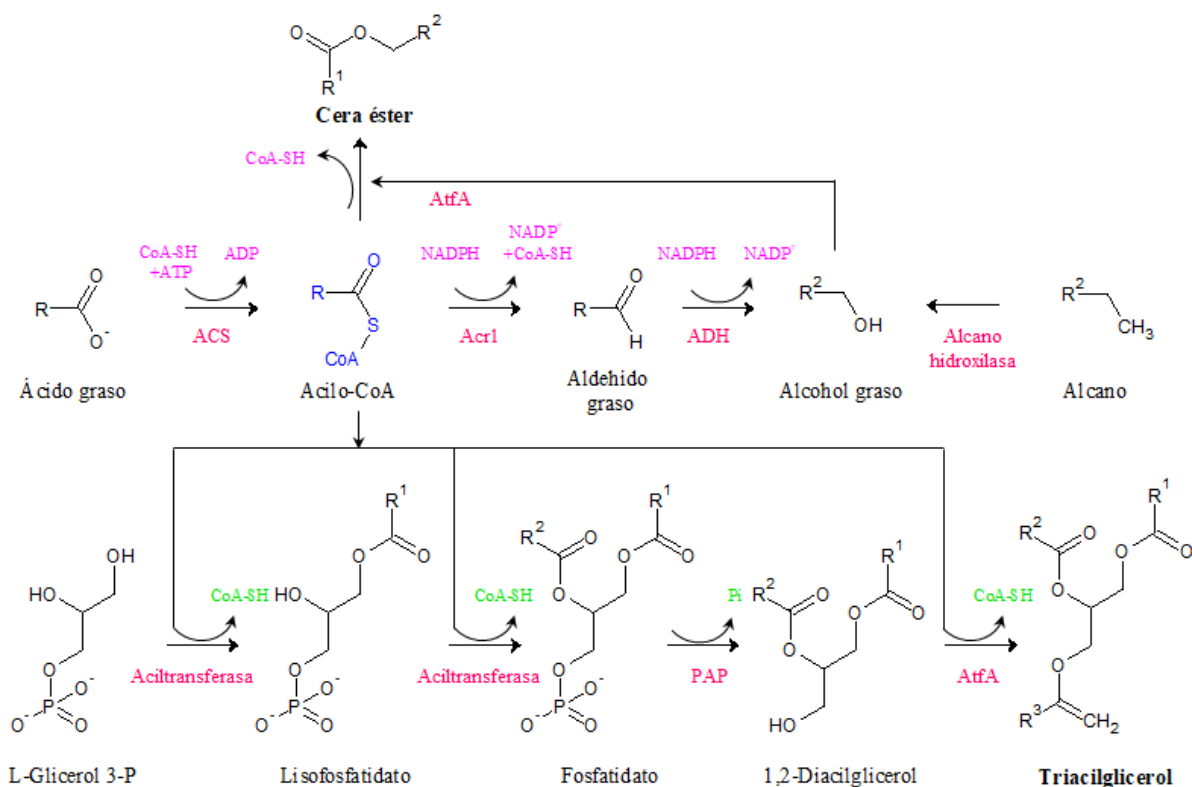
Hasta ahora, la síntesis de CEs y TAGs sólo ha sido observada en Actinobacterias de los géneros *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* y *Nocardia*, y en Gammaproteobacterias pertenecientes a *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Marinobacter*, *Alcanivorax*, *Thalassolituus*, *Psychrobacter Cycloclasticus*, *Neptunomonas*, *Oleiphilus* y *Oleispira* (Figura 3) (Wältermann and Steinbüchel 2005; Manilla-Pérez et al. 2010; Alvarez



**Figura 3** Síntesis de CEs y TAGs en bacterias.

El precursor común para la síntesis *de novo* de CEs y TAGs es el acilo-CoA (Figura 4). La síntesis de TAGs requiere la triple acilación del L-glicerol-3-fosfato. La acilación de los dos hidroxilos libres se cataliza por aciltransferasas que forman ácido lisofosfatídico y posteriormente ácido fosfatídico. Este último es hidrolizado a DAG por una ácido fosfatídico fosfatasa (*phosphatidic acid phosphatase*, PAP). El L-glicerol-3-fosfato proviene, principalmente, de la reducción de dihidroxiacetona fosfato a expensas de NADH. Todos los organismos vivos poseen la maquinaria enzimática necesaria para la síntesis de DAG, pues éste es un precursor de lípidos de membrana. Por lo tanto, la capacidad de síntesis de TAGs depende de la presencia de al menos una enzima que catalice la acilación del DAG. Hasta la fecha, se han reportado cuatro tipos de enzimas con esta característica: las acilo-CoA:DAG aciltransferasas donde el donador del grupo acilo es el acilo-CoA; las fosfolípido:DAG aciltransferasas donde el donador de acilo es el fosfolípido; las DAG:DAG transacilasas, que transfieren un grupo acilo de una molécula de DAG a otra; y las cera éster sintasas/diacilglicerol aciltransferasas (*wax ester synthase/acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase*, WS/DGAT), también llamadas aciltransferasas A (AtfAs), que utilizan acilo-CoA como donador de acilo (Alvarez 2016). Las AtfAs son enzimas bifuncionales que, además de posibilitar la síntesis de TAGs, catalizan la acilación de alcoholes primarios de cadena larga (alcoholes grasos). Esta última reacción, es el paso final en la vía de síntesis de CEs y puede ser catalizada, adicionalmente, por las cera éster sintasas (*wax ester synthase*,

WS) (Kalscheuer and Steinbüchel 2003; Stöveken et al. 2005). *Ex novo*, los alcoholes grasos son generados por la hidroxilación de n-alcenos catalizada por alceno hidroxilasas. La síntesis *de novo* de alcoholes grasos se lleva a cabo mediante la reducción de cuatro electrones, dependiente de NADPH, de una molécula de acilo-CoA o de acilo-ACP (Alvarez 2016).



**Figura 4** Vías de síntesis de CEs y TAGs en bacterias. AtfA: Aciltransferasa A. ACS: Acilo-CoA sintasa. Acr1: Acilo-CoA reductasa. ADH: alcohol deshidrogenasa. PAP: Ácido fosfatídico fosfatasa. CoA-SH: Coenzima A. Pi: fósforo inorgánico.

En bacterias, las principales aciltransferasas encargadas de la síntesis de CEs y TAGs son las AtfAs. La primera enzima identificada de este tipo fue la de ADP1 codificada por el gen *AtfA* (*wax/dgat*) (Kalscheuer and Steinbüchel 2003). Esta, es una proteína con baja especificidad de sustrato, puede catalizar la acilación de alcoholes lineales de dos a treinta átomos de carbono (C2-C30), utilizando palmitil-CoA como donador de acilo, y la transferencia de grupos acilo-CoA C2-C20 a n-hexadecanol, además de utilizar como sustrato alcoholes ramificados y fenol (Stöveken et al. 2005). Actualmente, además AtfA de ADP1, se han caracterizado por lo menos cinco AtfAs de cuatro cepas diferentes: Ma1 y Ma2 de *Marinobacter aquaeolei* VT8; Rh1 de *Rhodococcus jostii* RHA1; Ps1 de *Psychrobacter*

*cryohalolentis* K5 (Barney et al. 2012); y AtfA1 y AtfA2 de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (Kalscheuer et al. 2007). Estas, al igual que AtfA de ADP1, presentan una baja especificidad de sustrato. En estas especies los productos *in vivo* están formados, principalmente, por compuestos C16-C18, por lo que se ha sugerido que el perfil de productos no está relacionado con la especificidad de las AtfAs sino con la disponibilidad de los sustratos, propia de cada organismo (Barney et al. 2012).

En las tablas 2 y 3 se enlistan las Gammaproteobacterias y Actinobacterias en las que se ha identificado la síntesis de CEs y /o TAGs y, en los casos donde ha sido reportado, el porcentaje en peso seco (*cell dry weight*, % CDW) que son capaces de acumular. Las Gammaproteobacterias son capaces de sintetizar CEs y TAGs pero sintetizan principalmente CEs a bajos porcentajes, 0.2-14 % CDW (Bryn et al. 1977; Fixter et al. 1986; Kalscheuer and Steinbüchel 2003; Kalscheuer et al. 2007; Santala et al. 2014). Las Actinobacterias suelen almacenar altos porcentajes de su peso en forma de TAGs (16-87 % CDW), según la especie y el sustrato disponible. Generalmente, sólo son capaces de sintetizar CEs a partir de alcoholes grasos o alcanos disponibles. La limitación de estos organismos para sintetizar CEs *de novo* se debe a la ausencia de acilo-CoA reductasas, que catalizan la reducción de acilo-CoA a alcoholes grasos (Alvarez et al. 1996; Hernández et al. 2008; Alvarez 2016; Röttig et al. 2016).

**Tabla 2** Producción de CEs y TAGs en Gammaproteobacterias

Cepa	Sustrato	CEs (% CDW)	TAGs (% CDW)	Referencia
<i>Acinetobacter bayli</i> ADP1	Glucosa	1.7	n.r	(Santala et al., 2014)
	Glicerol-Gluconato	n.r.	0.7	c
	Gluconato	6.9	1.4	(Kalscheuer y Steinbüchel, 2003)
	Glicerol-Gluconato	++	++	(Barney et al., 2012)

<i>A. calcoaceticus</i> NCIB 10487	Succinato	14.1	n.r.	(Fixter et al., 1986)
<i>A. calcoaceticus</i> EBF 65/65	Succinato	11.4	n.r.	
<i>A. indicus</i> ATCC 17976	Acetato	12.6	n.r.	
<i>Acinetobacter haemolyticus</i> NCTC 10305	Succinato	8.2	n.r.	
<i>Moraxella nonliquefaciens</i> NCTC7784 N-a	Medio rico	0.6	0.0	(Bryn y Jantzen, 1977)
<i>M. bovis</i> 4 N-b		0.8	0.0	
<i>M. Iacunata</i> ATCC 17967		0.2	0.0	
<i>M. osloensis</i> 5873		0.0	0.0	
<i>M. osloensis</i> T3		0.2	0.0	
<i>M. atlantae</i> A1922		0.2	0.0	
<i>M. catarrhalis</i> NeI I		1.5	0.0	
<i>M. ovis</i> NCTC 10293		0.5	0.0	
<i>M. caviae</i> 199/55		0.3	0.0	
<i>Marinobacter aqualeolei</i> VT8		Piruvato	++++	
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	Piruvato	+++	+	(Kalscheuer et al., 2007)
<i>Alcanivorax jadensis</i> T9	Piruvato	+++	+	
<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2	Piruvato	0.0	23.0	
	Hexadecano	0.0	9.0	
<i>Thalassolituus oleivorans</i>	Piruvato	++++	-	
<i>Psychrobacter urativorans</i>	Cas aminoácidos	++++	-	(Russell y Volkman 1980)
<i>Psychrobacter cryohalolentis</i> K5	Acetato	++++	-	(Barney et al., 2012)

Los signos + y - indican caracterización cualitativa: Compuesto no sintetizado (-), baja producción (+), producción mayoritaria (+++) y producción exclusiva (++++). n.r: No reportado. % CDW: porcentaje del peso celular seco.

**Tabla 3** Producción de CEs y TAGs en Actinobacterias

<b>Cepa</b>	<b>Sustrato</b>	<b>CEs (% CDW)</b>	<b>TAGs (% CDW)</b>	<b>Referencia</b>
<i>Streptomyces sp.</i> G25	Fructosa	0.0	41.0	(Röttig et al., 2016)
<i>Streptomyces sp.</i> G49	Glicerol	0.0	26.0	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	* Huésped	+	+++	(Álvarez et al., 2006)
<i>Mycobacterium bovis</i>		+	+++	
<i>Rhodococcus opacus</i> PD630	Gluconato	+	76.0	(Álvarez et al., 1996)
	Acetato	-	31.0	
	Fructosa	-	40.0	
	Propionato	-	18.0	
	Ácido fenilacético	-	38.0	
	Pentadecano	-	39.0	
	Hexadecano	+	38.0	
	Heptadecano	-	28.0	
	Octadecano	-	39.0	
	Aceite de oliva	-	87.0	
<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	Glucosa	-	++++	(Hernández et al., 2008)
	Gluconato	-	++++	
	Acetato	-	++++	

	Ácido 3-hidroxi-butírico	-	++++	
	Hexadecano	+	+++	
	Hexadecano-hexadecanol	+	+++	
	Acetato	++++	-	
-		++++		
<i>Rhodococcus</i> sp. A27	Fructosa	-	16.0	(Röttig et al., 2016)
<i>Nocardia</i> sp. A3	Fructosa	+	+	
<i>Corynebacterium</i> sp. strain 7E1C	n-decano	++++	-	(Bacchinn et al., 1974)

Los signos + y - indican caracterización cualitativa: Compuesto no sintetizado (-), baja producción (+), producción mayoritaria (+++) y producción exclusiva (++++). n.r: No reportado. \*Ácidos grasos del huésped. % CDW: porcentaje del peso celular seco.

*Acinetobacter* es el género gramnegativo mejor caracterizado a la fecha, principalmente su producción de CEs (Tab. 2). Diecinueve cepas de *Acinetobacter* cultivadas con succinato en condiciones de limitación de nitrógeno mostraron la capacidad de almacenar CEs C30-C36 saturadas, mono- y di- insaturadas que constituyen entre el 0.06 y el 14.1 % CDW (Fixter et al. 1986). ADP1 es la cepa mejor descrita a nivel molecular, en esta, la síntesis *de novo* de los alcoholes grasos se lleva a cabo a través de dos pasos de reducción del acilo-CoA, el primero catalizado por Acr1 (acilo-CoA reductasa 1) (Reiser and Somerville 1997) cuyo producto es un aldehído graso, y el segundo por una aldehído reductasa no identificada que rinde alcoholes grasos (Santala et al. 2011a). El paso final para la síntesis de CEs y TAGs es catalizado por AtfA, la única WS/DGAT que posee ADP1, descrita anteriormente. AtfA se localiza, principalmente, en la cara interna de la membrana plasmática, allí, sintetiza pequeñas gotas de TAGs y CEs que coalescen formando un núcleo hidrofóbico rodeado por una monocapa de fosfolípidos y varias proteínas no caracterizadas. Estas estructuras son conocidas como esferas o cuerpos lipídicos, ADP1 sintetiza de una a tres de ellas y tienen un diámetro promedio de 200 nm (Wältermann et al. 2005).



Al igual que en otras cepas de *Acinetobacter*, en ADP1, las CEs son compuestos de 32 a 36 átomos de carbono formados por residuos de ácidos y alcoholes grasos C16 y C18 saturados o monoinsaturados (Stöveken et al. 2005). La distribución de ácidos grasos en los TAGs no ha sido reportada, pero se sabe que los acilgliceroles totales están constituidos por residuos de los ácidos grasos C12:0, C14:0, C16:1, C16:0, C18:1, C18:1n9+11 y C18:0 (Santala et al. 2011b). La producción de lípidos de reserva en ADP1 no ha sido evaluada de forma sistemática pero se sabe que: en cultivos con glucosa como FC produce 0.036 mmol CEs /g CDW (Santala et al. 2014), aproximadamente 1.7 % CDW; con una mezcla gluconato-glicerol, los TAGs forman 1.6 % de los lípidos totales (Santala et al. 2011b), aproximadamente, 0.07 % CDW; y en cultivo con gluconato, las CEs y los TAGs forman 6.7 y 1.4 % CDW, respectivamente (Kalscheuer and Steinbüchel 2003).

### 2.3. Las CEs y TAGs como metabolitos de interés

La energía es un requerimiento básico en la vida cotidiana. En el universo la energía es infinita, sin embargo, su disponibilidad está limitada por la capacidad del hombre para almacenarla y transportarla. Los combustibles son compuestos que permiten el almacenamiento y el transporte de energía; al reaccionar con el oxígeno (combustión) generan calor que puede ser aprovechado para realizar trabajo. Actualmente, la principal fuente de combustibles es el petróleo, que requiere ser reemplazado por alternativas renovables. Un mercado importante es el de los combustibles para transporte. Los combustibles alternativos deben poseer propiedades de combustión similares a las de los combustibles fósiles, de tal forma que permitan el buen funcionamiento del motor, entre otras características deseables como menor generación de emisiones y huella de CO<sub>2</sub> (The NEED Project, 2012).

El producto de transesterificación con metanol de las CEs y los TAGs de ADP1 es una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos (*fatty acid methyl esters*, FAMEs) y alcoholes grasos C12-C19 cuya longitud es adecuada para su uso como biodiesel. Además de poseer una densidad energética alta, los compuestos mencionados tienen dobles enlaces, lo que los hace adecuados para su uso a bajas temperaturas y debido a la presencia de grupos hidroxilo y enlaces tipo éster, la mezcla posee un contenido de oxígeno moderado que favorece la combustión (Lee et al. 2008).

Adicionalmente, las CE son ingredientes de cosméticos, alimentos, lubricantes, etc. (Santala et al. 2014) y los alcoholes grasos son precursores de detergentes y tienen aplicaciones directas en las industrias farmacéutica y cosmética debido a sus propiedades emulsificantes, emolientes, lubricantes y disolventes (Mudge et al. 2008).

#### **2.4.Importancia de la FC en la generación de metabolitos de interés**

En los medios de cultivo formulados para organismos heterótrofos como ADP1, la FC es también la fuente de energía. La FC suele modificar los parámetros de producción de un compuesto (rendimiento, productividad y concentración) debido a su grado de reducción y a su trayectoria metabólica a través de determinado organismo (Dugar and Stephanopoulos 2011). El grado de reducción es un concepto definido por convención que hace referencia al número de electrones disponibles para ser transferidos al oxígeno en la combustión de un compuesto (Vázquez, 2002), que es de forma muy simplificada lo que ocurre en el metabolismo de un organismo aerobio estricto como ADP1. En sistemas biológicos, la energía contenida en un compuesto se convierte en equivalentes de reducción (NAD(P)H) y ATP, que son dirigidos a la síntesis de biomasa, el producto de interés y otros subproductos, y mantenimiento celular.

En cultivos anaerobios y en estado estacionario de *E. coli* GJT001 utilizando FCs con diferentes grados de reducción, sorbitol (-1), glucosa (0) y gluconato (+1) se ha mostrado que la relación intracelular NADH/NAD<sup>+</sup> está relacionada de forma directa con el grado de reducción de la FC. Es decir presenta valores de 0.94, 0.75 y 0.51, para sorbitol, glucosa y gluconato, respectivamente. Adicionalmente, se observó que, en cultivos con mayor disponibilidad de NADH se favorece la generación de productos de fermentación con mayores requerimientos de equivalentes de reducción. Por lo que los autores sugieren el uso FC reducidas como una estrategia para mejorar la síntesis de compuestos que requieren equivalentes reducción (San, et al., 2002). Específicamente, se ha evaluado el efecto del uso de diferentes fuentes de carbono en la síntesis de lípidos de reserva en las cepas *Rhodococcus opacus* PD630 y *Rhodococcus jostii* RHA1, que son capaces de sintetizar tanto CEs como TAGs. En ambos estudios se observó que la fuente de carbono modifica la proporción CE/TAGs y el % CDW acumulado. Sin embargo, no parece haber una relación directa del grado de reducción de las fuentes de carbono con los parámetros evaluados (Álvarez et al., 1996; Hernández et al., 2008). Cabe mencionar que, en la caracterización de la producción de lípidos en *Acinetobacter baylyi* ADP1

también se ha hecho uso de diferentes FCs. Sin embargo, han sido ensayos independientes, realizados bajo condiciones distintas, por lo que no es posible determinar si existe o no un efecto de la FC en la producción dichos compuestos (Santala et al., 2011a; Santala et al., 2014; Kalscheuer y Steinbüchel, 2003).

Existen herramientas que permiten determinar la idoneidad de una FC para la generación de un producto, como el cálculo de rendimientos. El rendimiento máximo es la cantidad máxima de un producto que se puede formar a partir de un sustrato. Se calcula a través de un balance energético asumiendo que toda la energía presente en la FC es biológicamente transferida al producto y es independiente de la vía metabólica. El rendimiento de la vía metabólica depende de la vía específica y se calcula a partir de su estequiometría (Dugar and Stephanopoulos 2011). Sin embargo, debido a la complejidad del metabolismo global, los rendimientos calculados pueden ser distintos a los rendimientos reales, por lo que la determinación certera de la FC más eficiente para la generación de un producto específico debe ser realizada experimentalmente y/o por medio de la identificación de puntos de control metabólico a través de tecnologías ómicas y modelos a escala genómica.

Por otro lado, es deseable que la FC sea abundante, de bajo costo y que no sea utilizada como alimento humano. Las FCs evaluadas en este trabajo fueron: glucosa y xilosa, los azúcares más abundantes en los materiales lignocelulósicos (Zhao et al. 2012); glicerol, un residuo abundante de la industria del biodiesel (Dharmadi et al. 2006); y, acetato, piruvato y etanol, productos de fermentación de varios microorganismos.

### **3. Antecedentes**

ADP1 es considerado un microorganismo adecuado para la producción de CEs y TAGs debido a que posee las vías metabólicas necesarias para su síntesis (Santala et al. 2011b; Kannisto et al. 2014), utiliza un número importante de compuestos orgánicos como fuentes de carbono, nitrógeno y azufre (Taylor and Juni 1961a; Barbe et al. 2004) y su manipulación genética es relativamente sencilla (Metzgar et al. 2004).

Sin embargo, como otras Gammaproteobacterias, la cepa silvestre ADP1 acumula un bajo porcentaje de su peso celular en forma de TAGs (0.12 % CDW, (Santala et al. 2011b)) y CEs (3.5 % CDW, (Lehtinen et al. 2018)). Con el objetivo de generar cepas derivadas de ADP1,

sobre productoras de lípidos de reserva, se han abordado varias estrategias de ingeniería de vías metabólicas: la eliminación o regulación negativa de genes que codifican para enzimas que consumen acetil-CoA, un precursor de CEs y TAGs; la eliminación del flujo de carbono hacia la producción del EPS, un subproducto; la sobreexpresión de la enzima que cataliza el paso limitante de la vía de síntesis de CEs; y la eliminación de un paso enzimático que consume los productos de interés, TAGs. Como puede verse en la tabla 4, específicamente, para la generación de cepas sobre productoras de TAGs se han eliminado los genes *acrI* (codifica para la acilo-CoA reductasa que cataliza el primer paso de la vía de síntesis de CEs), *ACIAD3309* (codifica para una lipasa de TAGs) y *poxB* (convierte acetil-CoA en acetato). Para la generación de cepas sobre productoras de CEs se ha sobreexpresado *acrI*, eliminado o regulado negativamente *aceA* (que dirige el acetil-CoA hacia gluconeogénesis) y eliminado *rmlA* (el primer paso de la vía de síntesis de ramnosa, *rmlA*, el compuesto más abundante del EPS). Con estas estrategias se han generado cepas capaces de almacenar hasta 27 % CDW de CEs y 0.67 % CDW de TAGs (Santala 2011b; Santala 2018).

**Tabla 4** Cepas sobre productoras de LR derivadas de ADP1.

Cepa	Sustrato	CEs (% CDW)	TAGs (% CDW)	Ref.
WT	Gluconato-glicerol	N.D.	0.12	(Santala et al. 2011b)
$\Delta$ ACIAD3309	Gluconato-glicerol	N.D.	0.51	
$\Delta$ <i>acrI</i>	Gluconato-glicerol	N.D.	0.47	
$\Delta$ <i>poxB</i>	Gluconato-glicerol	N.D.	N.D.	
$\Delta$ ACIAD3309, $\Delta$ <i>acrI</i> , $\Delta$ <i>poxB</i>	Gluconato-glicerol	N.D.	0.67	
WT	Glucosa	3.5	N.D.	(Lehtinen et al. 2018)
<i>ΔacrI::kan<sup>r</sup>, PT5/lac-acrI, spc<sup>r</sup></i>	Glucosa	9.3	N.D.	
<i>ΔaceA::tdk/kan<sup>r</sup> ΔpoxB::araC-pBAD-aceA-cm<sup>r</sup></i>	Acetato	19.0	N.D.	
<i>ΔacrI::kan<sup>r</sup>, ΔaceA::PT5-acrI, spc<sup>r</sup></i>	Glucosa	27.0	N.D.	(Santala et al. 2018)
<i>ΔrmlA::kan<sup>r</sup>, pBAV1C-pykF</i>	Glucosa	6.9	N.D.	(Kannisto et al. 2017)

WT: *wild type* o cepa silvestre. N.D.: No determinado. % CDW: porcentaje del peso celular seco.

Hasta la fecha, no se ha explorado el uso de diferentes FCs u otras estrategias de cultivo para modular la producción de lípidos de reserva en ADP1. Adicionalmente, los datos cuantitativos del crecimiento de ADP1 con varias FCs son limitados y, debido a que fueron realizados bajo diferentes condiciones, no son comparables. Por lo que existe la necesidad de evaluar de manera metódica el crecimiento y la producción de LR en ADP1 con diferentes

fuentes de carbono. Como se mencionó anteriormente, la FC suele modificar los parámetros de producción de un compuesto (rendimiento, productividad y concentración) debido a su grado de reducción y a su trayectoria metabólica a través de determinado organismo (Dugar and Stephanopoulos 2011).

En la tabla 5 se muestra una lista de compuestos que han sido utilizados como FC para el cultivo de ADP1, de forma individual o en mezclas, y se indica la velocidad de crecimiento específica ( $\mu$ ) en los casos donde fue reportada.

**Tabla 5** Compuestos que han sido utilizados como FC para el cultivo de ADP1.

	FC	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	Ref.
Ácidos orgánicos	Acetato	0.44	(Sigala et al., 2017)
	D- y L-Lactato	N.D.	(Taylor and Juni 1961a)
	2-Cetoglutarato	N.D.	(Taylor and Juni 1961a)
	Malato	1.04	(Dolin y Juni, 1978)
	Oxalacetato	1.04	(Dolin y Juni, 1978)
	Succinato	N.D.	(Taylor and Juni 1961a)
	Piruvato	0.67	(Dolin y Juni, 1978)
	Gluconato	0.12	(Kannisto et al., 2014)
Alcoholes	Etanol	N.D.	(Taylor and Juni 1961a)
	D- y L-1,2-Propanodiol	N.D.	(Taylor and Juni 1961a)
	Meso-2,3-Butanodiol	N.D.	(Taylor and Juni 1961a)
Otros	Glucosa	0.18	(Kannisto et al., 2014)
	Ác. Vanillínico	N.D.	(Sigala, comunicación directa)
	Ác. p-Hidroxibenzoico	0.55	(Kannisto et al., 2015)
Mezclas	D- Xilosa-D-glucosa-Acetato-Formato	N.D.	(Kannisto et al., 2015)

	L-Arabinosa-D-glucosa-Acetato- Formato	N.D.	
	Glicerol-Gluconato	N.D.	(Santala et al., 2011)

N.D.: No determinado.  $\mu$ : velocidad específica de crecimiento.

#### **4. Hipótesis**

El estado de reducción de las diferentes fuentes de carbono modificará los rendimientos de biomasa y de lípidos de reserva en *Acinetobacter baylyi* ADP1

#### **5. Objetivo general**

Evaluar el efecto del uso de diferentes fuentes de carbono en el crecimiento y en la producción de lípidos de reserva de *Acinetobacter baylyi* ADP1

#### **6. Objetivos particulares**

6.1. Generar datos cuantitativos del crecimiento y la producción de lípidos de reserva en ADP1 con fuentes de carbono con distintos grados de reducción

6.2. Identificar las fuentes de carbono más eficientes para la producción de biomasa y lípidos de reserva en ADP1

6.3. Generar el conocimiento necesario para el diseño de una estrategia de cultivo para la sobreproducción de lípidos de reserva en ADP1

## 7. Materiales y métodos

### 7.1. Cepa, medios y condiciones de cultivo

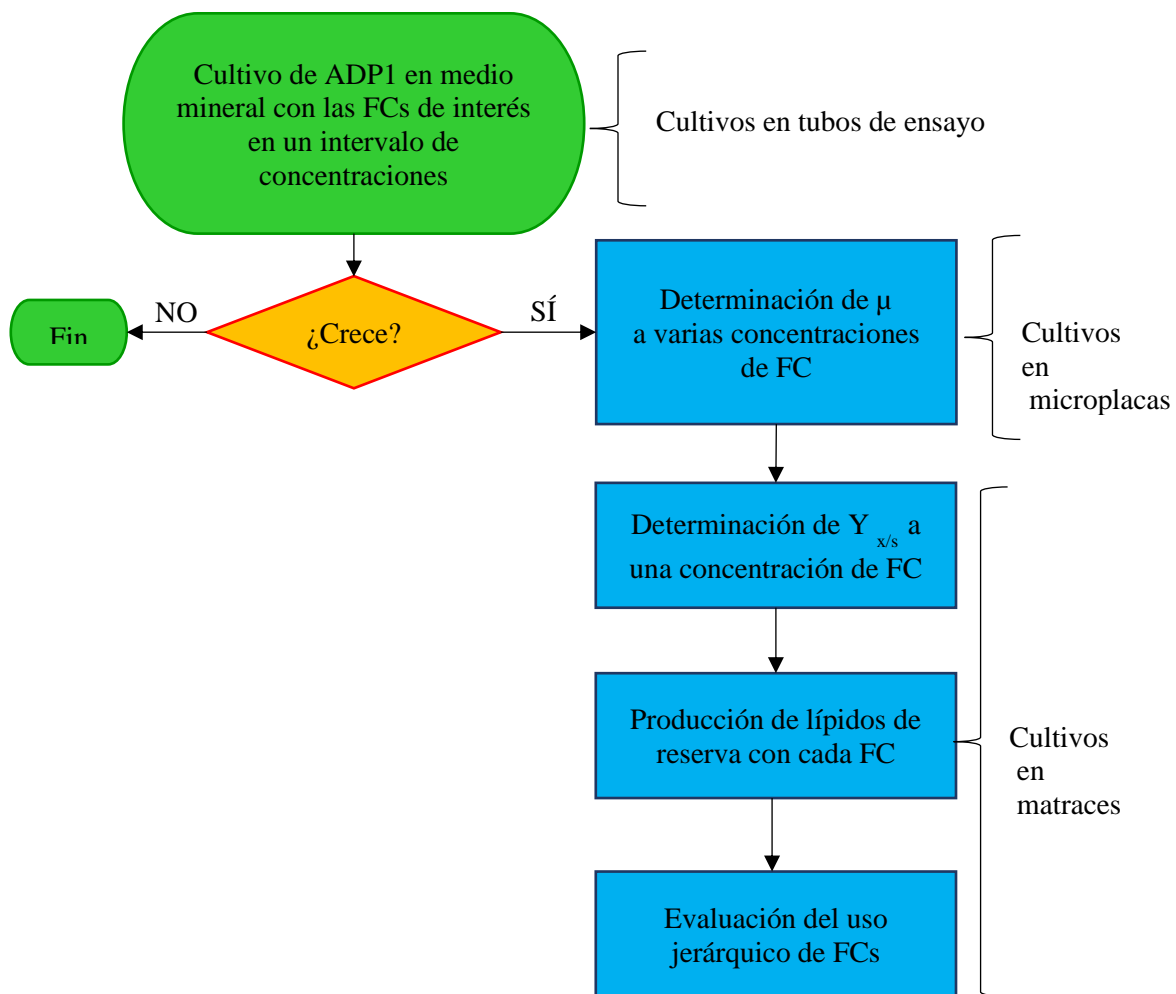
La cepa evaluada fue *Acinetobacter baylyi* ADP1 donada amablemente por la profesora Veronique de Berardinis (Genoscope CNS, Francia).

Los cultivos se llevaron a cabo en varios sistemas: tubos de ensayo de 160 x 10 mm con 3 ml de medio de cultivo, donde fue posible determinar la capacidad de ADP1 para crecer utilizando las fuentes de carbono de interés y su tolerancia a las mismas; microplacas de 96 pozos (volumen de cada pozo, 360  $\mu$ L) con 100  $\mu$ L de medio de cultivo, donde se observó el efecto de la concentración de sustrato en el crecimiento de ADP1; y, matraces Erlenmeyer con baffles (Eb) de 250 y 500 ml con 25 y 50 ml de medio de cultivo, respectivamente, donde fue posible la cuantificación de metabolitos para la determinación de los rendimientos de biomasa, la producción de lípidos y el orden de utilización de los diferentes compuestos en cultivos con mezclas de fuentes de carbono. Las microplacas fueron incubadas a 30 °C y agitación rápida en un lector de microplacas (ELx808, Biotek Inc., Winooski, EE. UU.); y, los tubos de ensayo y los matraces Eb, en una incubadora de mesa (New Brunswick Scientific Classic Series C24, Edison, EE. UU.) a 30 °C y 300 rpm.

Los cultivos fueron realizados en los medios: mineral AM1 (Martínez et al., 2007); mineral AM1 adicionado con ácido 3- (n-morfolino) propanosulfónico (MOPS) 100 mM (AM1-MOPS); medio Luria Bertani (LB); o medio LB adicionado con glucosa a 10 g L<sup>-1</sup>. El medio AM1 contiene (por litro): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.63 g, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.87 g, ácido cítrico 100 mg, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 370 mg, KCl 150 mg, Betaína 120 mg, FeCl<sub>3</sub> 2.4 mg, CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 300  $\mu$ g, CuCl<sub>2</sub> 150  $\mu$ g, ZnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O 300  $\mu$ g, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 300  $\mu$ g, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 75  $\mu$ g y MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O 495  $\mu$ g. El medio LB contiene (por litro): triptona 10 g, NaCl 10 g y extracto de levadura 5 g.

La estrategia experimental seguida para la evaluación del crecimiento y la producción de lípidos de reserva de ADP1 con varias fuentes de carbono se muestra en el diagrama 1 y se aborda de forma amplia en las siguientes secciones.





**Diagrama 1** Estrategia experimental seguida para la evaluación del crecimiento y la producción de lípidos de reserva de ADP1 con varias fuentes de carbono.

### 7.2.Crecimiento de ADP1 con FCs únicas: capacidad de crecimiento y tolerancia

La tolerancia y capacidad de ADP1 para utilizar diversas FCs se determinó en tubos de ensayo de 160 x 10 mm que contenían 3 ml de medio AM1-MOPS adicionado con glucosa 1-350 g L<sup>-1</sup>, acetato 1-20 g L<sup>-1</sup>, etanol 1-100 g L<sup>-1</sup>, piruvato 1- 100 g L<sup>-1</sup>, glicerol 1-80 g L<sup>-1</sup> o xilosa a 3 g L<sup>-1</sup>. Estos ensayos se iniciaron a una absorbancia de 0.03 a 600 nm (DO<sub>600</sub>) y se incubaron a 30°C y 300 rpm durante 24 h. Como inóculo se utilizaron cultivos en crecimiento exponencial realizados en medio LB.

### **7.3.Crecimiento de ADP1 con FCs únicas: determinación de la velocidad de crecimiento específica ( $\mu$ ) con las FCs metabolizables**

La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), a concentraciones seleccionadas de glucosa, acetato y piruvato, se evaluó en microplacas, cada pozo contenía 100  $\mu$ L de medio AM1-MOPS suplementado con glucosa 0.3-350  $\text{g L}^{-1}$ ; piruvato 1-80  $\text{g L}^{-1}$  o acetato 0.3-16  $\text{g L}^{-1}$ , inoculadas a 0.03  $\text{DO}_{600}$ . Las microplacas fueron incubadas a 30°C con agitación rápida, y el crecimiento fue seguido por absorbancia a 630 nm ( $\text{DO}_{630}$ ) cada 20 minutos. La  $\mu$  con etanol no se evaluó en microplacas debido a que se evapora de forma considerable, fue evaluada en matraces Eb de 250 ml que contenían 25 ml de medio AM1-MOPS adicionado con etanol entre 1 y 20  $\text{g L}^{-1}$ , estos fueron incubados hasta que no se observó crecimiento a 30°C y 300 rpm. Los cultivos con acetato, glucosa y piruvato a concentraciones donde se observó la velocidad de crecimiento específica máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ) en microplacas fueron realizados en matraces Eb de 250 ml que contenían 25 ml de medio AM1-MOPS adicionados con acetato 2  $\text{g L}^{-1}$ , glucosa 5  $\text{g L}^{-1}$  o piruvato 5  $\text{g L}^{-1}$  a 30°C y 300 rpm. Como inóculo, tanto en matraces como en microplacas, se utilizaron cultivos en crecimiento exponencial realizados en medio AM1-MOPS suplementado con la FC a evaluar a 1  $\text{g L}^{-1}$ . La biomasa se recuperó por centrifugación a 10 000 x g y se suspendió en medio AM1-MOPS fresco para la inoculación. El parámetro  $\mu$  se determinó calculando la pendiente de la línea que resultó de graficar los logaritmos naturales de  $\text{DO}_{600}$  o  $\text{DO}_{630}$  en crecimiento exponencial contra el tiempo en horas de al menos cuatro puntos.

### **7.4.Crecimiento de ADP1 con FCs únicas: determinación del rendimiento de biomasa ( $Y_{x/s}$ ) con las FCs metabolizables**

El rendimiento de biomasa a sustrato ( $Y_{x/s}$ ) en las diferentes FCs se evaluó en matraces Eb de 250 ml con 25 ml de medio AM1-MOPS suplementado con glucosa, acetato, piruvato o etanol a 3  $\text{g L}^{-1}$  a 30°C y 300 rpm. Los matraces fueron inoculados a 0.1  $\text{DO}_{600}$  (0.0220  $\text{g/L}$  de biomasa) con cultivos en crecimiento exponencial realizados en medio AM1-MOPS complementado con la FC correspondiente a 3  $\text{g L}^{-1}$ .  $Y_{x/s}$  se calculó dividiendo la biomasa generada ( $\text{g L}^{-1}$ ) entre el sustrato consumido ( $\text{mol}_{\text{FC}} \text{L}^{-1}$ ) al comienzo del estado estacionario.

## 7.5. Determinación del uso simultáneo de las FCs metabolizables: etanol, glucosa, acetato y piruvato

La evaluación del posible uso secuencial de fuentes de carbono en ADP1 se realizó en matraces Eb de 250 ml que contenían 25 ml de medio AM1-MOPS adicionado con las mezclas de FCs: acetato-piruvato-glucosa-etanol a 2 g L<sup>-1</sup> cada uno; acetato-glucosa a 2 g L<sup>-1</sup> cada uno; y acetato-etanol a 2 g L<sup>-1</sup> cada uno. Los matraces fueron inoculados con cultivos en crecimiento exponencial realizados en medio AM1-MOPS adicionado con la FC indicada en la sección de resultados e incubados a 30°C y 300 rpm.

## 7.6. Eliminación del gen *AtfA*

### 7.6.1. Amplificación de la *secuencia de inserción*

El ADN cromosomal de ADP1 se extrajo con el kit *UltraClean Microbial DNA Isolation* (QUIAGEN, Hilden, Alemania). El tamaño del producto fue comprobado en gel de agarosa al 1 %. El plásmido ploxCat2 contenido en la cepa *E. coli* XL1-Blue/ploxCat2 fue extraído por la técnica de *miniprep* montada en laboratorio Martínez-Bolívar-Gosset del Instituto de Biotecnología, UNAM. El tamaño del producto fue comprobado en gel de agarosa al 1 %. La secuencia *loxP-Cat2-loxP* fue amplificada a partir del plásmido ploxCat2 y comprobada por su tamaño en gel de agarosa al 1.5 %. Las secuencias que flanquean al gen *AtfA* de ADP1, 335 pb río arriba (secuencia nombrada *hom1*) y 278 pb río abajo (secuencia nombrada *hom2*), fueron amplificadas de ADN cromosomal. Las secuencias amplificadas fueron comprobadas por tamaño en gel de agarosa al 2.5 %. El ensamble de las secuencias *loxP-Cat2-loxP*, *hom1* y *hom2* se realizó a través de la técnica de PCR de empalme. La secuencia resultante, *hom1-loxP-Cat2-loxP-hom2* de 1734 pb, fue comprobada en gel de agarosa al 1 %, en adelante, esta secuencia será nombrada *secuencia inserto*. La integración de la *secuencia inserto* al genoma de ADP1 fue verificada por amplificación de la secuencia completa, una secuencia río arriba de 479 pb (nombrada *sec1*) y una secuencia río abajo de 405 pb (nombrada *sec2*). La comprobación de los productos de amplificación se realizó por su tamaño en gel de agarosa al 2.5 %. La concentración de los reactivos y las temperaturas utilizadas en las reacciones de PCR se indican en las tablas 6 y 7, respectivamente, y las secuencias de los *oligos* (iniciadores) en la tabla 8.

**Tabla 6** Mezclas de reacción utilizadas para la amplificación por PCR de las secuencias necesarias para eliminación del gen *AtfA*

Secuencia	H <sub>2</sub> O (μL)	Amortiguador (μL)	dNTP's 10 mM (μL)	Oligo forward 0.1 μM		Oligo reverse 0.1 μM		KAPA HiFi (μL)	ADN molde	
				Nombre	Vol. (μL)	Nombre	Vol. (μL)		Nombre	Vol. (μL)
<i>loxP-Cat2-loxP</i>	6.4	2	0.3	P1	0.3	P2	0.3	0.2	plex1Cat2	0.5
<i>hom1</i>	6.5	2	0.3	P3	0.3	P1'P4	0.3	0.2	ADN cromosomal	0.4
<i>hom2</i>	6.5	2	0.3	P2'P5	0.3	P6	0.3	0.2	ADN cromosomal	0.4
<i>hom1-loxP-Cat2-loxP-hom2</i> (PCR de empalme)	6.4	2	0.3	P3	0.1	P6	0.1	0.2	<i>hom1</i> <i>hom2</i> <i>loxP-Cat2-loxP</i>	0.3 0.3 0.3
<i>hom1-loxP-Cat2-loxP-hom2</i> (comprobación de integración)	6.6	2	0.3	P3	0.3	P6	0.3	0.2	<i>loxP-Cat2-loxP</i>	0.3
<i>sec1</i>	6.9	2	0.3	P3	0.3	S1	0.3	0.2	<i>hom1-loxP-Cat2-loxP-hom2</i>	0.1
<i>sec2</i>	6.9	2	0.3	S2	0.3	P6	0.3	0.2	<i>hom1-loxP-Cat2-loxP-hom2</i>	0.1

dNTP's: Desoxinucleósidos trifosfato. KAPA HiFi: polimerasa de alta fidelidad distribuida por Biosystems, posee una actividad específica de 1 U/ μL y es acompañada por amortiguador con magnesio.

**Tabla 7** Programas de temperatura utilizados para la amplificación por PCR de las secuencias necesarias para eliminación del gen *AtfA*

Secuencia	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Amplificación	Amplificación final	Núm. de ciclos
<i>loxP-Cat2-loxP</i>	95	98	64	72	72	30
	2 min	20 s	15 s	1 min	5 min	
<i>hom1</i>	95	98	65	72	72	30
	2 min	20 s	15 s	30 s	5 min	
<i>hom2</i>	95	98	60.8	72	72	30
	2 min	20 s	15 s	30 s	5 min	

<i>hom1-loxP-Cat2-loxP-hom2</i> (PCR de empalme)	95 3 min	98 20 s	68.8 30 s	72 2 min	72 5 min	30
<i>hom1-loxP-Cat2-loxP-hom2</i> (comprobación de integración)	95 3 min	98 20 s	60 15 s	72 2 min	72 5 min	30
<i>sec1</i>	95 3 min	98 20 s	60.6 15 s	72 50 s	72 5 min	30
<i>sec2</i>	95 3 min	98 20 s	60.6 15 s	72 50 s	72 5 min	30

**Tabla 8** Secuencia y tamaño de los *oligos* utilizados para la eliminación del gen *AtfA*

<i>Oligo</i>	Secuencia 5'→3'	Tamaño (pb)
P1	ACT TCT CGA GGT CGA CGG TA	20
P2	GCA TGC TAG AAC GTT AGC CG	20
P3	CAC GAG CGT GGT TTT GTT TC	20
P1' P4	TAC CGT CGA CCT CGA GAA GTA GCG TGG ATT GCC TCA CTG C	40
P2' P5	CGG CTA ACG TTC TAG CAT GCA AAC AAT AAA CTT GAT TTT TTA ATT TAT C	49
P6	TCT TAG CAA ATA ACG GGG TAT C	22
P7	TGT TCA GGC AGA TGC AGG TT	20
P8	AGT CGC GGA TCT TGA GCA TT	20
S1	ATTGGTGCCCTTAAACGCCT	20
S2	TGCGAAGTGATCTTCCGTCA	20

### 7.6.2. Transformación

Se realizó un cultivo, denominado 1, de ADP1 en un tubo de ensayo con 2 ml de medio LB y se incubó durante 16 h (hasta la fase estacionaria temprana). Para inducir la competencia se transfirieron 20 µL del cultivo 1 a un tubo de ensayo con 300 µL de medio LB fresco, cultivo 2, y se incubó durante 2.5 h. Se adicionaron 100 µL de la *secuencia inserto* al cultivo 2 y la mezcla se incubó por 2 h. El cultivo 2 transformado fue dispersado con perlas

de vidrio en cajas de medio LB con cloranfenicol a 15 µg/ml. Las cajas fueron incubadas a 30°C hasta observar la aparición de las colonias, alrededor de 36 h.

### 7.6.3. Evaluación de las colonias Cm<sup>R+</sup>

Las colonias resistentes a cloranfenicol (Cm<sup>R+</sup>) fueron evaluadas amplificando las secuencias *sec1* (479 pb), *sec2* (405 pb) y la *secuencia inserto* (1734 pb), en las condiciones indicadas en las tablas 6 y 7. Las secuencias amplificadas fueron comprobadas por gel de agarosa, al 2.5 % para *sec1* y *sec2*, y al 1 % para la *secuencia inserto*.

### 7.7. Cinética de producción de lípidos en las cepas ADP1 y ΔAtfA

La cinética de producción de lípidos de almacenamiento en las cepas ADP1 y ΔAtfA se evaluó en cultivos de una etapa, es decir, la producción de biomasa y de lípidos se realizó en un solo cultivo. Los cultivos se realizaron en matraces Eb de 500 ml que contenían 50 ml medio AM1-MOPS adicionado con glucosa a 20 g L<sup>-1</sup> (equivalente a 7.92 g Carbono/L) y fosfatos de amonio (equivalentes a 0.67 g Nitrógeno/L) a 30°C y 300 rpm. En estos cultivos, el nitrógeno es el sustrato limitante, la relación carbono/nitrógeno peso/peso (relación C/N) es igual a 12, en un cultivo balanceado dicha relación se encuentra alrededor de 4. Los matraces fueron inoculados a 0.1 DO<sub>600</sub> con un cultivo realizado en medio AM1 adicionado con glucosa a 10 g L<sup>-1</sup> y se incubaron a 30°C y 300 rpm hasta alcanzar la fase estacionaria y 36 h posteriores. Para el análisis de lípidos se tomaron muestras al inicio la fase estacionaria de crecimiento, donde se sabe que comienza la acumulación de lípidos de reserva (tiempo inicial o 0 h) y a las 12, 24 y 36 h posteriores.

### 7.8. Producción de lípidos en la cepa ADP1 con las FCs metabolizables

La producción de LR con glucosa, acetato, piruvato y etanol se evaluó en cultivos de dos etapas. La producción de biomasa se realizó durante la etapa I y se llevó a cabo en matraces Eb de 500 ml que contenían 50 ml de medio LB adicionado con glucosa 10 g L<sup>-1</sup> inoculados a 0.1 DO<sub>600</sub>, estos se incubaron hasta alcanzar alrededor de 5 DO<sub>600</sub> a 30°C y 300

rpm. Como inóculo se utilizaron cultivos en crecimiento exponencial realizados en medio LB adicionado con glucosa  $10 \text{ g L}^{-1}$ . La biomasa se recuperó por centrifugación a  $10\,000 \times g$  durante 15 minutos y se lavó con 20 ml de medio AM1-MOPS. El medio de lavado se separó por centrifugación a  $10\,000 \times g$  durante 15 minutos y decantación. La acumulación de lípidos de reserva se promovió durante la etapa II utilizando un medio limitado en nitrógeno (relación C/N entre 104 y 158, nótese que, la concentración de nitrógeno en estos cultivos es menor a la de los cultivos descritos en la sección 6.7, debido a que la producción de biomasa fue realizada en cultivo independientes), que es el medio AM1-MOPS descrito anteriormente sin  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  ni  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  y adicionado con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM y extracto de levadura a  $0.5 \text{ g L}^{-1}$ . El extracto de levadura fue adicionado debido a que previene la lisis de ADP1 al comienzo del cultivo (ver las secciones de resultados y discusión). Los ensayos se llevaron a cabo en matraces Eb de 250 ml con 25 ml de medio limitado en nitrógeno que se inocularon a 4  $\text{DO}_{600}$  con células de la etapa I. Las concentraciones de FC al comienzo de la etapa II fueron: glucosa  $20 \text{ g L}^{-1}$ , piruvato  $20 \text{ g L}^{-1}$  y etanol  $10 \text{ g L}^{-1}$ ; el acetato se alimentó cada 4 horas a  $8 \text{ g L}^{-1}$ .

### **7.9.Extracción de lípidos totales**

Los lípidos totales se extrajeron de la biomasa o del caldo de cultivo de muestras de 3 ml de cultivo siguiendo el protocolo de Folch con algunas modificaciones (Folch et al., 1957). En los cultivos realizados en dos etapas, las muestras fueron tomadas al comienzo de la etapa II y a las 12 h subsecuentes; y en los cultivos realizados en una etapa, las muestras fueron tomadas al inicio de la fase de crecimiento estacionario (0 h) y las 12, 24 y 36 h subsecuentes. La biomasa fue separada del caldo de cultivo por centrifugación a  $10\,000 \times g$  durante 15 min. Las muestras de caldo de cultivo fueron liofilizadas para disminuir su volumen. De forma independiente, para cada muestra, se realizaron dos extracciones secuenciales con 8 ml de cloroformo-metanol (2:1 v/v) en tubos Falcon de 15 ml (Fisher Scientific, Hampton, EE. UU.), a temperatura ambiente y 60 rpm durante 12 h. Después de cada período de incubación, el disolvente se separó por centrifugación a  $4500 \times g$  durante 15 min. El extracto lipídico se recuperó por separación de fases: se agregaron 4 ml de  $\text{NaCl}$   $10 \text{ g L}^{-1}$ , se agitó con vórtex, se centrifugó a  $4500 \times g$  durante 5 min y se recuperó la fase orgánica. El cloroformo se dejó evaporar a temperatura ambiente.

## 7.10. Evaluación de la resistencia de ADP1 a antibióticos

La resistencia de ADP1 a antibióticos se evaluó en medio LB líquido y sólido adicionado con carbenicilina (Cb), espectinomicina (Sp) o cloranfenicol (Cm) a 12.5, 25 o 50  $\mu\text{g/ml}$ . La resistencia en medio LB sólido se determinó cuantificando el crecimiento como unidades formadoras de colonias (UFCs) después de 87 h de cultivo. La resistencia en medio LB líquido se evaluó cuantificando el crecimiento como  $\text{DO}_{600}$  después de 13 h de cultivo.

## 7.11. Métodos analíticos

### 7.11.1. Cuantificación de crecimiento

El crecimiento de los cultivos realizados en matraces Eb y tubos de ensayo se determinó midiendo la  $\text{DO}_{600}$  en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.). En las microplacas, el crecimiento fue seguido automáticamente midiendo la  $\text{DO}_{630}$  en el lector de microplacas descrito anteriormente. Para hallar la relación entre la  $\text{DO}_{600}$  y la biomasa en CDW, se filtraron a vacío 10 ml de cultivos entre 0.1 y 0.9  $\text{DO}_{600}$  en filtros de nailon de 0.22  $\mu\text{m}$  y se secaron a 75°C hasta peso constante.

### 7.11.2. Cuantificación de metabolitos

Las concentraciones de glucosa, acetato, piruvato y etanol se determinaron por HPLC (Waters, Milford, EE. UU.) con una columna Aminex HPX-87H (300 mm  $\times$  7.8 mm, 9  $\mu\text{m}$ , Hercules, Bio-Rad, EE. UU.) a temperatura constante (50 °C), utilizando como eluyente  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 mM a 0.5 ml  $\text{min}^{-1}$ .

### 7.11.3. Análisis de lípidos

Los lípidos totales se analizaron cualitativamente mediante cromatografía en capa fina (*thin layer chromatography*, TLC) usando hexano-2-propanol-ácido acético (142.5:7.5:1 v/v/v) como fase móvil y placas de sílice ALUGRAM® SIL G como fase estacionaria. Para la visualización, las placas se tiñeron con yodo o sulfato cérico amoniacal. Este último se preparó mezclando 500 g de hielo *frappé*, 50 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y 25 g de  $(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, San Luis, EE. UU.). Como estándares se utilizaron ácido oleico, alcohol



olefíco, palmitato de cetilo y tripalmitoleato de glicerilo (Sigma-Aldrich, San Luis, EE. UU.).

Los lípidos totales se cuantificaron como alcoholes grasos o FAMES por cromatografía de gases con un detector de ionización de llama (*gas chromatography - flame ionization detector*, GC-FID). En resumen, los extractos de lípidos se disolvieron en 500  $\mu$ l de cloroformo y se incubaron con 320  $\mu$ l de BF<sub>3</sub>-metanol 10 % p/p (Sigma-Aldrich, San Luis, EE. UU.) a 60 ° C durante 1.5 h sin mezclar. Las mezclas de reacción se enfriaron en hielo, se agregaron 500  $\mu$ L de agua destilada, se agitaron con vórtex, se centrifugaron a 4500 x g durante 5 min y se recuperó la fase orgánica. El cloroformo se dejó evaporar a temperatura ambiente, el extracto se disolvió en 1 ml de cloroformo-metanol (1:1 v/v) y se agregaron 10  $\mu$ l de octanol (30 mg/ml) como estándar interno. Los FAMES y los alcoholes grasos presentes en estas mezclas se cuantificaron mediante GC-FID (Agilent 6850, Agilent Technologies, Santa Clara, EE. UU.) con una columna HP-INNOWax (30 m  $\times$  0.25 mm, 0.25  $\mu$ m, Agilent Technologies). Se inyectó 1  $\mu$ l de muestra en modo *split* (*ratio* 0.5) a 300 °C. El perfil de temperatura en la columna fue: 30 °C durante 5 min, 25 °C min<sup>-1</sup> hasta 180 °C, 15 °C min<sup>-1</sup> hasta 250 ° C, y finalmente, la temperatura se mantuvo a 250 °C durante 5 min. Como fase móvil se utilizó gas helio a una velocidad lineal de 1 ml min<sup>-1</sup>. Para obtener la curva estándar, se prepararon mezclas con 0.03, 0.08, 0.15, 0.3, 0.6 o 1.0 mg de cada uno de los compuestos esperados en los extractos lipídicos en 500  $\mu$ l de cloroformo: ácido láurico (C12:0), ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), alcohol palmitílico (C16:0), alcohol palmitolefílico (C16:1), alcohol estearílico (C18:0) y alcohol olefílico (C18: 1). Las mezclas se derivatizaron con BF<sub>3</sub>-metanol y se analizaron por GC-FID como se describió anteriormente.

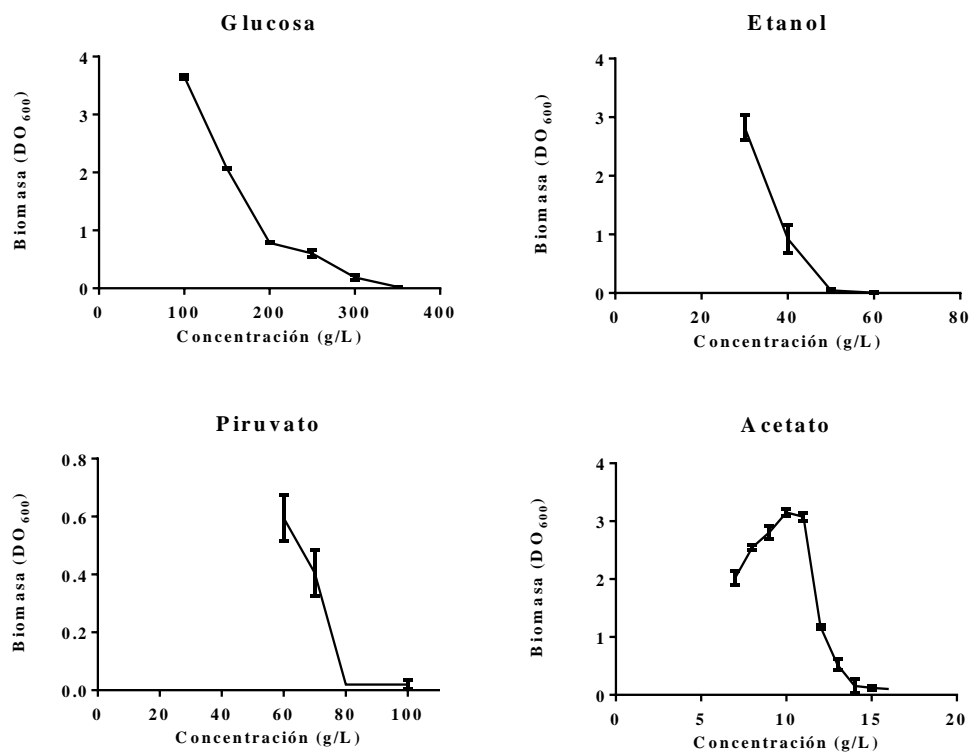
#### 7.12. **Análisis estadístico**

Los datos se presentaron como media  $\pm$  desviación estándar. Las comparaciones de medias se llevaron a cabo utilizando la prueba *t* a través de Prism Windows 6.07. El nivel de significancia se estableció en 0.05, entonces, una P <0.05 se consideró estadísticamente significativa.

## 8. Resultados

### 8.1. Crecimiento de ADP1 con FCs únicas

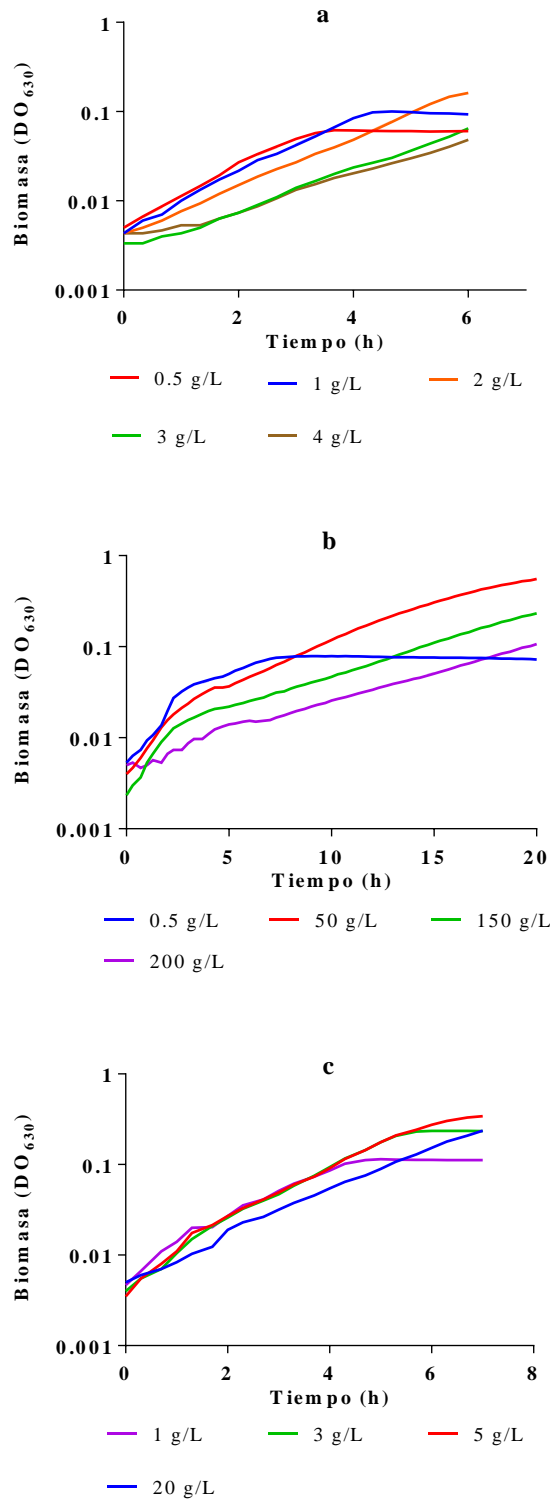
La capacidad de ADP1 para crecer utilizando xilosa, glicerol, acetato, piruvato, etanol y glucosa, como FCs únicas, se evaluó en cultivos de 24 h en tubos de ensayo con medio mineral AM1-MOPS adicionado con las FCs mencionadas. ADP1 fue capaz de crecer en los cultivos con glucosa, etanol, piruvato y acetato a concentraciones por debajo de 350, 50, 80 y 15 g L<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 5). Sin embargo, no se observó crecimiento en los cultivos con xilosa ni glicerol.



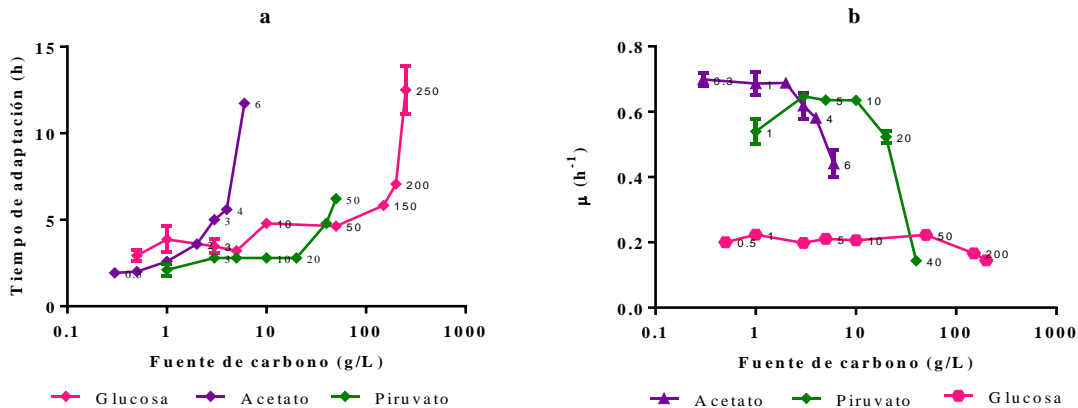
**Figura 5** Cultivos de ADP1 realizados en tubos de ensayo con medio mineral adicionado con glucosa, etanol, piruvato o acetato a diferentes concentraciones donde se observa la concentración mínima para la inhibición del crecimiento de ADP1 con cada sustrato.

Las cinéticas de crecimiento de ADP1 con glucosa, piruvato y acetato se evaluaron en cultivos en microplacas con las FCs a concentraciones menores a las inhibitorias observadas en el ensayo anterior, algunas curvas representativas se muestran en la Figura 6. En las curvas de crecimiento de ADP1 se observó el incremento de la etapa de adaptación relacionada directamente con la concentración de sustrato (Figura 7a). En la etapa de

crecimiento exponencial, se identificaron las concentraciones de sustrato óptimas para el crecimiento de ADP1: glucosa entre 0.5 y 50 g L<sup>-1</sup>, piruvato entre 3 y 10 g L<sup>-1</sup>, y acetato entre 0.3 y 2 g L<sup>-1</sup> (Figura 7b), donde se determinaron las velocidades específicas de crecimiento máximas ( $\mu_{\text{máx}}$ ) de  $0.21 \pm 0.01$ ,  $0.64 \pm 0.01$  y  $0.69 \pm 0.02$  h<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabla 9, Figura 7b).

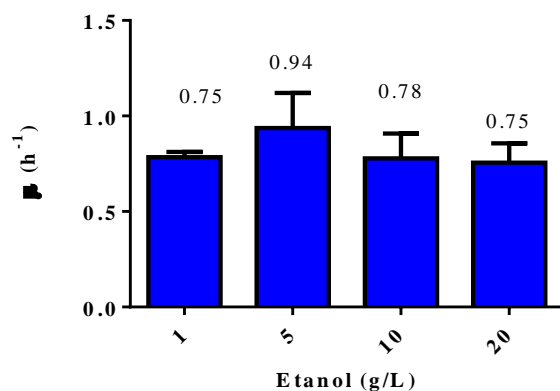


**Figura 6** Cultivos representativos de ADP1 en medio mineral suplementado con diferentes concentraciones de **a.** acetato, **b.** glucosa o **c.** piruvato



**Figura 7.** Efecto de la concentración de sustrato en la cinética de crecimiento de ADP1. **a.** Etapa de adaptación, el tiempo de adaptación aumenta de forma directa con la concentración de sustrato. **b.** Crecimiento exponencial, se observan concentraciones óptimas de sustrato para el crecimiento de ADP1

Debido a la alta evaporación del etanol, el crecimiento con este sustrato no pudo ser evaluado en microplacas. El crecimiento con etanol se evaluó en matraces con medio mineral adicionado con 1, 5, 10 y 20 g L<sup>-1</sup> de la fuente de carbono. La  $\mu_{\text{máx}}$  observada fue  $0,94 \pm 0,18$  h<sup>-1</sup> a 5 g L<sup>-1</sup> (Figura 8), sin embargo, no se encontró diferencia estadística al comparar la media de las  $\mu$  en las concentraciones evaluadas ( $P=0.3299$ ). La comparación de la velocidad de crecimiento de ADP1 con los diferentes sustratos se realizó en cultivos en matraces con medio mineral adicionado con las fuentes de carbono a una concentración dentro del intervalo donde se observó la  $\mu_{\text{máx}}$ , ya sea en microplacas o matraces. ADP1 mostró una velocidad de crecimiento mayor en acetato y etanol ( $0.93 \pm 0.06$  y  $0.94 \pm 0.18$ , respectivamente), y valores menores en piruvato y glucosa ( $0.61 \pm 0.01$  y  $0.25 \pm 0.01$ , respectivamente). Cabe mencionar que los valores de  $\mu$  para glucosa y piruvato observados en matraces fueron similares a los encontrados en microplacas, sin embargo, en acetato, la  $\mu$  fue 35 % mayor en los matraces (Tabla 9). Tanto en cultivos en matraces como en microplacas las  $\mu$  más altas fueron observadas en FCs gluconeogénicas comparadas con la  $\mu$  observada en glucosa.



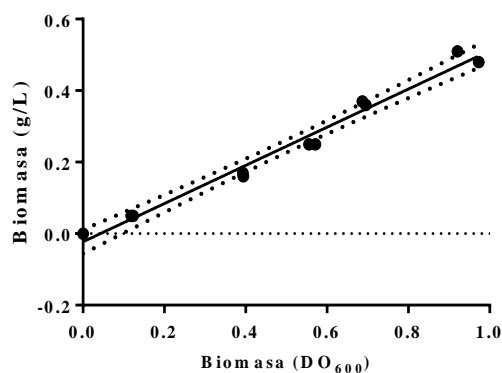
**Figura 8** Velocidad específica de crecimiento (eje y) en cultivos de ADP1 realizados en matraces con medio mineral adicionado con etanol a 1, 5, 10 y 20 g L<sup>-1</sup> (eje x).

**Tabla 9** Comparación de  $\mu_{\text{máx}}$  observada en cultivos de ADP1 con glucosa, acetato, etanol y piruvato en dos sistemas: microplacas y matraces.

Sustrato	Concentración (g L <sup>-1</sup> )	$\mu_{\text{máx}}$ (h <sup>-1</sup> )	
		Microplacas	Matraces
Glucosa	5	0.21 ± 0.01	0.25 ± 0.01
Acetato	2	0.69 ± 0.02	0.93 ± 0.06
Etanol	5	N.d.	0.94 ± 0.18
Piruvato	3	0.64 ± 0.01	0.61 ± 0.01

$\mu_{\text{máx}}$ : tasa de crecimiento específica máxima. N.d.: No determinado.

La producción de biomasa fue evaluada en medio mineral con 3 g L<sup>-1</sup> de la FC. La equivalencia en peso seco de la biomasa medida como DO<sub>600</sub> se calculó a través de la ecuación  $y=0.5488x-0.0329$  que tiene un R<sup>2</sup> de 0.9762, donde y es la biomasa en g CDW L<sup>-1</sup> y x la biomasa en DO<sub>600</sub> y que fue determinada en este trabajo (ver sección Materiales y métodos, Figura 9).



**Figura 9** Relación entre la concentración de biomasa en peso seco y la densidad óptica en cultivos de *A. baylyi* ADP1.

El rendimiento de biomasa ( $Y_{x/s}$ ) fue similar en acetato y glucosa ( $10.88 \pm 0.55$  y  $10.84 \pm 0.54$  g biomasa / C-mol, respectivamente), no se encontró diferencia significativa entre ambas medias y se determinó un valor de P de 0.8895. Para los cultivos con piruvato, se determinó un  $Y_{x/s}$  igual a  $12.54 \pm 1.32$  g biomasa / C-mol, y el mayor rendimiento se observó en etanol,  $14.14 \pm 1.59$  g biomasa / C-mol (Tabla 10). Los valores de concentración de biomasa y productividad (biomasa por volumen en el tiempo) más altos, al igual que el  $Y_{x/s}$ , se hallaron en cultivos con etanol,  $0.83$  g L<sup>-1</sup> y  $0.18$  g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente. Adicionalmente, en cultivos con etanol se identificó la producción de acetato con un rendimiento de  $0.52 \pm 0,06$  g Ac / g EtOH. Este ácido orgánico se consumió una vez que se agotó el etanol.

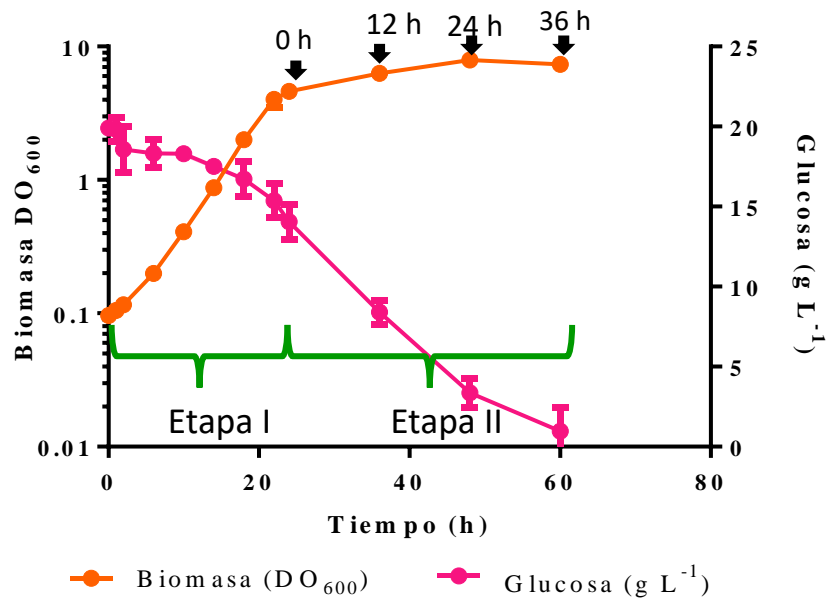
**Tabla 10** Parámetros de producción de biomasa evaluada con varias FCs a 3 g L<sup>-1</sup>

Sustrato	$Y_{x/s}$ (g biomasa mol-C <sup>-1</sup> )	Concentración (g biomasa L <sup>-1</sup> )	Productividad (g biomasa L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
Etanol	14.14 ± 1.59	1.64 ± 0.08	0.33 ± 0.04
Glucosa	10.84 ± 0.54	0.82 ± 0.04	0.07 ± 0.01
Acetato	10.88 ± 0.55	0.69 ± 0.03	0.14 ± 0.02
Piruvato	12.54 ± 1.32	0.83 ± 0.06	0.18 ± 0.01

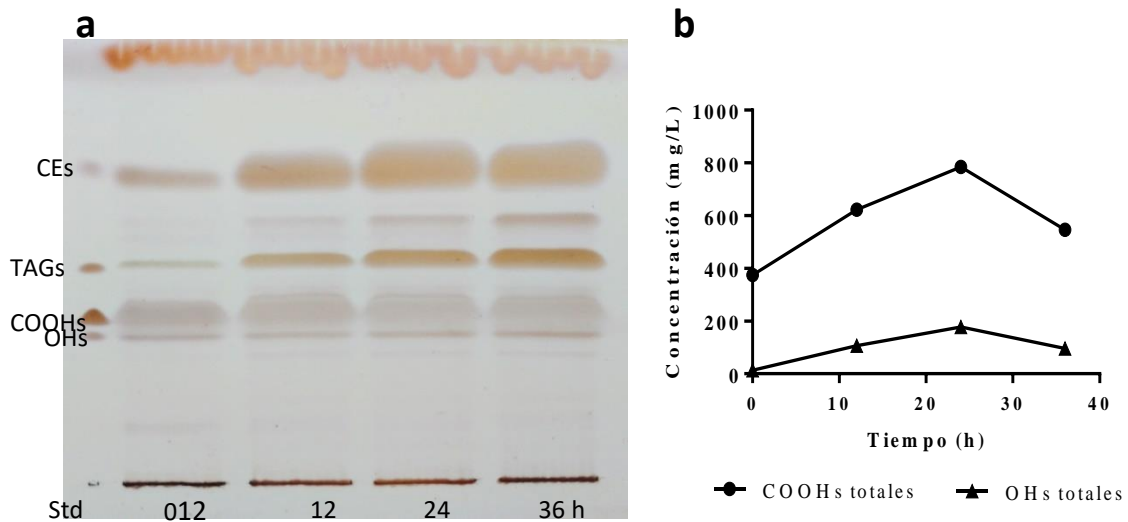
## 8.2. Cinética de producción de lípidos en ADP1

La producción de lípidos de reserva en el tiempo fue evaluada en cultivos en matraces con medio mineral con glucosa, que contenía una relación carbono/nitrógeno (C/N) igual a 12, es decir, un exceso de carbono. Como se mencionó anteriormente, el exceso de carbono propicia la acumulación de lípidos de reserva. Específicamente, en ADP1, se ha observado que, si bien existe síntesis de lípidos de reserva durante el crecimiento exponencial, estos se sintetizan mayoritariamente en estado estacionario. Los cultivos fueron monitoreados por absorbancia a 600 nm durante la etapa de crecimiento exponencial (etapa I o producción de biomasa) y 36 h posteriores (etapa II o producción de lípidos), se cuantificó el consumo de glucosa por HLPC y se evaluó la producción de lípidos en la etapa II, cualitativamente mediante TLC y cuantitativamente por GC-FID (Figuras 10 y 11). En la placa de TLC pudo observarse que durante la etapa II: la presencia de las CEs y los TAGs aumentó; los ácidos grasos libres fueron abundantes y su concentración no presentó cambios importantes; los alcoholes grasos libres fueron escasos y su concentración tampoco presentó cambios importantes (Figura 11a). La cuantificación por GC-FID indicó aumento en la concentración de lípidos totales durante las primeras 24 h de la etapa II, donde se alcanzaron  $177.5 \text{ mg L}^{-1}$  de alcoholes grasos y  $784.6 \text{ mg L}^{-1}$  de ácidos grasos, sin embargo, a las 36 h se observaron concentraciones menores, lo que sugiere el catabolismo de lípidos (Figura 11b). A las 24 h de la etapa II, la concentración de glucosa era  $3.4 \pm 0.9 \text{ g L}^{-1}$  y a las 36 h se había agotado (Figura 10), esto pudo limitar la síntesis de lípidos e inducir su consumo. Con la finalidad de evitar la limitación de la FC, la etapa II fue evaluada en cultivos en matraces alimentados con una solución de glucosa a  $200 \text{ g L}^{-1}$  cada 7-9 h (Figura 12a). Como puede verse en la placa de TLC (Figura 12b), nuevamente, la producción de LR aumentó hasta las 24 h y disminuyó a las 36 h. El consumo de sustrato indicó que durante la etapa II existe una disminución paulatina de la velocidad de consumo de glucosa, que puede deberse a pérdida de viabilidad de las células y/o inactivación de la maquinaria enzimática encargada del catabolismo de glucosa. Los ensayos realizados indican que, bajo las condiciones evaluadas, ADP1 es capaz de sintetizar lípidos de reserva únicamente durante 24 h de la etapa II.

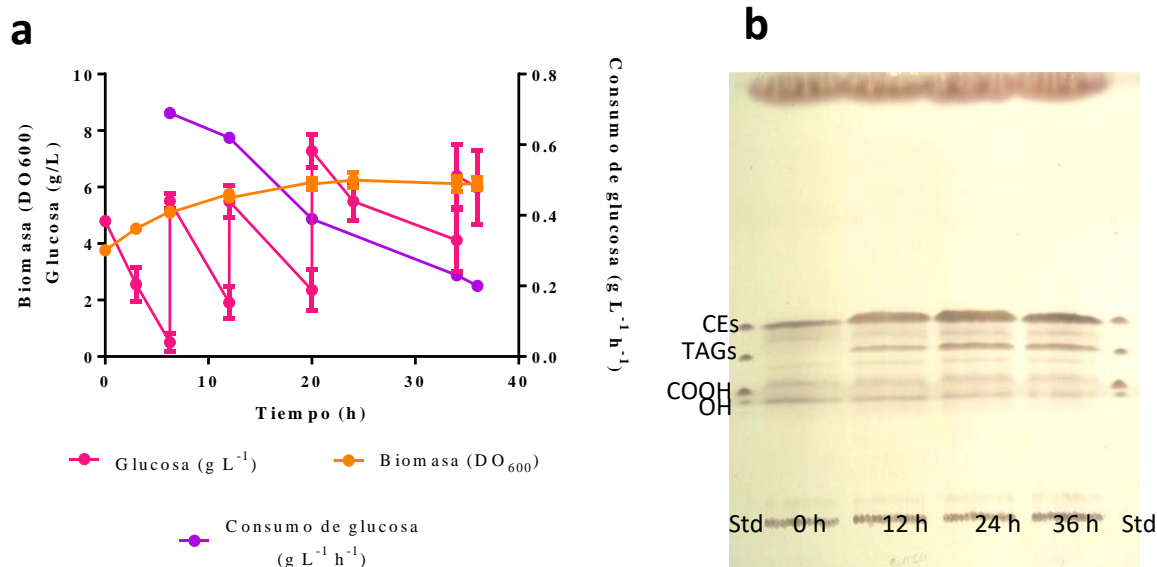




**Figura 10** Cultivos de ADP1 para la producción de biomasa y lípidos de reserva realizados en matraces con medio mineral adicionado con glucosa a 20 g/L. Etapa I: etapa de producción de biomasa. Etapa II: etapa de producción de lípidos. Las flechas indican los puntos donde se analizó el contenido de lípidos en la biomasa y el medio de cultivo

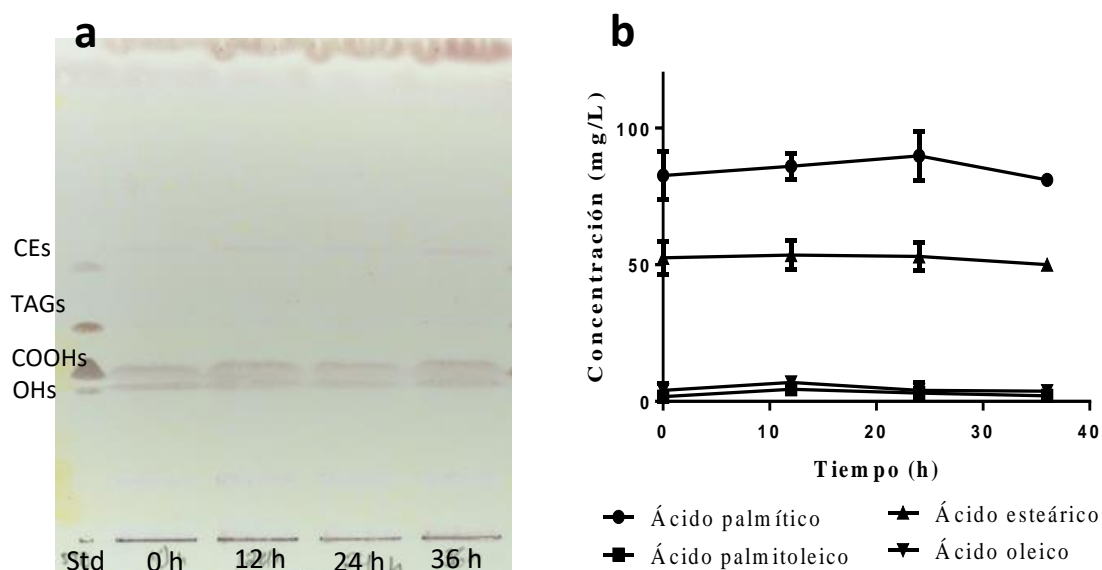


**Figura 11** Perfil lipídico de la biomasa de ADP1 durante la etapa II de los cultivos mostrados en la figura 10, obtenido por **a.** TLC y **b.** GC-FID. CEs: ceras éster. TAGs: triacilglicerol. COOHs: Ácidos grasos libres. OHs: Alcoholes grasos libres. Std: Estándares. COOHs totales: ácidos grasos totales. OHs totales: alcoholes grasos totales



**Figura 12** Etapa de producción de lípidos evaluada en cultivos en matraces alimentados con una solución de glucosa a  $200 \text{ g L}^{-1}$  cada 7-9 h. **a.** Curvas de biomasa, concentración de la FC y velocidad de consumo de la FC. **b.** Perfil lipídico de la biomasa a diferentes tiempos (0, 12, 24 y 36 h) obtenido por TLC. CEs: ceras éster. TAGs: triacilgliceroles. COOHs: Ácidos grasos libres. OHs: Alcoholes grasos libres. Std: Estándares.

Como puede verse en la figura 13a, en el sobrenadante se encontraron ácidos grasos libres y dos tipos de compuestos lipídicos no identificados, un grupo con una migración similar a la de los alcoholes grasos y otro con mayor migración que la mostrada por las CEs. Por GC-FID se corroboró que la concentración de lípidos totales en el medio de cultivo,  $132 \text{ mg L}^{-1}$ , se mantiene sin cambios importantes, a diferencia de lo observado en la biomasa durante la etapa II, en el sobrenadante no se observó la acumulación de lípidos (Figura 13b) por lo que la producción de lípidos de reserva con varias FCs se analizó únicamente en la biomasa.



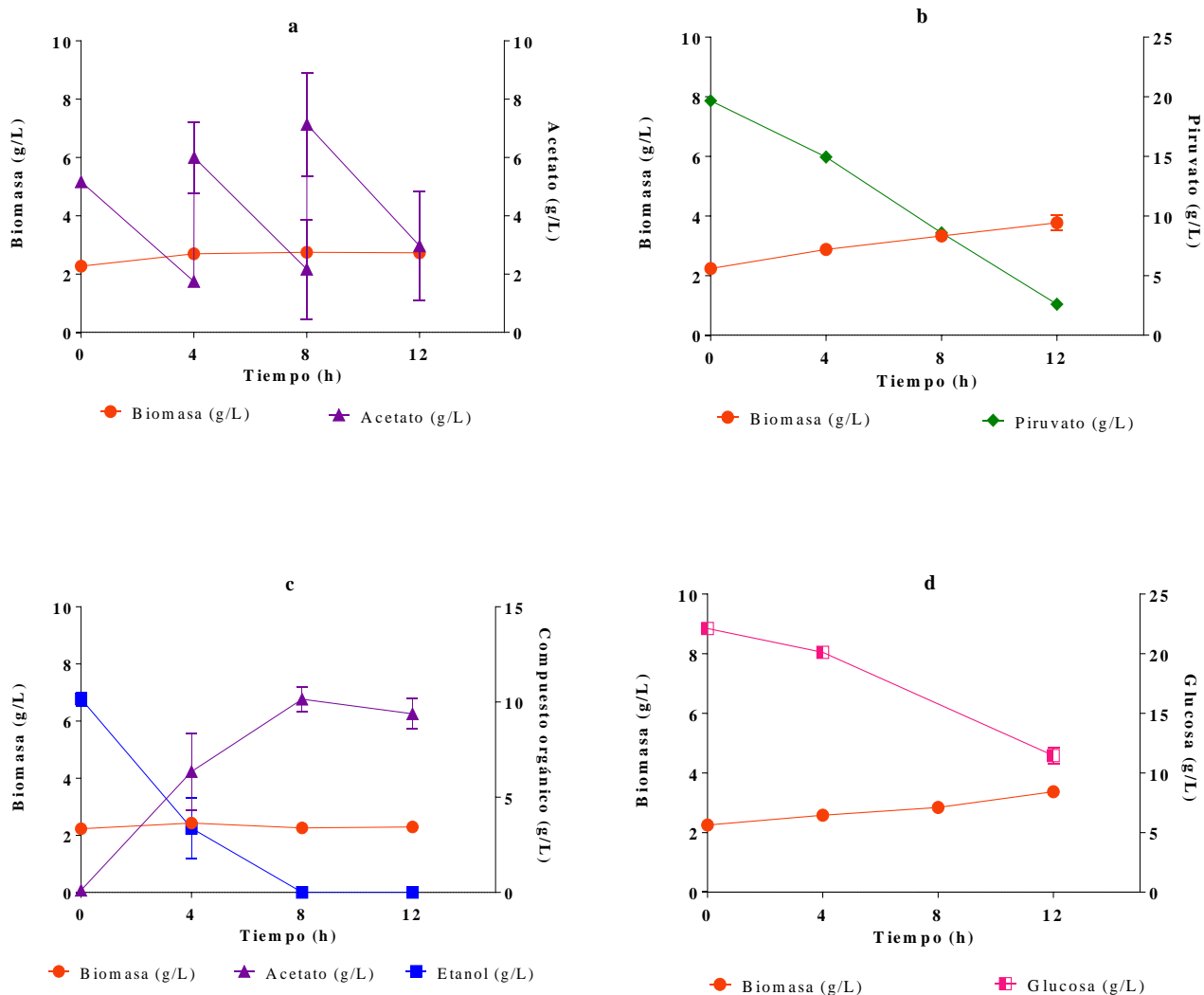
**Figura 13** Perfil lipídico del caldo de cultivo de la cepa ADP1 obtenido por TLC. **a.** Evaluación por TLC. **b.** Evaluación por GC-FID. CEs: ceras éster. TAGs: triacilgliceroles. COOHs: Ácidos grasos libres. OHs: Alcoholes grasos libres. Std: Estándares. COOHs totales: ácidos grasos totales. OHs totales: alcoholes grasos totales.

### 8.3. Producción de lípidos en ADP1 con las FCs metabolizables

La producción de CEs y TAGs con diferentes sustratos se evaluó en dos cultivos independientes, cultivo I (etapa I) y cultivo II (etapa II). Para todos los sustratos, el cultivo I se llevó a cabo en medio LB adicionado con glucosa a  $10 \text{ g L}^{-1}$ , esto, con el objetivo de partir de biomasa con las mismas características y evaluar el efecto del sustrato exclusivamente en la producción de lípidos. El cultivo II se llevó a cabo en medio mineral con una cantidad limitada de nitrógeno (relación C/N=104-158) adicionado con glucosa  $20 \text{ g L}^{-1}$ , piruvato  $20 \text{ g L}^{-1}$ , etanol  $10 \text{ g L}^{-1}$  o acetato  $8 \text{ g L}^{-1}$  (este último fue alimentado cada 4 h). La concentración de los sustratos se estableció por debajo de las CMI determinadas en este trabajo. La duración del cultivo II fue de 12 h donde, ya que en la caracterización cinética de producción de lípidos de ADP1, se observó que a este tiempo la acumulación de lípidos era considerable (Figuras 11 y 12). Debido a que no se observó acumulación de lípidos en el sobrenadante durante la etapa II (Figura 13), el análisis de lípidos con varias FCs fue realizado en biomasa únicamente.

En la Figura 14 se muestran la biomasa y el consumo de las FCs en los cultivos II. Se observó un aumento significativo en la biomasa de cultivos con glucosa y piruvato, pero

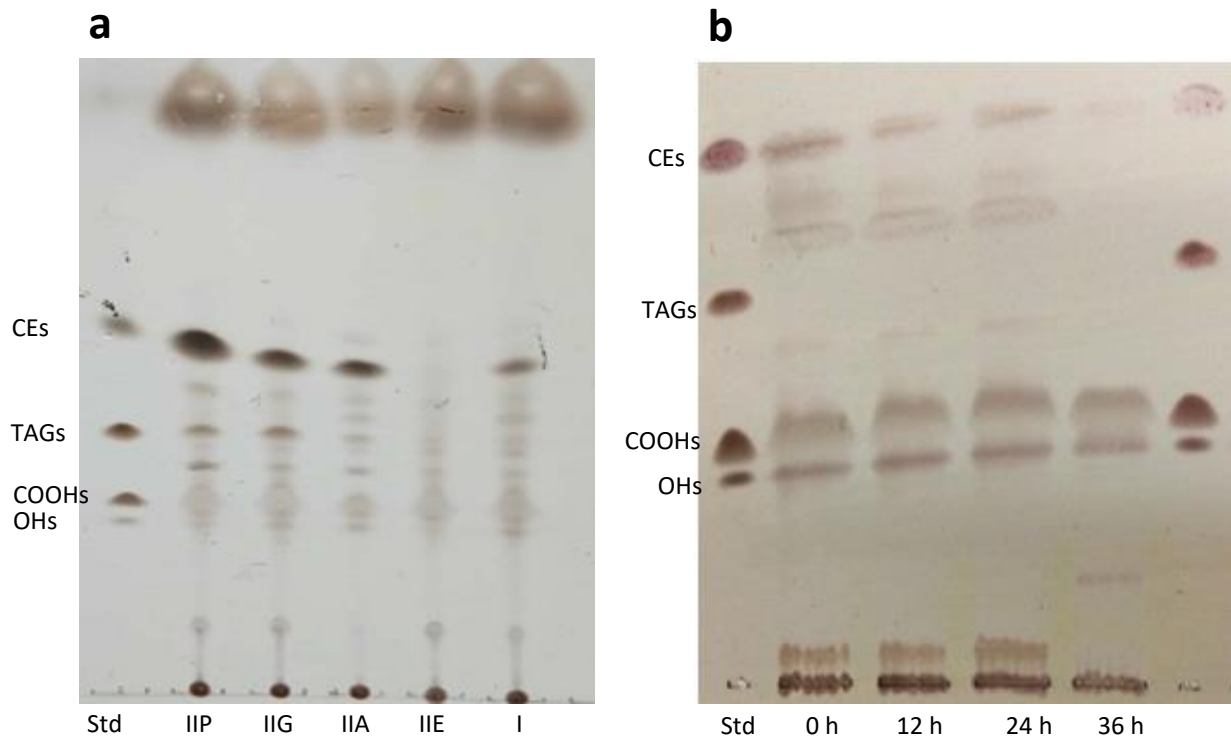
no en acetato ni en etanol. En todos los cultivos hubo consumo significativo de sustrato; interesante, en los cultivos con etanol se produjo acetato con un rendimiento de 0.778 mol acetato/ mol etanol.



**Figura 14** Cultivos en la etapa II. Consumo de sustrato y aumento de biomasa en cultivos en medio mineral limitado en nitrógeno y suplementado con **a.** acetato, **b.** piruvato, **c.** etanol y **d.** glucosa

Como se muestra en la placa de TLC (Figura 15a), al finalizar los cultivos I ya había acumulación de lípidos de reserva. En los cultivos II, las CE aumentaron en los cultivos con

glucosa, piruvato y acetato. Además, hubo una producción clara de TAGs en los cultivos con piruvato y glucosa; en cultivos con acetato la producción de estos compuestos no fue evidente. De forma distinta, en los cultivos en la etapa II con etanol se consumieron los lípidos de reserva procedentes de los cultivos de la etapa I. Por otro lado, la abundancia de los ácidos grasos libres no mostró cambios obvios de los cultivos I a los cultivos II realizados con glucosa y piruvato; lo mismo se observó en los cultivos con etanol, donde se consumieron los lípidos de reserva. De forma diferente, en los cultivos con acetato se observó consumo de ácidos grasos libres. Con la finalidad de evaluar si en cultivos con etanol existe síntesis de lípidos después de las 12 h en la etapa II, se realizaron cultivos donde la etapa II tuvo una duración de 36 horas. Como puede verse en la figura 15b, aún a tiempos más largos no existe producción de lípidos en ADP1 a partir de etanol.



**Figura 15 a.** Lípidos totales de biomasa separados por TLC. I: Lípidos totales de la biomasa al final del cultivo I. II: Lípidos totales de la biomasa al final de los cultivos II adicionados con piruvato (IIP), glucosa (IIG), acetato (IIA) o etanol (IIE). **b.** Lípidos totales de biomasa derivada de cultivos con etanol donde se observa que a través del tiempo no existe aumento en la concentración de lípidos. Std: estándares. OHs: alcoholes grasos libres. COOHs: ácidos grasos libres. TAGs: triacilgliceroles. CEs: ceras éster.

A partir de los datos de cuantificación de alcoholes y ácidos grasos totales obtenidos por GC-FID, las observaciones hechas en las placas de TLC e información encontrada en la literatura, se formularon ecuaciones que permitieron aproximar la producción de CEs y TAGs con las diferentes FCs.

En ADP1 los alcoholes grasos se pueden encontrar libres o formando CEs y los alcoholes grasos libres están presentes en concentraciones traza (Kalscheuer y Steinbüchel 2003). Por lo tanto, la concentración de alcoholes libres es despreciable y puede considerarse que los alcoholes totales se encuentran formando parte de CEs. Cada molécula de CE está formada por una molécula de alcohol graso. Entonces, la producción de CEs en la etapa II se aproximó mediante la ecuación 1, donde los alcoholes grasos totales ya producidos en la etapa I se restaron a los alcoholes grasos totales presentes en la etapa II y se consideró que un mol de alcoholes grasos equivale a un mol de CEs.

La producción de TAGs durante la etapa II se aproximó a través de la ecuación 4. Los TAGs ya producidos durante la etapa I se restaron a los TAG presentes en la etapa II (Ec. 2). Un mol de TAGs está formado por tres moles de ácidos grasos, los ácidos grasos pueden encontrarse libres o formando lípidos estructurales, CEs y TAGs; entonces, la concentración de TAGs puede relacionarse con la concentración de ácidos grasos totales (Ec. 3). Como se mencionó anteriormente, los ácidos grasos libres permanecen sin cambios importantes durante las etapas I y II en cultivos con glucosa y piruvato, adicionalmente, los lípidos estructurales pueden considerarse constantes porque el medio de cultivo en la etapa II es limitante de crecimiento. Con las consideraciones anteriores y a través de álgebra básica, se formuló la ecuación 4 que es válida para aproximar la concentración de los TAGs en cultivos con glucosa y piruvato, pero no en cultivos con acetato donde se observa consumo de ácidos grasos libres.

$$CEs_{\text{producidas II}} = \frac{1 \text{ mol } CEs}{1 \text{ mol } OHs} (OHs_{\text{totales II}} - OHs_{\text{totales I}})$$

**Ecuación 1** Aproximación de la concentración de CEs producidas durante la etapa

II.

$$\text{Ecuación 2 } TAGs_{\text{ producidos II}} = TAGs_{\text{ II}} - TAGs_{\text{ I}}$$

$$\text{Ecuación 3 } TAGs_X = \frac{1 TAGs_{\text{ mol}}}{3 COOHs_{\text{ mol}}} (COOHs_{\text{ totales X}} - COOHs_{\text{ libres X}} - COOHs_{\text{ estructurales X}} - COOHs_{\text{ CEs X}})$$

$$\text{Ecuación 4 } TAGs_{\text{ producidos II}} = \frac{1 TAGs_{\text{ mol}}}{3 COOHs_{\text{ mol}}} (COOHs_{\text{ totales II}} - COOHs_{\text{ CEs II}} - COOHs_{\text{ totales I}} + COOHs_{\text{ CEs I}})$$

**Ecuaciones 2-4** Aproximación de la concentración de TAGs producidos durante la etapa II.  $TAGs_{\text{ producidos}}$ : TAGs producidos.  $OHS_{\text{ totales}}$ : alcoholes grasos totales.  $COOHs_{\text{ totales}}$ : ácidos grasos totales.  $COOHs_{\text{ libres}}$ : ácidos grasos libres.  $COOHs_{\text{ estructurales}}$ : ácidos grasos formando lípidos estructurales.  $COOHs_{\text{ CEs}}$ : ácidos grasos formado CEs. *I*: en etapa I. *II*: en etapa II. *X*: en etapa I o II. Los valores de ácidos y alcoholes grasos se dan en moles.

Con el procedimiento descrito anteriormente, se obtuvieron rendimientos entre 1.3 y 3.9 mg de CEs o TAGs por gramo de FC, estos valores representan entre el 0.4 y el 1.4 % de los rendimientos estequiométricos calculados. De manera general los valores de rendimiento, concentración, porcentaje de peso seco acumulado como lípidos y productividad son al menos dos veces mayores utilizando piruvato como FC (Tabla 11).

**Tabla 11** Parámetros de producción de TAGs y CEs en los cultivos de ADP1 con acetato, glucosa y piruvato como FCs únicas.

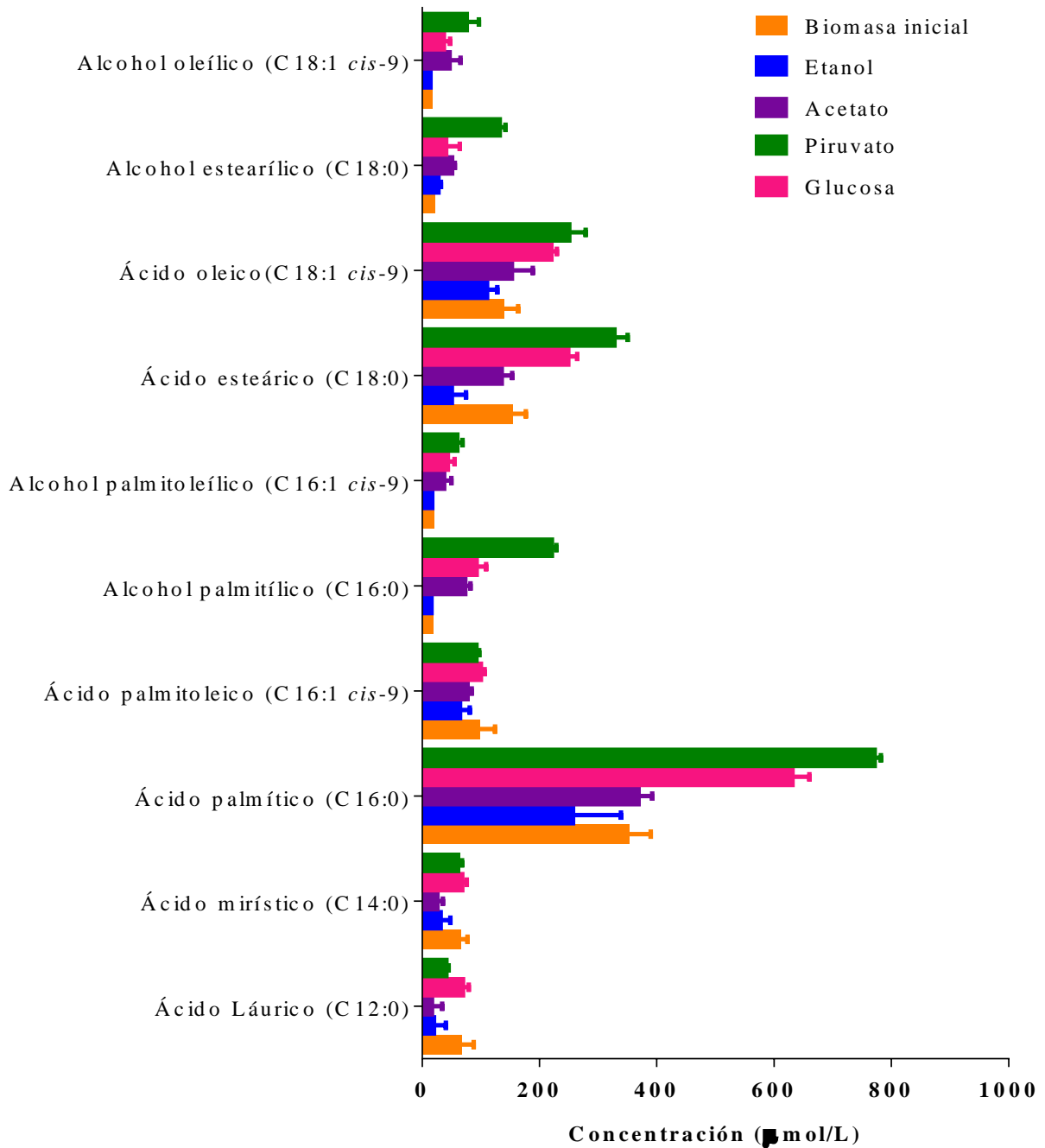
Sustrato	Y p/s (mg g <sub>FC</sub> <sup>-1</sup> )		% CDW	
	CEs	TAGs	CEs	TAGs
Glucosa	1.3 ± 0.0	1.4 ± 0.3	4.1 ± 0.0	1.5 ± 0.3
Acetato	2.9 ± 0.7	n.d.	4.2 ± 0.9	n.d.
Piruvato	3.9 ± 0.3	1.3 ± 0.3	10.0 ± 0.9	1.2 ± 0.3
Sustrato	Concentración (mg L <sup>-1</sup> )		Productividad (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	
	CEs	TAGs	CEs	TAGs
Glucosa	141.1 ± 1.5	52.6 ± 9.6	11.8	4.4
Acetato	114.9 ± 26.1	n.d.	9.6	n.d.
Piruvato	342.1 ± 29.5	41.6 ± 9.3	28.5	3.5

n.d.: no determinado. TAGs: triacilgliceroles. CEs: ceras éster. % CDW: porcentaje del peso celular seco. FC: fuente de carbono.

Es importante destacar que la proporción de TAGs y CEs mostró ser diferente en cada sustrato evaluado: en cultivos con acetato, aunque no fue posible calcular la concentración de TAGs, la placa de TLC indica una síntesis exclusiva o casi exclusiva de CEs; con piruvato, el porcentaje en peso seco de CEs es 8 veces mayor que el de TAGs; y finalmente, en cultivos con glucosa, la producción de CEs es 3 veces mayor que la producción de TAGs. La incapacidad de ADP1 para sintetizar lípidos de reserva en cultivos con etanol fue corroborada prolongando la duración de la etapa II a 36 h.

Los tipos de alcoholes y ácidos grasos identificados fueron los mismos para todas las FCs evaluadas: ácidos grasos C12:0, C14:0, C16:0, C16:1, C18:0 y C18:1; y alcoholes grasos C16:0, C16:1, C18:0 y C18:1 (Figura 16). En la cuantificación por GC-FID se detectó un consumo importante de ácidos grasos totales en los cultivos con etanol y acetato. Relacionando estos resultados con lo observado en las placas de TLC podemos deducir que en los cultivos con acetato este consumo es de ácidos grasos libres y en los cultivos con etanol es consumo de lípidos de reserva. Cabe mencionar que la concentración de ácidos grasos C12:0, C14:0 y C16:1 se mantuvo relativamente constante, lo que sugiere que estos compuestos se encuentran, principalmente, formando lípidos estructurales.





**Figura 16** Ácidos y alcoholes grasos identificados en la biomasa al final de la etapa I (biomasa inicial) y de la etapa II en cultivos con etanol, glucosa, piruvato y acetato.

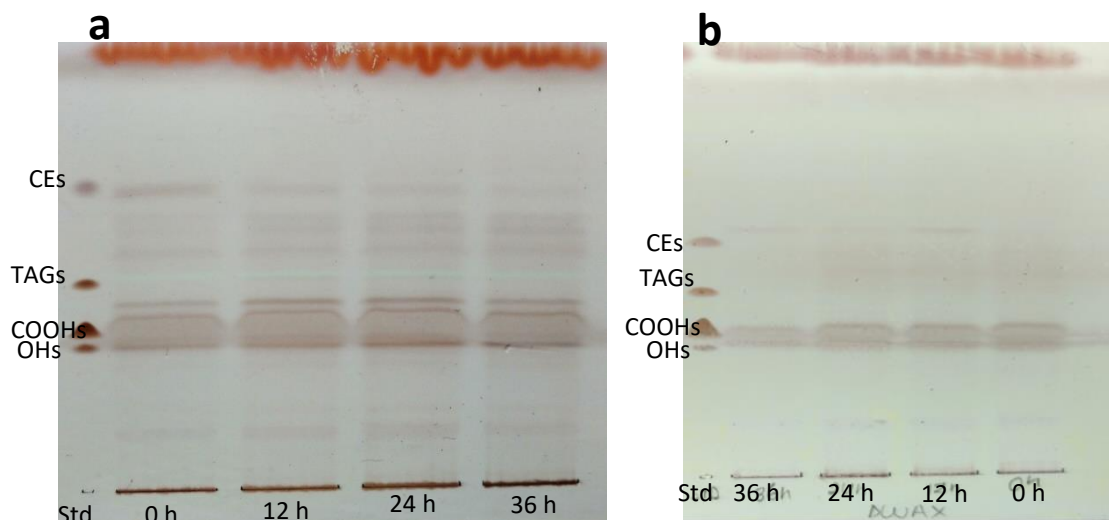
#### 8.4. Investigación adicional

##### 8.4.1. Efecto de la eliminación del gen *AtfA* en la producción de alcoholes grasos de ADP1

Como se mencionó en el apartado de antecedentes, el paso final para la síntesis de CEs y TAGs es catalizado la aciltransferasa *AtfA*, que media la formación de un enlace éster entre el 1,2-diacilglicerol o el alcohol graso y un acilo-CoA (Wältermann et al. 2005). En la literatura se ha reportado que la cepa  $\Delta AtfA$  pierde la capacidad para producir CEs y produce una cantidad baja de TAGs (Kalscheuer and Steinbüchel, 2003), sin embargo, el efecto de esta inactivación en la concentración de los alcoholes, precursores de las CEs, no ha sido descrito. Debido a la carencia de información acerca de la regulación de la vía de síntesis de CEs en ADP1, en este proyecto se propuso la eliminación de *AtfA*, que codifica para la enzima que consume el producto de interés (alcoholes grasos), como primera estrategia de ingeniería de vías metabólicas para generar una cepa acumuladora alcoholes grasos.

La producción de lípidos en la cepa  $\Delta AtfA$  fue evaluada en un cultivo con una relación C/N igual a 12 con glucosa como FC. El contenido de lípidos fue analizado por TLC y GC-FID durante la etapa II.

Las placas de TLC muestran que la cepa  $\Delta AtfA$  no acumula lípidos intracelularmente ni en el medio de cultivo (Figura 17). Al igual que en la cepa progenitora, los alcoholes y ácidos grasos libres no mostraron cambios importantes en el tiempo y se observó consumo de los lípidos de reserva de biomasa a partir de las 12 h de la etapa II. Las observaciones realizadas por TLC fueron corroboradas por GC-FID y nos permitieron concluir que en la cepa  $\Delta AtfA$  no hay acumulación de alcoholes grasos ni ningún otro compuesto lipídico.

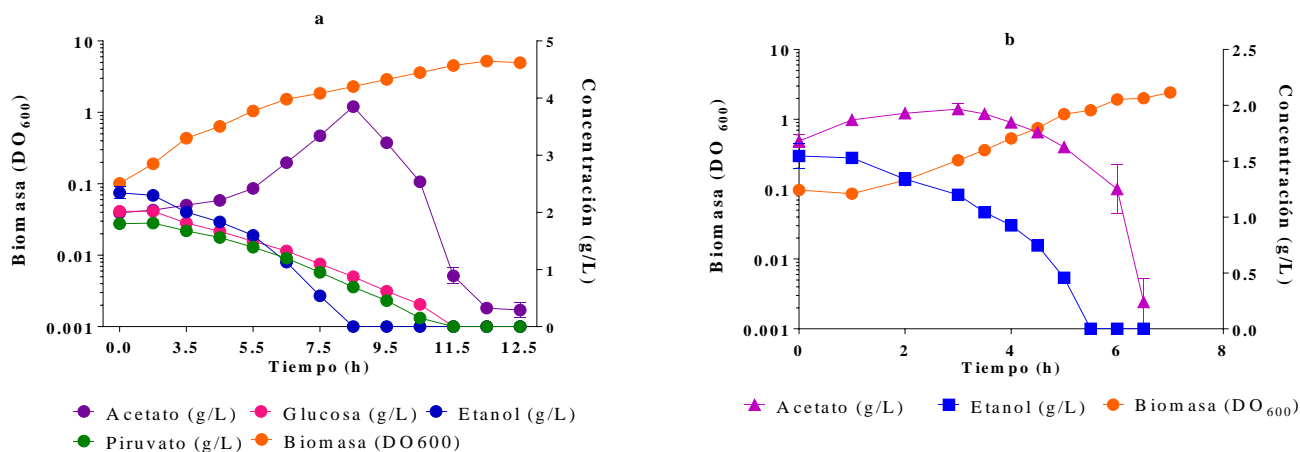


**Figura 17** Perfil lipídico de **a.** biomasa y **b.** medio de cultivo de la cepa *ΔAtfA* a las 0, 12, 24 y 36 h de la etapa II obtenidos por TLC. CEs: ceras éster. TAGs: triacilgliceroles. COOHs: ácidos grasos libres. OHs: alcoholes grasos libres. Std: estándares

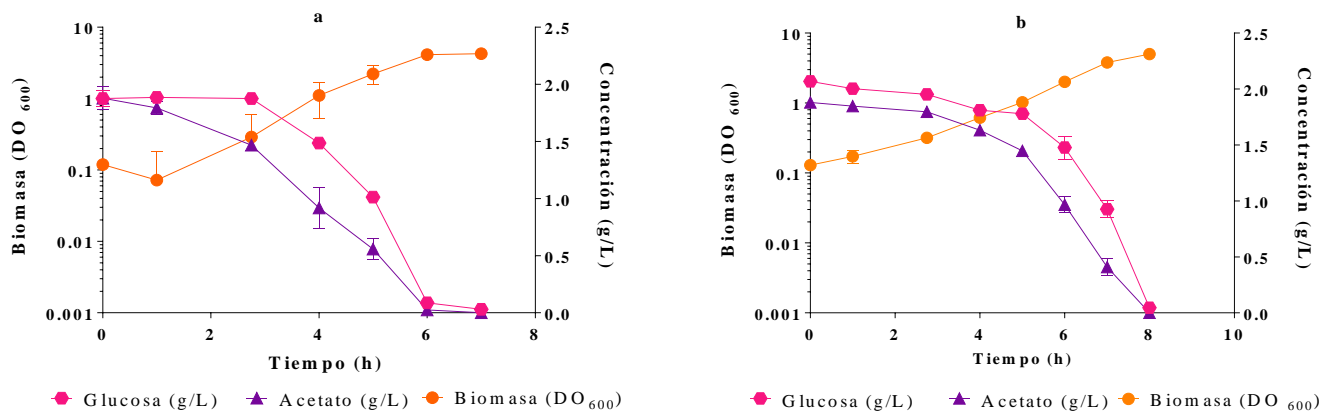
#### 8.4.2. Utilización simultánea de etanol, glucosa, acetato y piruvato en ADP1

En una serie de cultivos realizados en medio mineral, adicionado con mezclas las acetato-etanol-piruvato-glucosa, acetato-etanol y acetato-glucosa, se logró determinar que ADP1 es capaz de utilizar simultáneamente todas las fuentes de carbono evaluadas: acetato, etanol, piruvato y glucosa. En el cultivo con la mezcla acetato-etanol-piruvato-glucosa se observó la utilización simultánea de etanol, glucosa y piruvato (Figura 18a). El acetato se acumuló y fue consumido hasta que se agotó el etanol, por lo que se evaluó la posible represión catabólica del acetato por etanol. Sin embargo, en mezclas simples, acetato-etanol, el acetato se acumuló sólo al comienzo de los cultivos y luego se consumió simultáneamente con etanol (Figura 18b). Como evidencia adicional de la co-utilización de las FCs, se realizaron cultivos con una mezcla acetato-glucosa utilizando como inóculo células provenientes de cultivos con acetato o con glucosa. El uso de un inóculo crecido en acetato retrasó el consumo de la glucosa en la mezcla acetato-glucosa (Figura 19a) comparado con el cultivo realizado con un inóculo crecido en glucosa (Figura 19b), pero al final ambos

compuestos se utilizaron conjuntamente. Este conjunto de cultivos permitió concluir que ADP1 puede catabolizar simultáneamente todas las FCs evaluada



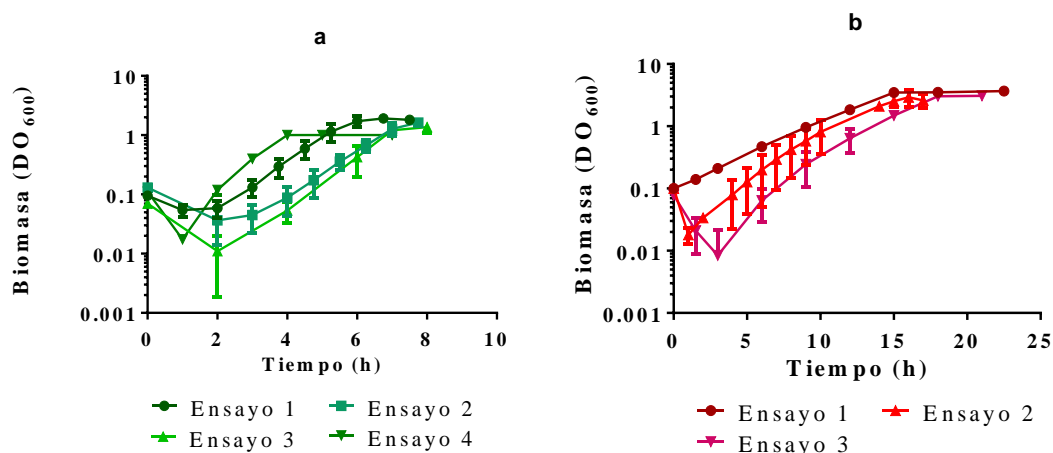
**Figura 18 a.** Cultivo de ADP1 en medio AM1-MOPS suplementado con una mezcla acetato-etanol-piruvato-glucosa a  $2 \text{ g L}^{-1}$  cada uno, crecimiento y consumo de las FCs **b.** Utilización simultánea de acetato y etanol en cultivo con una mezcla acetato-etanol.



**Figura 19** Cultivo de ADP1 en AM1-MOPS suplementado con una mezcla acetato-glucosa a  $2 \text{ g L}^{-1}$  cada uno, utilizando como inóculo: **a.** Un cultivo en AM1-MOPS con acetato o **b.** Un cultivo en AM1-MOPS con glucosa.

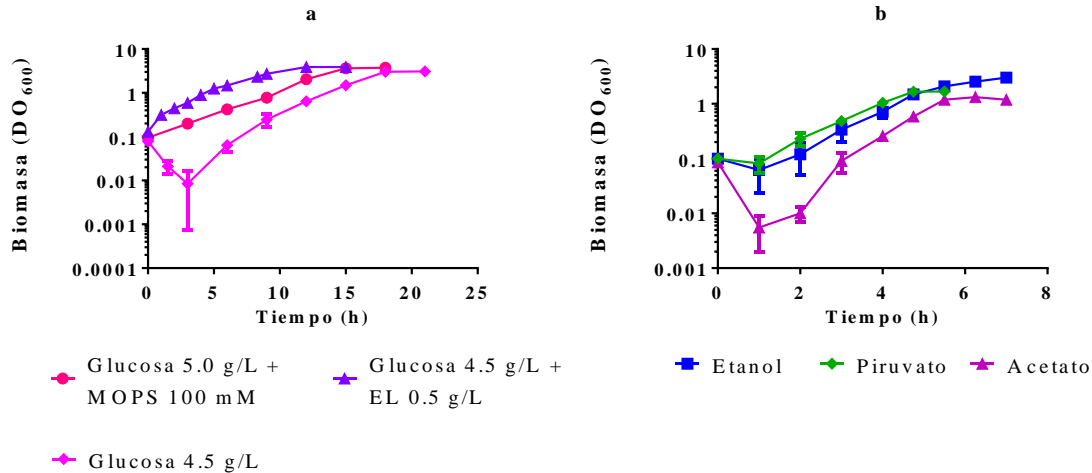
#### 8.4.3. Lisis de ADP1 al inicio de su cultivo en medio mineral

En cultivos llevados a cabo en matraces Eb con medio mineral AM1, adicionado con acetato o glucosa, se observó lisis celular al inicio del cultivo (Figura 20).



**Figura 20** Cultivos de ADP1 en medio mineral AM1 adicionado con **a.** acetato a  $4 \text{ g L}^{-1}$  o **b.** glucosa  $4 \text{ g L}^{-1}$ , donde se observa la lisis al inicio de los cultivos

Este fenómeno generó curvas de crecimiento poco reproducibles que complicaron el cálculo de  $\mu$ . En cultivos con glucosa, la adición de MOPS 100 mM o de extracto de levadura por lo menos a  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  evitó la lisis (Figura 21a). Estos compuestos ejercen un efecto osmoprotector, lo cual será abordado en la discusión de resultados. Debido a que la adición de extracto de levadura modifica los parámetros de crecimiento, se optó por adicionar MOPS a los cultivos realizados para la caracterización del crecimiento de ADP1. Cabe mencionar que, en cultivos con acetato, piruvato y etanol, la adición de MOPS no previno la lisis celular (Figura 21b).



**Figura 21 a.** Cultivos de ADP1 en medio AM1-MOPS adicionado con: glucosa 4.5 g L<sup>-1</sup>; glucosa 5.0 g L<sup>-1</sup> y MOPS 100 mM; o, glucosa 4.5 g L<sup>-1</sup> y extracto de levadura 0.5 g L<sup>-1</sup>. Se observa que la adición de MOPS y extracto de levadura previenen la lisis inicial en cultivos con glucosa. **b.** cultivos en AM1-MOPS adicionado con etanol, acetato o piruvato, a 3 g L<sup>-1</sup> cada uno, donde aún se observa la lisis al inicio de los cultivos

#### 8.4.4. Resistencia de ADP1 a antibióticos

El conocimiento de la resistencia de ADP1 a diversos antibióticos es necesario para su cultivo y modificación genética. Por esta razón se evaluó el crecimiento de ADP1, medido como DO<sub>600</sub> o unidades formadoras colonias (UFCs), en medio LB líquido y sólido adicionado con carbenicilina (Cb), espectinomicina (Sp) o cloranfenicol (Cm) a 12.5, 25 o 50 µg/ml.

En medio LB sólido, ADP1 no presentó resistencia a los antibióticos evaluados, pues no se observaron UFCs después de 87 h de cultivo. En medio LB líquido, después de 13 h de cultivo, ADP1 no presentó resistencia a Sp ni Cm, y mostró baja resistencia a Cb; generó 29, 6 y 6 % de biomasa, con referencia al medio sin antibiótico, con 12.5, 25 y 50 µg/ml de Cb, respectivamente (Tabla 12).

**Tabla 12.** Resistencia a antibióticos de ADP1 en medio LB líquido.

<b>Antibiótico</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Crecimiento (%)</b>
Ausente	-	100
Cb	12.5	29
Cb	25	6
Cb	50	6
Sp	12.5	0
Sp	25	0
Sp	50	0
Cm	12.5	0
Cm	25	0
Cm	50	0

## 9. Discusión de resultados

ADP1 es un organismo halotolerante, es decir, es capaz de crecer en presencia de altas concentraciones de sal (hasta  $53 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl y  $149 \text{ g L}^{-1}$  de KCl), sin embargo, crece mejor en su ausencia (Sand et al. 2011). Como otros organismos, ADP1 contiene con el estrés osmótico a través de la acumulación de solutos biocompatibles; se han identificado la síntesis de manitol y la internalización glicinbetaína y colina, esta última se utiliza para sintetizar glicinbetaína (Sand et al. 2013; Sand et al. 2014; Scholz et al. 2016). Las FCs, como cualquier otro soluto, imponen estrés osmótico a las células y, según su naturaleza química, podrían ejercer otros efectos adversos. En este trabajo, en congruencia con la osmotolerancia de ADP1, se encontró que puede crecer en medio mineral adicionado con concentraciones por debajo de  $350 \text{ g L}^{-1}$  de glucosa,  $80 \text{ g L}^{-1}$  de piruvato,  $50 \text{ g L}^{-1}$  de etanol y  $15 \text{ g L}^{-1}$  de acetato. La menor tolerancia de ADP1 a piruvato, acetato y etanol, puede estar relacionada con mecanismos tóxicos descritos para estos compuestos. Se ha propuesto que los ácidos débiles (p. ej. acetato y piruvato) pueden difundir a través de la membrana

plasmática en forma neutra. Una vez en el citoplasma, liberan un protón disminuyendo tanto el pH intracelular como el gradiente de protones transmembrana, lo que causa la interrupción de la actividad celular (Lasko et al. 2000). Por otro lado, el etanol está involucrado en la alteración de los enlaces de hidrógeno dentro de los lípidos de la membrana, lo que hace que las bicapas sean más fluidas y permeables. El cambio en las propiedades estructurales de las membranas también induce la disminución de la actividad de las proteínas embebidas en la membrana (Patra et al. 2006).

Por otro lado, en cultivos en microplacas se observaron concentraciones óptimas de sustrato para el crecimiento de 0.5 a 50 g L<sup>-1</sup> de glucosa, de 3 a 10 g L<sup>-1</sup> de piruvato y de 0.3 a 2 g L<sup>-1</sup> de acetato donde los valores  $\mu_{\text{máx}}$  observados fueron  $0.21 \pm 0.01$ ,  $0.64 \pm 0.01$  h<sup>-1</sup> y  $0.69 \pm 0.02$  h<sup>-1</sup>, respectivamente. La comparación de la  $\mu_{\text{máx}}$  con los cuatro sustratos fue evaluada en matraces debido a la alta evaporación de etanol en microplacas. Al igual que en microplacas, los valores más altos de  $\mu$  se encontraron con las FCs gluconeogénicas:  $0.93 \pm 0.06$  h<sup>-1</sup>,  $0.94 \pm 0.18$  h<sup>-1</sup> y  $0.61 \pm 0.01$  h<sup>-1</sup> con acetato a 2 g L<sup>-1</sup>, etanol 5 g L<sup>-1</sup> y piruvato 5 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. En cultivos con etanol y acetato se encontraron valores  $\mu$  estadísticamente iguales, esto, sumado a la acumulación de acetato en cultivos con etanol, sugiere que la conversión de etanol a acetato es eficiente y que el crecimiento en etanol está limitado por el metabolismo del acetato. En ADP1, las FCs gluconeogénicas se asimilan a través de la vía del glioxilato (Herman and Bell 1970). Sin embargo, los pasos enzimáticos para la síntesis de acetyl-CoA a partir de acetato (etanol) o piruvato son diferentes: el piruvato es descarboxilado a acetyl-CoA por el complejo de la piruvato deshidrogenasa; y el acetato puede ser fosforilado por la acetocinasa (Ack) y transferido a la coenzima A (Co-A) por la fosfato acetiltransferasa (Pta) o puede ser directamente activado por la acetyl-CoA sintetasa (Acs) (Barbe et al. 2004). Adicionalmente, el piruvato es asimilado a PEP por la PEP sintetasa (Herman and Bell 1970). Sugerimos que estas diferencias en el metabolismo del piruvato y el acetato están relacionadas con la  $\mu$  menor observada en el piruvato. Finalmente, se encontró una  $\mu$  considerablemente menor ( $0.25 \pm 0.01$  h<sup>-1</sup>) en glucosa a 5 g L<sup>-1</sup>, lo que confirma que en ADP1, como en otras especies de *Acinetobacter*, predomina el metabolismo gluconeogénico (Sigala et al. 2017).

En la caracterización cinética de la producción de lípidos en cepa ADP1 se observó el consumo de lípidos de reserva a partir de las 24 h de la etapa de acumulación de lípidos,



este evento coincide temporalmente con la disminución de la velocidad de consumo de sustrato, ambos eventos podrían estar relacionados con la pérdida de actividad de las enzimas encargadas del metabolismo de las FCs externas, lo que podría inducir el consumo de los lípidos de reserva, o pérdida de viabilidad de la células debidas a la ausencia de nitrógeno.

Como se mencionó en el apartado de antecedentes, las FCs evaluadas tienen diferentes grados de reducción, 6, 4, 4 y 3.3 para etanol, glucosa, acetato y piruvato, respectivamente (cálculos mostrados en el apéndice A). El grado de reducción indica el número de electrones disponibles para ser transferidos al oxígeno en una reacción de combustión, que es lo que ocurre de una manera muy simplificada en un metabolismo aerobio estricto como el de ADP1. El grado de reducción es un indicador del potencial de una FC para la generación de equivalentes de reducción (ATP, NADH y NADPH) necesarios para las vías biosintéticas. Si la FC fuera dirigida exclusivamente a la síntesis de lípidos de reserva se esperarían rendimientos de 630, 350, 310 y 300 mg de TAGs (tripalmitato de glicerol) por g de etanol, glucosa, acetato y piruvato, respectivamente; y 580, 320, 290 y 270 g de CEs (cetilpalmitato) por g de etanol, glucosa, acetato y piruvato, respectivamente (detalles de los cálculos mostrados en el apéndice B). Los rendimientos observados en este trabajo (1.3-3.9 mg/g FC) representan entre 0.4 y 1.4 % de los rendimientos de vías metabólicas calculados. Los rendimientos de vías son parámetros que permiten pronosticar la producción de un compuesto a partir de una FC. Sin embargo, el metabolismo global es muy complejo, la FC y energía se dirige también al mantenimiento celular, la generación de biomasa, etc., por lo que los resultados observados pueden ser distintos a los calculados, fue el caso en la producción de lípidos de reserva en ADP1 (Vázquez 2002). Los porcentajes de peso seco acumulado en forma de lípidos de reserva se encuentran cercanos a los valores reportados para ADP1 (1.7 % CDW de CEs con glucosa como FC (Santala et al. 2014); y 6.9 y 1.4 % CDW de CEs y TAGs, respectivamente, con gluconato como FC (Kalscheuer and Steinbüchel 2003)). Es importante mencionar que la acumulación observada en este trabajo en cultivos con piruvato es la más alta reportado para una cepa ADP1 silvestre, 10.0 y 1.2 % CDW de CEs y TAGs.

Los parámetros de producción de lípidos de reserva no mostraron ninguna relación con el estado de reducción de la FC y los rendimientos de las vías metabólicas presentados arriba. Es interesante destacar que, en cultivos con etanol que es la FC más reducida y donde

se esperaban los rendimientos más altos, no se observó acumulación de lípidos de reserva. En estos cultivos se produjo acetato ( $0.78 \text{ mol}_{\text{acetato}}/\text{mol}_{\text{etanol}}$ ) que no fue utilizado para la síntesis de lípidos de reserva a diferencia de los cultivos donde se utilizó acetato como sustrato donde se observó la acumulación de lípidos de reserva. Todos los parámetros de producción de lípidos de reserva mostraron valores superiores (de 1.8 a 3.3 veces) en cultivos con piruvato, que es el sustrato más oxidado, respecto a los cultivos con glucosa y acetato.

Por otro lado, se ha sugerido que la producción mayoritaria de CEs con relación a los TAGs en ADP1 se debe a la especificidad de AtfA (Kalscheuer and Steinbüchel 2003). Sin embargo, en este trabajo, encontramos que la relación de CEs: TAGs es modulada también por la FC utilizada durante la etapa de acumulación de lípidos. Cuando se usó acetato como FC, se sintetizaron, principalmente, CEs; en cultivos con piruvato se produjeron cinco moléculas de CEs por una molécula TAG; y con glucosa, la proporción de TAGs a CEs fue de 1:1.6.

La producción de biomasa también mostró ser independiente del estado de reducción de la FC, si bien, los valores de rendimiento de biomasa ( $Y_{x/s}$ ) y productividad fueron mayores con etanol, el segundo sustrato más eficiente para la producción de biomasa es el piruvato, el sustrato más oxidado. El  $Y_{x/s}$  observado con etanol ( $14.14 \pm 1.59 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{C-mol}$ ) es un valor 1.1 y 1.3 veces mayor los obtenidos en cultivos con piruvato y acetato o glucosa, respectivamente; la productividad de biomasa ( $0.33 \pm 0.04 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) es 1.8, 2.4 y 4.7 veces mayor que con piruvato, acetato y glucosa, respectivamente. Por lo tanto, la producción de biomasa, considerando los valores de rendimiento y productividad es mucho más eficiente en cultivos con etanol.

Por otro lado, en ADP1 se han reportado la represión del consumo de compuestos aromáticos por acetato y succinato relacionada con la presencia de la proteína Crc (control de la represión del catabólica) (Zimmermann et al. 2009) y la represión de consumo de glucosa por acetato (Kannisto 2018, tesis doctoral). En *Pseudomonas aeruginosa* y *P. putida* (Barbe et al. 2004), organismos cercanos filogenéticamente a ADP1 en los que se ha caracterizado la represión catabólica del carbono, se ha observado el uso jerárquico de FCs, las cuales son consumidas en el siguiente orden: algunos aminoácidos, Pro, Ala, Glu, Gln, His, Arg, Lys, Asp y Asn; acetato y succinato; glucosa; compuestos aromáticos, manitol y otros (Rojo 2010). En esta tesis, con una serie de cultivos realizados con mezclas de FCs,

logramos determinar que ADP1 es capaz de utilizar simultáneamente glucosa, acetato, etanol y piruvato. Si bien, puede observarse retraso en el consumo de glucosa en mezclas acetato-glucosa, la co-utilización de ambos compuestos después de 3 h de adaptación sugiere que la maquinaria enzimática para el consumo de glucosa no se expresa de forma constitutiva. Por lo tanto, en ADP1 no existe represión catabólica de glucosa por acetato ni uso preferencial de ninguna de las FCs evaluadas, aunque no se descarta que en este organismo pueda haber uso preferencial de otras FCs, como aminoácidos.

## 10. Conclusiones

- 10.1. La FC modifica los parámetros de crecimiento y la producción de lípidos de reserva en ADP1, aunque no se observa una relación directa con su estado de reducción.
- 10.2. La FC modula la proporción de CEs y TAGs.
- 10.3. El etanol es el sustrato más eficiente para la síntesis de biomasa y el piruvato el más eficiente para la síntesis de lípidos; con piruvato se observó el porcentaje de acumulación de lípidos más alto reportado para la cepa ADP1 silvestre, 11.2 % CDW.
- 10.4. ADP1 muestra mayor adaptación a FCs gluconeogénicas; en cultivos con FCs gluconeogénicas, los valores de  $\mu$  son de 2.4 a 3.8 veces mayores que en cultivos con glucosa y el consumo de glucosa no es constitutivo.
- 10.5. ADP1 presenta un límite de acumulación de lípidos de reserva relacionado con la disminución de la velocidad de consumo de la FC que puede deberse a pérdida de la viabilidad celular o de la actividad de las enzimas que participan en el catabolismo de la FC debidas a la limitación de nitrógeno.
- 10.6. ADP1, a pesar de poseer varios reguladores globales del metabolismo de carbono descritos en *Pseudomonas*, no presenta represión catabólica de glucosa por acetato y es capaz de co-utilizar etanol, acetato, glucosa y piruvato.
- 10.7. La ausencia de acumulación de lípidos en la cepa  $\Delta AtfA$  sugiere una regulación negativa en la vía de síntesis de CEs

## 11. Perspectivas

- 11.1. Determinar la importancia del pH y la disponibilidad de O<sub>2</sub> y N durante la etapa II en acumulación de lípidos de reserva de *A. bayli* ADP1.
- 11.2. Producir lípidos de reserva en un proceso de cultivo secuencial de las cepas de *E. coli* sobre productoras de ácido pirúvico (López-Portillo Mason, 2019) y *A. bayli* ADP1, que presenta una buena eficiencia de producción de lípidos a partir de piruvato.

## 12. Contribuciones

11.1. Estandarización de los métodos de cultivo, modificación genética y extracción y cuantificación de lípidos de *Acinetobacter baylyi* ADP1 con las herramientas disponibles en el laboratorio 04 del Instituto de Biotecnología UNAM.

11.2. Una publicación en una revista de divulgación científica arbitrada y de circulación internacional, anexa al final del documento (Salcedo-Vite et al. 2019).

### 13. Bibliografía

- Abdel-El-Haleem D (2004) *Acinetobacter*: environmental and biotechnological applications. African J. Biotechnol. 2:71–74
- Alvarez HM (2016) Triacylglycerol and wax ester-accumulating machinery in prokaryotes. Biochimie 120:28–39
- Alvarez HM, Mayer F, Fabritius D, Steinbüchel A (1996) Formation of intracytoplasmic lipid inclusions by *Rhodococcus opacus* strain PD630. Arch Microbiol 165:377–386 . <https://doi.org/10.1007/s002030050341>
- Barbe V, Vallenet D, Fonknechten N, Kreimeyer A, Oztas S, Labarre L, Cruveiller S, Robert C, Duprat S, Wincker P, Ornston LN, Weissenbach J, Marlière P, Cohen GN, Médigue C (2004) Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium. Nucleic Acids Res 32:5766–5779 . <https://doi.org/10.1093/nar/gkh910>
- Barney BM, Wahlen BD, Garner E, Wei J, Seefeldt LC (2012) Differences in substrate specificities of five bacterial wax ester synthases. Appl Environ Microbiol 78:5734–5745 . <https://doi.org/10.1128/AEM.00534-12>
- Beardmore-Gray M, Anthony C (1986) The Oxidation of Glucose by *Acinetobacter calcoaceticus*: Interaction of the Quinoprotein Glucose Dehydrogenase with the Electron Transport Chain. Microbiology 132:1257–1268
- Bleichrodt FS, Fischer R, Gerischer UC (2010) The  $\beta$ -keto adipate pathway of *Acinetobacter baylyi* undergoes carbon catabolite repression, cross-regulation and vertical regulation, and is affected by Crc. Microbiology 156:1313–1322 . <https://doi.org/10.1099/mic.0.037424-0>
- Bryn K, Jantzen E, Bovre K (1977) Occurrence and Patterns of Waxes in Neisseriaceae. J Gen Microbiol 102:33–43 . <https://doi.org/10.1099/00221287-102-1-33>
- Cerqueira GM, Peleg AY (2011) Insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. IUBMB Life 63:1055–1060 . <https://doi.org/10.1002/iub.533>
- Chen T-L, Siu L-K, Lee Y-T, Chen C-P, Huang L-Y, Wu RC-C, Cho W-L, Fung C-P (2008) *Acinetobacter baylyi* as a Pathogen for Opportunistic Infection. J Clin Microbiol 46:2938 LP – 2944 . <https://doi.org/10.1128/JCM.00232-08>
- Dal S, Steiner I, Gerischer U (2002) Multiple operons connected with catabolism of aromatic compounds in *Acinetobacter* sp. strain ADP1 are under carbon catabolite repression. J Mol Microbiol Biotechnol 4:389–404
- De Berardinis V, Vallenet D, Castelli V, Besnard M, Pinet A, Cruaud C, Samair S, Lechaplais C, Gyapay G, Richez C, Durot M, Kreimeyer A, Le Fèvre F, Schächter V, Pezo V, Döring V, Scarpelli C, Médigue C, Cohen GN, Marlière P, Salanoubat M, Weissenbach J (2008) A complete collection of single-gene deletion mutants of *Acinetobacter baylyi*

- ADP1. Mol Syst Biol 4: . <https://doi.org/10.1038/msb.2008.10>
- de Vries J, Wackernagel W (2002) Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. Proc Natl Acad Sci U S A 99:2094–2099 . <https://doi.org/10.1073/pnas.042263399>
- Dharmadi Y, Murarka A, Gonzalez R (2006) Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: A new platform for metabolic engineering. Biotechnol Bioeng 94:821–829 . <https://doi.org/10.1002/bit.21025>
- Dolin MI, Juni E (1978) Utilization of oxalacetate by *Acinetobacter calcoaceticus*: evidence for coupling between malic enzyme and malic dehydrogenase. J Bacteriol 133:786–793
- Dugar D, Stephanopoulos G (2011) Relative potential of biosynthetic pathways for biofuels and bio-based products. Nat Biotechnol 29:1074
- Elliot J (1978) Genetics and physiology of *Acinetobacter*. Annu Rev Microbiol 32:349–71 . <https://doi.org/10.1088/1367-2630/14/12/123016>
- Fischer R, Bleichrodt FS, Gerischer UC (2008) Aromatic degradative pathways in *Acinetobacter baylyi* underlie carbon catabolite repression. Microbiology 154:3095–3103 . <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/016907-0>
- Fixter LM, Nagi MN, McCormack JG, Fewson CA (1986) Structure, Distribution and Function of Wax Esters in *Acinetobacter calcoaceticus*. J Gen Microbiol 132:3147–3157 . <https://doi.org/10.1099/00221287-132-11-3147>
- Gohl O, Friedrich A, Hoppert M, Averhoff B (2006) The Thin Pili of *Acinetobacter* sp. Strain BD413 Mediate Adhesion to Biotic and Abiotic Surfaces. Appl Environ Microbiol 72:1394 LP – 1401 . <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1394-1401.2006>
- Görke B, Stülke J (2008) Carbon catabolite repression in bacteria: Many ways to make the most out of nutrients. Nat Rev Microbiol 6:613–624 . <https://doi.org/10.1038/nrmicro1932>
- Herman NJ, Bell EJ (1970) Metabolic control in *Acinetobacter* sp. I. Effect of C4 versus C2 and C3 substrates on isocitrate lyase synthesis. Can J Microbiol 16:769–774 . <https://doi.org/10.1139/m70-130>
- Hernández MA, Mohn WW, Martínez E, Rost E, Alvarez AF, Alvarez HM (2008) Biosynthesis of storage compounds by *Rhodococcus jostii* RHA1 and global identification of genes involved in their metabolism. BMC Genomics 9:1–13 . <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-600>
- Juni E (1978) Genetics and Physiology of *Acinetobacter*. Annu Rev Microbiol 32:349–371 . <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.32.100178.002025>
- Juni E (1972) Interspecies transformation of *Acinetobacter*: genetic evidence for a ubiquitous genus. J Bacteriol 112:917–931
- Juni E, Janik A (1969) Transformation of *Acinetobacter calco-aceticus* (*Bacterium anitratum*). J Bacteriol 98:281
- Kalscheuer R, Steinbüchel A (2003) A novel bifunctional wax ester synthase/acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase mediates wax ester and triacylglycerol biosynthesis in *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1. J Biol Chem 278:8075–8082 . <https://doi.org/10.1074/jbc.M210533200>
- Kalscheuer R, Stöveken T, Malkus U, Reichelt R, Golyshin PN, Sabirova JS, Ferrer M, Timmis KN, Steinbüchel A (2007) Analysis of storage lipid accumulation in *Alcanivorax borkumensis*: Evidence for alternative triacylglycerol biosynthesis routes in bacteria. J Bacteriol 189:918–928 . <https://doi.org/10.1128/JB.01292-06>
- Kannisto M, Aho T, Karp M, Santala V (2014) Metabolic engineering of *Acinetobacter baylyi* ADP1 for improved growth on gluconate and glucose. Appl Environ Microbiol

- 80:7021–7027 . <https://doi.org/10.1128/AEM.01837-14>
- Kannisto M, Efimova E, Karp M, Santala V (2017) Growth and wax ester production of an *Acinetobacter baylyi* ADP1 mutant deficient in exopolysaccharide capsule synthesis. *J Ind Microbiol Biotechnol* 44:99–105 . <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1872-1>
- Kannisto MS, Mangayil RK, Shrivastava-Bhattacharya A, Pletschke BI, Karp MT, Santala VP (2015) Metabolic engineering of *Acinetobacter baylyi* ADP1 for removal of *Clostridium butyricum* growth inhibitors produced from lignocellulosic hydrolysates. *Biotechnol Biofuels* 8:1–10 . <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0389-6>
- Kannisto, M (2018). Metabolic Engineering of *Acinetobacter baylyi* ADP1 for Improved Growth and Wax Ester Production Using Components of Lignocellulosic Hydrolysates as Carbon Sources. Tesis de Doctorado en Ciencias y Tecnología. Tampere University of Technology, Finlandia. Publication 1532
- Kaplan N, Rosenberg E (1982a) Exopolysaccharide Distribution of and Bioemulsifier Production by *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 and BD413. *Appl Env Microbiol* 44:1335–1341
- Kaplan N, Rosenberg E (1982b) Exopolysaccharide Distribution of and Bioemulsifier Production by *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 and BD413. *Appl Environ Microbiol* 44:1335–1341
- Kaplan N, Rosenberg E, Jann B, Jann K (1985) Structural studies of the capsular polysaccharide of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4. *Eur J Biochem* 152:453–458 . <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb09218.x>
- Kaplan N, Zosim Z, Rosenberg E (1987) Reconstitution of emulsifying activity of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 emulsan by using pure polysaccharide and protein. *Appl Environ Microbiol* 53:440–446
- Kaplan N, Rosenberg E, Jann B, Jann K (1985) Structural studies of the capsular polysaccharide of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4. *Eur J Biochem* 152:453–458 . <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb09218.x>
- Lasko DR, Zamboni N, Sauer U (2000) Bacterial response to acetate challenge: A comparison of tolerance among species. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:243–247 . <https://doi.org/10.1007/s002530000339>
- Lehtinen T, Efimova E, Santala S, Santala V (2018) Improved fatty aldehyde and wax ester production by overexpression of fatty acyl-CoA reductases. *Microb Cell Fact* 17:19 . <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0869-z>
- Li W, Lu C-D (2007) Regulation of carbon and nitrogen utilization by CbrAB and NtrBC two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189:5413–5420 . <https://doi.org/10.1128/JB.00432-07>
- López Portillo Masson Mauricio (2019). Ingeniería de bioprocesos para la producción de ácido pirúvico a partir de glucosa, xilosa y un hidrolizado de rastrojo de maíz con *Escherichia coli*. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Cuernavaca, Morelos, 30 de julio de 2019
- Manilla-Pérez E, Lange AB, Hetzler S, Steinbüchel A (2010) Occurrence, production, and export of lipophilic compounds by hydrocarbonoclastic marine bacteria and their potential use to produce bulk chemicals from hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:1693–1706 . <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2515-5>
- Metzgar D, Bacher JM, Pezo V, Reader J, Döring V, Schimmel P, Marlière P, de Crécy-Lagard V (2004) *Acinetobacter* sp. ADP1: An ideal model organism for genetic analysis and genome engineering. *Nucleic Acids Res* 32:5780–5790 . <https://doi.org/10.1093/nar/gkh881>

- Moreno R, Marzi S, Romby P, Rojo F (2009) The Crc global regulator binds to an unpaired A-rich motif at the *Pseudomonas putida* alkS mRNA coding sequence and inhibits translation initiation. *Nucleic Acids Res* 37:7678–7690 . <https://doi.org/10.1093/nar/gkp825>
- Mudge SM, Belanger SE, Nielsen AM (2008) Fatty Alcohols: Anthropogenic and Natural Occurrence in the Environment. Royal Society of Chemistry
- Murin CD, Segal K, Bryksin A, Matsumura I (2012) Expression vectors for *Acinetobacter baylyi* ADP1. *Appl Environ Microbiol* 78:280–283 . <https://doi.org/10.1128/AEM.05597-11>
- Palmen R, Buijsman P, Hellingwerf KJ (1994) Physiological regulation of competence induction for natural transformation in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Arch Microbiol* 162:344–351 . <https://doi.org/10.1007/BF00263782>
- Palmen R, Vosman B, Buijsman P, Breek CKD, Hellingwerf KJ (1993) Physiological characterization of natural transformation in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Gen Microbiol* 139:295–305 . <https://doi.org/10.1099/00221287-139-2-295>
- Patra M, Salonen E, Terama E, Vattulainen I, Faller R, Lee BW, Holopainen J, Karttunen M (2006) Under the influence of alcohol: The effect of ethanol and methanol on lipid bilayers. *Biophys J* 90:1121–1135 . <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.062364>
- Reiser S, Somerville C (1997) Isolation of mutants of *Acinetobacter calcoaceticus* deficient in wax ester synthesis and complementation of one mutation with a gene encoding a fatty acyl coenzyme A reductase. *J Bacteriol* 179:2969–2975 . <https://doi.org/10.1128/jb.179.9.2969-2975.1997>
- Rojo F (2010) metabolic versatility and interactions with the environment. 34:658–684 . <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00218.x>
- Röttig A, Hauschild P, Madkour MH, Al-Ansari AM, Almakishah NH, Steinbüchel A (2016) Analysis and optimization of triacylglycerol synthesis in novel oleaginous *Rhodococcus* and *Streptomyces* strains isolated from desert soil. *J Biotechnol* 225:48–56 . <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.03.040>
- Russell NJ, Volkman JK (1980) The Effect of Growth Temperature on Wax Ester Composition in the Psychrophilic Bacterium *Micrococcus cryophilus* ATCC 15174. *Microbiology* 118:131–141 . <https://doi.org/10.1099/00221287-118-1-131>
- San KY, Bennett GN, Berríos-Rivera SJ, Vadali RV, Yang YT, Horton E, Rudolph FB, Sariyar B, Blackwood K. (2002) Metabolic engineering through cofactor manipulation and its effects on metabolic flux redistribution in *Escherichia coli*. *Metab Eng* 4(2):182-92. doi: 10.1006/mben.2001.0220.12009797.
- Sand M, Berardinis V De, Mingote A, Santos H, Göttig S, Müller V (2011) Salt adaptation in *Acinetobacter baylyi*: identification and characterization of a secondary glycine betaine transporter. 723–730 . <https://doi.org/10.1007/s00203-011-0713-x>
- Sand M, Mingote AI, Santos H, Müller V, Averhoff B (2013) Mannitol , a compatible solute synthesized by *Acinetobacter baylyi* in a two-step pathway including a salt-induced and salt-dependent mannitol-1-phosphate dehydrogenase. 15:2187–2197 . <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12090>
- Sand M, Stahl J, Waclawska I, Ziegler C, Averhoff B, Biosciences M, Goethe JW (2014) Identification of an osmo-dependent and an osmo-independent choline transporter in *Acinetobacter baylyi* : implications in osmoprotection and metabolic adaptation. 16:1490–1502 . <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12188>
- Santala S, Efimova E, Karp M, Santala V (2011a) Real-Time monitoring of intracellular wax ester metabolism. *Microb Cell Fact* 10:1–8 . <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-75>



- Santala S, Efimova E, Kivinen V, Larjo A, Aho T, Karp M, Santala V (2011b) Improved Triacylglycerol Production in *Acinetobacter baylyi* ADP1 by Metabolic Engineering. *Microb Cell Fact* 10:36–36 . <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-36>
- Santala S, Efimova E, Koskinen P, Karp MT, Santala V (2014) Rewiring the wax ester production pathway of *Acinetobacter baylyi* ADP1. *ACS Synth Biol* 3:145–151 . <https://doi.org/10.1021/sb4000788>
- Santala S, Efimova E, Santala V (2018) Dynamic decoupling of biomass and wax ester biosynthesis in *Acinetobacter baylyi* by an autonomously regulated switch. *Metab Eng Commun* 7:e00078 . <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mec.2018.e00078>
- Scholz A, Stahl J, Berardinis V De, Müller V, Averhoff B (2016) Osmotic stress response in *Acinetobacter baylyi*: identification of a glycine – betaine biosynthesis pathway and regulation of osmoadaptive choline uptake and glycine – betaine synthesis through a choline-responsive BetI repressor. 8:316–322 . <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12382>
- Sigala JC, Suárez BP, Lara AR, Borgne S Le, Bustos P, Santamaría RI, González V, Martínez A (2017) Genomic and physiological characterization of a laboratory-isolated *Acinetobacter schindleri* ACE strain that quickly and efficiently catabolizes acetate. *Microbiol (United Kingdom)* 163:1052–1064 . <https://doi.org/10.1099/mic.0.000488>
- Stöveken T, Kalscheuer R, Malkus U, Reichelt R, Steinbüchel A (2005) The wax ester synthase/acyl coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase from *Acinetobacter* sp. strain ADP1: Characterization of a novel type of acyltransferase. *J Bacteriol* 187:1369–1376 . <https://doi.org/10.1128/JB.187.4.1369-1376.2005>
- Taylor WH, Juni E (1961a) Pathways for biosynthesis of a bacterial capsular polysaccharide I.: Characterization of the Organism and Polysaccharide. *J Bacteriol* 81:688–693
- Taylor WH, Juni E (1961b) Pathways for biosynthesis of a bacterial capsular polysaccharide II.: Carbohydrate Metabolism and Terminal Oxidation Mechanisms of a Capsule-Producing Coccus. *J Bacteriol* 81:694–703
- Taylor WH, Juni E (1961) Pathways for biosynthesis of a bacterial capsular polysaccharide. III. Syntheses from radioactive substrates. *J Biol Chem*
- The National Energy Education Development Project. *Transportation Fuels Infobook* (2012).
- van Schie BJ, Rouwenhorst RJ, de Bont JAM, van Dijken JP, Kuenen JG (1987) An in vivo analysis of the energetics of aldose oxidation by *Acinetobacter calcoaceticus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 26:560–567 . <https://doi.org/10.1007/BF00253033>
- Vanechoutte M, Young DM, Ornston LN, De Baere T, Nemeč A, Van Der Reijden T, Carr E, Tjernberg I, Dijkshoorn L (2006) Naturally Transformable *Acinetobacter* sp. Strain ADP1 Belongs to the Newly Described Species *Acinetobacter baylyi*. *Appl Environ Microbiol* 72:932–936 . <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.932-936.2006>
- Vázquez D (2002) *Termodinámica Biológica*. 223
- Wältermann M, Hinz A, Robenek H, Troyer D, Reichelt R, Malkus U, Galla HJ, Kalscheuer R, Stöveken T, Von Landenberg P, Steinbüchel A (2005) Mechanism of lipid-body formation in prokaryotes: How bacteria fatten up. *Mol Microbiol* 55:750–763 . <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04441.x>
- Wältermann M, Steinbüchel A (2005) Neutral Lipid Bodies in Prokaryotes: Recent Insights into Structure, Formation, and Relationship to Eukaryotic Lipid Depots. *J Bacteriol* 187:3607 . <https://doi.org/10.1128/JB.187.11.3607-3619.2005>
- Zhao X, Zhang L, Liu D (2012) Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels, Bioprod Biorefining* 6:465–482 . <https://doi.org/10.1002/bbb.1331>

Zimmermann T, Sorg T, Siehler SY, Gerischer U (2009) Role of *Acinetobacter baylyi* crc in catabolite repression of enzymes for aromatic compound catabolism. J Bacteriol 191:2834–2842 . <https://doi.org/10.1128/JB.00817-08>

## 14. Apéndices

### Apéndice A. Cálculo del estado de reducción de acetato, glucosa, etanol y piruvato

El estado de reducción es un concepto definido por convención que hace referencia al número de electrones que un compuesto puede donar al oxígeno en una reacción de combustión. En la tabla I se indica el número de electrones transferibles en los elementos presentes en las FCs.

**Tabla I.** Electrones transferibles al oxígeno en el carbono (C), hidrógeno (H) y oxígeno (O).

Elemento	Electrones transferibles
C	4
H	1
O	-2

En la tabla II se muestra las fórmulas condensadas y empíricas de las FCs. El grado de reducción de las FCs fue calculado de la fórmula empírica de tal forma que este parámetro está normalizado por mol de C. Para el cálculo del estado de reducción se utilizó la ecuación I.

**Tabla II.** FCs y sus respectivas fórmulas condensadas y empíricas y estado de reducción normalizado a un mol de C

FC	Fórmula condensada	Fórmula empírica	Estado de reducción
Etanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	CH <sub>3</sub> O <sub>1/2</sub>	(4) (1) + (1) (3) + (-2) (1/2) = 6

Glucosa	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	CH <sub>2</sub> O	(4) (1) + (1) (2) + (-2) (1) =4
Acetato	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> O	(4) (1) + (1) (2) + (-2) (1) =4
Piruvato	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	CH <sub>4/3</sub> O	(4) (1) + (1) (4/3) + (-2) (1) = 3.3

$$(e^- 1) (N1) + (e^- 2) (N2) + \dots\dots\dots (e^- n) (N n)$$

**Ecuación I.** Cálculo del grado de reducción o número de electrones transferibles de un compuesto (por molécula de carbono) al oxígeno. e<sup>-</sup>: electrones transferibles por un átomo del elemento. N: número de átomos.

**Apéndice B. Cálculo de los rendimientos de vías metabólicas de CEs y TAGs en *Acinetobacter baylyi* ADP1**

Para el cálculo de los rendimientos de vías metabólicas a partir de las FCs

1. Se realizaron los balances estequiométricos de las reacciones necesarias para formar los precursores de lípidos de reserva (Acetil-CoA, NAD(P)H, ATP y L-Glicerol 3-fosfato) a partir de los diferentes sustratos, mostrados en tablas III y IV. Las vías metabólicas de síntesis de lípidos de reserva y metabolismo de las FCs se muestran en las figuras 2 y 4 de este documento; se consideraron las siguientes equivalencias: 1 NADH = 2.5 ATP, 1 FADH<sub>2</sub> = 1.5 ATP, 1 QH<sub>2</sub> = 1.5 ATP y 1 NADH = 1 NADPH (debido a la presencia de transhidrogenasas en ADP1). Para el cálculo de producción de ATP y NAD(P)H se consideró la oxidación de las FCs hasta CO<sub>2</sub>.

**Tabla III.** Balances estequiométricos de las reacciones necesarias para formar a los precursores de lípidos de reserva

<b>Precursor de lípidos de reserva</b>	<b>Balances estequiométricos</b>	<b>Ec.</b>
Acetil-CoA	1 acetil-CoA = 1 etanol – 2 NAD(P)H + 1 ATP	<b>1</b>
	1 Acetil-CoA = 0.5 Glucosa – 1.5 NAD(P)H – 1.25 ATP	<b>2</b>
	1 Acetil-CoA = 1 Acetato + 1 ATP	<b>3</b>
	1 Acetil-CoA = 1 Piruvato - 1 NAD(P)H	<b>4</b>
L-Glicerol 3-fosfato	1 L-Glicerol 3-fosfato = 0.5 Glucosa + 0.75 ATP + 1 NADH	<b>5</b>
	1 L-Glicerol 3-fosfato = 1 piruvato + 2 ATP + 1 NADH	<b>6</b>
	1 L-Glicerol 3-fosfato = 2 etanol + 0.5 ATP -4 NADH	<b>7</b>
	1 L-Glicerol 3-fosfato = 2 acetato + 0.5 ATP	<b>8</b>

Ec.: número de ecuación.

**Tabla IV.** Equivalentes de ATP y NAD(P)H formados por la oxidación de las FCs a CO<sub>2</sub>.

<b>FC</b>	<b>NAD(P)H</b>	<b>ATP</b>
Etanol	5.6	14
Glucosa	12	30
Acetato	3.6	9
Piruvato	5	12.5

Los rendimientos de vías metabólicas fueron calculados para una cera éster C32 (cetilpalmitato) cuyo último paso de síntesis requiere de los intermediarios de 16 carbonos

palmitoil- CoA y alcohol palmitílico; y para un triacilglicerol formado por L-Glicerol 3-fosfato y tres moléculas de palmitoil- CoA (Triglicerato de palmitilo). En la tabla V se muestran los balances estequiométricos para la obtención de palmitoil- CoA y alcohol palmitílico a partir de los precursores Acetil-CoA, NAD(P)H y ATP.

**Tabla V.** Balances estequiométricos de la formación de palmitoil- CoA y alcohol palmitílico a partir de los precursores Acetil-CoA, NAD(P)H y ATP.

<b>Intermediario</b>	<b>Balance estequiométrico</b>	<b>Ec.</b>
Palmitil-CoA	1 Palmitil-CoA = 8 Acetil-CoA + 14 NAD(P)H + 8 ATP	<b>10</b>
Alcohol palmitílico	1 Alcohol palmitílico = 8 Acetil-CoA + 16 NAD(P)H + 8 ATP	<b>11</b>

Ec.: número de ecuación.

2. El cálculo de los rendimientos de vías metabólicas se realizó utilizando las ecuaciones obtenidas de los balances estequiométricos (**1-11**) de tal forma que todos precursores fueron sustituidos por sus equivalentes en moléculas de FC. A manera de ejemplo, se muestra el cálculo del rendimiento de vías metabólicas del cetilpalmitato a partir de glucosa:

Cetilpalmitato= Palmitil-CoA + Alcohol palmitílico (**12**)

Sustituimos **10** y **11** en **12**

Cetilpalmitato=8 Acetil-CoA + 14 NAD(P)H + 8 ATP + 8 Acetil-CoA + 16 NAD(P)H + 8 ATP

Cetilpalmitato = 16 Acetil-CoA + 30 NAD(P)H + 16 ATP **(13)**

Multiplicamos la ecuación 2 por 16

1 Acetil-CoA = 0.5 Glucosa – 1.5 NAD(P)H – 1.25 ATP

16 Acetil-CoA = 8 Glucosa – 24 NAD(P)H – 20 ATP **(14)**

Sustituimos **14** en **13**

1 Cetilpalmitato = 16 Acetil-CoA + 30 NAD(P)H + 16 ATP **(13)**

1 Cetilpalmitato = 8 Glucosa – 24 NAD(P)H – 20 ATP + 30 NAD(P)H + 16 ATP

1 Cetilpalmitato = 8 Glucosa + 6 NAD(P)H – 4 ATP **(15)**

Sustituimos ATP y NAD(P)H en **15** por sus equivalentes en glucosa mostrados en la tabla

IV

1 Cetilpalmitato = 8 Glucosa + 6 NAD(P)H – 4 ATP

1 Cetilpalmitato = 8 Glucosa + 6 NAD(P)H (1 Glucosa/ 12 NAD(P)H) – 4 ATP (1 Glucosa/

30 ATP) = 8 Glucosa + 0.5 Glucosa - 0.133 Glucosa

1 mol Cetilpalmitato = 8.37 mol Glucosa **(16)**

Para obtener la equivalencia en peso sustituimos el peso molecular de ambos compuestos en

**16**

1 mol Cetilpalmitato (480 g/ 1 mol) = 8.37 mol Glucosa (180 g/ 1 mol)

480.85 g Cetilpalmitato = 1507.34 g Glucosa

0.319 g Cetilpalmitato = 1 g Glucosa

De la misma forma fueron calculados los rendimientos de vías de cetilpalmitato y triglicerato de palmitilo a partir de todas las FCs (Tabla VI).

**Tabla IV.** Rendimientos de vías metabólicas de cetilpalmitato y triglicerato de palmitilo a partir de las diferentes FCs

<b>FC</b>	<b>Y<sub>CE/S</sub></b> <b>(g/g)</b>	<b>Y<sub>TAG/S</sub></b> <b>(g/g)</b>
Etanol	0.58	0.63
Glucosa	0.32	0.35
Acetato	0.29	0.31
Piruvato	0.27	0.30

Y<sub>CE/S</sub>: Rendimiento de CEs o cetilpalmitato por sustrato consumido. Y<sub>TAG/S</sub>: Rendimiento de TAGs o triglicerato de palmitilo por sustrato consumido.



15. Anexos

Anexo A. Comprobantes de participación en congresos

**SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUIMICA A.C.**

Otorga la presente

**CONSTANCIA** a:

**Karina J. Salcedo Vite**

Quien asistió y presentó el trabajo:

**Growth and reserve lipids production with the non-pathogenic  
*Acinetobacter baylyi* strain ADP1 using different carbon sources**

Por:

Karina J. Salcedo Vite, Juan C. Sigala Alanís, Daniel G. Segura González and Alfredo Martínez Jiménez

En la modalidad de presentación oral durante el  
XXXII Congreso Nacional de Bioquímica  
4 - 9 de noviembre de 2018, Ixtapa Zihuatanejo, Gro.

Atentamente



**Dra. Irene B. Castaño Navarro**  
Presidente

**Anexo B. Actividad docente desarrollada en la Universidad Politécnica del Estado de Morelos**



**A QUIEN CORRESPONDA  
PRESENTE.**

La Universidad Politécnica del Estado de Morelos con No. de Registro Patronal del IMSS D1717691102, con dirección en Blvd. Cuauhnáhuac # 566. Col. Lomas del Texcal, Jiutepec Morelos, a través de la Dirección de Finanzas y Capital Humano, hace constar que la C. SALCEDO VITE KARINA labora en esta Institución como PROFESORA POR ASIGNATURA adscrita a la DIRECCIÓN ACADÉMICA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA, impartiendo la asignatura de "Fundamentos de microbiología" en el periodo del 08 de mayo al 17 de agosto del año en curso y ha colaborado en el siguiente periodo:

PERIODO	ASIGNATURA
18 de Enero al 21 de Abril de 2018	"Ingeniería de rutas metabólicas "

A solicitud de la interesada y para los efectos que a la misma convenga, se extiende la presente Constancia, en la Ciudad de Jiutepec, Morelos a los 07 días del mes de agosto de dos mil diecinueve.

**ATENTAMENTE  
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DEL ESTADO DE MORELOS**

  
C.P. LAURA C. MAGDALENO ESLAVA  
DIRECTORA DE FINANZAS Y CAPITAL HUMANO  
Tel: 777 229 35 13



**Dirección de Finanzas y  
Capital Humano**

ymh / LCME

## **Anexo C. Publicación**

# Acinetobacter baylyi ADP1 growth performance and lipid accumulation on different carbon sources

**Karina Salcedo-Vite, Juan-Carlos Sigala, Daniel Segura, Guillermo Gosset & Alfredo Martinez**

**Applied Microbiology and  
Biotechnology**

ISSN 0175-7598

Volume 103

Number 15

Appl Microbiol Biotechnol (2019)

103:6217-6229

DOI 10.1007/s00253-019-09910-z



**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)".**



# *Acinetobacter baylyi* ADP1 growth performance and lipid accumulation on different carbon sources

Karina Salcedo-Vite<sup>1</sup> · Juan-Carlos Sigala<sup>2</sup> · Daniel Segura<sup>3</sup> · Guillermo Gosset<sup>1</sup> · Alfredo Martinez<sup>1</sup> Received: 8 February 2019 / Revised: 3 May 2019 / Accepted: 9 May 2019 / Published online: 30 May 2019  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

## Abstract

*Acinetobacter baylyi* ADP1 is a microorganism with the potential to produce storage lipids. Here, a systematic study was carried out to evaluate growth performance and accumulation of wax esters and triacylglycerols using glycerol, xylose, glucose, acetate, ethanol, and pyruvate as carbon sources. High specific growth rates ( $\mu$ ) were found in gluconeogenic carbon sources (ethanol, acetate, and pyruvate:  $0.94 \pm 0.18$ ,  $0.93 \pm 0.06$ , and  $0.61 \pm 0.01$  h<sup>-1</sup>, respectively), and low in glucose ( $0.25 \pm 0.01$  h<sup>-1</sup>). Interestingly, these  $\mu$  values were sustained in a broad range of concentrations of glucose (0.5–50 g L<sup>-1</sup>), pyruvate (3–10 g L<sup>-1</sup>), and acetate (0.3–2 g L<sup>-1</sup>), suggesting a high tolerance to glucose and pyruvate. It was observed that ADP1 is not able to use glycerol or xylose as unique carbon sources. On the other hand, ADP1 showed sensitivity to osmotic upshifts, noted by the lysis at the beginning of cultivations on different carbon sources. However, ADP1 is adapted to relatively high substrate concentrations as indicated by the minimal inhibitory concentrations (MICs) determined at 24 h of cultivations: 350, 50, 80, and 15 g L<sup>-1</sup> for glucose, ethanol, pyruvate, and acetate, respectively. Remarkably, ADP1 co-utilized glucose, acetate, ethanol, and pyruvate. Finally, the accumulation of storage lipids, wax esters (WEs), and triacylglycerols (TAGs) showed to be substrate dependent. Under nitrogen-limiting conditions, the TAGs:WEs (mol:mol) accumulation ratios were 1:4.9 in pyruvate and 1:1.6 in glucose, the WEs were mainly accumulated in acetate. In ethanol, no accumulation of lipids was detected.

**Keywords** *Acinetobacter baylyi* ADP1 · Gluconeogenic carbon sources · Storage lipids · Carbon source utilization

## Introduction

*Acinetobacter baylyi* strain ADP1 is a non-pathogenic Gram-negative Gammaproteobacterium that possesses favorable characteristics for basic and applied research in the fields of bioremediation and production of storage lipids. Its genetic manipulation

is straightforward (Metzgar et al. 2004); and it has been reported to grow in mineral media with a diversity of carbon sources, like ethanol, organic acids, intermediates of the tricarboxylic acid cycle, glucose, and gluconate (Taylor and Juni 1961; Herman and Bell 1970; Sturm et al. 1970). This bacterium produces wax esters (WEs) and triacylglycerols (TAGs) as secondary

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00253-019-09910-z>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Alfredo Martinez  
alfredo@ibt.unam.mx

Karina Salcedo-Vite  
kvite@ibt.unam.mx

Juan-Carlos Sigala  
jsigala@correo.cua.uam.mx

Daniel Segura  
daniel@ibt.unam.mx

Guillermo Gosset  
gosset@ibt.unam.mx

<sup>1</sup> Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Mor, Mexico

<sup>2</sup> Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa, Av. Vasco de Quiroga 4871, Col. Santa Fe Cuajimalpa, Delegación Cuajimalpa, 05348 Mexico City, Mexico

<sup>3</sup> Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Mor, Mexico

metabolites for carbon storage under nitrogen-limiting conditions (Santala et al. 2011b; Santala et al. 2011a).

The genome sequence of ADP1 has been published, concomitant with a detailed study of single-gene deletion mutants (Barbe et al. 2004; De Berardinis et al. 2008). These studies suggested that about 20% of the genes in ADP1 can be associated with catabolism and 10% with the transport of different compounds like aromatics, alkanesulfonates, and nucleotides (Barbe et al. 2004). ADP1, like other *Acinetobacter* species (Elliot 1978; Sigala et al. 2017) seems to have a limited capacity for carbon catabolism as it lacks some glycolytic enzymes, including 6-phosphofructokinase and pyruvate kinase. Also, it has been reported that ADP1 can sustain growth using glucose or gluconate as sole carbon and energy sources (Taylor and Juni 1961; Sigala et al. 2017); for glucose metabolism, this sugar is oxidized to gluconate and the Entner–Doudoroff pathway is used to catabolize this hexose (Barbe et al. 2004; Sigala et al. 2017). It has been suggested that pentoses, xylose, and arabinose are oxidized to lactones in the presence of glucose and acetate as carbon sources (van Schie et al. 1987; Kannisto et al. 2014). However, ADP1 is not able to use such pentoses as a unique carbon source (Taylor and Juni 1961).

As mentioned above, ADP1 synthesizes TAGs and WEs as carbon storage. These lipids are industrially valuable as oleochemicals and biofuels, and in the production of cosmetics, candles, printing inks, lubricants, and coatings respectively (Santala et al. 2011a; Santala et al. 2011b). Accumulation of lipophilic compounds is a common survival mechanism in prokaryotes (Wältermann and Steinbüchel 2005). Excess of carbon source can be stored as lipids which can be metabolized under starvation conditions (Fixter et al. 1986). On the other hand, in the natural environment, carbon sources availability is diverse and changing. For this reason, some microorganisms have developed carbon catabolite repression (CCR) mechanisms that regulate metabolism in such a way that the carbon source that allows the higher growth rate is consumed preferentially (Görke and Stülke 2008). ADP1 does not possess a carbohydrate phosphotransferase system (Barbe et al. 2004), which plays a central role in the most characterized CCR models, i.e., *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. However, CCR is present in ADP1, where the utilization of aromatic compounds is repressed by acetate and succinate (Dal et al. 2002; Zimmermann et al. 2009). For some Gammaproteobacteria of the genera *Pseudomonas* and *Azotobacter*, closely related to ADP1, the preferred carbon sources are also organic acids and amino acids, rather than glucose. In these bacteria, the process of CCR is elicited through the regulatory protein Crc that, together with Hfq, inhibits the translation of the target mRNAs (Rojo 2010; Moreno et al. 2015; Quiroz-Rocha et al. 2017). One or more small RNAs (CrcZ, CrcY, or CrcX) can antagonize the repression exerted by Crc (Filiatrault et al. 2013; Sonnleitner et al. 2009). In ADP1, Crc is also involved in posttranscriptional CCR of aromatic

compounds utilization by organic acids, by affecting the stability of the target mRNAs, although the mechanism has not been fully elucidated (Zimmermann et al. 2009).

Even though there is general knowledge regarding carbon substrate utilization by ADP1, no study has been performed to determine the growth capacity in different carbon sources with potential use in biotechnological processes. This work was aimed to establish quantitatively and systematically the ability of ADP1 to grow and store lipids using compounds found in low-cost raw materials as single carbon sources: glycerol, a residue in the biodiesel industry (Dharmadi et al. 2006); glucose and xylose, major sugars in lignocellulosic materials (Zhao et al. 2012); and acetate, pyruvate, and ethanol, found as fermentation products from different microorganisms. Also, the study was aimed to determine if ADP1 simultaneously utilizes the metabolized carbon sources.

## Materials and methods

### Strain, culture media, and culture conditions

The evaluated strain was *Acinetobacter baylyi* ADP1 that was kindly donated by Professor Veronique de Berardinis (Genoscope CNS, France) and has been deposited as DSM 24193 ([www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)) or ATCC 33305 ([www.atcc.com](http://www.atcc.com)). Cultures were carried out in four different systems: 96-well microplates, 160 × 10 mm test tubes, 250-mL quadruple baffled Erlenmeyer flasks (qbE flasks) or 500-mL qbE flasks. Microplates were incubated and monitored in a microplate reader (ELx808, BioTek Inc., Winooski, USA) at 30 °C and fast shake; test tubes and qbE flasks were incubated in a benchtop incubator shaker (New Brunswick Scientific Classic Series C24, Edison, USA) at 30 °C and 300 rpm.

The cultures were carried out in mineral medium AM1 (Martinez et al. 2007); mineral medium AM1 added with 3-(n-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) 100 mM (AM1-MOPS); Luria Bertani medium (LB); or LB medium added with glucose at 10 g L<sup>-1</sup>. Mineral medium AM1 contained (per liter): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.63 g, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.87 g, citric acid 100 mg, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 370 mg, KCl 150 mg, betaine 1 mM, FeCl<sub>3</sub> 2.4 mg, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 300 µg, CuCl<sub>2</sub> 150 µg, ZnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 300 µg, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 300 µg, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 75 µg, and MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 495 µg. The LB medium contained (per liter): tryptone 10 g, NaCl 10 g, and yeast extract 5 g.

### Growth and tolerance of ADP1 on different carbon sources

Tolerance and capacity to grow on diverse carbon sources for ADP1 were determined in test tubes containing 3 mL of medium AM1-MOPS added with glucose 1–350 g L<sup>-1</sup>, acetate 1–16 g L<sup>-1</sup>, ethanol 1–100 g L<sup>-1</sup>, pyruvate 1–100 g L<sup>-1</sup>,

glycerol 3 g L<sup>-1</sup> or xylose 3 g L<sup>-1</sup>. These assays were started at an optical density of 0.03 at 600 nm (OD<sub>600</sub>) and incubated during 24 h. Exponential growth cultures in LB medium were used as inoculum.

### Growth profile, specific growth rate, and biomass yield on different carbon sources

The specific growth rate ( $\mu$ ) at various concentrations of the different carbon sources was evaluated in microplates containing 100  $\mu$ L of AM1-MOPS supplemented with glucose 0.3–350 g L<sup>-1</sup>; pyruvate 1–80 g L<sup>-1</sup> or acetate 0.3–16 g L<sup>-1</sup> and inoculated at 0.03 OD<sub>600</sub>. Growth was followed by measuring the absorbance at 630 nm (OD<sub>630</sub>) each 20 min until no increase was observed. The growth on ethanol was not assessed using this system due to substantial evaporation promoted by the high ratio of area to volume in the microwells. Hence, for ethanol, the  $\mu$  was evaluated in 250-mL qbE flasks containing 25 mL of AM1-MOPS added with ethanol in the range of 1 to 20 g L<sup>-1</sup> and cultured until no growth was observed. To compare the  $\mu$  values obtained with ethanol, cultivations with glucose, acetate, and pyruvate were carried out also in 250-mL qbE flasks (containing AM1-MOPS with the substrate concentrations indicated in the results section). As inoculum, both in flasks and microplates, exponentially growing cultures in AM1-MOPS medium supplemented with the carbon source to be evaluated at 1 g L<sup>-1</sup>, were used. The biomass was recovered by centrifugation at 10,000 $\times$ g and suspended in fresh AM1-MOPS medium for inoculation. Parameter  $\mu$  was determined by calculating the slope of the curve describing natural logarithms of OD<sub>600</sub> or OD<sub>630</sub> in exponential growth against time from at least four data points.

The biomass yield ( $Y_{x/s}$ ) on the different carbon sources was evaluated in 250-mL qbE flasks containing AM1-MOPS supplemented with glucose, acetate, pyruvate, or ethanol at 3 g L<sup>-1</sup> each. The flasks were inoculated at 0.1 OD<sub>600</sub> with exponentially growing cultures performed in AM1-MOPS supplemented with the carbon source to be evaluated at 3 g L<sup>-1</sup>.  $Y_{x/s}$  was calculated dividing biomass generated (g L<sup>-1</sup>) by the consumed substrate (in C-mol L<sup>-1</sup> units) at the beginning of the stationary phase.

### Simultaneous utilization of carbon sources

A set of experiments were performed to evaluate substrate co-utilization in 250-mL qbE flasks containing AM1-MOPS added with different mixtures of carbon sources: acetate-ethanol-pyruvate-glucose, at 2 g L<sup>-1</sup> each; acetate-ethanol, at 2 g L<sup>-1</sup> each; and acetate-glucose, at 2 g L<sup>-1</sup> each. The flasks were inoculated with exponentially growing cultures performed in AM1-MOPS medium added with glucose at 2 g L<sup>-1</sup>, for the acetate-ethanol-pyruvate-glucose mixture; ethanol at 2 g L<sup>-1</sup>,

for the acetate-ethanol mixture; and acetate or glucose at 2 g L<sup>-1</sup> for the acetate-glucose mixture.

### Storage lipids production with different carbon sources

Storage lipids production, with glucose, acetate, pyruvate, and ethanol, was evaluated in two-stage cultures. The cell mass production was performed at stage I, which was carried out in 500-mL qbE flasks containing 50 mL of LB medium added with glucose at 10 g L<sup>-1</sup> and incubated until 5 OD<sub>600</sub>. As inoculum, exponentially growing cultures in LB medium supplemented with glucose 10 g L<sup>-1</sup> were used. The cells were recovered by centrifugation at 10,000 $\times$ g (15 min, room temperature) and washed with 20 mL of AM1-MOPS. The mineral washing medium was separated by centrifugation at 10,000 $\times$ g (15 min, room temperature) and decantation. The reserve lipids accumulation was promoted during stage II using a growth-limiting (nitrogen-limited) medium, which was AM1-MOPS without (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and added with KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 30 mM and yeast extract (YE) at 0.5 g L<sup>-1</sup> (this small amount of YE was used to prevent ADP1 lysis at the beginning of nitrogen-limited cultivations; see results section). Storage lipids assays were performed in 250-mL qbE flasks containing nitrogen-limited medium, which was inoculated to 4 OD<sub>600</sub> with stage I cells. Carbon source concentrations at the beginning of stage II were: glucose 20 g L<sup>-1</sup>, pyruvate 20 g L<sup>-1</sup>, and ethanol 10 g L<sup>-1</sup>; acetate was fed every 4 h at 8 g L<sup>-1</sup> (see “Results” for an explanation on the concentrations used).

### Total lipids extraction

Total lipids were extracted from the biomass of 3 mL culture samples taken at the beginning of stage II and after 12 h of incubation following Folch's protocol with some modifications (Folch et al. 1957). Biomass was collected by centrifugation at 10,000 $\times$ g (15 min, room temperature). Two sequential extractions were performed with 8 mL of chloroform-methanol (2:1 v/v) using 15-mL conical tubes (Fisher Scientific, Hampton, USA) at room temperature and 60 rpm for 12 h. After each incubation period, the solvent was separated by centrifugation at 4500 $\times$ g (15 min, room temperature). The lipid extract was recovered by phase separation: 4 mL of NaCl 10 g L<sup>-1</sup> was added, vortexed, and centrifuged at 4500 $\times$ g (5 min, room temperature), and the organic phase was recovered. Chloroform was evaporated at room temperature.

### Analytical methods

#### Growth quantification

For cultivations carried out in Erlenmeyer flasks and test tubes, growth was measured by OD<sub>600</sub> in a spectrophotometer



(Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). In the microplates, growth was followed automatically by OD<sub>630</sub>. For correlating OD<sub>600</sub> to dry cell weight (DCW), 10 ml of cultures, in the range from 0.1 to 0.9 OD<sub>600</sub>, were filtered under vacuum in preweighted 0.22-µm nylon filters and dried at 75 °C until constant weight. Calibration curve stated that 1 OD<sub>600nm</sub> is equivalent to 0.55 g<sub>DCW</sub> L<sup>-1</sup>.

**Metabolites quantification**

The concentrations of glucose, acetate, pyruvate, and ethanol were determined by HPLC (Waters, Milford, USA) with an Aminex HPX-87H column (300 mm × 7.8 mm, 9 µm, Hercules, Bio-Rad, USA) at 50 °C, using H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM as eluent at 0.5 mL min<sup>-1</sup>.

**Lipids analysis**

Total lipids were assayed by thin layer chromatography (TLC) using hexane-2-propanol-acetic acid (142.5: 7.5: 1 v/v/v) as mobile phase and silica plates ALUGRAM® SIL G as the stationary phase. For visualization, plates were stained with iodine or ammonium cerium sulfate. The latter was prepared by mixing 500 g of crushed ice, 50 mL of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 25 g of (NH<sub>4</sub>)<sub>4</sub>Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, San Luis, USA). Oleic acid, oleyl alcohol, cetyl palmitate, and glyceryl tripalmitoleate were used as standards (Sigma-Aldrich, San Luis, USA).

Total lipids were quantified as fatty alcohols or fatty acid methyl esters (FAMES) using gas chromatography and a flame ionization detector (GC-FID). Briefly, lipid extracts were dissolved in 500 µL of chloroform and incubated with 320 µL of BF<sub>3</sub>-methanol 10% w/w (Sigma-Aldrich, San Luis, USA) at 60 °C for 1.5 h without mixing. The reaction mixtures were cooled on ice, 500 µL of distilled water were added, vortexed, centrifuged at 4500×g (5 min, room temperature) and the organic phase was recovered. Chloroform was evaporated at room temperature, the extract was dissolved in 1 mL of chloroform-methanol (1:1 v/v), and 10 µL of octanol (30 mg/mL) were added as internal standard. One microliter of the derivatized sample was injected, in split mode (0.5 ratio) at 300 °C, into the chromatograph (Agilent 6850, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) with a HP-INNOWax column (30 m × 0.25

mm, 0.25 µm, Agilent Technologies, Santa Clara, USA). The temperature profile in the column was 30 °C for 5 min, a ramp at 25 °C min<sup>-1</sup> up to 180 °C, a second ramp at 15 °C min<sup>-1</sup> up to 250 °C, and finally, the temperature was held at 250 °C for 5 min. Helium gas was used as carrier gas at a linear velocity of 1 mL min<sup>-1</sup>. To obtain the standard curve, mixtures were prepared with 0.03, 0.08, 0.15, 0.3, 0.6, or 1.0 mg in 500 µL of chloroform, of each expected compound in the lipid extracts: lauric acid (C12:0), myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), palmitoleic acid (C16:1), stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1), palmityl alcohol (C16:0), palmitoleyl alcohol (C16:1), stearyl alcohol (C18:0), and oleyl alcohol (C18:1). Mixtures were derivatized with BF<sub>3</sub>-methanol and analyzed by GC-FID as described above.

WEs production in stage II was calculated with Eq. 1, where total fatty alcohols already produced in stage I were subtracted from total fatty alcohols present in stage II and one fatty alcohol mol was equivalent to one WEs mol.

For an approximation of TAGs production in stage II, TAGs already produced during stage I were subtracted from TAGs in stage II (Eq. 2a). One TAGs mol is formed by three fatty acids moles, and fatty acids can be found free or forming-structural lipids, WEs, and TAGs; then, TAGs concentration can be related to fatty acids concentration (Eq. 2b). Through basic algebra and considering that free and forming-structural lipids fatty acids remain constant in stages I and II (see results section) equation 2c was formulated. These considerations are valid for glucose and pyruvate cultures. Fatty acids and fatty alcohols values are given in moles.

$$WES_{producedII} = \frac{1 \text{ mol WEs}}{1 \text{ mol OHS}} (OHS_{totalII} - OHS_{totalI}) \tag{1}$$

Equation 1: Approximation of produced WEs during stage II. WEs<sub>produced II</sub>: produced wax esters during stage II. OHS<sub>total I</sub>: total fatty alcohols after stage I. OHS<sub>total II</sub>: total fatty alcohols after stage II.

$$TAGs_{producedII} = TAGs II - TAGs I \tag{2a}$$

$$TAGsX = \frac{1 \text{ TAGs mol}}{3 \text{ COOHs mol}} (COOHs_{total X} - COOHs_{free X} - COOHs_{structural-forming X} - COOHs_{WEs-forming X}) \tag{2b}$$

$$TAGs_{producedII} = \frac{1 \text{ TAGs mol}}{3 \text{ COOHs mol}} (COOHs_{total II} - COOHs_{WEs-forming II} - COOHs_{total I} + COOHs_{WEs-forming I}) \tag{2c}$$

Equation 2: Approximation of produced TAGs during stage II.  $WES_{produced}$ : produced wax esters.  $TAGs_{produced}$ : produced triacylglycerols.  $OHS_{total}$ : total fatty alcohols.  $COOHs_{total}$ : total fatty acids.  $COOHs_{free}$ : free fatty acids.  $COOHs_{structural-forming}$ : structural lipids-forming fatty acids.  $COOHs_{WES-forming}$ : wax ester-forming fatty acids.  $COOHs_{TAGs-forming}$ : triacylglycerols-forming fatty acids. *I*: in stage I. *II*: in stage II. *X*: in stage I or II.

### Statistical analysis

Data are presented as means  $\pm$  standard deviations. A *t* test was used to compare means (GraphPad Prism Version 6.07, GraphPad Software, Inc.) at a significance level of 0.05 (a *P* < 0.05 was considered statistically significant).

## Results

### Growth and tolerance of ADP1 on different carbon sources

The capacity of ADP1 to grow on glucose, xylose, acetate, pyruvate, glycerol, and ethanol was evaluated in test tubes with liquid mineral medium AM1-MOPS. In cultures with xylose ( $3 \text{ g L}^{-1}$ ) or glycerol ( $3 \text{ g L}^{-1}$ ), growth was not observed after 24 h of incubation. ADP1 was able to grow in cultures with glucose, ethanol, pyruvate, or acetate as the sole carbon source. The tolerance of ADP1 to these substrates, determined by the minimal inhibitory concentrations (MICs), was 350, 50, 80, and  $15 \text{ g L}^{-1}$ , respectively (see supplementary material Fig. S1).

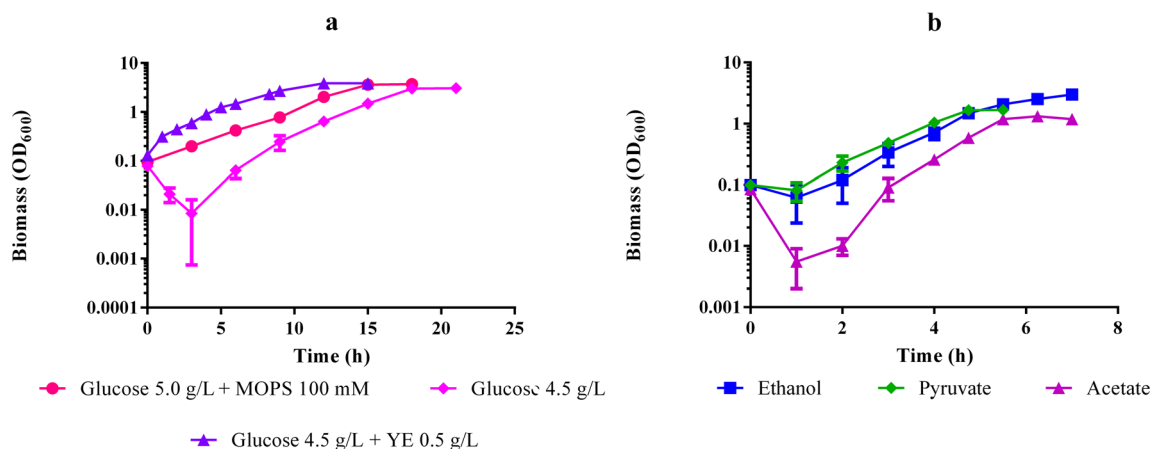
In cultures in qbE flasks with mineral AM1 medium, lysis of ADP1 was observed at the beginning of cultivations with all the evaluated substrates (data not shown). When glucose was used, the addition of MOPS 100 mM or at least  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  of yeast extract (YE) prevented lysis (Fig. 1a); these compounds exert

an osmoprotective effect. For this reason, all experiments presented hereinafter were carried out in AM1-MOPS medium, unless otherwise is indicated. However, when acetate, pyruvate, and ethanol were used, a detectable lysis was still present at the beginning of cultivations (Fig. 1b).

### Growth profile, specific growth rate, and biomass yield on different carbon sources

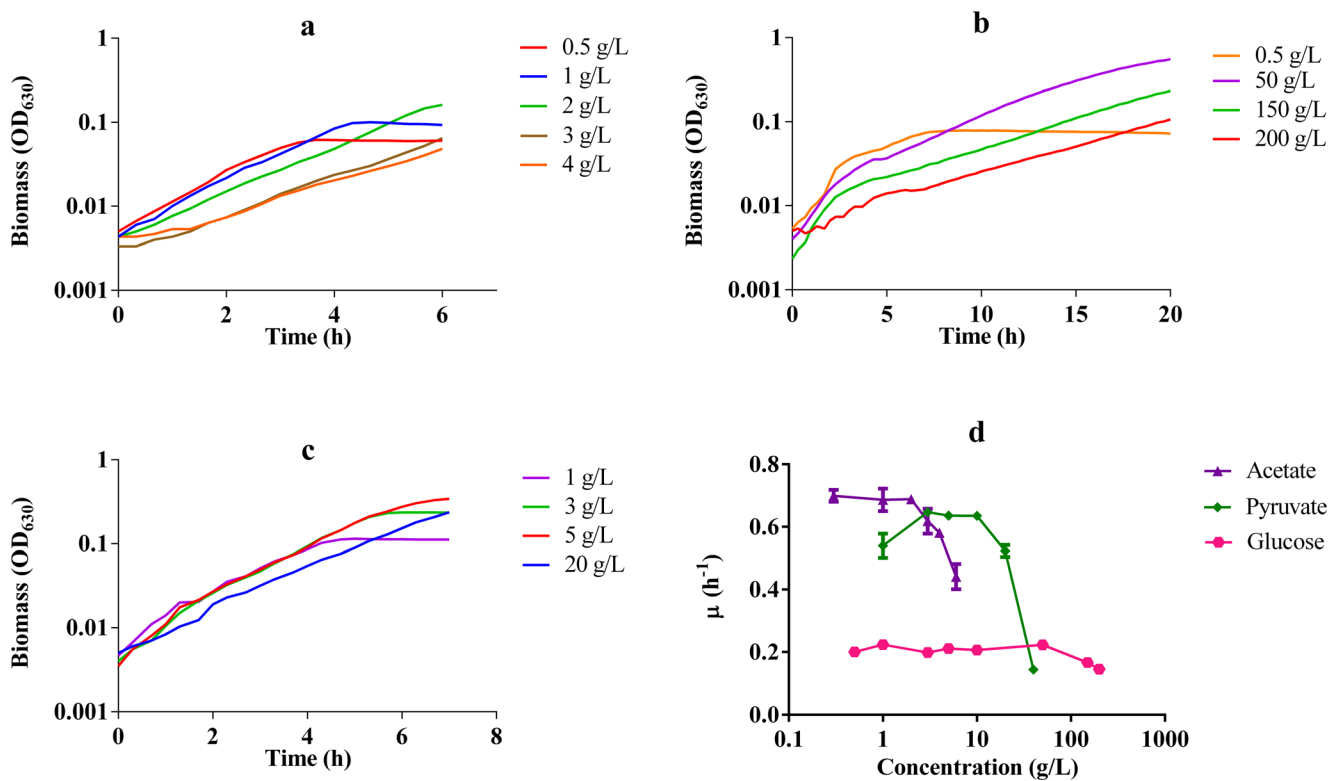
The growth profiles of ADP1 were obtained from cultures in microplates on various carbon sources in a range of concentrations (Fig. 2). A constant  $\mu$  was observed for glucose between 0.5 and  $50 \text{ g L}^{-1}$ , for pyruvate between 3 and  $10 \text{ g L}^{-1}$ , and acetate between 0.3 and  $2 \text{ g L}^{-1}$  (Fig. 2d). As mentioned in “Materials and methods”, due to high evaporation of ethanol in microplates, growth on this substrate was evaluated in flasks, with AM1-MOPS medium supplemented with ethanol at 1, 5, 10, and  $20 \text{ g L}^{-1}$ , where the higher  $\mu$  was  $0.94 \pm 0.18 \text{ h}^{-1}$  at  $5 \text{ g L}^{-1}$ ; while at 1, 10, and  $20 \text{ g/L}$  were  $0.78 \pm 0.03$ ,  $0.78 \pm 0.13$ , and  $0.76 \pm 0.10$ , respectively. However, no statistical difference was observed comparing the mean of the  $\mu$  values in the range of concentration tested (a *P* value of 0.3299 and an average  $\mu$  of  $0.81 \pm 0.13 \text{ h}^{-1}$  were obtained). For comparative purposes between cultures in microplates and flasks; flask cultures were carried out with glucose, pyruvate, and acetate at a concentration value where the higher  $\mu$  was observed in microplates. The  $\mu$  values for glucose and pyruvate were similar in microplates and flasks, but for acetate  $\mu$  was higher in the flasks (Table 1). For cultivations in flasks, the higher  $\mu$  was found in acetate and ethanol, followed by pyruvate, and glucose.

The  $Y_{x/s}$  evaluated in AM1-MOPS containing  $3 \text{ g L}^{-1}$  of the carbon source, was similar in acetate and glucose,  $10.88 \pm 0.55$  and  $10.84 \pm 0.54 \text{ g biomass/C-mol}$ , respectively (no significant difference was found, a *P* value of 0.8895 was determined). For cultivations with pyruvate,  $Y_{x/s}$  was  $12.54 \pm 1.32 \text{ g biomass/C-mol}$ , and the highest yield was observed for



**Fig. 1** ADP1 cultivations in mineral medium AM1 supplemented with glucose  $4.5 \text{ g L}^{-1}$ ; glucose  $5.0 \text{ g L}^{-1}$  and MOPS 100 mM; and glucose and yeast extract (YE) at 4.5 and  $0.5 \text{ g L}^{-1}$ , respectively (a). ADP1

cultivations in AM1-MOPS added with ethanol, acetate, or pyruvate,  $3 \text{ g L}^{-1}$  each (b)



**Fig. 2** ADP1 cultivations in mineral medium AM1-MOPS supplemented with different concentrations of **a** acetate, **b** glucose, or **c** pyruvate, as sole carbon sources. **d** Effect of substrate concentration on specific growth rates

ethanol,  $14.14 \pm 1.59 \text{ g}_{\text{biomass}}/\text{C-mol}$ . Additionally, acetate production was detected when ethanol at  $3 \text{ g L}^{-1}$  was used as a carbon source with a yield of  $0.52 \pm 0.06 \text{ g}_{\text{Ac}}/\text{g}_{\text{EtOH}}$ . This organic acid was consumed once ethanol was depleted.

### Simultaneous utilization of carbon sources

When ADP1 was cultivated in an acetate-ethanol-pyruvate-glucose mixture, these substrates were co-utilized, except acetate (Fig. 3). Acetate was first accumulated until ethanol was depleted, which suggested catabolic repression of acetate catabolism by ethanol. However, in a mixture of acetate-ethanol, acetate was accumulated at the beginning of the cultures and then was consumed simultaneously with ethanol (Fig. 4). As additional evidence for carbon co-utilization, cultivations with

the acetate-glucose mixture were carried out using cells cultivated with acetate or glucose as inoculum. It was observed that using a culture adapted to grow in acetate delayed the use of glucose three hours, but in the end, both compounds were co-utilized (Fig. 5). Therefore, we concluded that ADP1 can catabolize all the evaluated carbon sources simultaneously.

### Storage lipids production with different carbon sources

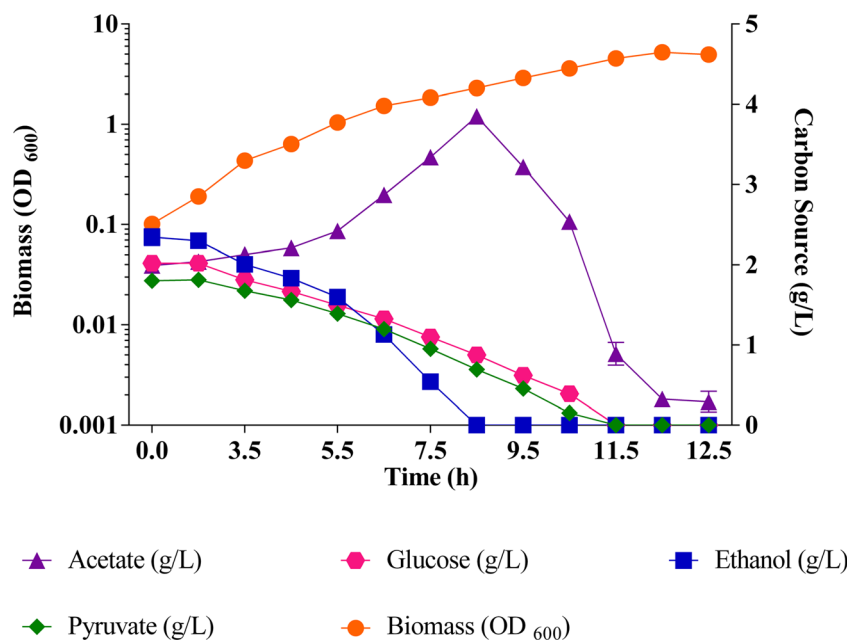
The production of reserve lipids (WEs and TAGs) was evaluated with glucose, acetate, pyruvate, and ethanol in two-stage cultures. In this strategy, the stage I was performed for biomass production and stage II for lipids production. In all the cases, stage I was carried out in LB medium added with glucose at  $10 \text{ g L}^{-1}$ . Lipids accumulation in ADP1 occurs mainly as a result of the lack of some essential nutrient for biomass formation under carbon abundance conditions (Wältermann et al. 2007). Therefore, stage II was carried out in nitrogen-limited mineral medium. The substrates concentrations were below the MICs determined in this work glucose  $20 \text{ g L}^{-1}$ , pyruvate  $20 \text{ g L}^{-1}$ , ethanol  $10 \text{ g L}^{-1}$ , and acetate was fed three times at  $8 \text{ g L}^{-1}$  (for a total of  $24 \text{ g L}^{-1}$ )

Lipids production was evaluated visually by TLC and quantitatively by GC-FID. In experiments with glucose at  $20 \text{ g L}^{-1}$ , the reserve lipids were accumulated at least for 24 h of stage II, and higher accumulation was detected before 12 h (see supplementary material Fig. S2). Therefore, a length

**Table 1.** Comparison of specific growth rates of ADP1 in microplates and flasks.  $\mu_{\text{max}}$  (maximal specific growth rate) found under the evaluated conditions. *N.d.* non-determined

Substrate	Concentration ( $\text{g L}^{-1}$ )	$\mu_{\text{max}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	
		Microplates	Flasks
Glucose	5	$0.21 \pm 0.01$	$0.25 \pm 0.01$
Acetate	2	$0.69 \pm 0.02$	$0.93 \pm 0.06$
Ethanol	5	N.d.	$0.94 \pm 0.18$
Pyruvate	3	$0.64 \pm 0.01$	$0.61 \pm 0.01$

**Fig. 3** ADP1 growth and substrate consumption kinetics in cultivations with AM1-MOPS medium supplemented with an acetate-ethanol-pyruvate-glucose mixture at 2 g L<sup>-1</sup> each.



of 12 h for stage II was established. Additionally, it was observed that free fatty acids and alcohols produced during stage I remained without any important change throughout stage II.

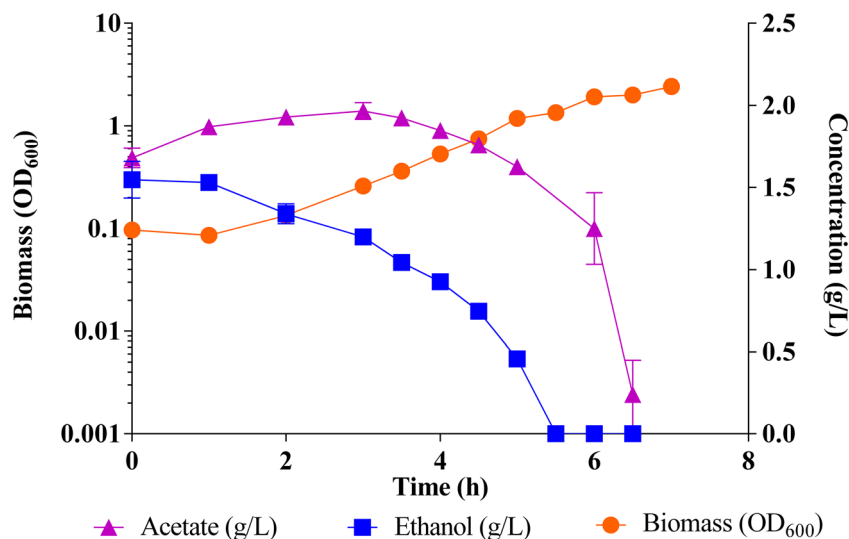
As shown in Fig. 6, a significant increase in OD<sub>600</sub> was observed in stage II cultivations with glucose and pyruvate but not with acetate and ethanol. In ethanol cultures, acetate was produced with a yield of 0.778 mol<sub>acetate</sub>/mol<sub>ethanol</sub>, and in all cultures, there was substrate consumption.

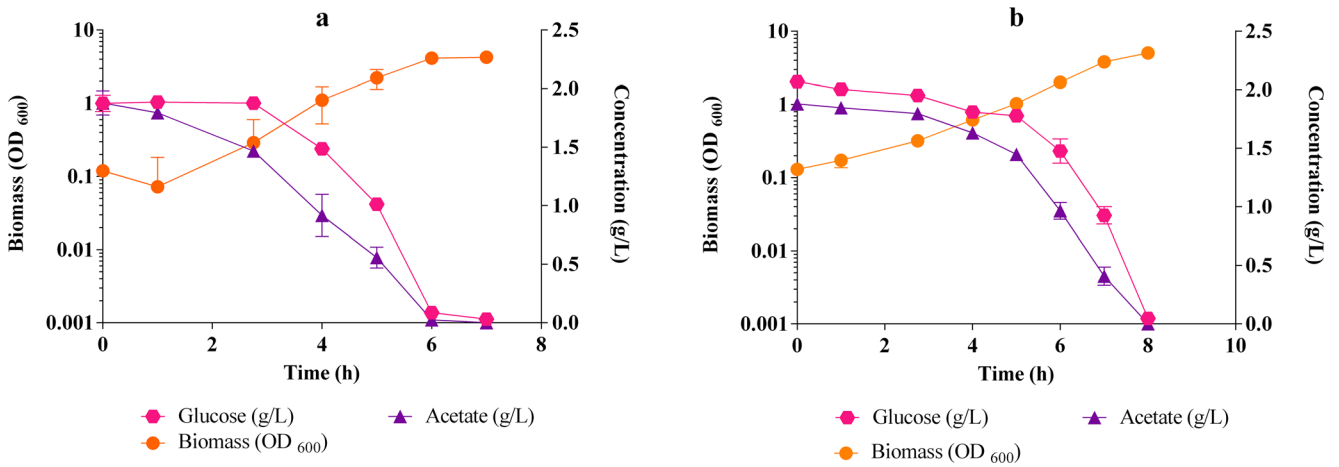
Figure 7 shows the TLC plate with lipids extracted from cultivations in different carbon sources. Reserve lipids were accumulated even in stage I, while in stage II WEs increased in cultivations with glucose, pyruvate, and acetate as expected. Also, there was a production of TAGs in the cultures with pyruvate and glucose. However, in cultures with acetate, the production of these compounds was not evident. In the culture

with ethanol, the reserve lipids produced during phase I were consumed. Regarding free fatty acids, not noticeable changes were observed from stage I to stage II in cultures with glucose and pyruvate. Interestingly, the same result was found in ethanol cultures where reserve lipids were consumed. Finally, in cultivations with acetate, free fatty acids were consumed.

The quantification by GC-FID allowed determining the production of total fatty acids and alcohols as free form or as part of a biomolecule. In ADP1 fatty alcohols can be found free or forming WEs. Since free fatty alcohols in ADP1 are present in trace concentrations (Kalscheuer and Steinbüchel 2003), the level of WEs was directly related to total fatty alcohols through equation 1 (see “Materials and methods”). TAGs production in stage II, in cultures with glucose and pyruvate, was approximated by equation 2c relating TAGs concentration to total fatty

**Fig. 4** ADP1 growth and substrate consumption in cultivations with AM1-MOPS supplemented with an acetate-ethanol mixture at 2 g L<sup>-1</sup> each

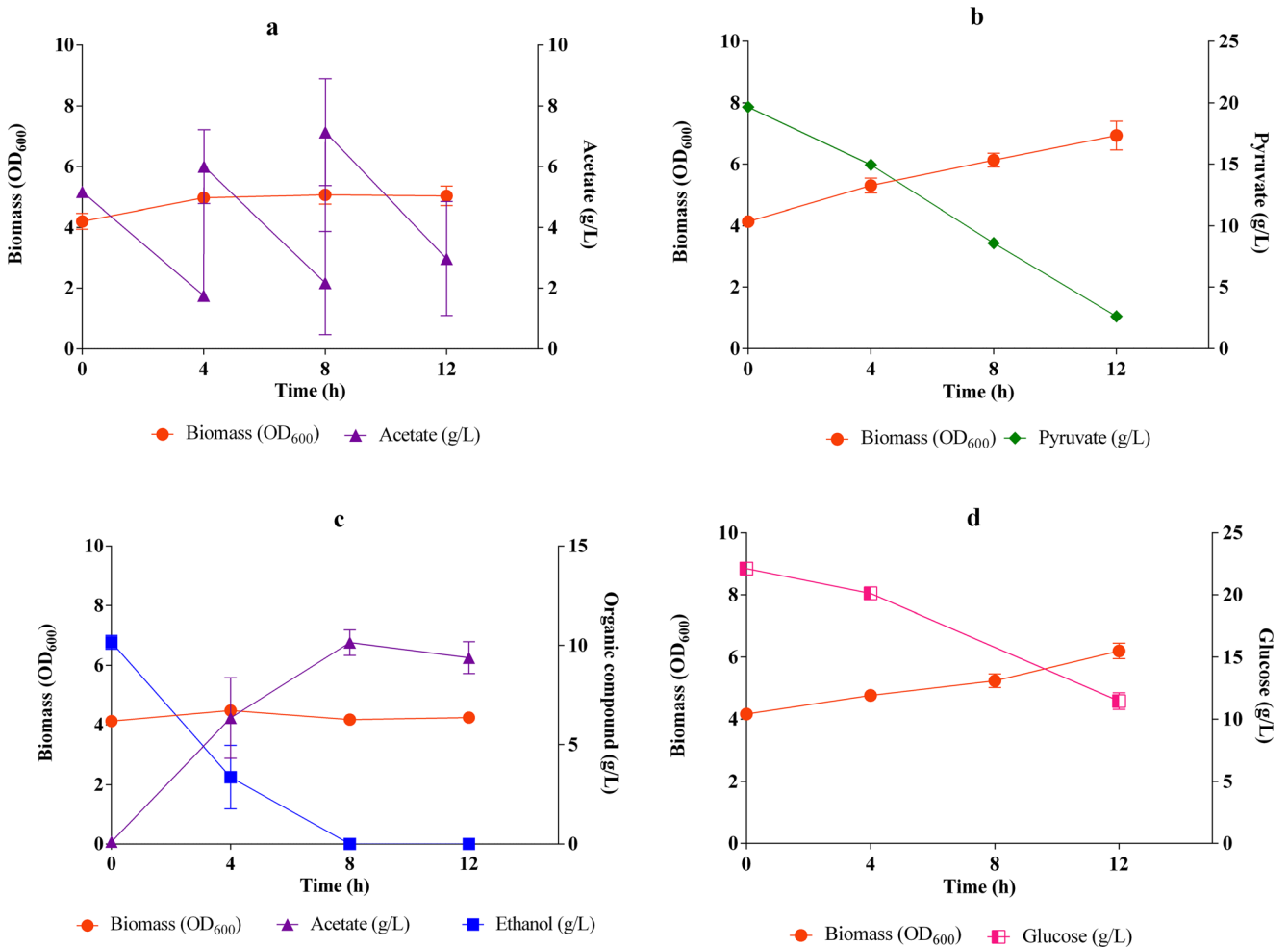




**Fig. 5** ADP1 growth and substrate consumption in cultivations with AM1-MOPS medium supplemented with an acetate-glucose mixture at  $2 \text{ g L}^{-1}$  each. Inoculum developed in **a** AM1-MOPS added with acetate at  $2 \text{ g L}^{-1}$  and **b** AM1-MOPS supplemented with glucose at  $2 \text{ g L}^{-1}$

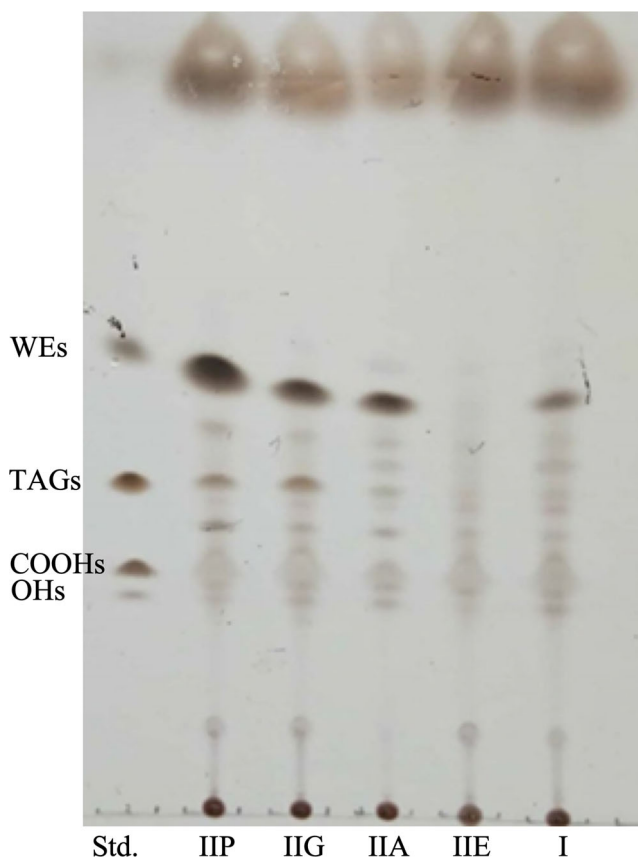
acids concentration in stages I and II. For the formulation of equation 2c, it was considered that forming-structural lipids and

free fatty acids remain constant in stages I and II. Cultivations in stage II were carried out in growth-limiting conditions; and, as



**Fig. 6** Substrate consumption and biomass increase in nitrogen-limited stage II cultivations in mineral medium (with  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  of yeast extract) and supplemented with **a** acetate, **b** pyruvate, **c** ethanol, and **d**. Glucose.

Biomass in OD<sub>600</sub>, substrate consumption, and acetate production in culture with ethanol are shown



**Fig. 7** Total lipids separated by TLC. I: stage I biomass total lipids. II: stage II biomass total lipids from cultures supplemented with pyruvate (IIP), glucose (IIG), acetate (IIA), or ethanol (IIIE). Std.: standards. OHs: free fatty alcohols. COOHs: free fatty acids. TAGs: triacylglycerols. WEs: wax esters

observed in TLC lipids profile, free fatty acids remained without important changes when glucose and pyruvate were used as carbon sources.

As indicated in Table 2, the yield and ratio of TAGs and WEs produced by ADP1 were substrate dependent. In cultures with pyruvate a higher carbon flux was directed towards WEs synthesis compared to TAGs. Moreover, in the case of glucose, although the production of WEs was higher than the production of TAGs, the TAGs:WEs ratio was 1:1.6. In cultures with acetate, even though it was not possible to approximate TAGs concentration, TLC showed an exclusive or almost exclusive synthesis of WEs.

**Table 2** Yield and ratio of TAGs to WEs produced by ADP1 in mineral medium supplemented with acetate, glucose, or pyruvate. TAGs triacylglycerols. WEs wax esters, N.d. non-determined

Substrate	Yield ( $\mu\text{mol}/\text{C-mol}$ )		TAGs:WEs ratio
	TAGs	WEs	
Pyruvate	183.61 $\pm$ 40.95	898.36 $\pm$ 77.41	1:4.9
Glucose	309.59 $\pm$ 56.72	493.44 $\pm$ 5.27	1:1.6
Acetate	N.d.	488.19 $\pm$ 110.98	–

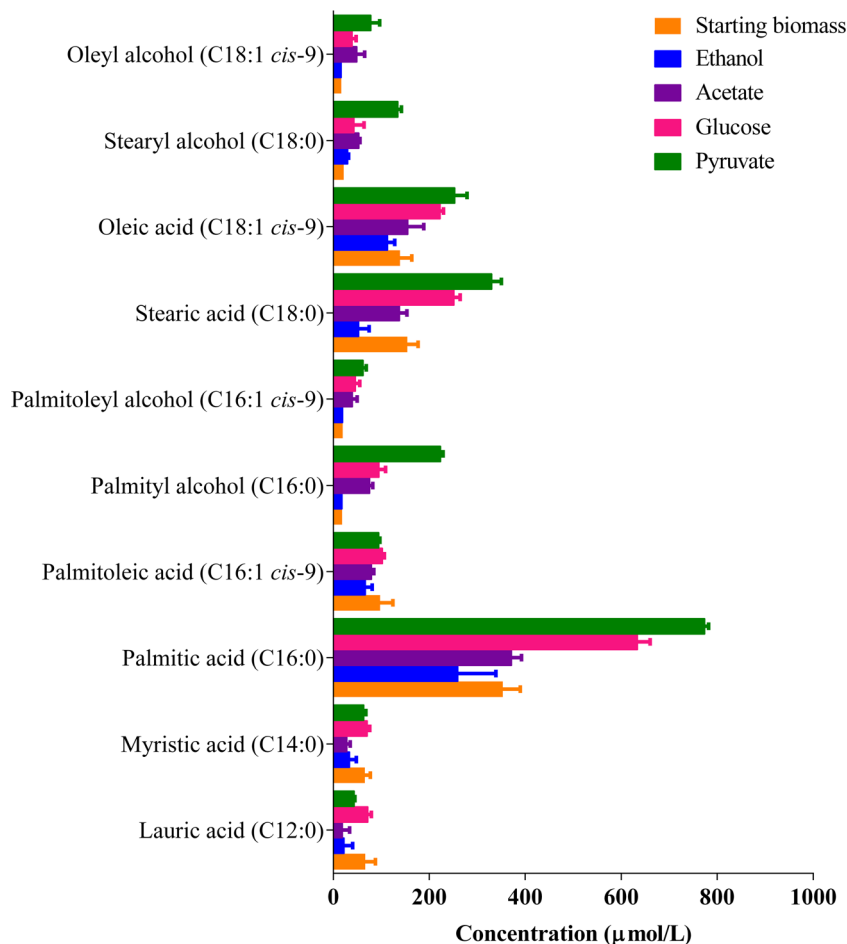
Identified alcohols and fatty acids were the same for all the evaluated carbon sources. These compounds include fatty acids C12:0, C14:0, C16:0, C16:1 *cis*-9 and C18:0 and C18:1 *cis*-9; and fatty alcohols C16:0, C16:1 *cis*-9 and C18:0 and C18:1 *cis*-9 (Fig. 8). In GC-FID quantification, a conspicuous consumption of fatty acids in the cultures with ethanol and acetate was detected, which agreed with the consumption of reserve lipids and free fatty acids in cultivations with ethanol and acetate, respectively. Notably, the concentration of fatty acids C12:0, C14:0, and C16:1 *cis*-9 remained relatively constant.

## Discussion

ADP1 can grow at relatively high concentrations of glucose, pyruvate, acetate, and ethanol, according to the MIC values of 350, 80, 15, and 50 g L<sup>-1</sup>, respectively. However, we found that this strain was unable to sustain growth using xylose or glycerol as sole carbon sources. In previous studies, it has been reported that ADP1 does not consume xylose when used as the sole carbon source (Taylor and Juni 1961; Kannisto et al. 2015). Regarding glycerol metabolism, ADP1 possesses the enzymes glycerol phosphate kinase and glycerol phosphate dehydrogenase, which are necessary to integrate glycerol to the central metabolism, and, although no gene sequence related to glycerol transport has been identified (Barbe et al. 2004), the use of glycerol by ADP1 in a mixture with gluconate has been reported (Santala et al. 2011b). Our results corroborate that xylose or glycerol cannot be used as sole carbon sources to sustain the growth of ADP1.

Carbon sources, like any other solute, impose osmotic stress on bacteria and could exert other adverse effects. Lysis was found at the beginning of cultures of ADP1 carried out in qbE flasks. When using glucose, lysis was prevented by the addition of MOPS 100 mM or 0.5 g L<sup>-1</sup> of YE. It is known that osmotic upshifts stimulate K<sup>+</sup> uptake and accumulation of some anions, like MOPS (Wood et al. 2009) as K<sup>+</sup> counterion (Wood 2011). Furthermore, glycine betaine and choline are present in YE (Dulaney et al. 1968), glycine betaine is a known compatible solute accumulated by many microbes under osmotic stress to prevent loss of water, and it has been reported that ADP1 accumulates glycine betaine from the environment and synthesizes it from choline in response to osmotic upshifts (Sand et al. 2011; Sand et al. 2014; Scholz et al. 2016). Because lysis is relieved by reported osmoprotectants, we propose that the lysis at the beginning of these cultures is caused by the osmotic upshift when ADP1 is changed from depleted media to a fresh culture and YE provides glycine betaine that helps to contend with such osmotic stress. In cultures with acetate, pyruvate, and ethanol, MOPS addition was not enough for preventing lysis. Then, lysis could be related to other well-known adverse effects for the mentioned compounds besides the osmotic stress. It has been proposed

**Fig. 8** Fatty acids and alcohols identified in biomass from stage I (starting biomass) and from stage II, cultures supplemented with ethanol, glucose, pyruvate, and acetate



that weak acids (e.g., acetate and pyruvate) can diffuse across the plasma membrane in the neutral form. Once in the cytoplasm, they release a proton, thus decreasing both the pH and the transmembrane proton gradient, which causes cellular activity disruption (Lasko et al. 2000). On the other hand, ethanol is involved in disturbing hydrogen bonds within membrane lipids causing the bilayers to become more fluid and permeable. The change in structural properties of the membranes also induces the decrease of the activity of embedded proteins (Patra et al. 2006).

In cultures carried out in microplates, it was observed that a constant  $\mu$  was obtained in a range of substrate concentration. With glucose an average  $\mu$  of  $0.21 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$  was found from 0.5 to 50  $\text{g L}^{-1}$ . This behavior was also found with the organic acids, where a constant  $\mu$  of  $0.64 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$  was obtained for pyruvate in the range of 3 to 10  $\text{g L}^{-1}$  and of  $0.69 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$  for acetate from 0.3 to 2  $\text{g L}^{-1}$  (see Fig. 3d).

Cultivations with the four carbon sources were also evaluated in qbE flasks. As in microplates, highest  $\mu$  values were found with the gluconeogenic carbon sources:  $0.93 \pm 0.06 \text{ h}^{-1}$ ,  $0.94 \pm 0.18 \text{ h}^{-1}$  and  $0.61 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$  with acetate at 2  $\text{g L}^{-1}$ ,

ethanol 5  $\text{g L}^{-1}$  and pyruvate 5  $\text{g L}^{-1}$ , respectively. Similar values of  $\mu$  were found when the strain was grown in the presence of ethanol or acetate. Because ethanol is oxidized to acetate and excreted to culture media, these results suggest that conversion of ethanol to acetate is efficient and the metabolism of acetate limits ADP1 growth in ethanol. In ADP1, gluconeogenic carbon sources are assimilated through the glyoxylate pathway (Herman and Bell 1970). However, the enzymatic steps for the synthesis of acetyl-CoA from acetate or pyruvate are different: pyruvate is decarboxylated to acetyl-CoA by the pyruvate dehydrogenase complex; and acetate can be either, phosphorylated by the acetokinase (Ack) and transferred to coenzyme A (CoA) by the phosphate acetyltransferase (Pta) or directly activated by the acetyl-CoA synthetase (Acs) (Barbe et al. 2004). Additionally, pyruvate is assimilated to PEP by the PEP synthetase (Herman and Bell 1970). We suggest that these differences in the metabolism of pyruvate and acetate are related to the lower  $\mu$  observed in pyruvate. Finally, a considerably lower  $\mu$  ( $0.25 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ ) was found in glucose at 5  $\text{g L}^{-1}$ , confirming the preferred gluconeogenic metabolism of several species of *Acinetobacter* (Sigala et al. 2017).

On the other hand, it is known that ADP1 displays CCR of aromatic compounds utilization by acetate and succinate (Zimmermann et al. 2009). In this work, it was observed that ADP1 co-consume glucose, ethanol, acetate, and pyruvate indicating that acetate does not catabolically repress these substrates, as it happens in the closely related *Pseudomonas* and *Azotobacter*, at least for glucose when acetate is present and where the Crc (catabolite repression control) protein is also present (Quiroz-Rocha et al. 2017; Rojo 2010). Regardless of the different  $\mu$  and  $Y_{x/s}$  obtained with these four carbon sources, ADP1 was able to utilize glucose, ethanol, acetate, and pyruvate simultaneously. Furthermore, as reported before for *A. calcoaceticus* LMD 79.41 (Van Schie et al. 1989), we suggest that in ADP1, enzymes for glucose catabolism are not constitutively expressed since glucose consumption was delayed around three hours when acetate was used to generate the inoculum for cultivations in an acetate-glucose mixture.

It is known that the final step for WEs and TAGs synthesis is catalyzed by the wax ester synthase/diacylglycerol acyltransferase enzyme (WS/DGAT) encoded by the *wax/dgat* gene. It has been reported that WS/DGAT has a specific activity of  $90.37 \text{ pmol (mg protein min)}^{-1}$  for the synthesis of WEs and ten times lower for the synthesis of TAGs. However, in this work, we found that the ratio of WEs to TAGs is related not only to the WS/DGAT activity but to the carbon source used during nitrogen limitation. When acetate was used as carbon source WE were mostly synthesized; in cultures with pyruvate five WEs molecules were produced per one TAG molecule; and with glucose, the ratio of TAGs to WEs was 1:1.6. Departing from acyl-CoA for WEs and from acyl-CoA and dihydroxyacetone phosphate for TAGs, the requirements of reducing equivalents for the synthesis of one TAG molecule are lower than those for one WE molecule, 1 and 2 NAD(P)H, respectively. However, no relationship between the carbon source reduction state and the reserve lipids ratio was found. Indeed, with ethanol, the more reduced substrate, no lipids production was observed, and the higher reserve lipids yield ( $Y_{p/s}$ ) were seen in pyruvate and glucose. Glucose and acetate reduction degrees by mol of carbon are similar. However, much lower  $Y_{p/s}$  was observed in acetate (see Table 2). The  $Y_{p/s}$  and the ratio of TAGs to WEs could be related to the carbon flow distribution between the reserve lipids and the exopolysaccharide pathways; the latter is known to be active in the stationary phase (Kaplan and Rosenberg 1982). The observed acids and fatty alcohols profiles were the same for all the evaluated carbon sources (Fig. 8).

Similar to the reserve lipids yield ( $Y_{p/s}$ ), biomass yield ( $Y_{x/s}$ ) was not related to the carbon source reduction state. Even highest  $Y_{x/s}$  was observed in ethanol,  $14.14 \pm 1.59 \text{ g}$

$\text{biomass/C-mol}$ , the most reduced carbon source, the second higher value was in pyruvate,  $12.54 \pm 1.32 \text{ g biomass/C-mol}$ , the most oxidized carbon source. Finally, lower values were observed in acetate and glucose,  $10.88 \pm 0.55$  and  $10.84 \pm 0.54 \text{ g biomass/C-mol}$ , respectively.

In this study, through cultivations in liquid mineral medium, we were able to evaluate ADP1 growth performance and production of lipids on different carbon sources. ADP1 was capable of growing at relatively high concentrations of glucose, pyruvate, ethanol, and acetate. Higher  $\mu$  values were observed in the gluconeogenic carbon sources, acetate, ethanol and pyruvate, and much lower in glucose. In cultures with pyruvate and glucose, the higher reserve lipids yields were observed, however, in cultures with pyruvate around 83% of these compounds were WEs, compared with 61% in the cultures with glucose. In cultures with acetate, WEs were mainly accumulated. Therefore, the proportion of WEs to TAGs produced under nitrogen-limiting conditions is substrate dependent. Additionally, a couple of features of ADP1 were identified: its sensitivity to osmotic upshifts and the simultaneous metabolism of glucose, pyruvate, acetate, and ethanol.

**Acknowledgments** We acknowledge Georgina Hernández-Chávez, Maria E. Rodríguez-Alegría, Alfonso Miranda-Molina, Alejandro Torres, Aurelia González-Guzman, and Manuel Saucedo-Ramírez for technical assistance during the development of this study. We thank Luis Caspeta for critical reading of the manuscript.

**Funding information** This study was financially supported by the Mexican National Council for Science and Technology (CONACYT), FONCICYT ERANet-LAC Grant C0013-248192.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval** This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

## References

- Barbe V, Vallenet D, Fonknechten N, Kreimeyer A, Oztas S, Labarre L, Cruveiller S, Robert C, Duprat S, Wincker P, Ornston LN, Weissenbach J, Marlière P, Cohen GN, Médigue C (2004) Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium. *Nucleic Acids Res* 32:5766–5779. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh910>
- Dal S, Steiner I, Gerischer U (2002) Multiple operons connected with catabolism of aromatic compounds in *Acinetobacter* sp. strain ADP1 are under carbon catabolite repression. *J Mol Microbiol Biotechnol* 4:389–404



- De Berardinis V, Vallet D, Castelli V, Besnard M, Pinet A, Craud C, Samair S, Lechaplais C, Gyapay G, Richez C, Durot M, Kreimeyer A, Le Fèvre F, Schächter V, Pezo V, Döring V, Scarpelli C, Médigue C, Cohen GN, Marlière P, Salanoubat M, Weissenbach J (2008) A complete collection of single-gene deletion mutants of *Acinetobacter baylyi* ADP1. *Mol Syst Biol* 4. <https://doi.org/10.1038/msb.2008.10>
- Dharmadi Y, Murarka A, Gonzalez R (2006) Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. *Biotechnol Bioeng* 94:821–829. <https://doi.org/10.1002/bit.21025>
- Dulaney E, Dulaney D, Rickes E (1968) Factors in yeast extract which relieve growth inhibition of bacteria in defined medium of high osmolarity. *Dev Ind Microbiol* 9:260–269
- Elliot J (1978) Genetics and physiology of *Acinetobacter*. *Annu Rev Microbiol* 32:349–371. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/14/12/123016>
- Filiatrault MJ, Stodghill PV, Wilson J, Butcher BG, Chen H, Myers CR, Cartinhour SW (2013) CrcZ and CrcX regulate carbon source utilization in *Pseudomonas syringae* pathovar tomato strain DC3000. *RNA Biol* 10:245–255. <https://doi.org/10.4161/ma.23019>
- Fixter LM, Nagi MN, McCormack JG, Fewson CA (1986) Structure, distribution and function of wax esters in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Gen Microbiol* 132:3147–3157. <https://doi.org/10.1099/00221287-132-11-3147>
- Folch J, Lees M, Sloane GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226(1):497–509
- Görke B, Stülke J (2008) Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol* 6:613–624. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1932>
- Herman NJ, Bell EJ (1970) Metabolic control in *Acinetobacter* sp. I. Effect of C4 versus C2 and C3 substrates on isocitrate lyase synthesis. *Can J Microbiol* 16:769–774. <https://doi.org/10.1139/m70-130>
- Kalscheuer R, Steinbüchel A (2003) A novel bifunctional wax ester synthase/acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase mediates wax ester and triacylglycerol biosynthesis in *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1. *J Biol Chem* 278:8075–8082. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210533200>
- Kannisto M, Aho T, Karp M, Santala V (2014) Metabolic engineering of *Acinetobacter baylyi* ADP1 for improved growth on gluconate and glucose. *Appl Environ Microbiol* 80:7021–7027. <https://doi.org/10.1128/AEM.01837-14>
- Kannisto MS, Mangayil RK, Shrivastava-Bhattacharya A, Pletschke BI, Karp MT, Santala VP (2015) Metabolic engineering of *Acinetobacter baylyi* ADP1 for removal of *Clostridium butyricum* growth inhibitors produced from lignocellulosic hydrolysates. *Biotechnol Biofuels* 8:1–10. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0389-6>
- Kaplan N, Rosenberg E (1982) Exopolysaccharide distribution of and bioemulsifier production by *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 and BD413. *Appl Environ Microbiol* 44:1335–1341
- Lasko DR, Zamboni N, Sauer U (2000) Bacterial response to acetate challenge: a comparison of tolerance among species. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:243–247. <https://doi.org/10.1007/s002530000339>
- Martinez A, Grabar TB, Shanmugam KT, Yomano LP, York SW, Ingram LO (2007) Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. *Biotechnol Lett* 29:397–404. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9252-y>
- Metzgar D, Bacher JM, Pezo V, Reader J, Döring V, Schimmel P, Marlière P, de Crécy-Lagard V (2004) *Acinetobacter* sp. ADP1: an ideal model organism for genetic analysis and genome engineering. *Nucleic Acids Res* 32:5780–5790. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh881>
- Moreno R, Hernández-Arroz S, La Rosa R, Yuste L, Madhushani A, Shingler V, Rojo F (2015) The Crc and Hfq proteins of *Pseudomonas putida* cooperate in catabolite repression and formation of ribonucleic acid complexes with specific target motifs. *Environ Microbiol* 17:105–118. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12499>
- Patra M, Salonen E, Terama E, Vattulainen I, Faller R, Lee BW, Holopainen J, Karttunen M (2006) Under the influence of alcohol: the effect of ethanol and methanol on lipid bilayers. *Biophys J* 90:1121–1135. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.062364>
- Quiroz-Rocha E, Moreno R, Hernandez-Ortiz A, Fragoso-Jimenez JC, Muriel-Millan LF, Guzman J, Espin G, Rojo F, Nuñez C (2017) Glucose uptake in *Azotobacter vinelandii* occurs through a GluP transporter that is under the control of the CbrA/CbrB and Hfq-Crc systems. *Scientific Reports* 7(858):858. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00980-5>
- Rojo F (2010) Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol Rev* 34:658–684. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00218.x>
- Sand M, De BV, Mingote A, Santos H, Göttig S, Müller V (2011) Salt adaptation in *Acinetobacter baylyi*: identification and characterization of a secondary glycine betaine transporter. *Arch Microbiol* 193:723–730. <https://doi.org/10.1007/s00203-011-0713-x>
- Sand M, Stahl J, Waclawska I, Ziegler C, Averhoff B, Biosciences M, Goethe JW (2014) Identification of an osmo-dependent and an osmo-independent choline transporter in *Acinetobacter baylyi*: implications in osmoprotection and metabolic adaptation. *Environ Microbiol* 16:1490–1502. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12188>
- Santala S, Efimova E, Karp M, Santala V (2011a) Real-time monitoring of intracellular wax ester metabolism. *Microb Cell Fact* 10:1–8. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-75>
- Santala S, Efimova E, Kivinen V, Larjo A, Aho T, Karp M, Santala V (2011b) Improved triacylglycerol production in *Acinetobacter baylyi* ADP1 by metabolic engineering. *Microb Cell Fact* 10:1–10. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-36>
- Scholz A, Stahl J, De BV, Müller V, Averhoff B (2016) Osmotic stress response in *Acinetobacter baylyi*: identification of a glycine – betaine biosynthesis pathway and regulation of osmoadaptive choline uptake and glycine – betaine synthesis through a choline-responsive BetI repressor. *Environ. Microbiol. Rep.* 8:316–322. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12382>
- Sigala JC, Suárez BP, Lara AR, Le Borgne S, Bustos P, Santamaría RI, González V, Martínez A (2017) Genomic and physiological characterization of a laboratory-isolated *Acinetobacter schindleri* ACE strain that quickly and efficiently catabolizes acetate. *Microbiol (United Kingdom)* 163:1052–1064. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000488>
- Sonnleitner E, Abdou L, Haas D (2009) Small RNA as global regulator of carbon catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:21866–21871. <https://doi.org/10.1073/pnas.pnas.0910308106>
- Sturm RN, Herman NJ, Bell EJ (1970) Metabolic control in *Acinetobacter* sp. II. Effect of C4 versus C2 substrates on alpha-ketoglutarate dehydrogenase synthesis. *Can J Microbiol* 16:817–820. <https://doi.org/10.1139/m70-137>
- Taylor WH, Juni E (1961) Pathways for biosynthesis of a bacterial capsular polysaccharide I. Characterization of the organism and polysaccharide. *J Bacteriol* 81:688–693
- van Schie BJ, Rouwenhorst RJ, de Bont JAM, van Dijken JP, Kuenen JG (1987) An in vivo analysis of the energetics of aldose oxidation by *Acinetobacter calcoaceticus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 26:560–567. <https://doi.org/10.1007/BF00253033>

- Van Schie BJ, Rouwenhorst RJ, Van Dijken JP, Kuenen JG (1989) Selection of glucose-assimilating variants of *Acinetobacter calcoaceticus* LMD 79.41 in chemostat culture. *Antonie Van Leeuwenhoek* 55:39–52. <https://doi.org/10.1007/BF02309618>
- Wältermann M, Steinbüchel A (2005) Neutral lipid bodies in prokaryotes: recent insights into structure, formation, and relationship to eukaryotic lipid depots. *J Bacteriol* 187:3607–3619. <https://doi.org/10.1128/JB.187.11.3607-3619.2005>
- Wältermann M, Stöveken T, Steinbüchel A (2007) Key enzymes for biosynthesis of neutral lipid storage compounds in prokaryotes: properties, function and occurrence of wax ester synthases/acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferases. *Biochimie* 89:230–242. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.07.013>
- Wood JM (2011) Osmotic stress. In: *Bacterial stress responses*. American Society of Microbiology, pp 133–144
- Wood JM, Rosenthal AZ, Gralla J, Greie J-C, Booth IR, Altendorf K (2009) Osmotic stress. *EcoSal Plus* 3. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.5.4.5>
- Zhao X, Zhang L, Liu D (2012) Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels, Bioprod Biorefining* 6:465–482. <https://doi.org/10.1002/bbb.1331>
- Zimmermann T, Sorg T, Siehler SY, Gerischer U (2009) Role of *Acinetobacter baylyi* crc in catabolite repression of enzymes for aromatic compound catabolism. *J Bacteriol* 191:2834–2842. <https://doi.org/10.1128/JB.00817-08>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.