

UdelaR - Facultad de Ciencias

PEDECIBA - Biología

Sub Área Microbiología

Tesis de Maestría

2015

**Estudio del metabolismo de xilosa en
Herbaspirillum seropedicae Z69
orientado a optimizar la producción de
poli-3-hidroxibutirato**

Ana Karen Malan Courdin

Orientadora: Dra. Silvia Batista

Tribunal: Dr. Luis Acerenza

Orientadora (ANII): Mag. Ana Inés Catalán

Dr. Raúl Platero

Dra. Fernanda Azpiroz

Unidad de Microbiología Molecular, Departamento de Bioquímica y Genómica
Microbianas, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)
Montevideo, Uruguay

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que contribuyen a que este trabajo sea posible:

- a Silvia y a Ana Inés por aceptar ser mis orientadoras, por darme, una vez más, la oportunidad de continuar trabajando con ellas; por haber confiado en mí y por todo su apoyo, dedicación y comprensión.
- a toda la gente del laboratorio: María, Mini, Célica, Susana, Maria Lis, Laura, Dani S., Dani C., Ceci T., Ceci Delo, Cintia, la Rubia, Vanessa, Fernanda, Inés, Vero, Arianne, Paula, Fede R., Manuel, Nacho y a todos los que me estoy olvidando, por su apoyo y compañía, no sólo en lo que a trabajo se refiere.
- Al Prof. José Gregorio Cabrera Gómez por recibirme en su laboratorio y darme la oportunidad de hacer los ensayos en biorreactor.
- A Karel por dedicar su tiempo libre a enseñarme a usar COBRA a las 9pm después de largas jornadas de congreso y por ayudarme con los ensayos enzimáticos en el laboratorio de Bioproductos, USP.
- Y a toda la gente de los laboratorios 148 y 172 del Laboratorio de Bioproductos, Departamento de Microbiología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad de San Pablo, por acompañarme durante largas noches de ensayos en biorreactor, por ayudarme y apoyarme en todos mis experimentos, locuras y hazañas...
- A Magdalena por las fructíferas charlas sobre flujos metabólicos y otras esencias de la vida.

A los que financiaron este proceso:

- A la ANII por la beca de postgrado.
- A PEDECIBA-Biología por la financiación para la pasantía y las alcúotas que siempre son bien aprovechadas.

Finalmente quiero agradecer a Joako por su paciencia, por su continuo apoyo, por continuar a mi lado y continuamente aguantarme la cabeza. A mis amigos/as y a mi familia que siempre son necesarios para completar nuestras vidas. A mi hermano Agustín por escuchar mis presentaciones y por las largas charlas científicas.

RESUMEN

Herbaspirillum seropedicae Z69 es una β -Proteobacteria capaz de crecer en xilosa y acumular más del 50% de su peso seco como poli-3-hidroxibutirato (PHB). El PHB tiene propiedades termoplásticas, es biodegradable, biocompatible y puede producirse a partir de fuentes renovables. La producción del PHB es más costosa que la de los plásticos convencionales. Se estima que una posible estrategia para abaratar el proceso implica el uso de fuentes carbonadas de bajo costo como la hemicelulosa hidrolizada, residuo rico en xilosa, proveniente de la biomasa vegetal y ampliamente distribuido.

Con el objetivo de optimizar la producción de PHB por *H. seropedicae* Z69 a partir de hemicelulosa hidrolizada, se propuso construir una red del metabolismo central y analizarla mediante análisis de balance de flujos (FBA). Para determinar cuáles son las rutas que participan en el catabolismo de D-xilosa en *H. seropedicae* Z69 se desarrolló una estrategia que implicó la búsqueda *in silico* de genes candidatos a codificar para enzimas involucradas en el catabolismo de xilosa en *H. seropedicae* SmR1 y mediciones *in vitro* de las actividades enzimáticas involucradas en estas rutas. Basados en estos resultados se construyó una colección de mutantes *knock-out* de la cepa Z69 en uno o más genes.

El mutante *fabG* (*Hsero_4497*) (codificaría para una xilosa deshidrogenasa de la ruta de Weimberg, XDH), presentó una velocidad de crecimiento un 50% menor comparado con la cepa salvaje al crecer en xilosa como única fuente carbonada. Asimismo, este mutante presentó una drástica reducción de la actividad XDH comparada con la cepa salvaje.

Los extractos de Z69 cultivada con xilitol exhibieron actividad xilitol deshidrogenasa (XOLDH) (ruta oxo-reductiva), mientras que la misma estuvo ausente en extractos de Z69 cultivada con xilosa o glucosa. Sin embargo, los extractos de *Z69 Δ fabG* cultivada en xilosa presentaron actividad XOLDH significativamente mayor que la de la cepa salvaje en las mismas condiciones. Esto sugeriría que la ruta oxo-reductiva se expresaría cuando la ruta de Weimberg es disfuncional. Para validar esta hipótesis se construyeron mutantes en el ORF *Hsero_3396* (candidato a codificar para XOLDH) derivados de la cepa salvaje y de *Z69 Δ fabG*. Estos mutantes se comportaron igual que sus cepas parentales, indicando que este ORF no codificaría para la XOLDH o que hay otras enzimas que son capaces de suplir esta función sin afectar el fenotipo.

Con los datos disponibles se construyó una red del metabolismo carbonado central de *H. seropedicae* incluyendo 110 reacciones y 82 metabolitos. Se realizó FBA con las restricciones experimentales obtenidas de cultivos en lote y lote alimentado de las cepas Z69 y *Z69 Δ fabG* cultivadas con xilosa como única fuente carbonada. Con este análisis no se pudo reproducir exactamente el crecimiento o la producción de PHB determinadas en la cepa salvaje, indicando que faltarían considerar reacciones en esta red, que hay limitaciones mal impuestas o que la ecuación de biomasa no es la adecuada.

En cultivos en lote alimentado la cepa Z69 alcanzó un máximo contenido de PHB de 53% y una biomasa total de 5,32g/l, mientras que en las mismas condiciones, la cepa *Z69 Δ fabG* llegó a 5,44g/l de biomasa total y un contenido del 55%.

Según los datos experimentales y calculados con FBA, el mutante *Z69 Δ fabG* emplearía principalmente la ruta oxo-reductiva para catabolizar xilosa y sería más eficiente que la cepa salvaje, que utilizaría la ruta de Weimberg.

INDICE

RESUMEN	3
INDICE.....	4
INDICE DE FIGURAS	8
INDICE DE TABLAS	10
ABREVIACIONES	11
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 Polihidroxicanoatos	12
1.1.1 Biosíntesis.....	13
1.1.2 Propiedades físicas.....	14
1.1.3 Propiedades de los PHAs como material plástico	15
1.1.4 Aplicaciones.....	16
1.1.5 Producción industrial de PHAs	16
1.1.6 Producción de PHAs usando sustratos de bajo costo	17
1.2 Biomasa lignocelulósica.....	18
1.3 Metabolismo de xilosa en microorganismos	19
1.3.1 Ruta oxo-reductiva	20
1.3.2 Ruta de la D-xilosa isomerasa	20
1.3.3 Rutas de Weimberg y Dahms.....	22
1.4 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	23
1.4.1 Metabolismo carbonado	24
1.4.2 Síntesis de PHAs por <i>H. seropedicae</i> Z69	27
1.5 Ingeniería metabólica y biología de sistemas	28
1.5.1 Representación matemática del metabolismo	28
1.5.2 Análisis de balance de flujos (<i>FBA de flux balance analysis</i>).....	30
2. HIPÓTESIS.....	33
3. OBJETIVO GENERAL.....	33
3.1 Objetivos específicos.....	33
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
4.1 Bacteria, plásmidos y medios de cultivo	34
4.2 Construcción de mutantes de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z69 en los genes de interés..	36

4.2.1 <i>cross-over</i> PCR	37
4.2.2 Clonado en vector pCR2.1-TOPO	40
4.2.3 Subclonado en <i>pk18mobsacB</i>	41
4.2.4 Mutagénesis del gen de interés en <i>H. seropedicae</i> Z69.....	41
4.3 Ensayo de complementación de función	42
4.3.1 Vector de amplio espectro pBBR1MSC-2.....	42
4.3.2 Vector de espectro reducido <i>pk18mobsacB</i>	43
4.4 Curvas de crecimiento.....	43
4.5 Medidas de actividades enzimáticas.....	44
4.6 Perfil de crecimiento y acumulación de PHB en Erlenmeyer.....	45
4.6.1 Determinaciones analíticas	46
4.7 Cultivos en lote y lote alimentado en fermentador	46
4.7.1 Determinaciones analíticas	47
4.7.2 Cálculos	48
4.8 Construcción de la red metabólica y análisis de balance de flujos	48
5. RESULTADOS	50
5.1 Identificación de genes y vías metabólicas implicadas en el catabolismo de xilosa.....	50
5.2 Construcción de las cepas mutantes.....	50
5.2.1 Complementación de función del mutante <i>Z69ΔfabG</i>	53
5.3 Evaluación del crecimiento en diferentes fuentes de carbono de las cepas mutantes....	57
5.3.1 Mutante en el gen <i>fabG</i>	57
5.3.1.1 Complementación de función en <i>Z69ΔfabG</i>	58
5.3.2 Mutantes en el gen <i>Hsero_1671</i>	59
5.3.3 Mutantes en el gen <i>Hsero_4498</i>	60
5.3.4 Mutante en el gen <i>ilvD</i>	61
5.3.5 Mutantes en el gen <i>Hsero_3396</i>	62
5.4 Determinaciones enzimáticas	63
5.4.1 Especificidad de sustrato de la enzima xilosa deshidrogenasa.....	65
5.5 Obtención de datos experimentales y reconstrucción de la red metabólica	66
5.5.1 Obtención de datos experimentales en estado <i>pseudo-</i> estacionario.....	66
5.5.1.1 Cultivo en lote en Erlenmeyer.....	66
5.5.1.2 Cultivo en lote de la cepa salvaje de <i>H. seropedicae</i> Z69.....	67

5.5.1.3 Cultivo en lote del mutante Z69 Δ <i>fabG</i>	68
5.5.1.4 Cultivo en lote alimentado de <i>H. seropedicae</i> Z69	70
5.5.1.5 Cultivo en lote alimentado del mutante Z69 Δ <i>fabG</i>	72
5.5.2 Construcción de la red metabólica.....	74
5.5.3 Ajuste de la red metabólica a los datos experimentales	74
5.5.4 Predicción de mutaciones	82
6. DISCUSIÓN.....	84
6.1 Elucidación de las rutas implicadas en el catabolismo de xilosa y validación mediante el análisis fenotípico de mutantes en genes clave.....	84
6.1.1 Xilosa deshidrogenasa	84
6.1.1.1 Complementación del mutante Z69 Δ <i>fabG</i>	86
6.1.2 Glucosa deshidrogenasa.....	86
6.1.3 Xilitol deshidrogenasa	87
6.1.4 Xilonato deshidratasa	88
6.2 Análisis de balance de flujos	89
6.2.1 Reconstrucción de la red metabólica.....	89
6.2.2 FBA restringido con datos experimentales	90
6.2.3 Elección de la función objetivo	94
6.2.4 Predicción de mutaciones	95
6.3 Análisis de parámetros de cultivo y de la síntesis de PHB en cepas Z69 y Z69 Δ <i>fabG</i> cultivadas en presencia de xilosa como única fuente de carbono.....	95
6.3.1 Cultivos en lote en Erlenmeyer	95
6.3.2 Cultivo en lote de la cepa salvaje de <i>H. seropedicae</i> Z69 en fermentador	96
6.3.3 Cultivo en lote de la cepa mutante Z69 Δ <i>fabG</i> en fermentador.....	97
6.3.4 Cultivos en lote alimentado	99
7. CONCLUSIONES	101
8. PERSPECTIVAS	102
9. REFERENCIAS.....	103
10. Anexos	113
10.1 Medios de cultivo y soluciones utilizadas	113
10.2 Técnicas de Biología Molecular	114
10.2.1 Lisados celulares.....	114

10.2.2 Electroforesis en gel de agarosa	115
10.2.3 Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	116
10.2.4 Transformación de <i>E. coli</i> TOP10 competentes	116
10.2.5 Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina	116
10.2.6 Conjugación triparental.....	117
10.3 Análisis de PHB	118
10.3.1 Propanólisis	118
10.3.2 Condiciones del ensayo cromatográfico en GC-FID	118
10.4 Cálculos de velocidades específicas para cada estado <i>pseudo</i> -estacionario en cultivos en lote	118
10.4.1 <i>H. seropedicae</i> Z69	118
10.4.2 Z69 Δ <i>fabG</i>	121
10.5 Red metabólica.....	123

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura general de los polihidroxicanoatos.	13
Figura 2: Ruta de biosíntesis de P(HB-HV) y de PHB.....	14
Figura 3: Ruta oxo-reductiva (azul) y ruta de la xilosa isomerasa (verde).....	20
Figura 4: Organización del operón <i>xyl</i> en <i>E. coli</i> K12 y en diferentes especies de <i>Burkholderia</i> y <i>Pseudomonas</i>	21
Figura 5: Esquema de las rutas oxidativas descritas para el catabolismo de xilosa en diversos microorganismos	22
Figura 6: Organización de los genes involucrados en la degradación de xilosa en diferentes microorganismos.	23
Figura 7: Ruta involucrada en el metabolismo de L-arabinosa en <i>H. seropedicae</i>	25
Figura 8: Genes de <i>H. seropedicae</i> SmR1 que codificarían para enzimas claves del metabolismo de xilosa.	25
Figura 9: Procedimiento para llevar a cabo un análisis de balance de flujos.	31
Figura 10: Mapas de los vectores utilizados en este trabajo.....	35
Figura 11: Procedimiento llevado a cabo para la construcción de los mutantes.	36
Figura 12: <i>Cross-over</i> PCR.....	37
Figura 13: Electroforesis en gel de agarosa en donde se evidencian los fragmentos de ADN obtenidos en las reacciones de PCR realizadas para construir el mutante Z69Δ <i>fabG</i>	52
Figura 14: Electroforesis en gel de agarosa del PCR3 utilizado para diferenciar los clones salvajes (<i>wt</i>) de los mutantes Z69Δ <i>fabG</i> luego de la inducción del doble evento de recombinación.	53
Figura 15: Electroforesis en gel de agarosa en donde se visualizan los fragmentos de ADN obtenidos por la reacción de PCR dirigida para amplificar la copia salvaje del gen <i>fabG</i>	54
Figura 16: Comprobación de la orientación del gen <i>fabGwt</i> clonado en el vector pBBR1MSC-2.	54
Figura 17: (A) Posibles eventos de recombinación que pueden ocurrir entre pK18 <i>mobsacB:fabGwt</i> y el genoma de Z69Δ <i>fabG</i>	56
Figura 18: Curvas de crecimiento de la cepa salvaje de <i>H. seropedicae</i> Z69 y del mutante Z69Δ <i>fabG</i>	57
Figura 19: Curvas de crecimiento de la cepa salvaje de <i>H. seropedicae</i> Z69, del mutante Z69Δ <i>fabG</i> y de las cepas complementadas.....	58
Figura 20: Curvas de crecimiento de la cepa salvaje de <i>H. seropedicae</i> Z69 y de los mutantes Z69Δ <i>fabG</i> , Z69Δ <i>Hsero_1671</i> y Z69Δ <i>fabG</i> Δ <i>Hsero_1671</i>	59
Figura 21: Perfil de crecimiento de la cepa salvaje de <i>H. seropedicae</i> Z69, y de los mutantes Z69Δ <i>fabG</i> , Z69Δ <i>Hsero_4498</i> y Z69Δ <i>fabG</i> Δ <i>Hsero_4498</i>	60
Figura 22: Perfil de crecimiento de la cepa salvaje de <i>H. seropedicae</i> Z69, y de los mutantes Z69Δ <i>fabG</i> , Z69Δ <i>Hsero_4498</i> y Z69Δ <i>ilvD</i>	61
Figura 23: Perfil de crecimiento de los mutantes en el ORF <i>Hsero_3396</i> , candidato a codificar para la enzima xilitol deshidrogenasa	62
Figura 24: Actividad xilosa deshidrogenasa y xilitol deshidrogenasa	63
Figura 25: Especificidad de sustrato de la enzima xilosa deshidrogenasa.	65
Figura 26: Perfil de crecimiento y acumulación de PHB por la cepa salvaje y mutante Z69Δ <i>fabG</i> crecidos en Erlenmeyer con agitación orbital y medio LGI con 30g/l de xilosa inicial.	66
Figura 27: Perfil de crecimiento, acumulación de PHB y consumo de xilosa y amonio en <i>H. seropedicae</i> Z69 salvaje.	67
Figura 28: Perfil de crecimiento, acumulación de PHB y consumo de xilosa y amonio en el mutante Z69Δ <i>fabG</i> durante un cultivo en lote realizado en biorreactor.....	69
Figura 29: Cultivo en lote alimentado limitado en NH ₄ ⁺ de la cepa salvaje <i>H. seropedicae</i> Z69	70
Figura 30: Cultivo en lote alimentado limitado en NH ₄ ⁺ del mutante Z69Δ <i>fabG</i>	72
Figura 31: Distribución de flujos para <i>H. seropedicae</i> Z69 crecida en cultivos en lote	76

Figura 32: Distribución de flujos calculada utilizando FBA y los datos experimentales de consumo de xilosa encontrados en el segundo estado (izquierda) y el tercer estado (derecha) <i>pseudo</i> -estacionario del cultivo en lote de la cepa mutante Z69 Δ <i>fabG</i>	78
Figura 33: Velocidades específicas de crecimiento para cada punto del cultivo en lote alimentado de la cepa salvaje de <i>H. seropedicae</i> Z69.	79
Figura 34: Velocidades específicas de producción de PHB para cada punto del cultivo en lote alimentado de la cepa salvaje de <i>H. seropedicae</i> Z69.....	80
Figura 35: Velocidades específicas de crecimiento para cada punto del cultivo en lote alimentado del mutante Z69 Δ <i>fabG</i>	81
Figura 36: Velocidades específicas de síntesis de PHB para cada punto del cultivo en lote alimentado del mutante Z69 Δ <i>fabG</i>	82
Figura 37: Marcadores de peso molecular utilizados en las electroforesis en gel de agarosa.....	115
Figura 38: Gráficos de ajuste lineal realizados para calcular las velocidades específicas del cultivo en lote de la cepa salvaje de <i>H. seropedicae</i> Z69, en donde se encontraron dos estados <i>pseudo</i> -estacionarios caracterizados por la misma tasa de crecimiento, consumo de xilosa y amonio, pero con diferentes velocidades de producción de PHB.	119
Figura 39: Ajuste de los datos empleados para calcular las velocidades específicas en el estado <i>pseudo</i> -estacionario entre las 12 y 18 horas del cultivo en lote de la cepa salvaje de <i>H. seropedicae</i> Z69.	120
Figura 40: Ajustes de los datos para calcular las velocidades específicas correspondientes al primer estado <i>pseudo</i> -estacionario (4 a 10horas) del cultivo en lote del mutante Z69 Δ <i>fabG</i>	121
Figura 41: Ajustes de los datos para calcular las velocidades específicas correspondientes al segundo estado <i>pseudo</i> -estacionario (11 a 15,5 horas) del cultivo en lote del mutante Z69 Δ <i>fabG</i>	122
Figura 42: Ajustes de los datos para calcular las velocidades específicas correspondientes al tercer estado <i>pseudo</i> -estacionario (18,5 a 27,5 horas) encontrado en el cultivo en lote del mutante Z69 Δ <i>fabG</i>	123

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Propiedades de diferentes PHAs y de plásticos convencionales derivados del petróleo. Extraído de Castilho et al. (2009).	15
Tabla 2: Aplicaciones de los PHAs.	16
Tabla 3: Datos de producción de PHAs utilizando diferentes biomásas lignocelulósicas hidrolizadas.	18
Tabla 4: Composición de los hidrolizados de bagazo de caña de azúcar luego de ser sometidos a diferentes condiciones de pre- tratamiento con ácido sulfúrico (0,75% pH 1,1).	19
Tabla 5: Genes de <i>H. seropedicae</i> que codificarían para enzimas claves de las rutas del catabolismo de xilosa descritas en otros microorganismos (Malan 2011).	26
Tabla 6: Usos y aplicaciones del análisis de balance de flujos.....	32
Tabla 7: Cepas bacterianas y plásmidos utilizadas en este trabajo.....	34
Tabla 8: Cebadores diseñados para la construcción de los mutantes por <i>cross-over</i> PCR.....	39
Tabla 9: Temperatura de hibridación (°C) empleada en cada PCR para cada gen.	40
Tabla 10: Tamaño esperado, en pares de bases, de cada fragmento amplificado por cada reacción de PCR.....	40
Tabla 11: Mutantes construidos en este trabajo. En la columna de la derecha se nombra la presunta enzima que codificaría cada gen y entre paréntesis la ruta de degradación de xilosa en la que participaría.....	51
Tabla 12: Actividades enzimáticas	64
Tabla 13: Velocidades específicas de cada estado <i>pseudo</i> -estacionario encontrados en el cultivo en lote realizado en biorreactor con la cepa salvaje de <i>H. seropedicae</i> Z69.	68
Tabla 14: Velocidades específicas de cada estado <i>pseudo</i> -estacionario encontrados en el cultivo en lote realizado en biorreactor con el mutante Z69 Δ <i>fab</i>	69
Tabla 15: Velocidades específicas para cada punto del cultivo en lote alimentado de la cepa salvaje de <i>H. seropedicae</i> Z69.	71
Tabla 16: Velocidades específicas calculadas para cada momento del cultivo en lote alimentado de la cepa mutante Z69 Δ <i>fabG</i>	73
Tabla 17: Procedimiento para calcular las velocidades específicas dependiendo del tipo de cultivo y de la fase de crecimiento.	121
Tabla 18: Red metabólica de <i>H. seropedicae</i> Z69 utilizada en este trabajo.	124
Tabla 19: Metabolitos y sus abreviaciones de la red metabólica de <i>H. seropedicae</i>	131

ABREVIACIONES

COBRA = Reconstrucción y análisis basado en restricciones (*CO*nstraints *B*ased *R*econstruction *a*nd *A*nalysis)

DCIP = 2,6-diclorofenil indofenol

FBA = Análisis de balance de flujos (*F*lux *B*alance *A*nalysis)

HB = 3-hidroxi-butirato

HV = 3-hidroxi-valerato

4HV = 4-hidroxi-valerato

Km = kanamicina (antibiótico)

Nal = ácido nalidíxico (antibiótico)

PCR = Reacción en cadena de la polimerasa

PHV=poli-3-hidroxi-valerato

P(HB-HV) = copolímero con unidades de HB y HV

PHAs = polihidroxi-alcanoatos

PHB = poli-3-hidroxi-butirato

PMS = metasulfato de fenacina

PQQ = pirroloquinolina quinona

XDH = xilosa deshidrogenasa

Xgal = 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

XOLDH = xilitol deshidrogenasa

Xr = biomasa residual

Xt = biomasa

1. INTRODUCCIÓN

Los materiales plásticos obtenidos a partir de combustibles fósiles han sido incorporados en casi todos los ámbitos de nuestra vida diaria. Los plásticos se usan para producir envases, utensilios del hogar y partes de maquinarias de distinto porte. La variabilidad en el precio del petróleo y el previsto agotamiento de sus reservas, ha promovido el interés por parte de la industria y la comunidad por reconsiderar su reemplazo por productos fabricados a partir de fuentes renovables de energía. Además, el cambio climático y los problemas ambientales asociados alertan sobre la necesidad de modificar la producción a procesos más sustentables y cambiar los plásticos por materiales biodegradables. Así, han surgido varios “polímeros verdes”, entre ellos los polímeros de origen bacteriano conocidos genéricamente como polihidroxicanoatos (PHAs) (FitzPatrick et al. 2010)(Leong et al. 2014).

1.1 Polihidroxicanoatos

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son polímeros constituidos por monómeros de hidroxiaácidos unidos por enlaces éster. Su estructura general se muestra en la Figura 1. Estos compuestos son sintetizados naturalmente por diversos microorganismos como reserva de fuente de carbono, energía y poder reductor. Se acumulan en el citoplasma en forma de gránulos (Leong et al. 2014)(Madison & Huisman 1999). Estos compuestos de reserva contribuyen a la supervivencia de la célula en condiciones de escasez de nutrientes. A su vez, se ha observado que las bacterias que contienen gránulos de PHAs presentan una mayor tolerancia al estrés generado por agresiones medioambientales como la exposición a la luz ultravioleta, calor o shock osmótico (Tan et al. 2014).

Las bacterias productoras de PHAs se pueden clasificar en dos grupos de acuerdo a las condiciones de cultivo que necesitan para la acumulación del polímero. El primer grupo requiere la limitación de un nutriente esencial como el nitrógeno, fósforo u oxígeno disuelto (O₂) y un exceso de fuente carbonada. En este grupo se encuentran más de 300 especies de bacterias Gram negativas y Gram positivas, de los géneros *Cupriavidus*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Enterobacter* y *Rhodobacter*, así como también algunas cianobacterias y arqueas halófilas. El segundo grupo incluye a los organismos que acumulan el polímero durante todo el crecimiento y no necesitan limitación de nutrientes, como lo son *Alcaligenes latus*, *Alcaligenes eutrophus*, *Azotobacter vinelandii* y cepas recombinantes de *Escherichia coli* (Leong et al. 2014).

De acuerdo a su estructura química, los PHAs se pueden clasificar en dos grandes grupos. Los PHAs de cadena corta están compuestos por hidroxiaácidos de 3 a 5 átomos de carbono. Dentro de este grupo se encuentra el poli-3-hidroxi butirato (PHB), el poli-3-hidroxi valerato (PHV) y el copolímero P(HB-HV). El PHB fue el primer PHA en ser identificado y ha sido el más estudiado hasta el momento. Cuando los hidroxiaácidos componentes contienen más de 6 átomos de carbono, los polímeros se denominan PHAs de cadena media (Castilho et al. 2009)(Leong et al. 2014).

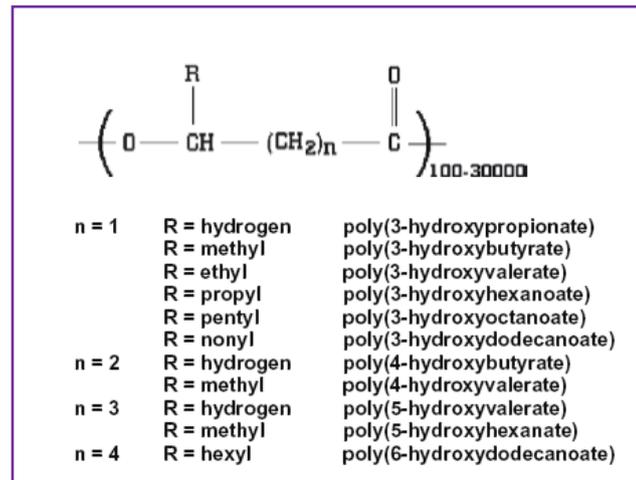


Figura 1: Estructura general de los polihidroxicanoatos. Extraído de Castilho et al. (2009).

1.1.1 Biosíntesis

La composición monomérica de los PHAs depende del sustrato carbonado aportado al medio de cultivo, del metabolismo y especificidad de la enzima que polimeriza los monómeros (PHA sintasa) presentes en el microorganismo productor (Madison & Huisman 1999).

Se han descrito varias rutas para la biosíntesis de PHAs (Tan et al. 2014). En la Figura 2 se muestra la ruta clásica de síntesis de PHB que se encuentra en diversos microorganismos incluyendo *Herbaspirillum seropedicae* (Catalán et al. 2007). El acetil-CoA es la molécula clave en esta ruta que consiste en tres reacciones secuenciales. En la primer reacción, catalizada por la enzima 3-cetotiolasa, dos moléculas de acetil-CoA se condensan formando una molécula de acetoacetil-CoA. En una segunda reacción, el acetoacetil-CoA es reducido a 3-hidroxiacetil-CoA por medio de la acción de la acetoacetil-CoA reductasa (NADPH-dependiente). Finalmente, se lleva a cabo la polimerización de los monómeros 3-hidroxiacetil-CoA, reacción catalizada por la PHB sintasa, produciendo PHB (Catalán et al. 2007)(Madison & Huisman 1999)(Laycock et al. 2014).

Cuando se incorpora ácido propiónico o ácido valérico en un medio que contiene glucosa como fuente de carbono, algunos microorganismos son capaces de producir el copolímero P(HB-HV). En este caso, una molécula de acetil-CoA es condensada con una de propionil-CoA, mediante la reacción catalizada por una enzima 3-cetotiolasa con diferente especificidad por el sustrato que la 3-cetotiolasa involucrada en la ruta de síntesis de PHB (Madison & Huisman 1999). Luego el 3-cetovaleril-CoA es reducido a 3-hidroxi-valeril-CoA en una reacción catalizada por la misma enzima acetoacetil-CoA reductasa de la ruta de síntesis del PHB. Finalmente, la reacción de polimerización es llevada a cabo por otra PHA sintasa (Laycock et al. 2014).

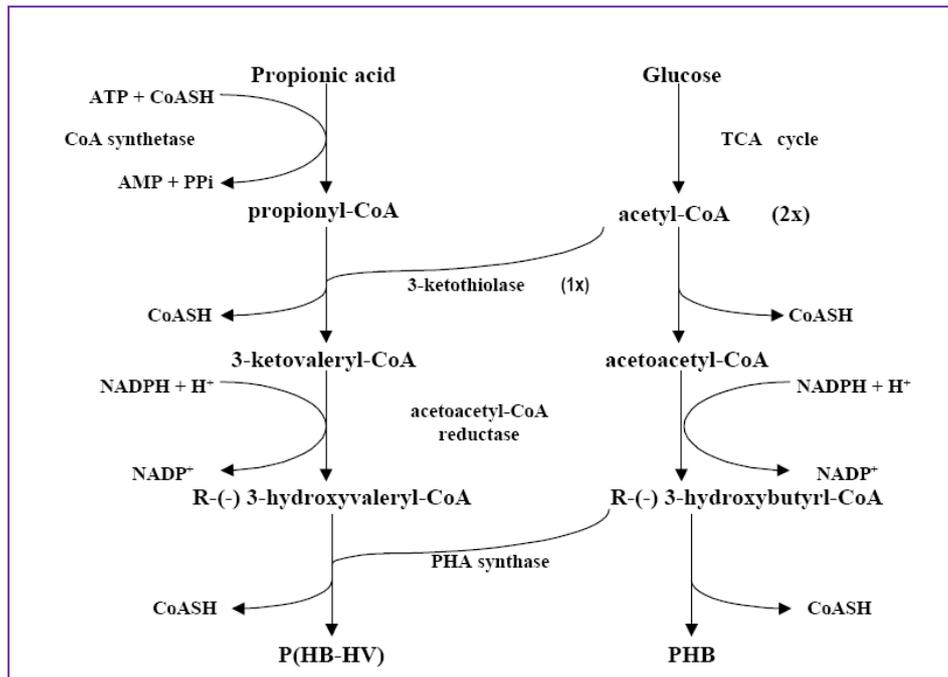


Figura 2: Ruta de biosíntesis de P(HB-HV) y de PHB. Extraído de Ojumu et al. (2004).

En aquellos microorganismos que sintetizan PHAs de cadena media, los hidroxiaxil-CoA monoméricos se obtienen a partir de rutas no específicas para la síntesis de éstos polímeros. Estos intermediarios provienen tanto de la vía de β -oxidación (ruta de degradación de ácidos grasos) y/o de la ruta de biosíntesis *de novo* de ácidos grasos (Tan et al. 2014).

1.1.2 Propiedades físicas

Los PHAs son insolubles en agua y presentan propiedades termoplásticas y/o elastoméricas. Las mismas varían considerablemente dependiendo de la composición monomérica del polímero. El largo de cadena de los monómeros que los constituyen influye en la hidrofobicidad, la temperatura de fusión, la temperatura de transición vítrea y el grado de cristalinidad del polímero (Castilho et al. 2009)(Leong et al. 2014).

Dentro de la célula, el PHB se presenta en un estado amorfo y fluido, pero luego de extraído se vuelve altamente cristalino. Esta alta cristalinidad lo vuelve poco flexible y quebradizo. Su temperatura de fusión es de 175-180°C y se descompone a una temperatura muy cercana (200°C), lo que impone algunas limitantes a la hora de su procesamiento a nivel industrial (Leong et al. 2014)(Madison & Huisman 1999).

Las propiedades físicas del PHB se pueden mejorar cuando se incorporan unidades de 3-hidroxivalerato. De ésta manera el copolímero P(HB-HV) posee una temperatura de fusión menor que el PHB, brindando así más posibilidades para su procesamiento térmico sin que se degrade el polímero (Madison & Huisman 1999). Otra posibilidad de mejorar las propiedades mecánicas del PHB es mediante la mezcla de este biopolímero con otros materiales

biodegradables sintéticos (El-Hadi et al. 2002). Estas propiedades adquieren una gran importancia cuando se evalúan sus aplicaciones comerciales (ver Tabla 1).

Los PHAs de cadena media, como por ejemplo el poli-3-hidroxi octanoato, poseen un menor nivel de cristalinidad y son más elásticos en comparación con el PHB y el P(HB-HV) (Madison & Huisman 1999).

En la Tabla 1 se muestran las propiedades de diferentes PHAs y de polímeros derivados del petróleo utilizados convencionalmente.

Tabla 1: Propiedades de diferentes PHAs y de plásticos convencionales derivados del petróleo.
Extraído de Castilho et al. (2009).

Polímero	Temperatura de fusión (°C)	Módulo de Young (GPa)	Resistencia a la tracción (MPa)	Porcentaje de elongación a la ruptura (%)
PHB	175- 180	3,5- 4,0	40	3-8
P(HB-HV) (3 mol% HV)	170	2,9	38	n.d.
P(HB-HV) (20 mol% HV)	145	1,2	32	50-100
P(3HB-co-4HV) (3 mol% 4HV)	166	n.d.	28	45
P(3HB-co-4HV) (10 mol% 4HV)	159	n.d.	24	242
Poli-3-hidroxi octanoato	61	n.d.	6- 10	300- 450
Polipropileno isotáctico (iPP)	170-176	1,0- 1,7	29,3- 38,6	500- 900
Poli etileno de alta densidad (HDPE)	112- 132	0,4- 1,0	17,9- 33,1	12-700
Poli etileno de baja densidad (LDPE)	88- 100	0,05- 0,1	15,2- 78,6	150- 600
Poli estireno (PS)	80- 110	3,0-3,1	50	3- 4
Nylon-6,6	265	2,8	83	60

n.d.: datos no disponibles.

1.1.3 Propiedades de los PHAs como material plástico

Los PHAs son biodegradables, pudiéndose descomponer rápidamente (3-9 meses) a H₂O y CO₂ en condiciones aeróbicas o a metano en condiciones anaeróbicas, por una gran variedad de microorganismos en diversos ecosistemas (Leong et al. 2014).

Son biocompatibles, enantioméricamente puros, no tóxicos, insolubles en agua, inertes, estables, con una gran diversidad estructural, por lo que tienen un gran potencial en el campo médico (Leong et al. 2014).

Otra propiedad importante de estos materiales de origen biológico es la posibilidad de ser producidos a partir de recursos renovables, sin requerir combustibles fósiles. La generación de PHAs a nivel industrial utiliza, en general, productos derivados de vegetales como fuente de carbono (Liguori et al. 2013). Debido a esto, su síntesis y biodegradación son compatibles con el ciclo del carbono (Verlinden et al. 2007).

1.1.4 Aplicaciones

Las perspectivas de uso de los PHAs no pretenden sustituir a los plásticos convencionales totalmente. Las aplicaciones más interesantes tienen en cuenta su biodegradabilidad, biocompatibilidad y la posibilidad de utilizar sustratos renovables en su producción. En la Tabla 2 se muestran algunas aplicaciones.

Tabla 2: Aplicaciones de los PHAs.

Aplicaciones	Referencia
Medicina y farmacia:	(Leong et al. 2014)
- Ortopedia (tornillos, sustitución de hueso y cartílago)	
- Dispositivos para el sistema cardiovascular	
- Tratamiento de heridas (sustitutos de piel, suturas)	
- Sondas urológicas	(O'Connor et al. 2013)
- Nano y micro-esferas para la aplicación controlada de drogas	
- Actividad anticancerígena	
A nivel industrial:	(Bugnicourt et al. 2014)
- Envoltorios para alimentos, cosméticos, etc	
- Productos convencionales: botellas, utensilios, redes de pesca, productos sanitarios, etc.	(Koller et al. 2010)
- Fibras textiles	(Yogesh et al. 2012)
- Precursores para síntesis química de compuestos ópticamente puros, como vitaminas, antibióticos, feromonas y compuestos aromáticos	
- Películas de PHA para cubrir tarjetas de crédito u otros documentos	
- Papel sintético	
- Aditivos para alimentos	
En el agro:	(Yogesh et al. 2012)
- Tutores y soportes para plantines de árboles o plantas	
- Tubos de riego que se utilizan sólo una estación	
- Materiales para la distribución más lenta de herbicidas, pesticidas o fertilizantes en el suelo	
- Potencial suplemento alimenticio para animales	

1.1.5 Producción industrial de PHAs

El primer intento de producción industrial de PHB estuvo a cargo de la North–American Company W.R. Grace Co. en la década de 1950. En los años 70', Imperial Chemical Industries (ICI, Reino Unido) comenzó a producir PHAs bajo la marca comercial de Biopol. Años después, las patentes fueron vendidas a Zeneca, luego a Monsanto y ahora son propiedad de Metabolix Inc. (EEUU). Actualmente, esta compañía produce, bajo la marca comercial Mirel, 50.000 toneladas de PHAs por año (Castilho et al. 2009). La producción se desarrolla mediante fermentación microbiana a gran escala, a partir de azúcar como fuente de carbono (www.mirelplastics.com).

La compañía alemana Biomer produce PHAs a pequeña escala (Castilho et al. 2009), utilizando la bacteria *A. latus* crecida en medio líquido con azúcar como fuente carbonada, para la elaboración de dispositivos médicos (www.biomer.de).

En América del Sur, la empresa brasilera Biocycle produce PHB a escala piloto, utilizando melaza como fuente de carbono. Esta compañía vende las escamas de plástico a otras empresas, que producen los productos finales de plástico biodegradable (www.biocycle.com.br).

Sin embargo, la producción de plásticos biodegradables, en general, sigue siendo muy pequeña en comparación con la producción de plásticos de origen petroquímico. Se producen 1.000 a 20.000 toneladas por año de PHAs, mientras que se producen 300.000 toneladas al año de polietileno. Esto se debe, en parte, al mayor precio en el mercado de los PHAs (1,5 a 5 euros/kg) con respecto al polipropileno, que cuesta entre 0,2 y 0,4 euros/kg (Urtuvia et al. 2014).

A nivel mundial existen varios esfuerzos dirigidos a mejorar la viabilidad económica de la producción de PHAs. Estos incluyen la instalación de plantas piloto incorporando nuevas estrategias de fermentación, la optimización de los procesos de recuperación del PHA, el uso de la tecnología del ADN recombinante e ingeniería metabólica, la búsqueda de nuevos organismos productores de PHAs, el acoplado del proceso de producción a otras industrias y la utilización de fuentes carbonadas más económicas, como los materiales de desecho (Castilho et al. 2009)(Lee & Na 2013).

1.1.6 Producción de PHAs usando sustratos de bajo costo

La evaluación del balance económico del proceso de producción de PHAs sugiere que el costo de la fuente carbonada es el factor que más influye en el costo final del PHA producido, llegando a contribuir en más del 50% (Urtuvia et al. 2014)(Koller et al. 2010). En general, esto se debe a que las fuentes carbonadas que se utilizan son azúcares puros como sacarosa, glucosa y ácidos grasos (Cesário et al. 2014). Para reducir el costo de producción de PHAs se ha propuesto la utilización de materias primas de bajo costo como los subproductos de otras industrias, entre ellos el glicerol, el suero de queso y residuos agrícolas como el bagazo de caña de azúcar, aserrín o biomasa forestal. Este enfoque tiene la ventaja de convertir materiales de desecho en productos con valor agregado (Cesário et al. 2014). Esta estrategia permite, además, acoplar la producción de PHAs a una cadena industrial pre-existente, haciendo el proceso más rentable económicamente. Un ejemplo es la producción de PHB asociada a la biorefinería industrial sucro-alcoholera establecida en Brasil (Biocycle)(Nonato et al. 2001).

Cabe destacar que en el proceso de selección de la materia prima de bajo costo se debe tener en cuenta su disponibilidad en la zona geográfica en donde se desea colocar la planta de PHAs (Lee & Na 2013).

El bajo costo y la alta disponibilidad de la hemicelulosa han promovido el desarrollo de trabajos de investigación sobre la producción de PHAs empleando tanto los azúcares constituyentes de la hemicelulosa (xilosa, arabinosa y glucosa), así como directamente diferentes biomásas hidrolizadas. En este tipo de trabajos se utilizan organismos descritos previamente como buenos productores de PHB y se analiza su capacidad para crecer y transformar estos sustratos de bajo costo en biopolímeros (Tabla 3).

Por otro lado, existen trabajos en los cuales se trata de aislar microorganismos de ambientes ricos en materia orgánica en descomposición, adaptados a la utilización de los azúcares constituyentes del material lignocelulolítico y estudiar su capacidad para producir PHAs (M. Lopes et al. 2009).

Tabla 3: Datos de producción de PHAs utilizando diferentes biomásas lignocelulósicas hidrolizadas.

Cepa	Fuente de carbono	Tipo de cultivo	Polímero	% acumulado	$Y_{p/s}$ (g.g ⁻¹)	Productividad (g.l ⁻¹ .h ⁻¹)	Referencia
<i>Burkholderia sacchari</i>	Hidrolizado de paja de trigo	Lote alimentado	PHB	72	0,22	1,6	(Cesário et al. 2014)
<i>B. sacchari</i>	Bagazo de caña de azúcar hidrolizado	Lote	PHB	62	0,39		(Silva et al. 2004)
<i>B. cepacia</i>	Bagazo de caña de azúcar hidrolizado	Lote	PHB	53	0,29		(Silva et al. 2004)
<i>B. cepacia</i>	Hidrolizado de madera de sugar maple	Lote alimentado	PHB	51,4			(Pan et al. 2012)
<i>Ralstonia eutropha</i>	Bagazo de caña de azúcar hidrolizado	Lote	PHAs	57			(Yu & Stahl 2008)
<i>Bacillus firmus</i>	Paja de arroz hidrolizada	Lote	PHB	89			(Sindhu et al. 2013)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Licor de caña de azúcar	Lote	PHB	70		0,23	(Jiang et al. 2008)

Esto se enmarca en el concepto de biorefinería, que tiene como objetivo transformar todos los productos generados en una cadena agroindustrial, como la biomasa lignocelulósica (sustrato rico en xilosa), en biocombustibles, energía y productos químicos comercializables con valor agregado (FitzPatrick et al. 2010)(Cherubini 2010).

1.2 Biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica es el conjunto de materia orgánica de origen vegetal que incluye, entre otros, leña, arbustos, residuos forestales y agrícolas, restos de poda y subproductos de industrias de transformación de la madera. La biomasa lignocelulolítica tiene un gran potencial energético que proviene de la energía solar y el CO₂ acumulado en formas más reducidas de carbono. Es una de las fuentes renovables con mayor disponibilidad en la naturaleza, representando una materia prima de bajo costo para la producción de biocombustibles, energía y biomoléculas con valor agregado y no compite con la producción de alimentos (Saha, 2003).

En nuestro país, las industrias de pulpa de papel, madera sólida y la cadena sucro-alcoholera de ALUR, constituyen las principales fuentes generadoras de residuos lignocelulósicos.

La biomasa lignocelulolítica está compuesta por hemicelulosa (20-35%), celulosa (35-50%) y lignina (10-25%) (Cherubini 2010)(Menon & Rao 2012).

Para que los azúcares presentes en la biomasa lignocelulósica estén disponibles ésta se debe hidrolizar y para ello existen pre tratamientos físico-químicos o biológicos. La finalidad del pre tratamiento es remover la lignina, hidrolizar la hemicelulosa a azúcares fermentables, y reducir la cristalinidad de la celulosa para liberar la glucosa (Yu & Stahl 2008). En la Tabla 4 se muestra la composición de los hidrolizados derivados de bagazo de caña de azúcar bajo diferentes tratamientos físico-químicos con ácido diluido, en donde se observa claramente que el azúcar

predominante es la D-xilosa. Cabe destacar que la hidrólisis ácida del bagazo de caña genera algunos compuestos tóxicos, como el ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural, que, en general, deben ser eliminados para permitir la adecuada utilización de los azúcares por los microorganismos (Silva et al. 2004).

Tabla 4: Composición de los hidrolizados de bagazo de caña de azúcar luego de ser sometidos a diferentes condiciones de pre- tratamiento con ácido sulfúrico (0,75% pH 1,1). Tabla extraída de Yu & Stahl (2008).

Condiciones de pre- tratamiento					
Temperatura (°C)	100	115	115	130	130
Tiempo (minutos)	300	120	300	120	240
Composición del hidrolizado					
Xilosa (g/l)	12,13	18,90	15,90	16,55	16,25
Arabinosa (g/l)	1,54	1,60	1,67	1,52	1,7
Glucosa (g/l)	0,81	1,73	2,20	1,63	2,07
Azúcares reductores (g/l)	19,2	27,6	25,7	30,7	27,9
% de xilosa en la biomasa sólida que es recuperado	48,7	75,9	63,8	66,5	65,3

En la actualidad, la biomasa lignocelulolítica es utilizada principalmente para la obtención de biocombustibles (etanol y biodiesel), energía eléctrica, calor y vapor (Resquin et al. 2011). Sin embargo, la industria biotecnológica ofrece oportunidades para la utilización alternativa de residuos agro-industriales. El bagazo de caña, mayor subproducto de la industria de la caña de azúcar, es un residuo utilizado en fermentaciones microbianas para la producción de compuestos con valor agregado como por ejemplo: xilitol, solventes, ácido láctico y PHAs (Snell & Peoples 2009)(Yu & Stahl 2008)(Saha 2003).

1.3 Metabolismo de xilosa en microorganismos

La hemicelulosa es el segundo polímero más abundante en la naturaleza y está compuesto principalmente por D-xilosa. Sin embargo, son pocos los microorganismos que pueden utilizar este azúcar de forma eficiente. Pensando en el concepto de biorefinería, es muy importante poder desarrollar procesos eficientes de bioconversión de D-xilosa en productos con valor agregado. Para ello es necesario conocer las rutas metabólicas implicadas en el proceso (Dumon et al. 2012). Hasta el momento se han descrito cuatro rutas para el metabolismo de la xilosa, que se detallan a continuación.

1.3.1 Ruta oxo-reductiva

La ruta oxo-reductiva se encuentra comúnmente en levaduras, hongos filamentosos y otros eucariotas. Esta ruta transforma la D-xilosa en xilitol por medio de la enzima xilosa reductasa NAD(P)H dependiente. Luego el xilitol es oxidado a D-xilulosa por la xilitol deshidrogenasa, que utiliza NAD^+ como cofactor. En el último paso, la D-xilulosa es fosforilada, mediando la xilulosa quinasa, dando como producto final D-xilulosa-5-fosfato, que entra directamente en la vía de las pentosas fosfato (Stephens et al. 2007)(Jeffries 2006). En la Figura 3 se muestra un esquema de los pasos mencionados anteriormente.

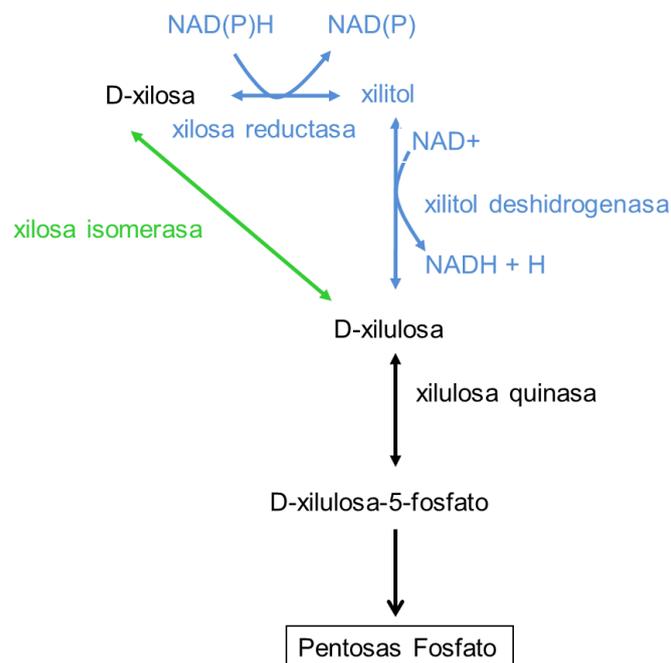


Figura 3: Ruta oxo-reductiva (azul) y ruta de la xilosa isomerasa (verde). Los pasos compartidos por ambas rutas se muestran en negro (Stephens et al. 2007)(Jeffries 2006).

1.3.2 Ruta de la D-xilosa isomerasa

La ruta de la D-xilosa isomerasa transforma directamente la D-xilosa en D-xilulosa, participando la enzima D-xilosa isomerasa tal como se muestra en la Figura 3. Esta vía se encuentra presente en bacterias, aunque se ha descrito también en algunos hongos (Stephens et al. 2007)(Jeffries 2006).

Los genes que codifican para las enzimas de esta ruta en *E. coli* y en varias especies de *Pseudomonas* y *Burkholderia* se encuentran organizados en un operón, denominado operón *xyl*. En la Figura 4 se muestra dicho operón, en donde el gen *xylA* codifica para la xilosa isomerasa y el gen *xylB* codifica para la xiluloquinasa. Este último se encuentra dentro del locus *xyl* en *E. coli* K12, mientras que en *Pseudomonas* y *Burkholderia* se encuentra en otras regiones del genoma, alejado del mismo. El sistema de transporte está representado por los genes *xylF* (proteína de unión a xilosa; *xylose-binding protein*), *xylG* (proteína de unión a ATP; *ATP-binding protein*) y *xylH* (transportador de membrana). El gen *xylR* está involucrado en la regulación de la transcripción (M. S. G. Lopes et al. 2009).

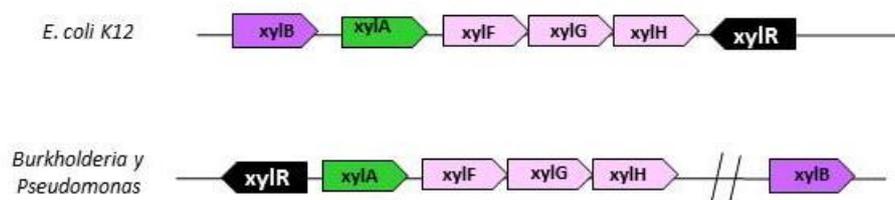


Figura 4: Organización del operón *xyl* en *E. coli* K12 y en diferentes especies de *Burkholderia* y *Pseudomonas*. *xylA* codifica para la xilosa isomerasa, *xylB* para la xilulosa quinasa, *xylFGH* codifican para el transportador de xilosa del tipo ABC y *xylR* es un regulador de la transcripción. Figura extraída y modificada de Lopes et al. (2009).

1.3.3 Rutas de Weimberg y Dahms

La ruta de Weimberg (Weimberg 1961) y la ruta de Dahms (Dahms 1974) han sido descritas en algunas bacterias (Stephens et al. 2007) y arqueas (U. Johnsen et al., 2009) (Ulrike Johnsen & Schönheit, 2004). En la Figura 5 se muestra un esquema de los pasos involucrados, en donde se observa la participación de una xilosa deshidrogenasa y otras enzimas, formando el intermediario 2-ceto-3-deoxi-xilonato, que luego puede generar α -cetoglutarato en la vía de Weimberg o ser transformado en piruvato y glicolaldehído si sigue la ruta de Dahms (Stephens et al. 2007).

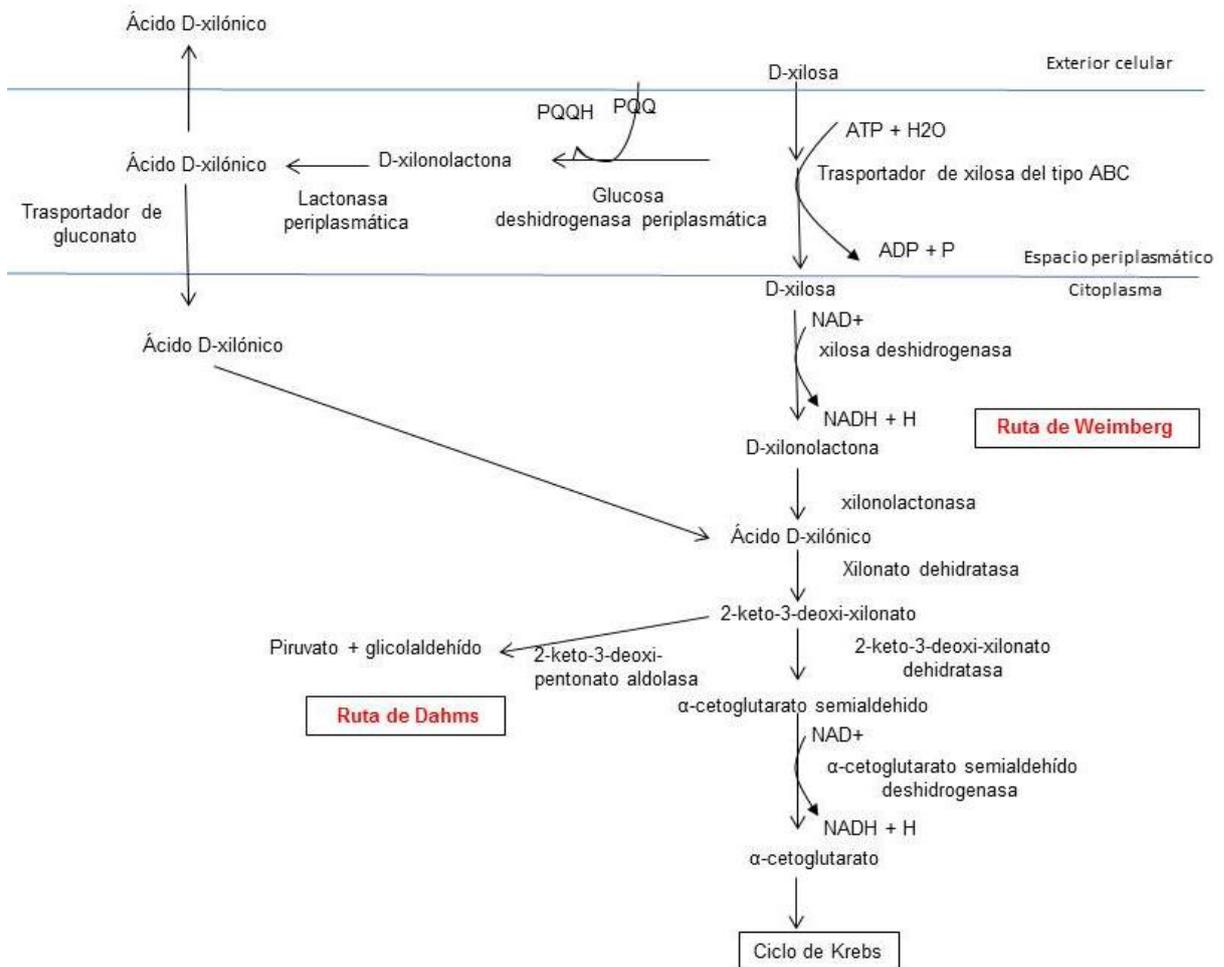


Figura 5: Esquema de las rutas oxidativas descritas para el catabolismo de xilosa en diversos microorganismos (Weimberg 1961)(Dahms 1974)(Zhang et al. 2013).

Por otro lado, se ha observado en *Gluconobacter oxydans* y *Pseudomonas putida*, que la enzima periplasmática glucosa deshidrogenasa dependiente de pirroloquinolina quinona, puede oxidar la D-xilosa a D-xilonolactona. Luego, la gluconolactonasa periplasmática promueve la síntesis de D-xilonato, que puede ser excretado al medio de cultivo o internalizado por el transportador de D-gluconato y continuar su degradación por la ruta de

Weimberg o la ruta de Dahms como se muestra en la Figura 5 (Meijnen et al. 2009)(Buchert & Viikari 1988)(Zhang et al. 2013).

Tal como se ilustra en la Figura 6, los genes que codifican para las enzimas involucradas en estas rutas pueden encontrarse dentro de un operón y transcribirse todos juntos como en el caso de *Caulobacter crescentus* (Stephens et al. 2007) o encontrarse dispersos en el genoma como en el caso del arquea halofílica *Haloarcula marismortui* (Johnsen et al. 2009). En otros casos, estos genes se encuentran en megaplásmidos, como ocurre en el arquea halofílica *Haloferax volcanii* (Johnsen et al. 2009) o en la actinobacteria *Arthrobacter nicotinovorans* (Mihasan et al. 2013).

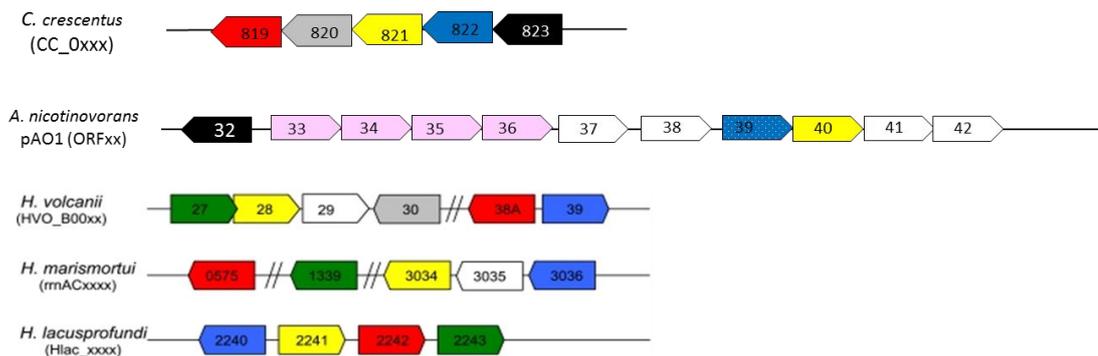


Figura 6: Organización de los genes involucrados en la degradación de xilosa en diferentes microorganismos. Los genes se muestran de forma esquemática con flechas de colores de acuerdo a los productos que codifican: amarillo: xilosa deshidrogenasa, gris: xilonolactonasa, rojo: xilonato deshidratasa, verde: 2-keto-3-deoxi-xilonato deshidratasa, azul: α -cetoglutarato semialdehído deshidrogenasa, negro: activador de la transcripción, rosado: transportadores del tipo ABC de xilosa. Figura modificada de Stephens et al. (2007); Mihasan et al. (2013); Johnsen & Schonheit, (2004) y Johnsen et al. (2009).

1.4 *Herbaspirillum seropedicae*

Este género abarca bacterias Gram negativas, con forma de vibrio o helicoidal. Generalmente, las células poseen dos flagelos (aunque pueden tener de uno a tres) en uno o ambos polos. El diámetro celular es de 0,6 a 0,7 μm y el largo varía según el medio de cultivo desde 1,5 a 5 μm (Baldani et al. 1986).

Las bacterias de la especie *H. seropedicae* crecen bien en un rango amplio de pH, desde 5,3 a 8,0. Su temperatura óptima de crecimiento es 34°C y no se observa crecimiento a temperaturas menores de 22°C o mayores a 37°C. No crecen en presencia de NaCl en concentraciones mayores al 2% y no necesitan vitaminas u otros nutrientes o cofactores para su crecimiento. La cepa tipo de la especie es susceptible a varios antibióticos, como el cloramfenicol, tetraciclina, gentamicina, kanamicina, eritromicina y estreptomycin, pero es resistente a la penicilina (Baldani et al. 1986).

Las bacterias de esta especie tienen la capacidad de reducir nitrógeno atmosférico bajo condiciones de microaerobiosis y en esas condiciones crecen bien, consumiendo N_2 como única fuente de nitrógeno (Baldani et al. 1986).

En la naturaleza a estas bacterias se las encuentra como endófitas de gramíneas: caña de azúcar, sorgo, maíz, avena, etc. (Kennedy et al. 2004)(Baldani et al. 1997). Además, son capaces de promover el crecimiento vegetal (Muthukumarasamy et al. 2006).

Al ensayar *H. seropedicae* se obtienen resultados positivos en las pruebas bioquímicas de catalasa, ureasa y oxidasa. Puede consumir varios carbohidratos como glucosa, galactosa, D-xilosa y L-arabinosa, así como también manitol, sorbitol, xilitol y glicerol como únicas fuentes de carbono (Catalán et al. 2007)(Baldani et al. 1986). Consume ácidos orgánicos, como malato, fumarato, succinato, piruvato, citrato y el trans-aconitato, cuando se cultiva en presencia de amonio (NH_4^+) o N_2 (Baldani et al. 1986).

1.4.1 Metabolismo carbonado

El metabolismo carbonado en *H. seropedicae* está poco estudiado y caracterizado. A partir de las determinaciones bioquímicas de actividades enzimáticas realizadas en nuestro laboratorio (Unidad de Microbiología Molecular del IIBCE) y por análisis de secuencia del genoma de la cepa SmR1 (Pedrosa et al. 2011), se sabe que *H. seropedicae* emplea la ruta de Entner-Doudoroff para el catabolismo de glucosa, y que además posee completos los ciclos de Krebs y del glioxilato. Como rutas biosintéticas utilizaría la gluconeogénesis y la ruta de las pentosas fosfato. Además, no utilizaría la vía de glicólisis por carecer de la enzima fosfo-fructoquinasa (Pedrosa et al. 2011), ni la vía de las pentosas fosfato para el catabolismo de glucosa, por no poseer la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa (datos obtenidos previamente en nuestro laboratorio).

Por otro lado, en lo que refiere al metabolismo de azúcares de 5 átomos de carbono, se sabe que la L-arabinosa se metaboliza siguiendo la ruta que se muestra en la Figura 7 (Mathias et al. 1989). Esta ruta contiene intermediarios no fosforilados y produce α -cetoglutarato, un importante intermediario del ciclo de Krebs.

H. seropedicae es capaz de crecer en presencia de xilosa como única fuente de carbono (Catalán et al. 2007), aunque las posibles vías metabólicas que participan no han sido descritas. La ruta de Weimberg descrita previamente (Figura 5) para el catabolismo de xilosa es similar a la ruta descrita para el catabolismo de arabinosa en *H. seropedicae* (Figura 7). Esto sugiere, en primera instancia, que la xilosa podría ser metabolizada por esta vía. Esta presunción fue respaldada con ensayos bioquímicos realizados en nuestro laboratorio, en los que se detectó actividad xilosa deshidrogenasa en extractos celulares de *H. seropedicae* crecida con glucosa o xilosa como única fuente carbonada (Malan 2011). Además, Mathias et al. (1989) publicaron que *H. seropedicae* no posee la enzima 2-keto-3-deoxi-pentonato aldolasa, por lo que no podría utilizar la vía de Dahms para degradar la xilosa (Figura 5).

También se comprobó la actividad xilitol deshidrogenasa, enzima que cataliza la segunda reacción de la ruta oxo-reductiva (Figura 3). La misma estuvo presente en extractos celulares de *H. seropedicae* Z69 crecida en xilitol, pero no se detectó actividad en los extractos celulares de la cepa crecida en xilosa o glucosa como únicas fuentes carbonadas, sugiriendo que esta ruta no estaría implicada en el catabolismo de D-xilosa (Malan 2011).

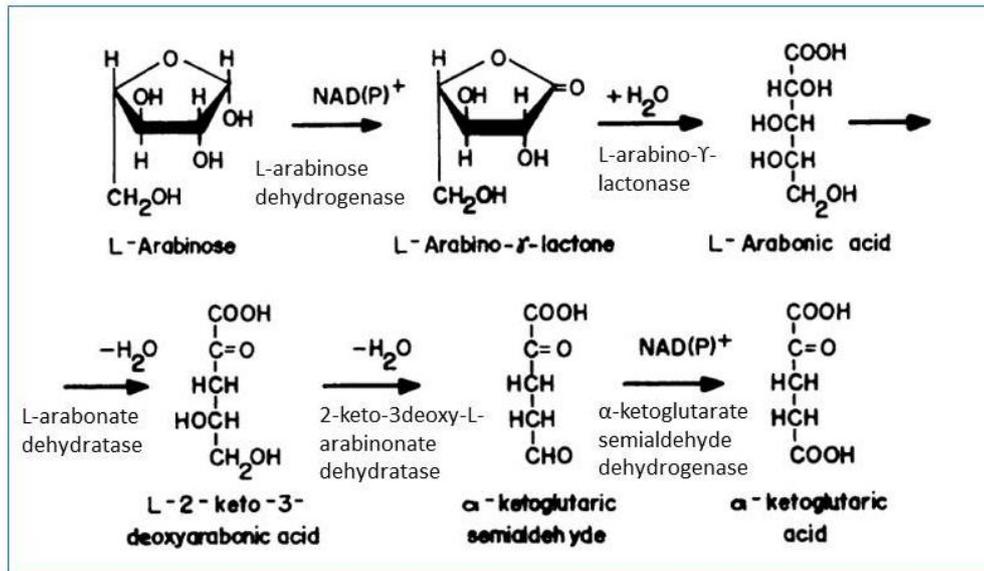


Figura 7: Ruta involucrada en el metabolismo de L-arabinosa en *H. seropedicae*. Extraído y modificado de Mathias et al. (1989)

Actualmente no se encuentra disponible el genoma de *H. seropedicae* Z69, pero sí el genoma de *H. seropedicae* SmR1 (Número de acceso en GenBank: NC_014323). Esta cepa es una derivada espontánea resistente a estreptomicina, de la cepa Z78. Los genotipos de las cepas Z78 y Z69 se presume que son muy similares en virtud de estudios previamente desarrollados (Soares-Ramos et al. 2003). En el genoma de SmR1 no se encuentran anotados genes que codifiquen para enzimas de las rutas catabólicas de xilosa descritas. Sin embargo, se encontró un ORF candidato a codificar para la xilitol deshidrogenasa (*Hsero_3396*) y dos ORFs para la xilulosa quinasa (*xyIB*), que correspondería a la ruta de degradación del xilitol a D-xilulosa-5-fosfato (Figura 3). A su vez, se encuentran anotados, formando un operón, los genes que codifican para las enzimas que internalizan la xilosa a la célula: *xyIF* (proteína periplasmática del sistema de transporte ABC de D-xilosa), *xyIG* (ATPasa, forma parte del transportador del tipo ABC de D-xilosa) y *xyIH* (transportador del tipo ABC, permeasa de D-xilosa) y un gen regulador: *xyIR* (proteína reguladora de la transcripción del operón *xyI* de la familia AraC) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, NC_014323) (ver Figura 8).

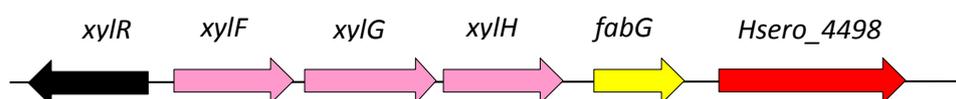


Figura 8: Genes de *H. seropedicae* SmR1 que codificarían para enzimas claves del metabolismo de xilosa. Los genes se muestran de forma esquemática con flechas de colores de acuerdo a los productos que codificarían: negro: activador de la transcripción, rosado: transportadores del tipo ABC de xilosa, amarillo: xilosa deshidrogenasa, rojo: xilonato dehidratasa (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, NC_014323).

Considerando las actividades enzimáticas y los genes que codifican para las mismas descritos en otros microorganismos, se analizó *in silico*, utilizando la herramienta Blastp (www.ncbi.nlm.nih.gov) el genoma de *H. seropedicae* SmR1 para identificar genes candidatos (ORFs) que codifiquen para enzimas claves implicadas en el metabolismo de xilosa (Malan 2011). En la Tabla 5 se muestra un resumen de los posibles genes en *H. seropedicae* que codificarían para enzimas claves de las rutas identificadas en el catabolismo de xilosa en otros microorganismos (Malan 2011). En la Figura 8 se observa que dos de estos genes se encuentran contiguos al operón *xyl*.

Tabla 5: Genes de *H. seropedicae* que codificarían para enzimas claves de las rutas del catabolismo de xilosa descritas en otros microorganismos (Malan 2011).

Enzima	Genes candidatos
Ruta de Weimberg	
Xilosa deshidrogenasa	<i>fabG</i> (<i>Hsero_4497</i>) y <i>Hsero_1041</i>
Xilonolactonasa	<i>Hsero_3879</i> y <i>Hsero_1044</i>
Xilonato deshidratasa	<i>Hsero_4498</i> , <i>Hsero_1040</i> y <i>ilvD</i> (<i>Hsero_3335</i>)
Ruta oxoreductiva y de la xilosa isomerasa	
Xilosa reductasa	----
Xilitol deshidrogenasa	<i>Hsero_3396</i>
Xilulosa quinasa	<i>xyIB</i> (<i>Hsero_3399</i>) y <i>xyIB</i> (<i>Hsero_0446</i>)
Xilosa isomerasa	----

En el marco del proyecto desarrollado entre los años 2010-2011 (Proyecto de Iniciación ANII, Título: “Estudio del metabolismo de xilosa de *Herbaspirillum seropedicae* Z69 orientado a optimizar la producción de Polihidroxibutirato a partir de hemicelulosa”), se obtuvo una colección de clones mutantes derivados de la cepa Z69 obtenidos por inserción al azar del transposón mini-Tn5(*kan-oriV-pgfp*) (Rosconi et al. 2006). El objetivo de este trabajo fue identificar las vías metabólicas implicadas en metabolismo de xilosa en *H. seropedicae*, mediante la selección y estudio de clones mutantes incapaces de crecer en glucosa y/o xilosa como única fuente de carbono. Aun habiendo analizado el fenotipo de más de 3000 transconjugantes, no se obtuvieron clones incapaces de crecer en xilosa como fuente de carbono pero capaces de crecer utilizando glucosa. Estos resultados sugieren que la cepa Z69 de *H. seropedicae* podría expresar más de una vía metabólica para degradar la xilosa en las condiciones ensayadas, o que podrían expresarse enzimas redundantes en una o varias vías.

1.4.2 Síntesis de PHAs por *H. seropedicae* Z69

H. seropedicae acumula niveles significativos de PHB cuando se cultiva en presencia de glucosa como única fuente carbonada. Asimismo, es capaz de sintetizar PHB en presencia de un amplio rango de sustratos carbonados como galactosa, fructosa, xilosa, manitol y gluconato. Por otro lado, es capaz de acumular P(HB-HV) si se adiciona ácido nonanoico en el medio de cultivo como única fuente de carbono. Como se mencionó previamente, expresa la ruta clásica de síntesis de PHB al consumir glucosa como fuente de carbono (Catalán et al. 2007) (Figura 2). Estudios desarrollados en nuestro laboratorio permitieron optimizar el contenido de PHB acumulado por *H. seropedicae* cultivada en presencia de glucosa como única fuente de carbono desde un 40% hasta un 60%. La estrategia utilizada para la optimización del proceso incluyó la determinación de la relación óptima entre las cantidades de glucosa y nitrógeno mediante un diseño factorial con punto central. La relación atómica C/N óptima obtenida fue de 25 (Proyecto PDT 74-17).

Cuando *H. seropedicae* Z69 fue cultivada en medio LGI en presencia de 30g/l de xilosa, el pH del medio alcanzó un valor cercano a 4, el crecimiento celular se detuvo y la biomasa disminuyó. Este incremento de la acidez promovió probablemente la muerte celular, dado que estos cultivos no fueron capaces de crecer al ser transferidos a medio rico sólido. Este comportamiento no se observó al cultivar la cepa en presencia de 10g/l de xilosa o de 30g/l de glucosa. Cuando se incluyó *buffer* MES 50mM pH=7,0 en el medio LGI con 30g/l de xilosa, *H. seropedicae* Z69 fue capaz de crecer sin alterar el pH del medio, alcanzando una concentración de biomasa de 7,6g/l y acumulando hasta un 50% de su peso seco como PHB (Malan 2011). Al cultivar la cepa en medio LGI con el adiciónado del mismo *buffer* y una mezcla de xilosa, glucosa y arabinosa en proporciones similares a las presentes en el bagazo de caña de azúcar, alcanzó un contenido de 56% de PHB y una biomasa de 8,9g/l (Malan 2011).

En las condiciones de cultivo ensayadas, con exceso de fuente carbonada (30g/l), la cepa podría estar llevando a cabo un metabolismo del tipo “fermentativo”, en donde algunos metabolitos, incluyendo ácidos orgánicos, serían excretados contribuyendo a la acidificación del medio. La excreción de ácidos orgánicos estaría indicando que parte del carbono adicionado para el crecimiento y síntesis de PHB está siendo utilizado en la síntesis de esos compuestos excretados. Esto se traduce en un menor rendimiento de transformación de la

fuentes de carbono en PHB, lo que se podría solucionar redirigiendo el flujo de carbono hacia la formación de PHB, mediante la eliminación de las vías que producen metabolitos de excreción o ajustando las condiciones de cultivo.

1.5 Ingeniería metabólica y biología de sistemas

La ingeniería metabólica consiste en optimizar determinadas propiedades fisiológicas en un organismo, por ejemplo la formación de productos de interés, ya sea a partir de cambios en las reacciones bioquímicas o mediante la introducción de nuevas reacciones a través de modificaciones genéticas. Tradicionalmente, los organismos eran modificados mediante mutaciones al azar, posteriormente se comenzaron a utilizar las mutaciones dirigidas, pero siempre se trabajó sin tener en cuenta cómo esos cambios afectaban a la totalidad del metabolismo celular. Actualmente, la ingeniería metabólica se focaliza en las rutas integradas en el metabolismo celular y no en las reacciones individuales, examinando así la red metabólica completa y tratando de generar cambios racionales (Stephanopoulos et al. 1998), usando un enfoque de biología de sistemas (Toya & Shimizu 2013).

Este enfoque de la biología consiste en explicar el comportamiento de una célula no sólo como la mera suma de sus elementos constitutivos, sino también teniendo en cuenta la interacción entre ellos y las propiedades que emergen de estas. Este enfoque sistémico le concede un importante rol a las redes, ya que ellas son las que contienen estas interacciones entre los elementos y son capaces de explicar el comportamiento celular observado. Así existen las redes metabólicas, regulatorias y de señalización, siendo las redes metabólicas las mejores caracterizadas hasta el momento (Palsson 2006)(Llaneras & Picó 2008).

Una red metabólica puede ser definida por un conjunto de metabolitos (nodos) conectados por reacciones bioquímicas (flechas) que pueden representar la estructura del metabolismo celular. Cuando un sistema contiene todas las reacciones posibles que pueden darse en un célula se trata de una red metabólica reconstituida a escala genómica y para ello se integran datos provenientes de la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica, entre otros (Palsson 2006)(Bazzani 2014)(Orth et al. 2010).

1.5.1 Representación matemática del metabolismo

El conocimiento estructural inmerso en la red metabólica se puede traducir en términos matemáticos mediante el uso de una matriz estequiométrica (S'), en la cual, se representan los coeficientes estequiométricos de cada metabolito (m), descritos en cada fila, para cada una de las reacciones (n) descritas en cada columna (Trinh et al. 2009). La matriz S' tiene coeficientes negativos para cada metabolito que está siendo consumido y coeficientes positivos para los metabolitos que se producen en cada reacción (Orth et al. 2010)(ver Figura 8).

Una vez que se definió la matriz estequiométrica, los balances de masas que involucran a cada metabolito intracelular se pueden representar matemáticamente como un conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias:

$$\frac{dc}{dt} = S' \cdot v - \mu \cdot c$$

En donde c (c_1, c_2, \dots, c_m) es el vector con las concentraciones intracelulares de los metabolitos, $v=(v_1, v_2, \dots, v_n)$ es el vector con los flujos a través de cada reacción, y μ es la velocidad específica de crecimiento de las células. Esta es la ecuación de balance de masa dinámico que describe cómo evoluciona en el tiempo la concentración de cada metabolito c_i . Para poder modelar este cambio es necesario conocer la estequiometría (S'), la velocidad específica de crecimiento (μ) y los flujos de las reacciones intracelulares (v). Desafortunadamente, los mecanismos de las reacciones intracelulares son complejos y aun no son muy bien comprendidos. Por esta razón, en el modelado estequiométrico no se tiene en cuenta el comportamiento dinámico intracelular asumiendo un estado *pseudo*-estacionario de los metabolitos internos. La dinámica intracelular es mucho más rápida que la dinámica extracelular, así se puede asumir que la dinámica intracelular alcanza el estado estacionario instantáneamente, sin tener en cuenta su estado transitorio. El asumir un estado estacionario no implica que la naturaleza dinámica de todo el proceso se deja de lado, ya que la dinámica de los procesos extracelulares como el consumo de sustratos o la formación de productos es considerada (Llaneras & Picó 2008)(Trinh et al. 2009).

Los balances de masa de cada metabolito pueden ser descritos por un sistema homogéneo de ecuaciones lineales:

$$S \cdot v = 0$$

Esta ecuación define un espacio restringido en donde se encuentran todas las distribuciones de flujos (v) posibles de una red metabólica, pero no predice cual es esa distribución. De este modo, esta ecuación contiene, o representa, las capacidades de la red metabólica modelada. La matriz S incluye la información de la matriz S' más una reacción que da cuenta del proceso de formación de biomasa.

Ya que típicamente se tiene más reacciones (n) que metabolitos independientes (m), el espacio definido por esta ecuación es indeterminado con $n-m$ grados de libertad (Llaneras & Picó 2008)(Orth et al. 2010).

Si todas las reacciones de la red metabólica son reversibles, las soluciones a la ecuación anterior están dadas por el espacio nulo de la matriz estequiométrica, que puede ser representado como un hiperplano, un subespacio de R^n en donde cada eje corresponde al flujo a través de cada reacción (Llaneras & Picó 2008).

Por otro lado, tenemos el caso en donde todas las reacciones son irreversibles, es decir donde no existen velocidades negativas:

$$v_i \geq 0$$

Ahora, esta restricción genera un sistema de desigualdades que no se pueden resolver utilizando álgebra lineal y para ello se recurre al análisis convexo. El espacio de distribuciones de flujo se ha convertido ahora en un cono con punta (*convex polyhedral cone*). En casos reales, donde existen reacciones reversibles e irreversibles también se recurre a la descripción mediante análisis convexo (Llaneras & Picó 2008)(Papin et al. 2004).

A su vez, se pueden imponer restricciones en los valores máximos de flujos de cada reacción que están dados por la capacidad de cada enzima o del transporte de los metabolitos:

$$v \leq v_{max}$$

Si esta información está disponible para todos los flujos, el espacio de soluciones posibles está limitado y en términos matemáticos el espacio de soluciones ahora es un cono poliedro convexo delimitado (Llaneras & Picó, 2008).

Incluso después de colocar estas restricciones existe un gran número de posibles soluciones y por ello se han desarrollado varias estrategias para resolver el problema, entre ellas el balance de flujos metabólicos.

1.5.2 Análisis de balance de flujos (*FBA de flux balance analysis*)

El balance de flujos busca maximizar o minimizar una función objetivo:

$$Z = c^T \cdot v$$

que puede estar dada por cualquier combinación lineal de flujos, en donde c es un vector de pesos que indica cuanto contribuye cada reacción a la función objetivo. Generalmente se maximiza o minimiza un único flujo, entonces, en este caso c es un vector de ceros con un valor 1 en el lugar correspondiente a la reacción de interés. Esto genera un sistema de ecuaciones lineales que se pueden resolver utilizando programación lineal. Así, FBA permite obtener un único vector v con la distribución de flujos óptima (Orth et al. 2010).

Para definir la función objetivo se define un fenotipo, en la forma de un objetivo biológico, que sea relevante para el caso en estudio. En el caso de querer predecir el crecimiento, la función objetivo es la biomasa, que representa la velocidad en la que los metabolitos son convertidos en biomasa. El flujo a través de esta reacción corresponde con la velocidad específica de crecimiento del microorganismo (μ) y tiene unidades de hora⁻¹ (Orth et al. 2010).

A su vez, algunas tasas de flujo pueden ser medidas experimentalmente, como el consumo de sustrato o la producción de productos de interés. Estos datos sirven como entradas al sistema generando restricciones a los límites superior e inferior de algunas reacciones. Estos flujos se expresan en unidades de $\text{mmol} \cdot \text{g}_x^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, siendo X el peso seco de la biomasa celular medido experimentalmente (Orth et al. 2010).

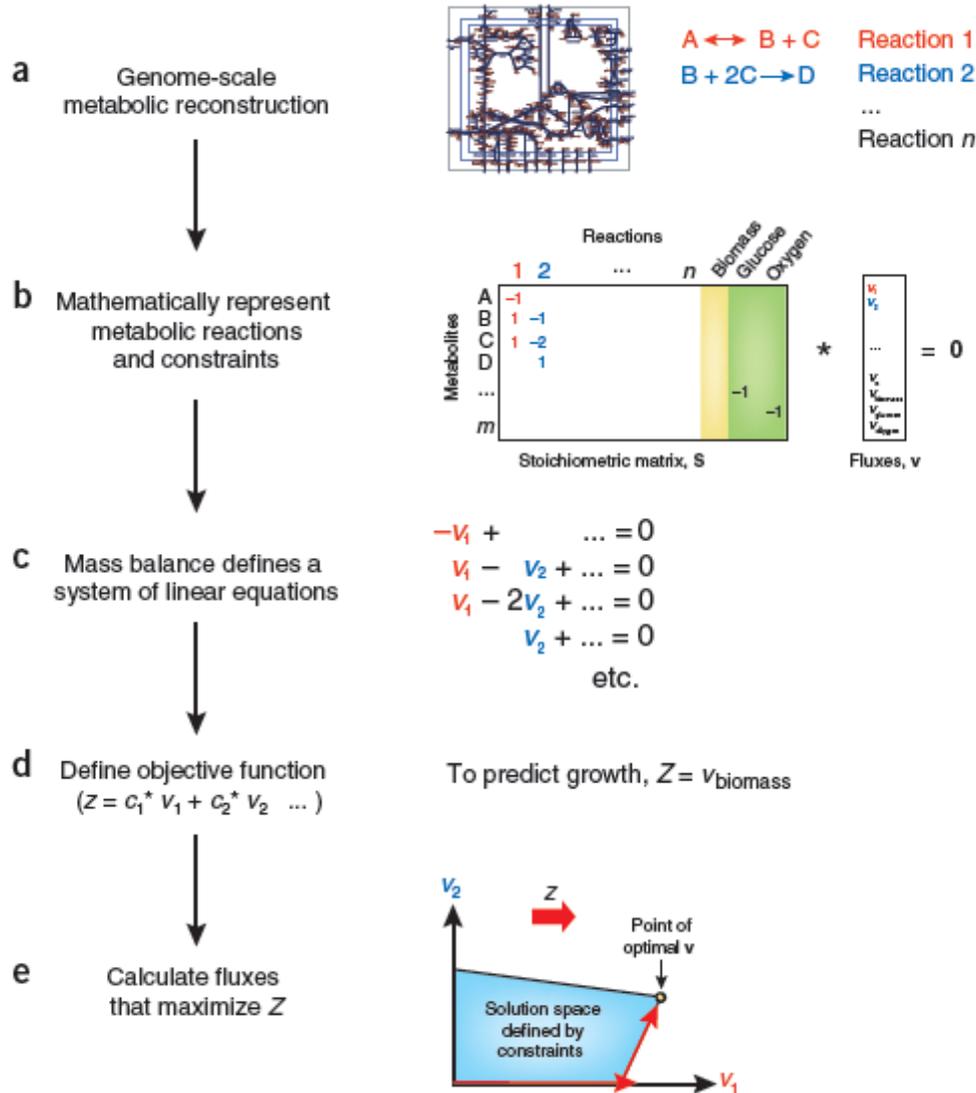


Figura 9: Procedimiento para llevar a cabo un análisis de balance de flujos. A) Primero hay que reconstruir la red metabólica con las reacciones estequiométricamente balanceadas. B) Esta reconstrucción se transforma en un modelo matemático formando una matriz S , en donde cada fila representa un metabolito y cada columna representa una reacción. El crecimiento es incorporado al modelo con una ecuación de biomasa que simula el consumo de los metabolitos durante el crecimiento (columna amarilla). Las reacciones de intercambio (columnas verdes) son usadas para representar el flujo de metabolitos como glucosa, oxígeno, etc, hacia adentro y hacia afuera de la célula. C) En estado estacionario, los flujos a través de cada reacción están dados por la ecuación $S \cdot v = 0$, que define un sistema de ecuaciones lineales. Como los modelos, en general, contienen más reacciones que metabolitos, hay más de una posible solución a este sistema de ecuaciones. D) Para resolver las ecuaciones es necesario definir una función objetivo: $Z = c^T v$ (en donde, c es un vector indicando cuanto contribuye cada reacción v a la función objetivo). E) La programación lineal es usada para identificar la distribución de flujos que maximiza o minimiza la función objetivo de entre todas las soluciones posibles (región azul) definidas por las restricciones impuestas por las ecuaciones de balance de masas y los límites de las reacciones. La flecha roja indica la dirección en la que aumenta Z . Como la solución óptima se encuentra lo más alejada posible, la flecha roja muestra el camino seguido por la programación lineal para resolver el problema, identificando a la solución en un borde o esquina del espacio de soluciones. Imagen extraída de (Orth et al. 2010).

En resumen, FBA puede ser definido como el uso de programación lineal para resolver la ecuación $S \cdot v = 0$, cuando se tiene un conjunto de límites superiores e inferiores para v y una combinación lineal de flujos como función objetivo. La respuesta de FBA es una distribución de flujos particulares, v , que maximizan o minimizan la función objetivo (Orth et al. 2010). En la Figura 9 se muestra un esquema del procedimiento necesario para llevar a cabo un análisis de balances de flujos.

Para llevar a cabo un análisis de balance de flujos se han desarrollado varios programas que pueden identificar rápidamente la solución óptima para largos sistemas de ecuaciones (Copeland et al. 2012). Entre ellos, COBRA *toolbox* es un paquete de herramientas que fue desarrollado para Matlab (<http://www.mathworks.com>) y se encuentra disponible de forma libre y gratuita (Schellenberger et al. 2011).

En la Tabla 6 se muestran algunas aplicaciones de FBA para resolver problemas concretos.

Tabla 6: Usos y aplicaciones del análisis de balance de flujos.

Aplicación	Referencia
Refinar y validar redes metabólicas reconstituidas a escala genómica utilizando datos experimentales	(Wu et al. 2014)(Park et al. 2011)
Determinar las distribuciones de flujos que representan el metabolismo celular bajo diferentes condiciones	(Yu & Si 2004)(Weiner et al. 2014)
Encontrar las condiciones para la máxima conversión de sustrato en productos mediante:	
- el manejo de las velocidades específicas de producción y consumo	(Dishisha et al. 2014)
- formulación de medios de cultivo y condiciones óptimas de crecimiento	(Varma & Palsson 1994)
- predicción de mutaciones (OptKnok)	(Choon et al. 2014)
Calcular el máximo teórico, bajo determinadas condiciones, para una reacción de interés: crecimiento o producción de un producto	(Orth et al. 2010)(Gonzalez et al. 2010)
Predecir el comportamiento celular bajo diferentes condiciones ambientales, consumo de diferentes fuentes de carbono, disponibilidad de oxígeno.	(Orth et al. 2010)(Babaei et al. 2014)(Park et al. 2011)
Biología sintética	(Weiner et al. 2014)
Encontrar reacciones faltantes en los modelos reconstituidos a escala genómica (<i>Gap filling</i>)	(Latendresse 2014)
Soluciones óptimas alternativas usando análisis de variabilidad de flujos (FVA)	(Mahadevan & Schilling, 2003)
Análisis de robustez	(Edwards & Palsson, 2000)
Análisis de la esencialidad de genes	(Wu et al. 2014)

2. HIPÓTESIS

A partir de los datos experimentales, medidas de actividades enzimáticas y datos del genoma de *H. seropedicae* SmR1, es posible construir un mapa metabólico con las reacciones bioquímicas involucradas en el catabolismo de la xilosa en *H. seropedicae* Z69. El análisis mediante balance de flujos metabólicos de la red elaborada reproduce el comportamiento celular, crecimiento y síntesis de PHB, observados experimentalmente cuando *H. seropedicae* crece en presencia de xilosa como única fuente de carbono. Todas estas herramientas permiten definir modificaciones genéticas que optimizan la producción de PHB cuando *H. seropedicae* utiliza xilosa como única fuente de carbono.

3. OBJETIVO GENERAL

Construir una red del metabolismo central carbonado de *H. seropedicae* para el desarrollo de análisis de balance de flujos, dirigidos a optimizar la producción de un compuesto de interés biotecnológico como el PHB, a partir de xilosa.

3.1 Objetivos específicos

- 1- Identificar las rutas involucradas en el catabolismo de xilosa en *H. seropedicae* Z69.
- 2- Construir una red que describa el metabolismo central carbonado de *H. seropedicae* Z69 al consumir xilosa como única fuente de carbono.
- 3- Realizar FBA a partir de la red propuesta para:
 - Ajustar y validar el modelo utilizando datos experimentales.
 - Estimar las distribuciones de flujos que ocurren en la célula bajo condiciones experimentales de acumulación de PHB.
 - Predecir mutantes para redirigir los flujos a una mayor acumulación de PHB.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Bacteria, plásmidos y medios de cultivo

En la Tabla 7 se describen las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo. Asimismo, en la Tabla 7 y en la Figura 10 se muestran en detalle los plásmidos empleados en este trabajo.

Herbaspirillum seropedicae y todos los mutantes de esta cepa se cultivaron en medio rico TY (Beringer 1974) y en medio definido LGI (Cavalcante & Döbereiner 1988) (su composición se detalla en el Anexo 10.1).

Todas las cepas de *Escherichia coli* se cultivaron en medio rico LB (diluído al ½) (Bertani 1951)(Anexo 10.1).

Los antibióticos se prepararon a una concentración 1000X, se esterilizaron por filtración (0.2µm), se mantuvieron a -20°C y se adicionaron al medio de cultivo estéril en el momento de usarlo. El tipo de antibiótico y la concentración utilizada en µg/ml se indica en cada caso.

Todas las cepas utilizadas y obtenidas en este trabajo se almacenaron a -80°C en tubos de 1,5ml conteniendo 0,6ml de suspensión celular crecida durante toda la noche en el medio líquido rico con el antibiótico adecuado y 0,6ml de solución de glicerol (Ausubel et al. 1992) (Anexo 10.1) como fuente de respaldo por períodos prolongados de hasta tres años.

Tabla 7: Cepas bacterianas y plásmidos utilizadas en este trabajo.

	Características relevantes	Referencia
Cepas		
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z69	NaI ^R	(Baldani et al. 1986)
<i>Escherichia coli</i> TOP10	Organismo huésped de plásmidos y construcciones de interés.	Invitrogen, USA
Plásmidos		
pCR2.1	Vector para el clonado de productos de PCR. Km ^R .	TOPO TA cloning kit (Invitrogen, USA)
pK18mobsacB	Plásmido de espectro reducido, derivado de pBR322 (replicón pMB1). Vector suicida en <i>H. seropedicae</i> , transferible por conjugación, con el gen <i>sacB</i> . Km ^R .	(Schäfer et al. 1994)
pRK2013	Replicón ColE1 conteniendo los genes <i>tra</i> de RK2. Km ^R .	(Ditta et al. 1980)
pBBR1MSC-2	Vector derivado de pBBR, transferible por conjugación, utilizado para ensayos de complementación de función. Km ^R . Replicable en <i>H. seropedicae</i>	(Kovach et al. 1995)

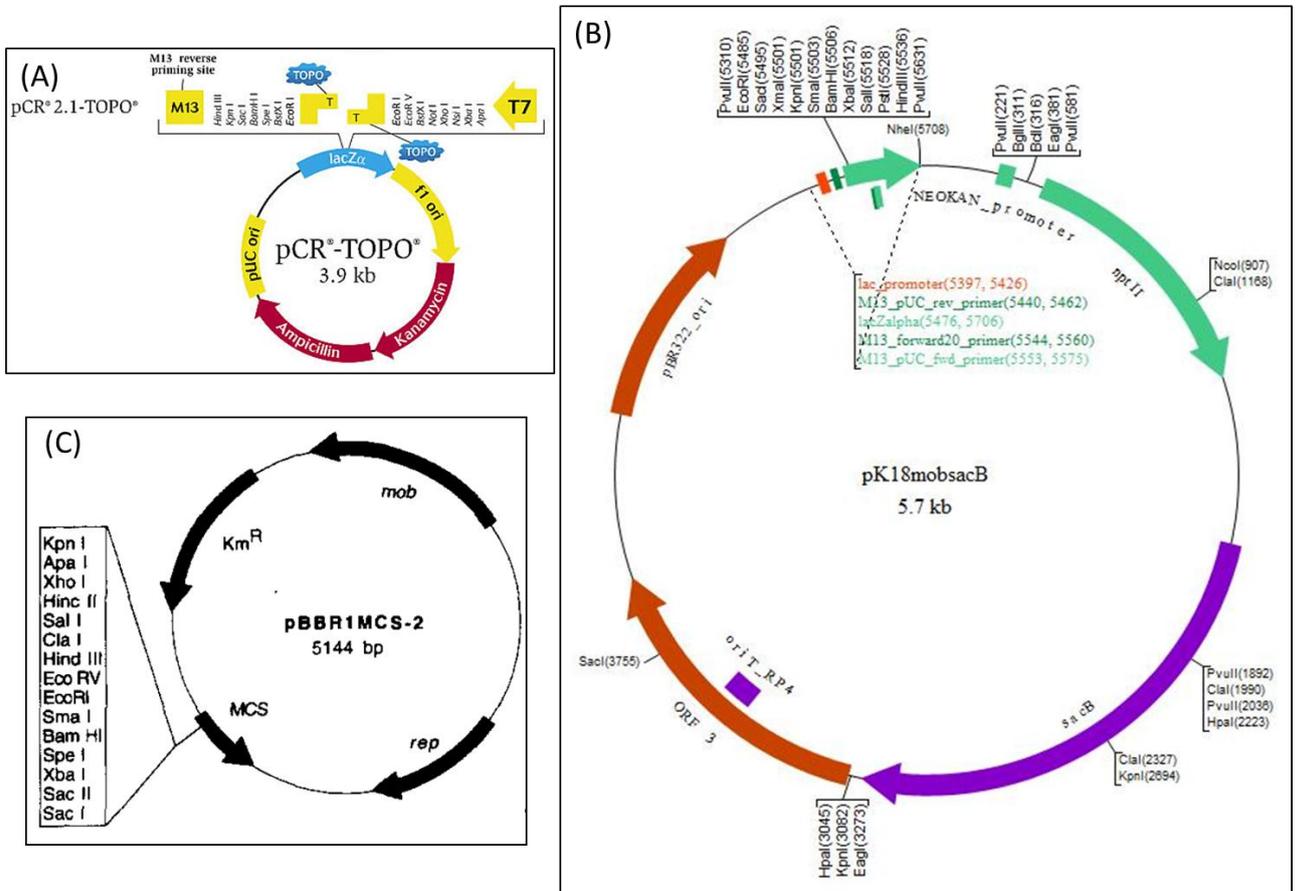


Figura 10: Mapas de los vectores utilizados en este trabajo: (A) pCR2.1, (B) pK18mobsacB y (C) pBBR1MCS-2.

4.2 Construcción de mutantes de *Herbaspirillum seropedicae* Z69 en los genes de interés

En la Tabla 8 se indican los genes que se eligieron para ser mutados en este trabajo. Dicha elección se basó en los alineamientos realizados previamente (Tabla 5) (Malan 2011) y en los datos obtenidos luego de anotar el genoma de *H. seropedicae* SmR1, disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (NC_014323) utilizando el servidor RAST (<http://rast.nmpdr.org/>) (Aziz et al. 2008).

En la Figura 11 se muestra el esquema de trabajo diseñado para construir cada mutante.

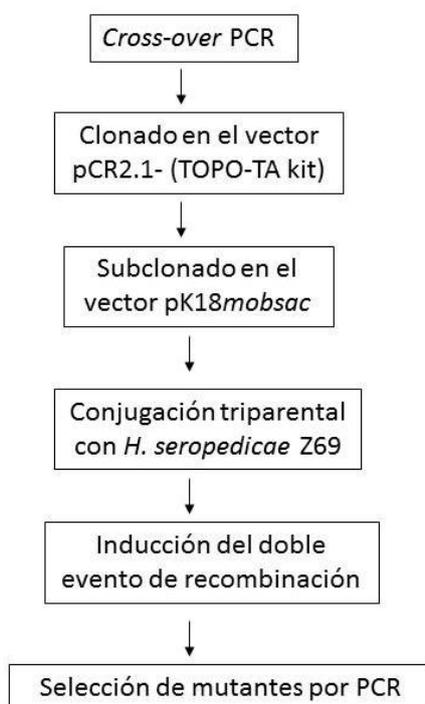


Figura 11: Procedimiento llevado a cabo para la construcción de los mutantes.

4.2.1 cross-over PCR

Utilizando la técnica de mutagénesis mediada por *cross-over* PCR (Sukdeo & Charles 2003), que se muestra en la Figura 12, se amplificaron los fragmentos de ADN necesarios para construir cada mutante. Esta técnica consiste en reemplazar un segmento de la región codificante de un gen, por un pequeño fragmento de 21 nucleótidos, sintetizado mediante una serie de reacciones de PCR, tal como se describe en la Figura 12. Los cebadores 1rev y 2for contienen secuencias complementarias entre sí de 21pb. Esta metodología mantiene intacto el marco de lectura del gen mutado y la expresión de los genes adyacentes. De esta manera se obtienen mutantes no polares, que no expresan exclusivamente el/los gen/es de interés.

Para ello se diseñaron cebadores específicos, en base a la secuencia de los genes (ORFs) seleccionados a partir del genoma de *H. seropedicae* SmR1, utilizando el programa PrimerSelect de la compañía DNASTAR (<http://www.dnastar.com/t-primerselect.aspx>). Se corroboró la calidad de los cebadores seleccionados utilizando el programa FastPCR 6.3 (<http://primerdigital.com/tools/>) y el programa ApE (A plasmid Editor) de M. Wayne Davis (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>). En la Tabla 8 se muestran los cebadores diseñados para cada gen. Los mismos se sintetizaron en Macrogen (Corea del Sur).

Con el programa ApE se analizaron las secuencias de las construcciones que se obtendrían por PCR, a fin de verificar la ausencia de sitios de restricción *HindIII* y *XbaI*. A su vez se determinaron los perfiles de restricción que se obtendrían, en cada caso, al utilizar la enzima de restricción *EcoRI* que casualmente corta en un solo sitio a las construcciones realizadas.

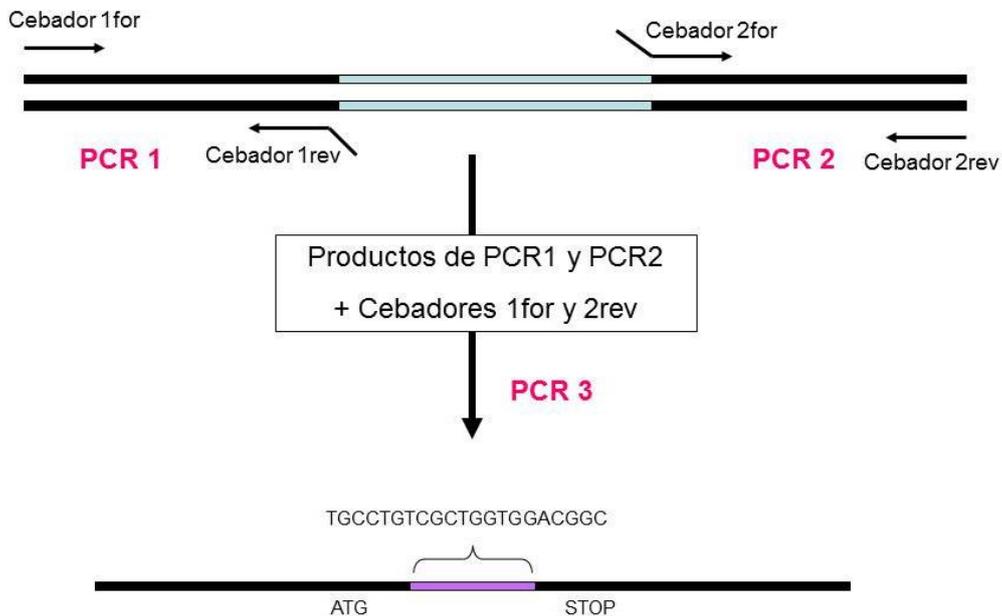


Figura 12: *Cross-over* PCR. Figura extraída y modificada de Sukdeo & Charles, (2003).

Se realizaron los ensayos de PCR1 (cebadores 1for y 1rev) y PCR2 (cebadores 2for y 2rev) por separado, utilizando el termociclador Gene Touch marca Bioer Technology (China) con el siguiente programa: 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de 1 minuto a 93°C, 30 segundos a la temperatura de hibridación detallada en la Tabla 9 y 1 minuto a 72°C y una extensión final de 10 minutos a 72°C. Cabe mencionar que para cada PCR se ensayaron 3 temperaturas de hibridación: 50°C, 60°C y 65°C. Para seguir trabajando se eligió la condición que produjo mejores resultados en lo que refiere a la amplificación de un fragmento de ADN del tamaño esperado (Tabla 10) con una concentración adecuada para su posterior procesamiento.

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 20µl conteniendo *buffer* de reacción 1X, dNTPs 1µM, 0,5µM de cada cebador, 0,05U/µl de Taq-polimerasa (SBS, China) y agua bi-distilada en cantidades necesarias. Como ADN molde se utilizó 2µl de un lisado celular de *H. seropedicae* Z69 preparado como se detalla en el Anexo 10.2.1.

El resultado de todas las reacciones de PCR se observó mediante electroforesis en gel de agarosa tal como se describe en el Anexo 10.2.2. En los casos que no fue posible amplificar un fragmento único, se repitió la reacción de PCR en un volumen de 50µl, se sembró todo el volumen en el gel de agarosa y el fragmento del tamaño de interés se purificó del gel, luego de realizada la electroforesis, utilizando el kit PureLink de Invitrogen (Alemania).

El tercer PCR (PCR3) se realizó utilizando como templados 1µl de los PCR anteriores (PCR1 y PCR2), o 1µl de fragmento aislado, según el caso y el siguiente programa: 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de 1 minuto a 93°C, 45 segundos a la temperatura de hibridación detallada en la Tabla 9 y 1,5 minutos a 72°C y una extensión final de 10 minutos a 72°C. En la reacción de PCR se utilizaron los cebadores 1for y 2rev y demás reactivos en las cantidades mencionadas previamente.

En todos los PCR se realizó un control negativo conteniendo todos los reactivos de la reacción menos el ADN molde.

Tabla 8: Cebadores diseñados para la construcción de los mutantes por *cross-over* PCR.

Nombre	Secuencia 5'a 3'
Xilosa deshidrogenasa (<i>fabG</i>, <i>Hsero_4497</i>)	
fabG1for	GCCGGCAACATGGGCGAACTGGA
fabG1rev	GCCGTCCACCAGCGACAGGCAGCCGGCGAGGCTGCGATAGAGG
fabG2for	TGCCTGTCGCTGGTGGACGGCCCCCGAAGAAGAGGCGAAATCC
fabG2rev	GCGGTGGGGCGGCGGCAGTT
Glucosa deshidrogenasa (<i>Hsero_1671</i>)	
GDH1 for	CCCTGGGCAAGACCGAGAAAGA
GDH1 rev	GCCGTCCACCAGCGACAGGCAGGACTTGAAGGCCGAACTGCG
GDH2 for	TGCCTGTCGCTGGTGGACGGCCGCGCATGACCACGAGAAC
GDH2 rev	GCAGGGCGGCGGCGAACT
Xilonato deshidratasa (<i>Hsero_4498</i>)	
4498.1 for	GGGCGGGGTGGACATCCTCATCAA
4498.1 rev	GCCGTCCACCAGCGACAGGCAGGTGGGGCGGCGGCAGTTCTC
4498.2 for	TGCCTGTCGCTGGTGGACGGCATGCTGGTCAGCGAGGAAGAG
4498.2 rev	GAGCAGGGTGTTGGCGTCATCGT
Xilonato deshidratasa (<i>ilvD</i>, <i>Hsero_3335</i>)	
ilvD1for	CACGGTGCCGGCCATGAGGGATTT
ilvD1rev	GCCGTCCACCAGCGACAGGCACGATGTGCCGCCGCTGTGGTGT
ilvD2for	TGCCTGTCGCTGGTGGACGGCAGACGTACGCGCCGGCAAGATGAC
ilvD2rev	GCAGGCCGCCAGCGTAGTAGAAAT
Xilitol deshidrogenasa (<i>Hsero_3396</i>)	
XOH 1 for	CTACGGTCCCTATGCGGTGTTCTG
XOH1 rev	GCCGTCCACCAGCGACAGGCATGCTGCCATGGGTGTAGTAGT
XOH2 for	TGCCTGTCGCTGGTGGACGGCTTCATCTCGCGCAAGTTCCCC
XOH2 rev	CACGCGGTCGGCCAGGGTCAT

Tabla 9: Temperatura de hibridación (°C) empleada en cada PCR para cada gen.

Gen	PCR1	PCR2	PCR3
<i>fabG</i>	65	65	65
<i>ilvD</i>	65	60	65
<i>Hsero_1671</i>	60	60	60
<i>Hsero_3396</i>	58	58	60
<i>Hsero_4498</i>	60	65	65

Tabla 10: Tamaño esperado, en pares de bases, de cada fragmento amplificado por cada reacción de PCR. PCRwt corresponde al fragmento amplificado con las condiciones de PCR3 usando como templado ADN de la cepa salvaje.

ORF	PCR1	PCR2	PCR3	PCRwt
<i>fabG</i>	570	510	1059	1619
<i>Hsero_1671</i>	506	440	925	2197
<i>Hsero_4498</i>	865	619	1463	2741
<i>ilvD</i>	552	488	1019	2059
<i>Hsero_3396</i>	471	743	1193	1956

4.2.2 Clonado en vector pCR2.1-TOPO

El producto obtenido en el PCR3 se clonó en el vector pCR2.1-TOPO utilizando el kit de Invitrogen (EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Con esta mezcla de ligación se transformaron células competentes de *E. coli* TOP10 (Anexo 10.2.3 y 10.2.4) (Sambrook et al. 1989). 100µl de esta suspensión celular se sembró, mediante rastrillado, en placas de LB con 50µg/ml de kanamicina (Km⁵⁰) y 20µg/ml Xgal (X-gal²⁰) y se incubaron a 37°C. Se seleccionaron las colonias blancas, que presuntivamente habrían incorporado el vector con el inserto. Los plásmidos contenidos en las colonias seleccionadas fueron analizados mediante extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina (anexo 10.2.5) y posterior restricción enzimática con la enzima *EcoRI* (Bioron, Alemania). La calidad del ADN plasmídico y los productos de restricción se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa, tal como se describe en el anexo 10.2.2.

Los plásmidos que presentaron el perfil de restricción esperado se secuenciaron (a partir del cebador M13 forward) en el Servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur (IP) de Montevideo a los efectos de verificar si la construcción era la correcta. La secuencia obtenida se analizó mediante BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando como base de datos todas las secuencias nucleotídicas del GenBank. En algunos casos se realizó un alineamiento adicional utilizando el programa ApE.

4.2.3 Subclonado en *pk18mobsacB*

El fragmento de interés se subclonó en el sitio *HindIII-XbaI* del vector *pk18mobsacB*. Para ello, dicho fragmento se recuperó a partir del vector pCR2.1 TOPO mediante digestión simultánea con las enzimas de restricción *HindIII* y *XbaI* de Promega (EEUU), según las instrucciones del fabricante. La mezcla de digestión se sometió a una electroforesis en gel de agarosa de acuerdo a lo descrito en el Anexo 10.2.2 y se aisló el fragmento correspondiente al inserto, utilizando el kit PureLink de Invitrogen (Alemania).

Luego se procedió a clonar el inserto (construcción de interés) en el vector *pk18mobsacB* previamente digerido con *HindIII* y *XbaI*. La ligación se realizó en un volumen final de 20µl, conteniendo buffer de ligación 1X, 5U de enzima T4-DNA ligasa de Bioron (Alemania) y aproximadamente 175ng de inserto y 100ng de vector lineal (relación molar inserto: vector (10:1)), La reacción se incubó a 16°C durante toda la noche. Con esta mezcla de ligación se transformaron células competentes de *E. coli* TOP10 de forma similar a lo descrito anteriormente. Se seleccionaron las colonias blancas. Las células seleccionadas fueron cultivadas en 5ml de caldo LB, se extrajo el ADN plasmídico por lisis alcalina (Anexo 10.2.5) y se verificó la presencia del inserto de tamaño adecuado mediante electroforesis en gel de agarosa (Anexo 10.2.2), luego de digerir una alícuota con *HindIII* y *XbaI* (Promega, EEUU) tal como se describió anteriormente.

4.2.4 Mutagénesis del gen de interés en *H. seropedicae* Z69

El vector *pk18mobsacB* con la construcción de interés se transfirió a *H. seropedicae* mediante conjugación triparental (Anexo 10.2.6). Las colonias transconjugantes (simples eventos de recombinación) se seleccionaron en TY-Km⁵⁰-NaI⁵⁰.

Para inducir el doble evento de recombinación, algunos transconjugantes seleccionados se cultivaron en caldo TY sin antibiótico durante toda la noche. Cada uno de estos cultivos se utilizó para preparar diluciones (10⁻²) en medio TY líquido y se sembró en superficie 100µl de cada suspensión celular en placas con TY-sacarosa 15% (p/v). Las placas se incubaron a 30°C por 48 horas.

Cada una de las colonias obtenidas se repicaron a medio sólido TY y TY-Km⁵⁰. Las colonias sensibles a Km se analizaron mediante PCR para verificar la presencia del gen mutado. Para ello se realizó un ensayo de PCR usando como templado un lisado celular de cada colonia y manteniendo las mismas condiciones del PCR3 descrito anteriormente. En los ensayos de PCR de los posibles mutantes Z69Δ*fabG*Δ4498 se utilizaron los cebadores *fabG1for* y *4498.2rev* y 60°C de temperatura de hibridación. En todos los ensayos de PCR se usaron como controles, lisados de la cepa salvaje y de la cepa portando el simple evento de recombinación. Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Los tamaños esperados se detallan en la Tabla 10, en dónde cada clon mutante debería amplificar un fragmento del tamaño del PCR3 y en los casos de aquellos clones que revirtieron al genotipo salvaje debería amplificar un fragmento mayor. Así, se eligió un solo clon con la mutación de interés para seguir trabajando. Como un control adicional, para confirmar la identidad del fragmento de ADN que correspondería al gen mutado, el mismo se secuenció (Servicio de Secuenciación del IP de Montevideo), usando el cebador *1for* del gen en estudio

(en el caso del mutante doble Z69 Δ *fabG* Δ 4498 se utilizó para secuenciar el cebador 4498.2 rev) y la secuencia obtenida se analizó mediante BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando como base de datos la colección de secuencias nucleotídicas del Gen Bank.

4.3 Ensayo de complementación de función

El ensayo de complementación de función se realizó para el mutante Z69 Δ *fabG*. Para ello se utilizaron dos estrategias: se expresó la copia salvaje del gen *fabG* en el vector de expresión pBBR1MSC-2 o se lo integró en el genoma de Z69 Δ *fabG* utilizando el vector suicida pK18*mobsacB*.

4.3.1 Vector de amplio espectro pBBR1MSC-2

En primer término se amplificó una copia del gen salvaje en estudio utilizando las mismas condiciones del ensayo PCR3 (ver punto 4.2.1), usando como templado un lisado celular de la cepa salvaje de *H. seropedicae* Z69.

El producto de amplificación del tamaño esperado fue visualizado en una electroforesis en gel de agarosa, tal como se describe en el Anexo 10.2.2, y purificado a partir del gel utilizando el kit Zymoclean™ (Zymo Research, EEUU). Este fragmento se clonó en el vector pCR2.1-TOPO del kit TOPO TA, y se verificó su identidad según el perfil de restricción y secuenciación, tal como se describió en el punto 4.2.2

Una alícuota de este ADN plasmídico se digirió con la enzima de restricción *EcoRI* (Bioron, Alemania), se realizó una electroforesis en gel de agarosa y se aisló dicho fragmento con el kit Zymoclean™ (Zymo Research, EEUU). Este fragmento clonado contenía un sitio *EcoRI* hacia el final de la construcción, pero por fuera del gen *fabG*.

El fragmento conteniendo la copia salvaje del gen *fabG* se subclonó en el vector pBBR1MSC-2 previamente digerido con *EcoRI*. La ligación se realizó utilizando la enzima T₄-DNA ligasa (Bioron, Alemania) tal como se mencionó en el punto 4.2.3. Con esta mezcla de ligación se transformaron por shock térmico células competentes de *E. coli* TOP10 y se seleccionaron las colonias blancas que crecieron luego de 24 horas de incubación en LB-Km⁵⁰-Xgal²⁰. Las células seleccionadas fueron cultivadas en 5ml de caldo LB, se extrajo el ADN plasmídico mediante lisis alcalina y se digirió una alícuota con *EcoRV* (New England Biolabs, EEUU). Se confirmó la presencia del inserto del tamaño de interés y en la orientación correcta mediante una electroforesis en gel de agarosa.

El vector pBBR1MSC-2 con la copia salvaje del gen *fabG* se movilizó hacia *H. seropedicae* Z69 Δ *fabG* mediante conjugación triparental como se explicó previamente. Además se construyeron las siguientes cepas como control:

- *H. seropedicae* Z69 pBBR1MSC-2
- *H. seropedicae* Z69 pBBR1MSC-2:*fabG*wt
- *H. seropedicae* Z69 Δ *fabG*pBBR1MSC-2

4.3.2 Vector de espectro reducido pK18*mobsacB*

La copia salvaje del gen *fabG* clonado en el vector pCR2.1-TOPO se subclonó en el vector pK18*mobsacB* en el sitio *EcoRI*, siguiendo la metodología descrita en el punto 4.2.3.

Este vector se movilizó a la cepa Z69Δ*fabG* mediante conjugación triparental como se describe en el Anexo 10.2.6. Se seleccionaron los clones capaces de crecer en TY-km⁵⁰-NaI³⁰ y se prepararon lisados, tal como se describe en el Anexo 10.2.1. Mediante 2 ensayos de PCR diferentes se verificó cual evento de recombinación había ocurrido, de modo de seleccionar aquel clon que contuviera una copia intacta del gen salvaje (ver Figura 17). Los ensayos de PCR se realizaron con el mismo programa empleado en los ensayos PCR3 previamente descrito. En este caso se utilizó una temperatura de hibridación de 60°C. Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20μl conteniendo Mango Mix 1X de la marca Bioline (Reino Unido), 0,5μM de cebador fabG1for o del cebador fabG2rev, 0,5μM de cebador M13reverse (proporcionado por el kit TOPO TA Cloning de Invitrogen, EEUU) y 2μl de lisado. Cada ensayo de PCR incluyó un control negativo sin ADN molde y un control positivo en donde se utilizó el vector pK18*mobsacB:fabGwt* como ADN molde. Los resultados de estas reacciones de PCR se observaron en electroforesis en gel de agarosa tal como se describe en el Anexo 10.2.2.

4.4 Curvas de crecimiento

Los perfiles de crecimiento se determinaron a partir de cultivos ensayados en placas de microtitulación estériles de 96 pocillos conteniendo 200μl de medio LGI suplementado con 30μg/ml de nalidíxico y con distintas fuentes de carbono a diferentes concentraciones según se indica en cada caso. En el caso de las cepas complementadas se adicionó además 50μg/ml de kanamicina tanto en la placa de microtitulación como en los cultivos de inóculos, de forma de asegurar el mantenimiento del plásmido replicable o del cointegrado.

Los cultivos de inóculos se cultivaron en 5ml de medio líquido TY-NaI³⁰ por 24 horas a 30°C y 200rpm. Se extrajeron 1,3ml de cada cultivo, se centrifugaron a 6000rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en igual volumen de LGI sin fuente de carbono. Cada pocillo se inoculó con 20μl de suspensión celular. Los crecimientos para cada cepa y para cada condición se realizaron por cuadruplicado. También se incluyeron controles negativos sin inocular.

Las medidas de densidad óptica a 620nm se realizaron en el instrumento Varioskan Flash, versión 4.00.51 de la marca Thermo Scientific (EEUU) cada 2 horas. La placa se incubó dentro del equipo a 30°C por 50 horas. El crecimiento se monitoreó utilizando el programa del equipo: SkanIt Software 2.4.3 RE.

Se graficó el promedio de cada medida en función de la variable tiempo. Las barras de error corresponden al desvío estándar.

Para calcular la velocidad específica de crecimiento (μ) se graficó el logaritmo natural del promedio de densidad óptica en función del tiempo para cada cepa y para cada condición. Utilizando el método de mínimos cuadrados se determinó la mejor recta que ajustara a los datos, en donde la pendiente corresponde a la velocidad de crecimiento específica. La

pendiente se calculó con datos de la fase exponencial y se descartaron los valores de los extremos de modo que la pendiente fuera máxima.

4.5 Medidas de actividades enzimáticas

Las actividades enzimáticas fueron determinadas en extractos celulares preparados a partir de *H. seropedicae* Z69 salvaje y los diferentes mutantes cultivados por 40 horas en matraces Erlenmeyer de 2L conteniendo 300ml de medio líquido LGI en las siguientes condiciones:

- Condición 1 - cepa salvaje en presencia de 30g/l de glucosa
- Condición 2 - cepa salvaje con 30g/l de xilosa y 50mM de *buffer* MES pH=7,0
- Condición 3 - Z69 Δ *fabG* con 30g/l de xilosa y 50mM de *buffer* MES pH=7,0
- Condición 4 - Z69 Δ *fabG* con 10g/l de xilosa
- Condición 5 - Z69 Δ *fabG* pBBR1-*MSC2:fabGwt* con 30g/l de xilosa, 50mM de *buffer* MES pH=7,0 y 50 μ g/ml de kanamicina
- Condición 6 - Z69 Δ *fabG*(pBBR1-*MSC2:fabGwt*) con 10g/l de xilosa y 50 μ g/ml de kanamicina

Los matraces fueron inoculados con 30ml de un cultivo previamente crecido durante 24 horas en medio LGI suplementado con 10g/l de xilosa o glucosa según corresponda. Como pre-inóculo se utilizó 5ml de un cultivo de la cepa de interés crecido durante 24 horas en medio TY. Todos los cultivos se incubaron a 30 °C con agitación orbital de 200rpm.

Las células de los Erlenmeyer de 2 litros crecidas por 40 horas fueron recolectadas por centrifugación y se lavaron con una solución amortiguadora de fosfato de sodio 50mM pH=7,6. Aproximadamente 6g del *pellet* húmedo se resuspendió en 5ml de la misma solución.

Los extractos celulares fueron obtenidos con una prensa French Press Aminco (EEUU). Se utilizó una presión de trabajo de 13.000psi. La suspensión obtenida se centrifugó a 14.000rpm por 30 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se fraccionaron en varias alícuotas y las mismas se guardaron a -20°C hasta efectuar las determinaciones enzimáticas correspondientes.

La actividad enzimática de xilosa deshidrogenasa se estimó midiendo la aparición del NADH por aumento de la absorbancia a 340nm cada 0,2 segundos entre los 5 y 60 segundos luego de iniciada la reacción. Los ensayos se llevaron a cabo en cubetas de cuarzo, con un volumen final de 1ml, en donde se adicionó 895 μ l de *buffer* fosfato de sodio 50mM pH=7,6, 20 μ l del extracto celular, 80 μ l de NAD⁺ 50mM y 5 μ l de xilosa 1M (Stephens et al. 2007) (Los extractos celulares de Z69 Δ *fabG* pBBR1-*MSC2:fabGwt* se diluyeron previamente diez veces con solución amortiguadora de fosfato de sodio 50mM pH=7,6). La reacción comenzó a monitorearse luego del agregado de la xilosa. Todas las medidas se corrigieron descontando el NADH producido, independientemente de la presencia de xilosa (ensayo blanco sin xilosa).

La actividad de la enzima xilitol deshidrogenasa se estimó midiendo la aparición de NADH por medidas de absorbancia a 340nm cada 0,2 segundos entre los 5 y 40 segundos luego de comenzada la reacción. Se utilizó un volumen final de reacción de 1ml en donde se adicionó 850 μ l de *buffer* Tris-HCl 50mM pH=8,5, 20 μ l de extracto celular, 20 μ l de NAD⁺ 50mM y 10 μ l de xilitol 1M. La reacción comenzó a cuantificarse luego del agregado del xilitol (Jin & Jeffries,

2004). Todas las medidas se corrigieron descontando el NADH producido independientemente de la presencia de xilitol (actividad basal del extracto celular).

La actividad de la enzima glucosa deshidrogenasa se estimó midiendo la disminución de absorbancia del DCIP a 600nm cada 0,2 segundos en el intervalo entre los 10 segundos y los 240 segundos luego de comenzada la reacción. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 1ml, conteniendo 820µl de *buffer* fosfato de sodio 0,1M pH=7,0, 50µl de DCIP 3mM, 100µl de PMS 0,4mM, 10µl de extracto celular y 20µl de glucosa 1M. En todos los casos se realizó un control negativo, conteniendo todos los reactivos mencionados, menos la glucosa.

Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 (Japón).

El ensayo de actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se realizó en Departamento de Microbiología del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de San Pablo, Brasil. El extracto celular se preparó a partir de células de *H. seropedicae* Z69 crecidas durante toda la noche a 30°C y 200rpm en 5 ml de caldo TY. Las células fueron recolectadas por centrifugación, se lavó el *pellet* celular con *buffer* Tris 50mM pH=7,0 y se resuspendió en 1ml de *buffer* de equilibrio (fosfato de sodio 50mM pH=7,0, glicerol 10%(v/v), NaCl 5mM, β-mercaptoetanol 10mM e imidazol 10mM). La suspensión celular se procesó en un sonicador manteniendo el tubo en hielo. Las micelas obtenidas se centrifugaron 5 minutos a 13.000rpm y el sobrenadante se conservó en hielo para su posterior utilización durante el día.

La actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se estimó midiendo la aparición de NADH a 340nm cada 0,2 segundos en el intervalo entre los 10 segundos y 240 segundos luego de iniciada la reacción. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 300µl, conteniendo 280µl de *buffer* de medición (Tris 50mM pH=8,0, MgCl₂ 5mM, NaCl 5mM, β-mercaptoetanol 10mM, glicerol 10%(v/v), NAD⁺ 0,5mM (o NADP⁺ 0,5mM), glucosa-6-fosfato 1mM) y 20µl de extracto celular.

Las actividades enzimáticas se estimaron a partir de las curvas de absorbancia versus tiempo, calculando la pendiente de la parte lineal de cada curva. Una unidad enzimática (U) está definida por la cantidad de enzima que se requiere para reducir 1µmol de NAD⁺ o NADP⁺ en 1 minuto. Cada medida se realizó por triplicado y los errores corresponden a la desviación estándar de los valores de actividad obtenidos en medidas independientes.

La determinación de proteínas en cada extracto celular se realizó por el método de Bradford y utilizando seroalbúmina bovina para la curva de calibración (Bradford 1976).

4.6 Perfil de crecimiento y acumulación de PHB en Erlenmeyer

Este ensayo se realizó con la cepa salvaje de *H. seropedicae* Z69 y con el mutante Z69Δ*fabG* en matraces Erlenmeyer de 2 litros conteniendo inicialmente 250ml de medio LGI suplementado con 30g/l de xilosa. Cada Erlenmeyer se inoculó con 25ml de una suspensión celular cultivada durante 12 horas para la cepa salvaje y 24 horas para el mutante Z69Δ*fabG* en matraces Erlenmeyer de 1L conteniendo 100ml de medio LGI con 10g/l de xilosa. Como pre-inóculo se utilizó un cultivo de cada cepa incubado durante 24 horas en tubos conteniendo aproximadamente 10ml de caldo TY. Todos los cultivos se incubaron a 30°C con agitación orbital a 200rpm.

De cada Erlenmeyer de 2 litros se tomaron muestras de forma aséptica a distintos tiempos para las determinaciones de densidad óptica a 620nm, biomasa celular, concentración de PHB y pH. Cada muestra se analizó por duplicado.

4.6.1 Determinaciones analíticas

La medida de densidad óptica se realizó en el espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 (Japón) a una longitud de onda de 620nm, empleando agua como blanco y realizando las diluciones adecuadas con agua en los casos necesarios.

La biomasa celular, definida como el peso seco celular, se determinó a partir de 1ml de cultivo. Las muestras se centrifugaron por 10 minutos a 10.000rpm. Los *pellets* de células se lavaron dos veces con el mismo volumen de agua destilada y fueron secados en estufa a 60°C por 72 horas o hasta peso constante. Se pesaron en balanza analítica.

La concentración de PHB se determinó mediante el peso seco del material polimérico extraído a partir de volúmenes de cultivo conocidos. Para ello, se tomaron muestras de 5ml o 10ml de cultivo bacteriano y se centrifugaron por 10 minutos a 10.000 rpm. Para la extracción del polímero, el *pellet* celular se sometió a lisis con igual volumen de hipoclorito de sodio 5% por 2 horas, a 37°C. El contenido celular liberado se centrifugó a 10.000 rpm por 10 minutos y se lavó dos veces con agua destilada. Se determinó el PHB acumulado por unidad de volumen mediante el pesado del material luego de secado en estufa a 60°C hasta peso constante.

Los valores de biomasa (X_t) y concentración de PHB fueron expresados en gramos de peso seco por litro de cultivo. La biomasa residual (X_r) se calculó como la biomasa total menos el valor de concentración de PHB acumulado. El contenido de PHB se define como el porcentaje en peso de PHB acumulado en las células secas totales y se calcula a partir de los datos de biomasa y concentración de PHB. La productividad se calcula dividiendo la concentración de PHB (en g/l) entre el tiempo necesario para alcanzar esa concentración.

El pH se midió con pHmetro marca Oakton siguiendo las instrucciones del fabricante en los sobrenadantes de las muestras extraídas del cultivo.

4.7 Cultivos en lote y lote alimentado en fermentador

Se realizaron cultivos en lote con un pulso de xilosa y lote alimentado con la cepa salvaje de *H. seropedicae* Z69 y con el mutante Z69 Δ *fabG*. Estos ensayos se realizaron en el Departamento de Microbiología del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de San Pablo, Brasil.

Como pre-inóculo se utilizó una suspensión celular crecida por 24 horas a 30°C y 150rpm de agitación orbital en un Erlenmeyer de 250ml conteniendo 50ml de medio TY. Los inóculos se incubaron en las mismas condiciones en Erlenmeyer de 1L conteniendo 200ml de medio LGI suplementado con 10g/l de xilosa y 20ml de pre-inóculo.

El cultivo en lote de la cepa salvaje de *H. seropedicae* Z69 se llevó a cabo en un biorreactor Biostat B (Braun Biotech International, Alemania) de 5 litros, conteniendo inicialmente 2 litros de cultivo.

El cultivo en lote del mutante Z69 Δ fabG y los cultivos en lote alimentado se llevaron a cabo en el biorreactor BioBundles con controlador automático ez-Control (Applikon Biotechnology, Holanda) de 7 litros, conteniendo inicialmente aproximadamente 2,5 litros de cultivo.

En todos los casos se utilizaron las mismas condiciones de operación: temperatura 34°C, aireación 1litro/minuto, velocidad de agitación inicial 300rpm, oxígeno disuelto mayor al 40% mediante el aumento de la agitación (en el caso de la cepa salvaje cultivada en lote también fue necesario aumentar la aireación hasta 3 litros/minuto). El pH se mantuvo en 7,0 mediante la adición automática de NaOH 2N o H₂SO₄ 0,5N.

En todos los casos se utilizó el medio LGI modificado, tal como se detalla en el Anexo 10.1. En los cultivos en lote se adicionó 30g/l de xilosa al inicio y luego se dio un pulso de xilosa hasta llegar a una concentración de aproximadamente 30g/l cuando ésta bajó a aproximadamente 5g/l.

Los cultivos en lote alimentado se iniciaron como un cultivo en lote con medio LGI conteniendo 0,26g/l de (NH₄)₂SO₄ y 2g/l de xilosa. A las 4 o 5 horas se comenzó la alimentación con un flujo aproximado de 2ml/minuto. La solución de alimentación contenía 300g/l de xilosa y 8g/l de (NH₄)₂SO₄.

Luego de iniciada la incubación, se extrajeron muestras (25-30ml) de forma aséptica cada 1 hora durante la fase exponencial y luego cada tres horas. En los cultivos en lote alimentado las muestras se tomaron cada 2 horas. De cada muestra, se determinó por duplicado, pH, biomasa, concentraciones de PHB, xilosa, amonio y ácidos orgánicos presentes en el sobrenadante.

A los inóculos y a una muestra tomada al final de cada ensayo en biorreactor se le realizaron controles de contaminación en placa de Petri conteniendo medio TY sólido y frotis con tinción de Gram, el cual se observó en un microscopio óptico.

4.7.1 Determinaciones analíticas

Se tomaron 10ml de cada muestra de biorreactor, se centrifugó 10 minutos a 8.000rpm, el sobrenadante se guardó a -20°C y el *pellet* se resuspendió en 1-2ml de agua desionizada. Cada *pellet* resuspendido se transfirió a tubos de 2ml y se centrifugó a 14.000rpm por 10 minutos. El *pellet* celular se guardó a -20°C hasta su liofilización.

La biomasa total (Xt) fue determinada pesando las células liofilizadas obtenidas a partir de 10ml de cultivo.

Para cuantificar la concentración de PHB, muestras de aproximadamente 10mg de células liofilizadas utilizadas para la determinación de biomasa fueron sometidas a propanólisis (Riis & Mai 1988) y los propil-ésteres formados fueron cuantificados mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID), según el protocolo descrito por Gómez et al. (1996). En el Anexo 10.3 se muestran con más detalle estos protocolos.

La concentración de xilosa en el sobrenadante se determinó por HPLC (Dionex Ultimate 3000) equipado con una columna Aminex HPX87-H (Biorad, EEUU) y detector de índice de refracción (IR). La fase móvil fue agua milli-Q, el flujo de corrida 0,6ml/min y la temperatura de la columna 45°C. Se utilizó un detector de índice de refracción marca Shodex (EEUU).

La concentración de amonio en el sobrenadante del medio de cultivo se determinó utilizando un electrodo de amonio (Thermo Orion, Waltham, MA, EEUU).

La concentración de ácidos orgánicos en los sobrenadantes se determinó por HPLC (Dionex Ultimate 3000) equipado con una columna Biorad-aminex HPX-87H. La fase móvil fue H_2SO_4 0,005M en agua ultra pura, el flujo de corrida 0,6 ml/min y la temperatura de la columna 60°C. Se utilizó un detector de índice de refracción marca Shodex (EEUU). Se realizaron curvas de calibración con los siguientes estándares: piruvato, succinato, lactato, acetato y formiato.

4.7.2 Cálculos

Los valores de biomasa (X_t) y concentración de PHB fueron expresados en gramos de peso seco por litro de cultivo. La biomasa residual (X_r) se calculó como la biomasa menos el valor de concentración de PHB acumulado.

Como el volumen del biorreactor varió más del 10% a lo largo del tiempo, todos los valores se corrigieron considerando los volúmenes reales y se expresaron en gramos. En cada cultivo en lote fue posible definir uno o más estados *pseudo*-estacionarios caracterizados por velocidades específicas constantes que se calcularon según lo indicado en el Anexo 10.4. En los cultivos en lote alimentado las velocidades volumétricas son constantes, mientras que las velocidades específicas varían continuamente, y por eso se calcularon para cada punto, utilizando las ecuaciones que se muestran en el Anexo 10.4. La velocidad específica de crecimiento se expresó en h^{-1} , mientras que las demás velocidades se expresaron en $\text{mmol.g}_{X_r}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

La productividad se calcula como la cantidad de PHB acumulada por unidad de volumen de medio de cultivo presente en el biorreactor en ese momento y por unidad de tiempo transcurrido.

4.8 Construcción de la red metabólica y análisis de balance de flujos

La red metabólica de *H. seropedicae* Z69 se construyó en base a la red del metabolismo central de *Escherichia coli* propuesta por Orth et al. (2010) y disponible en <http://systemsbiology.ucsd.edu/Downloads/EcoliCore>.

Se verificó que todas las reacciones del modelo se encontraran en *H. seropedicae* SmR1 utilizando dos bases de datos: KEGG (<http://www.genome.jp/kegg>) y BioCyc (<http://biocyc.org>).

Utilizando la herramienta COBRA (Schellenberger et al. 2011) en Matlab versión R2010a con el *solver* glpk se adicionaron reacciones al modelo para la ruta de Entner Doudoroff, síntesis de PHB y consumo de xilosa utilizando la función `addReaction`. Para eliminar reacciones, se marcó flujo 0, tanto en el límite superior, como en el inferior, usando la función `changeRxnBounds`. Esta misma función se utilizó para restringir los flujos de acuerdo a las velocidades específicas observadas experimentalmente.

Se realizó análisis de balance de flujos maximizando la función objetivo elegida, utilizando la función: `optimizeCbModel(modelo, 'max')`. En algunos casos se eligió la síntesis de PHB como función objetivo, usando la función

`changeObjective(modelo, 'sintPHB')`. Si no se elige función objetivo, COBRA optimiza, por defecto, el flujo a través de la ecuación de biomasa.

5. RESULTADOS

5.1 Identificación de genes y vías metabólicas implicadas en el catabolismo de xilosa

Se anotó nuevamente el genoma de *H. seropedicae* SmR1 utilizando el servidor RAST. Sólo el 50% de los ORFs se lograron anotar y ubicar dentro de un subsistema. Se encontraron varios genes pertenecientes al subsistema de utilización de xilosa, entre ellos los que codificarían para los transportadores (*xyIF* y *xyIG*) y la proteína reguladora activadora (*xyIR*). También se identificó el gen *fabG* como candidato a codificar para la xilosa deshidrogenasa, el ORF *Hsero_4498* como candidato a codificar para la xilonato deshidratasa, y el ORF *Hsero_0147* como candidato a codificar para la enzima cetoglutárico semialdehído deshidrogenasa, todas enzimas de la ruta de Weimberg (Figura 5, Tabla 5). Además, se encontraron dos copias del gen *xyIB* que codificarían para la xilulosa quinasa y un ORF *Hsero_3396* que codificaría para la xilitol deshidrogenasa de la ruta oxo-reductiva (Figura 3, Tabla 5). Los nombres de estos genes, por practicidad, son los que figuran en el GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/NC_014323).

5.2 Construcción de las cepas mutantes

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el punto anterior y en los alineamientos realizados previamente (Malan, 2011) (Tabla 5), se construyeron mutantes de *H. seropedicae* Z69 en genes candidatos a estar involucrados en el catabolismo de xilosa.

En la Tabla 11 se detallan los mutantes de construidos en este trabajo, mediante la eliminación de la mayor parte de la región codificante de cada gen.

Tabla 11: Mutantes construidos en este trabajo. En la columna de la derecha se nombra la presunta enzima que codificaría cada gen y entre paréntesis la ruta de degradación de xilosa en la que participaría.

Mutantes construidos	Cepa deficiente en el/los gen/es que codificaría/n para:
Z69Δ <i>fabG</i>	Xilosa deshidrogenasa (Weimberg)
Z69Δ <i>Hsero_1671</i>	Glucosa deshidrogenasa periplasmática dependiente de PQQ (Weimberg)
Z69Δ <i>fabG</i> Δ <i>Hsero_1671</i>	Xilosa deshidrogenasa (Weimberg) y glucosa deshidrogenasa periplasmática dependiente de PQQ (Weimberg)
Z69Δ <i>Hsero_4498</i>	Xilonato dehidratasa (Weimberg)
Z69Δ <i>fabG</i> Δ <i>Hsero_4498</i>	Xilosa deshidrogenasa (Weimberg) y xilonato dehidratasa (Weimberg)
Z69Δ <i>ilvD</i>	Xilonato dehidratasa (Weimberg)
Z69Δ <i>Hsero_3396</i>	Xilitol deshidrogenasa (oxo-reductiva)
Z69Δ <i>fabG</i> Δ <i>Hsero_3396</i>	Xilosa deshidrogenasa (Weimberg) y xilitol deshidrogenasa (oxo-reductiva)
Z69Δ <i>Hsero_4498</i> Δ <i>Hsero_3396</i>	Xilonato dehidratasa (Weimberg) y xilitol deshidrogenasa (oxo-reductiva)

Para la construcción de estas cepas mutantes se diseñaron cebadores específicos en base a la secuencia del genoma de *H. seropedicae* SmR1 y se realizaron 3 reacciones de PCR tal como se detalla en materiales y métodos. En la Figura 13 se muestra, a modo de ejemplo, los resultados obtenidos para el gen *fabG*, en dónde se observan los resultados obtenidos en cada amplificación. Para el PCR1 se espera un fragmento de 570pb, para el PCR2 un fragmento de 510pb y para el PCR3 un fragmento de 1059pb.

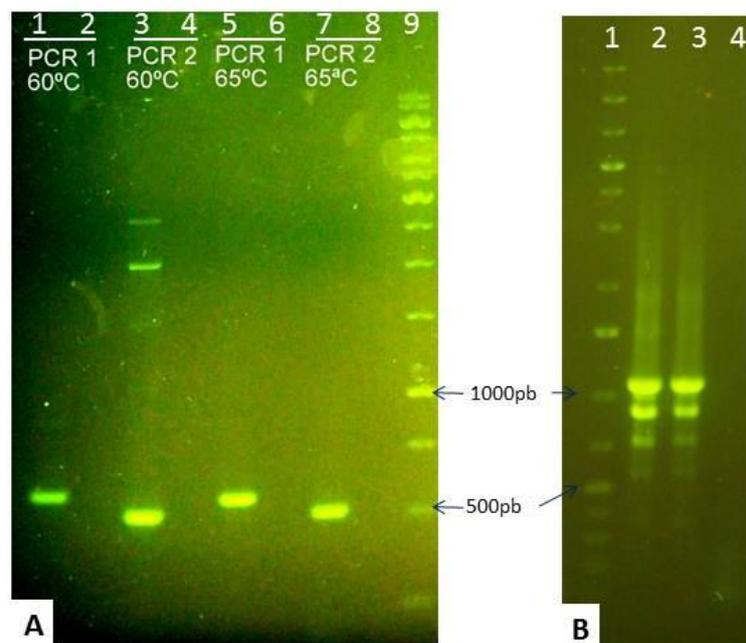


Figura 13: Electroforesis en gel de agarosa en donde se evidencian los fragmentos de ADN obtenidos en las reacciones de PCR realizadas para construir el mutante Z69Δ*fabG*. A) Se muestran los resultados de las reacciones de PCR 1 y 2 realizados con 2 temperaturas de hibridación diferentes indicadas en la figura. En lo carriles pares de la Figura A se incluye cada control negativo sin ADN. En el carril 9 se muestra el marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (Fermentas) B) Se muestra el resultado de dos reacciones de PCR idénticas para el PCR3 (carriles 2 y 3) en la cual se utilizó una temperatura de hibridación de 65°C. En el carril 4 se encuentra el control negativo sin ADN. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas).

Luego de la inducción del doble evento de recombinación, tal como se describe en materiales y métodos, se pueden obtener clones con genotipo mutante o clones con genotipo salvaje. Para diferenciarlos se realizó una reacción de PCR tal como se detalla en materiales y métodos. En la Figura 14 se muestran los resultados obtenidos para el mutante Z69Δ*fabG*. Los clones mutantes deberían amplificar fragmento de 1059pb, mientras que en los clones salvajes se espera un fragmento de amplificación de 1619pb. En cada caso se eligió un solo clon mutante para seguir trabajando.

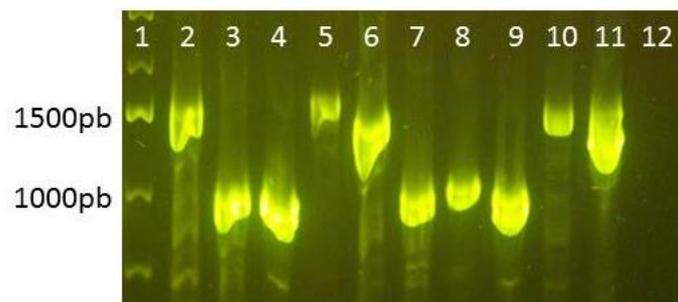


Figura 14: Electroforesis en gel de agarosa del PCR3 utilizado para diferenciar los clones salvajes (*wt*) de los mutantes Z69Δ*fabG* luego de la inducción del doble evento de recombinación. Los clones mostrados en los carriles 5, 6, 10 y 11 habrían revertido al genotipo salvaje, mientras que en los clones que se muestran en los carriles 3, 4, 7, 8 y 9 el gen *fabG* habría sido escindido. El carril 12 es el control negativo sin ADN molde, mientras que en el primer carril 2 se muestra el control positivo en donde se utilizó un lisado de la cepa salvaje como molde. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular 1KB Plus DNA Ladder (Fermentas).

5.2.1 Complementación de función del mutante Z69Δ*fabG*

Para complementar la función perdida en el mutante Z69Δ*fabG* se utilizaron dos estrategias con diferentes resultados. En primer lugar se amplificó por PCR la copia salvaje del gen *fabG* utilizando los cebadores *fabG1for* y *fabG2rev*. El producto de la reacción de PCR se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 15). Este fragmento se clonó en los vectores pBBR1MSC-2 y pK18*mobsacB*. Se verificó la orientación del inserto en el vector pBBR1MSC-2 para corroborar que el gen estaba clonado en el sentido adecuado para su expresión bajo el control del promotor *plac* perteneciente al vector. Este vector posee un solo sitio *EcoRV* en el sitio múltiple de clonado, que se encuentra previo al inserto; el gen *fabGwt* clonado posee un sitio *EcoRV* en su secuencia. Si se digiere pBBR1MSC-2:*fabGwt* con *EcoRV* se obtienen dos fragmentos, uno de aproximadamente 6kb correspondiente al vector y otro correspondiente al inserto de 639pb si el mismo está clonado en el sentido deseado para su expresión o un fragmento de 933pb si el inserto se encuentra en el sentido contrario, tal como se observa en la Figura 16.

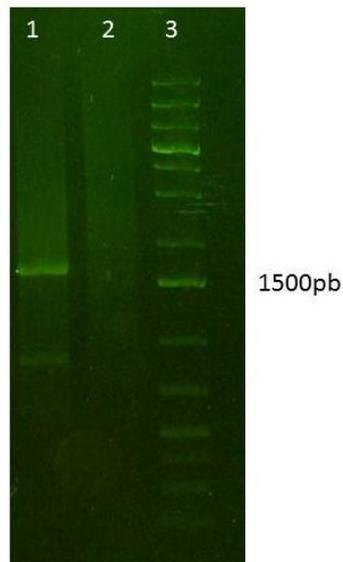


Figura 15: Electroforesis en gel de agarosa en donde se visualizan los fragmentos de ADN obtenidos por la reacción de PCR dirigida para amplificar la copia salvaje del gen *fabG* (tamaño esperado: 1619pb, carril 1). En el carril 2 se observa el control negativo sin ADN. En el carril 3 se muestra el marcador de peso molecular 1KB Plus DNA Ladder (Fermentas).

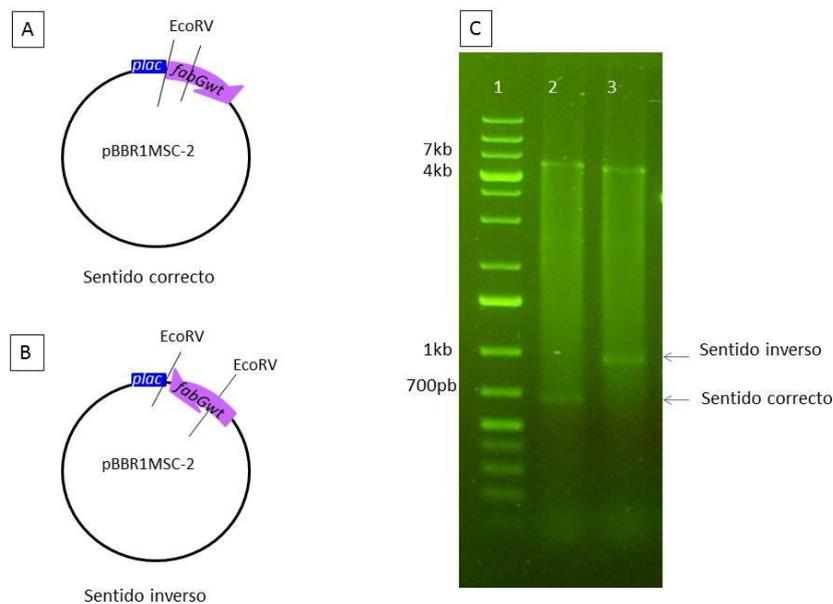


Figura 16: Comprobación de la orientación del gen *fabGwt* clonado en el vector pBBR1MSC-2. A y B) Esquema simplificado del vector pBBR1MSC-2 con el inserto *fabGwt* clonado en el sentido correcto para su expresión bajo el promotor *plac* (A) y (B) con el inserto clonado en el sentido inverso. C) Electroforesis en gel de agarosa en donde se visualizan los fragmentos que resultaron luego de digerir con *EcoRV* el vector pBBR1MSC-2:*fabGwt*. En cada caso el fragmento de mayor tamaño corresponde al vector, mientras que el fragmento de menor tamaño corresponde al inserto. La muestra del carril 2 tiene el inserto clonado en el sentido correcto para su expresión, mientras que la muestra del carril 3 tiene el inserto clonado en el sentido contrario. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Fermentas).

Ambos vectores se movilizaron a *Z69ΔfabG* mediante conjugación triparental. El vector pK18*mobsacB* no es replicable en *H. seropedicae*, por lo que en las colonias Km^R obtenidas se dio un evento de recombinación, y el vector se cointegró en el genoma. De estos clones sólo serviría el que haya recombinado de modo que se recuperase la copia salvaje del gen *fabG* con su promotor tal como se describe en la Figura 17A. De acuerdo a lo observado en la Figura 17B la copia salvaje del gen *fabG* estaba clonada en el vector pK18*mobsacB* en el sentido asumido en la figura ya que la reacción de PCR que amplificó el fragmento del tamaño esperado para el inserto *fabGwt* (aprox. 1600pb) desde el plásmido fue utilizando el cebador *fabG1for*, entonces en los PCR en los que se utilizó el cebador *fabG2rev* no se debería haber amplificado nada (carriles 6, 7, 9 y 10). La colonia A (carril 2) representa el evento de recombinación 2 mostrado en la parte A de la Figura, este es el evento no deseado. La colonia B (carril 3) amplificó el fragmento de aproximadamente 1600pb correspondiente al gen salvaje, indicando que se dio el evento de recombinación que se estaba buscando, mostrado con el número 1 en la parte A de la Figura, por lo tanto se eligió esta colonia para seguir trabajando. Cabe mencionar que hay fragmentos de tamaños inesperados que amplificaron inespecíficamente en varios casos.

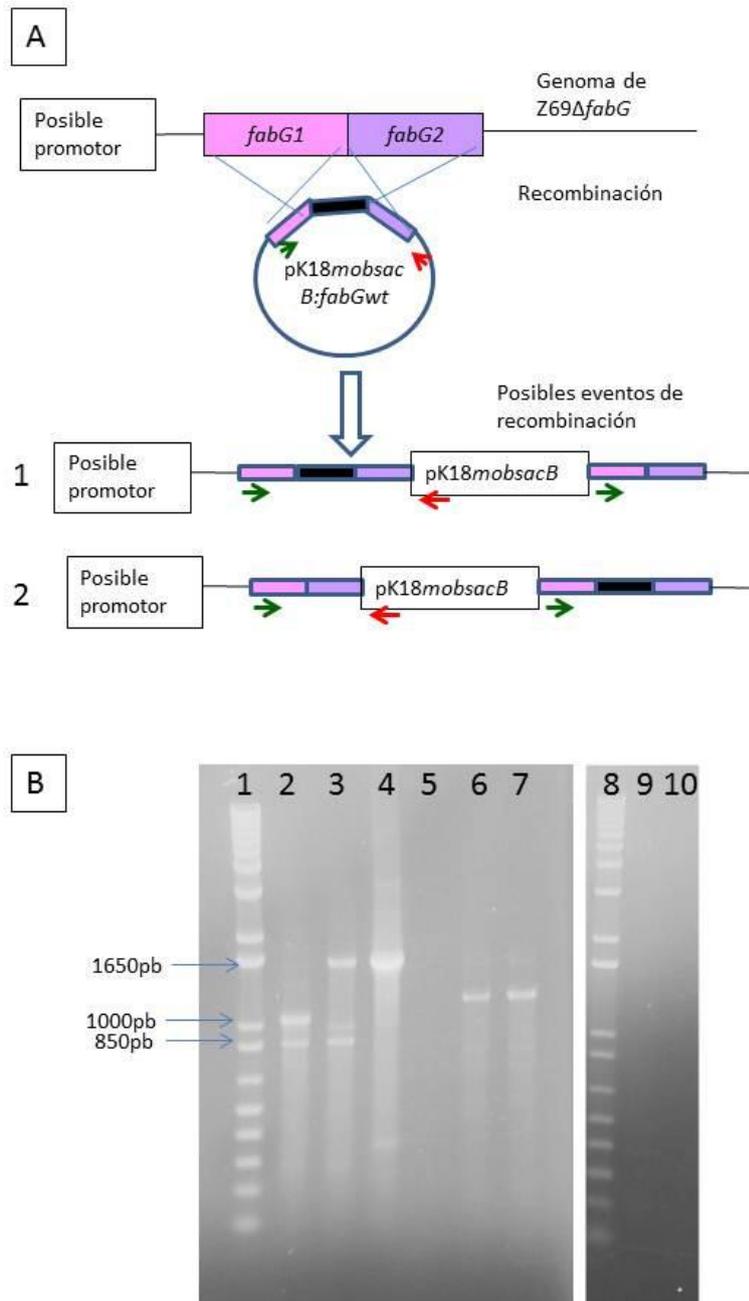


Figura 17: (A) Posibles eventos de recombinación que pueden ocurrir entre *pK18mobsacB:fabGwt* y el genoma de *Z69ΔfabG*. La flecha roja indica el cebador M13rev que hibrida con el vector y la flecha verde muestra el cebador *fabG1for*. Cabe destacar que como no sabe la orientación del inserto en *pK18mobsacB*, se hicieron dos reacciones de PCR para cada muestra, utilizando en una el cebador *fabG1for* y en la otra el cebador *fabG2rev*. (B) Electroforesis en gel de agarosa en donde se evidencian los fragmentos de ADN obtenidos en cada reacción de PCR realizada. En los carriles 2-5 se utilizó el cebador *fabG1for* asumiendo que el inserto estaba clonado en el sentido que se muestra en la figura. En los carriles 6, 7, 9 y 10 se utilizó el cebador *fabG2rev* asumiendo que el inserto está clonado en el sentido inverso al indicado en la figura. En cada caso se utilizó como ADN molde: 2 y 6 lisado de la colonia A, 3 y 7: lisado de la colonia B, 4 y 9: *pK18mobsacB:fabGwt* purificado (control positivo), 5 y 10 son los controles negativos en donde no se utilizó ADN molde. En los carriles 1 y 8 se muestra el marcador de peso molecular 1KB Plus DNA Ladder (Life Technologies).

5.3 Evaluación del crecimiento en diferentes fuentes de carbono de las cepas mutantes

5.3.1 Mutante en el gen *fabG*

El gen *fabG* codificaría para la xilosa deshidrogenasa, primera enzima de la ruta de Weimberg (Figura 5). Para verificar esta hipótesis se construyó la cepa mutante *H. seropedicae* Z69 Δ *fabG* y se analizó su fenotipo de en cuanto a su capacidad de crecer en medio mínimo líquido con diferentes fuentes carbonadas. En la Figura 18 se muestran los perfiles de crecimiento de la cepa salvaje y del mutante Z69 Δ *fabG* en diferentes fuentes de carbono. La cepa salvaje presentó una velocidad de crecimiento específica de 0,24h⁻¹ y 0,17h⁻¹ al crecer en presencia de 10g/l y 30g/l de xilosa respectivamente, mientras que la velocidad de crecimiento específica máxima de Z69 Δ *fabG* fue 0,10h⁻¹ y 0,13h⁻¹ en las mismas condiciones de cultivo.

No se observaron diferencias en el crecimiento entre ambas cepas cuando se cultivaron con glucosa, arabinosa o xilitol como únicas fuentes carbonada (Figura 18).

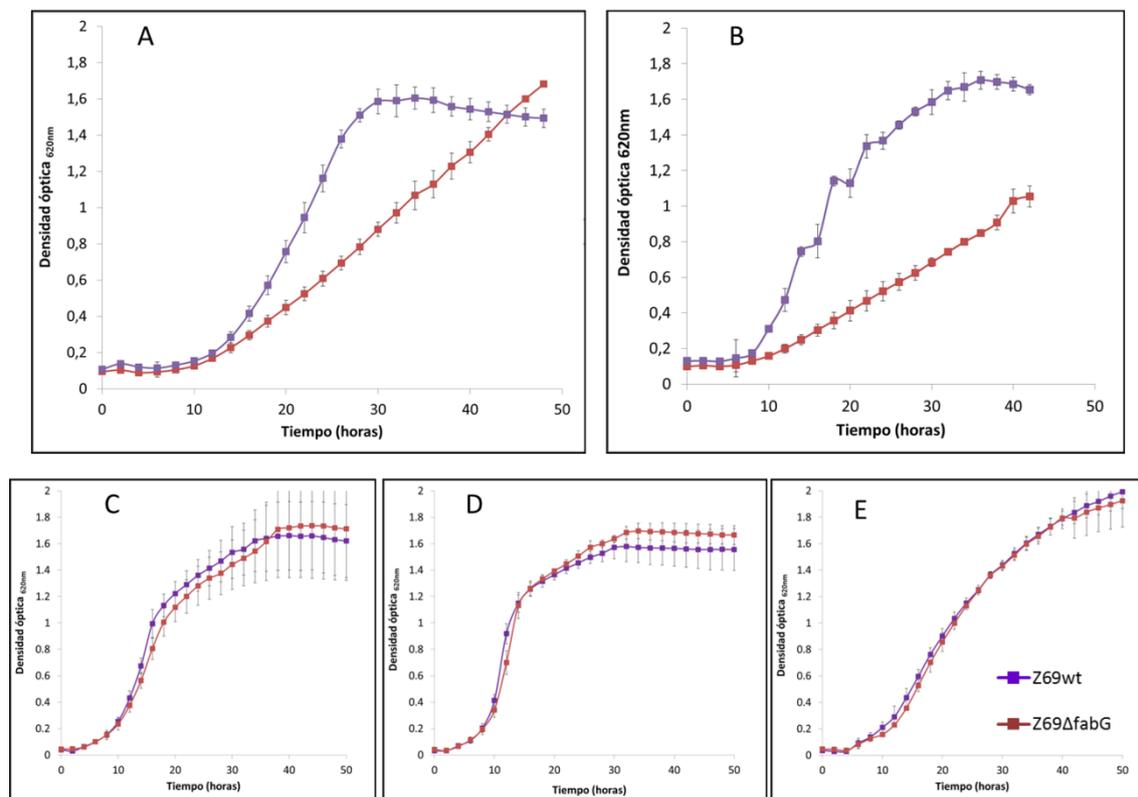


Figura 18: Curvas de crecimiento de la cepa salvaje de *H. seropedicae* Z69 y del mutante Z69 Δ *fabG* en medio LGL suplementado con 30g/l de xilosa (A), 10g/l de xilosa (B), 10g/l de glucosa (C), 10g/l de arabinosa (D) o 10g/l de xilitol (E) como única fuente de carbono.

5.3.1.1 Complementación de función en Z69ΔfabG

Cuando la cepa mutante se complementó con el vector pBBR1MSC-2 conteniendo la copia salvaje del gen *fabG*, el crecimiento no se recuperó totalmente tal se observa en la Figura 19. Sin embargo, cuando el mutante se complementó induciendo un evento de recombinación usando el vector pK18mobsacB conteniendo la copia salvaje del gen *fabG*, el fenotipo salvaje es totalmente recuperado (Figura 19).

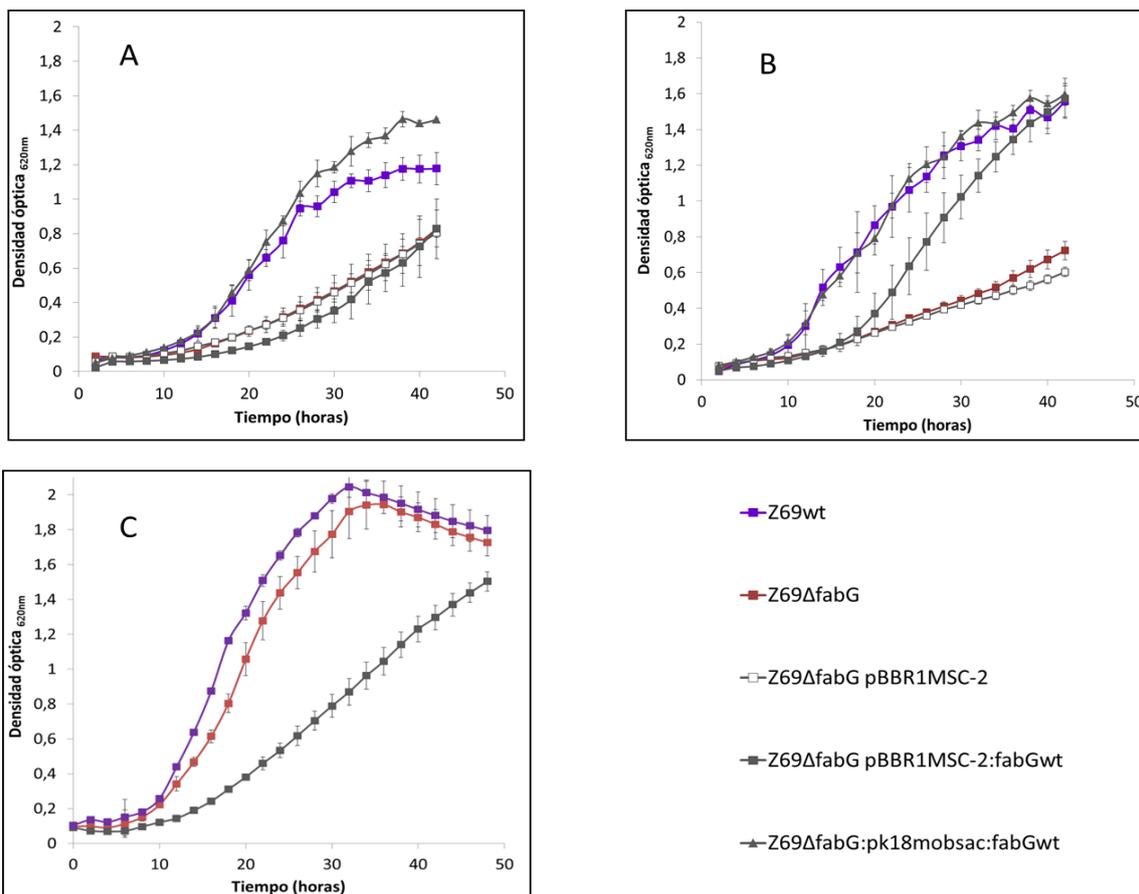


Figura 19: Curvas de crecimiento de la cepa salvaje de *H. seropedicae* Z69, del mutante Z69ΔfabG y de las cepas complementadas en medio LGI suplementado con 30g/l de xilosa (A), 10g/l de xilosa (B), 10g/l de glucosa (C) como única fuente de carbono.

5.3.2 Mutantes en el gen *Hsero_1671*

El gen *Hsero_1671* se encuentra anotado en el genoma de *H. seropedicae* SmR1 como candidato a codificar para la enzima glucosa deshidrogenasa periplasmática dependiente de PQQ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, NC_014323). Se ha observado que en otras bacterias ésta enzima es capaz de catalizar la oxidación de la xilosa formando xilonolactona y por lo tanto, al igual que la enzima codificada por el gen *fabG*, podría estar involucrada en el primer paso de la ruta de Weimberg (Figura 5).

Por este motivo se construyeron mutantes a partir de la cepa salvaje y de *Z69ΔfabG*, con la eliminación parcial del ORF *Hsero_1671* candidato a codificar para la glucosa. En la Figura 20 se muestran los perfiles de crecimiento de estas cepas en medio LGI suplementado con 30g/l de xilosa, 10g/l de xilosa o 10g/l de glucosa como única fuente carbonada. Como se puede observar los perfiles de crecimiento de los mutantes en el ORF *Hsero_1671* no presentaron diferencias con los perfiles de crecimiento de sus cepas parentales en ninguna de las condiciones ensayadas.

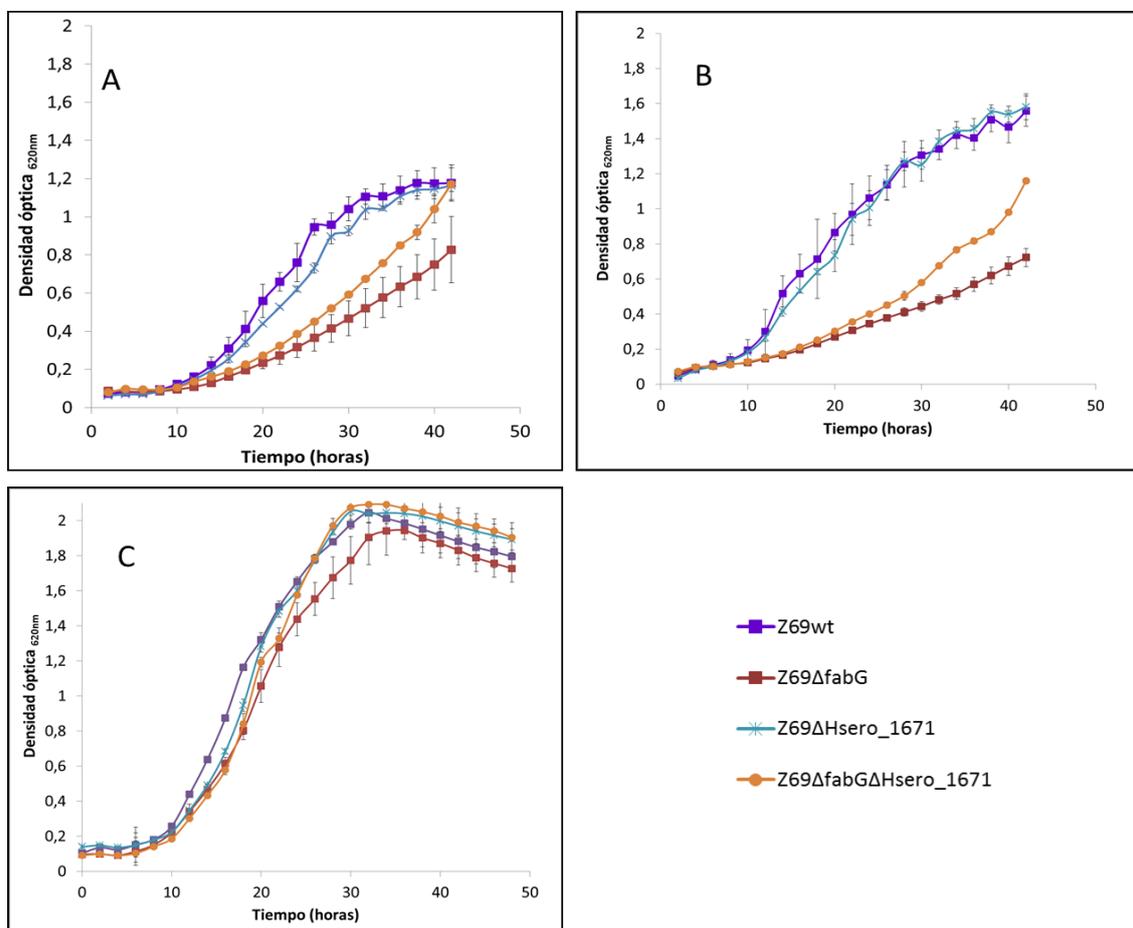


Figura 20: Curvas de crecimiento de la cepa salvaje de *H. seropedicae* Z69 y de los mutantes *Z69ΔfabG*, *Z69ΔHsero_1671* y *Z69ΔfabGΔHsero_1671* en medio LGI suplementado con 30g/l de xilosa (A), 10g/l de xilosa (B) o 10g/l de glucosa (C) como única fuente de carbono.

5.3.3 Mutantes en el gen *Hsero_4498*

El gen *Hsero_4498* codificaría para una xilosa deshidratasa, tercer enzima de la ruta de Weimberg. En la Figura 21 se muestra el perfil de crecimiento de los mutantes *Z69ΔHsero_4498*, *Z69ΔfabG*, *Z69ΔfabGΔHsero_4498*, y la cepa salvaje *Z69* empleando medio LGI suplementado con 30g/l o 10g/l de xilosa o con 10g/l de glucosa. Si bien el crecimiento de los mutantes en el ORF *Hsero_4498* parece mayor al de sus cepas parentales en las gráficas A y B mostradas en la Figura 21, este efecto se debe a que la cepa salvaje presentó un crecimiento menor al habitual.

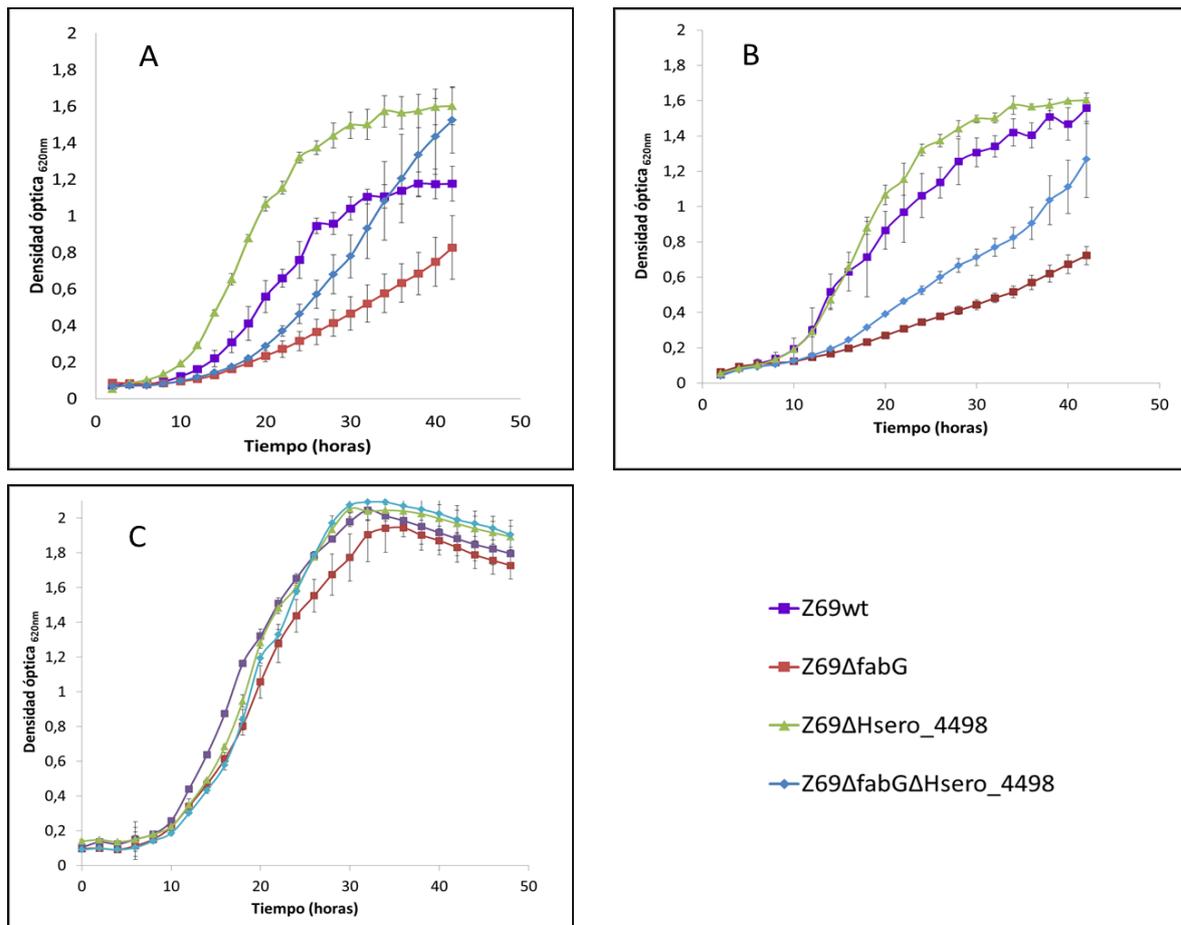


Figura 21: Perfil de crecimiento de la cepa salvaje de *H. seropedicae* Z69, y de los mutantes *Z69ΔfabG*, *Z69ΔHsero_4498* y *Z69ΔfabGΔHsero_4498* en medio LGI suplementado con 30g/l de xilosa (A), 10g/l de xilosa (B), 10g/l de glucosa (C).

5.3.4 Mutante en el gen *ilvD*

El gen *ilvD*, al igual que el gen *Hsero_4498*, podría codificar para una xilonato deshidratasa, tercer enzima de la ruta de Weimberg. Se construyó el mutante *Z69ΔilvD* mediante la eliminación parcial del gen *ilvD* y se analizó su capacidad de crecer en medio mínimo líquido con diferentes fuentes carbonadas. En los perfiles de crecimiento mostrados en la Figura 22 no se observaron diferencias en el crecimiento entre el mutante *Z69ΔilvD* y la cepa salvaje cuando utilizaron 10g/l de glucosa o xilosa. En cambio, cuando se adicionó 30g/l de xilosa como única fuente de carbono al medio de cultivo se observó una reducción del crecimiento de *Z69ΔilvD* con respecto a la cepa salvaje. Esta reducción de crecimiento es muy similar a la observada en el mutante *Z69ΔfabG* (mutante en la enzima xilosa deshidrogenasa, primer enzima de la ruta de Weimberg).

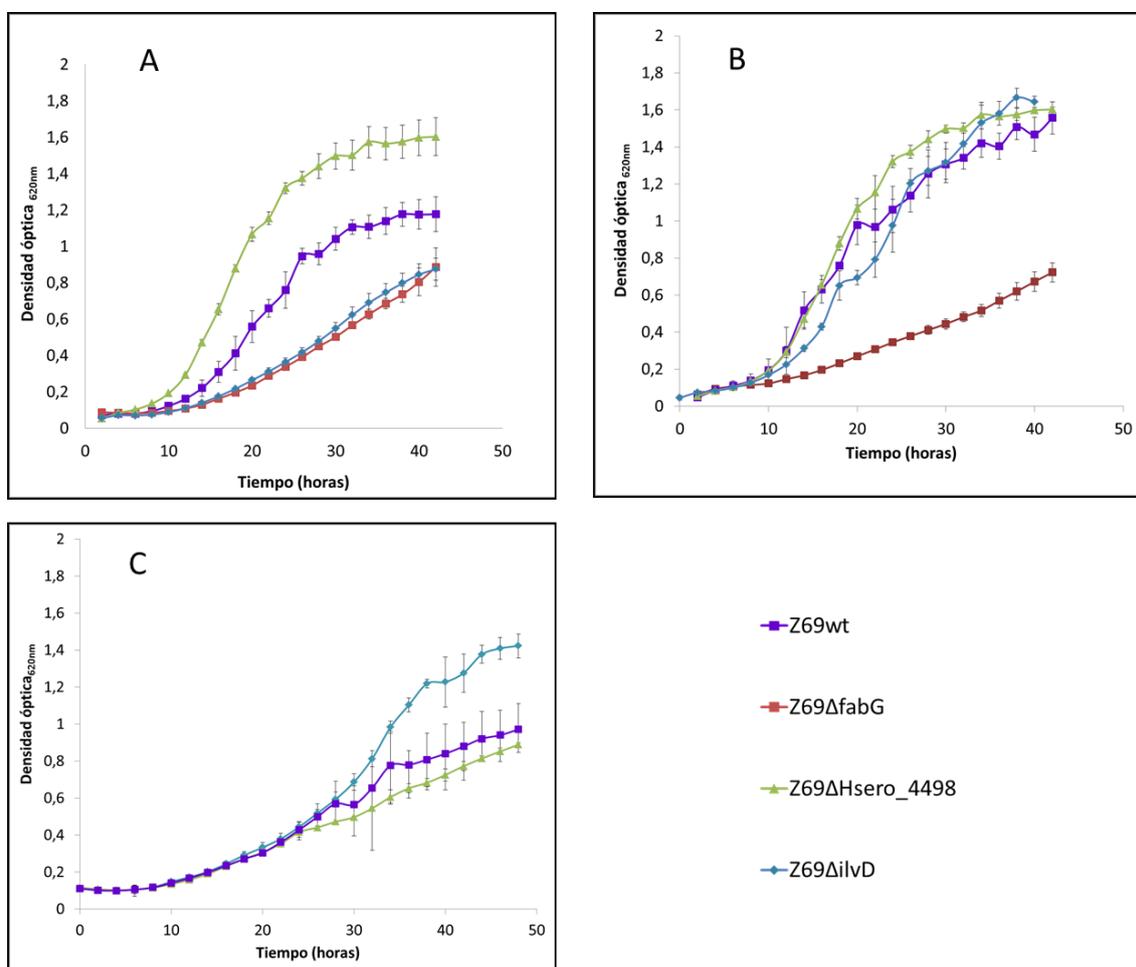


Figura 22: Perfil de crecimiento de la cepa salvaje de *H. seropedicae* Z69, y de los mutantes *Z69ΔfabG*, *Z69ΔHsero_4498* y *Z69ΔilvD* en medio LGI suplementado con 30g/l de xilosa (A), 10g/l de xilosa (B), 10g/l de glucosa (C).

5.3.5 Mutantes en el gen *Hsero_3396*

Hsero_3396 codificaría para la enzima xilitol deshidrogenasa de la ruta de oxo-reductiva, la cual podría ser una alternativa a la ruta de Weimberg para catabolizar la xilosa en *H. seropedicae*. Se construyeron los mutantes *Z69ΔHsero_3396*, *Z69ΔfabGΔHsero_3396* y *Z69ΔHsero_4498ΔHsero_3396*. Estas dos últimas cepas tendrían interrumpidos genes implicados en el catabolismo de la xilosa por la ruta de Weimberg y por la ruta oxo-reductiva.

En la Figura 23 se muestra el perfil de crecimiento de estos mutantes en medio mínimo líquido empleando diferentes fuentes de carbono. Como se observa, las cepas mutantes se comportan igual a su parental en cuanto al crecimiento en xilosa, mientras que el crecimiento en xilitol no se ve alterado. Tampoco se observaron diferencias entre los mutantes y la cepa salvaje al crecer en medio LGI suplementado con 10g/l de glucosa o con 30mM de sorbitol (datos no mostrados).

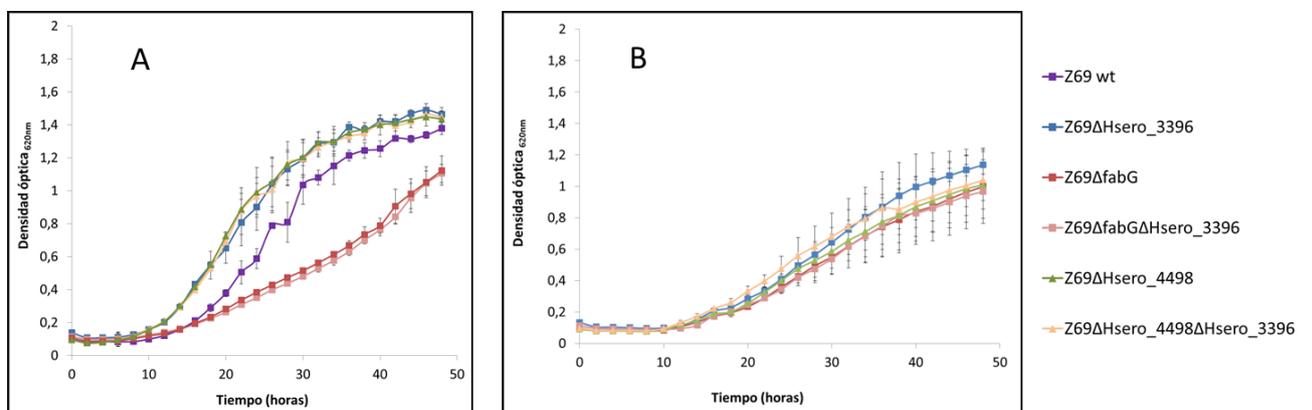


Figura 23: Perfil de crecimiento de los mutantes en el ORF *Hsero_3396*, candidato a codificar para la enzima xilitol deshidrogenasa, en medio LGI suplementado con 10g/l de xilosa (A) o 10g/l de xilitol (B).

5.4 Determinaciones enzimáticas

Para estudiar con más detalle el fenotipo de las cepas mutantes y verificar la presencia de las rutas de Weimberg y oxo-reductiva se realizaron determinaciones enzimáticas en extractos libres de células de Z69wt y de los diferentes mutantes cultivados en presencia de xilosa, glucosa o xilitol como única fuente carbonada. En la Figura 24 y en la Tabla 12 se muestran los resultados de la determinación de actividad enzimática xilosa deshidrogenasa y xilitol deshidrogenasa. Como se observa, la actividad xilosa deshidrogenasa es claramente menor en el mutante Z69 Δ fabG comparada con la actividad de la cepa salvaje crecida en dos condiciones diferentes. No se detectó actividad xilosa deshidrogenasa en extractos de la cepa salvaje cuando creció con xilitol como única fuente carbonada.

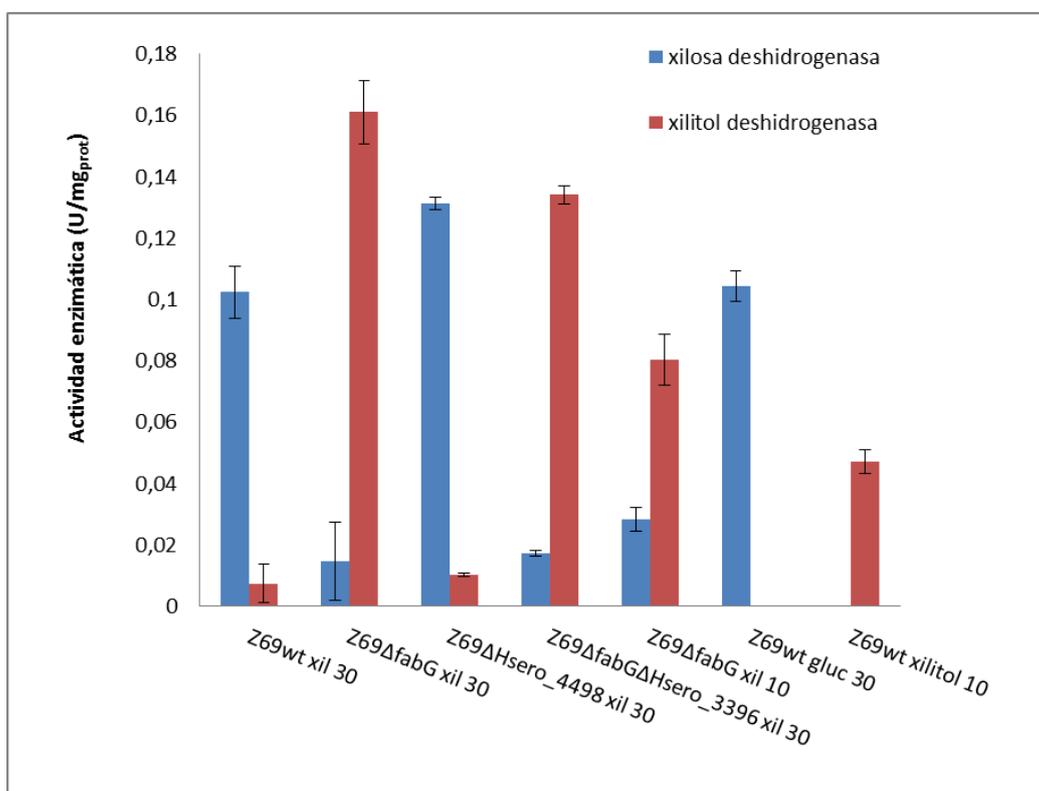


Figura 24: Actividad xilosa deshidrogenasa y xilitol deshidrogenasa en extractos celulares de la cepa salvaje (Z69wt) crecida con 30g/l de xilosa (xil) o con 30g/l de glucosa (gluc) o con 10g/l de xilitol y de los diferentes mutantes crecidos con 10g/l o 30g/l de xilosa.

Además, en la Tabla 12 se observa que la actividad xilosa deshidrogenasa en extractos celulares de la cepa complementada *Z69ΔfabG* pBBR1MSC-2:*fabGwt* fue diez veces mayor que la de la cepa salvaje crecida en las mismas condiciones.

La actividad xilitol deshidrogenasa fue casi indetectable en extractos de la cepa salvaje crecida en xilosa o glucosa, sin embargo esta fue ampliamente superior en extractos celulares del mutante *Z69ΔfabG* crecido con xilosa (Tabla 12). No se realizaron medidas de la actividad xilitol deshidrogenasa en el mutante *Z69ΔHsero_3396*.

No se pudo detectar actividad glucosa deshidrogenasa en extractos celulares de la cepa salvaje crecida con 30g/l de glucosa ni en el extracto celular de *Z69ΔfabG* crecida con 30g/l de xilosa.

Tabla 12: Actividades enzimáticas ($\text{U}\cdot\text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$) determinadas en extractos celulares de las distintas cepas crecidas con el sustrato indicado en la tabla como única fuente carbonada.

Fuente de carbono de crecimiento (g/l)	Cepa	Xilosa deshidrogenasa	Xilitol deshidrogenasa	Glucosa deshidrogenasa
Xilosa 30	Z69wt	0.099 ± 0.009	0.006 ± 0.006	
	<i>Z69ΔfabG</i>	0.02 ± 0.01	0.14 ± 0.03	0
	<i>Z69ΔfabG</i> pBBR1MSC2: <i>fabGwt</i>	1.4 ± 0.2	0	
	<i>Z69ΔHsero_4498</i>	0.131 ± 0.002	0.0101 ± 0.0005	
	<i>Z69ΔfabGΔHsero_3396</i>	0.017 ± 0.001	0.134 ± 0.003	
Xilosa 10	<i>Z69ΔfabG</i>	0.028 ± 0.003	0.080 ± 0.008	
	<i>Z69ΔfabG</i> pBBR1MSC2: <i>fabGwt</i>	0.6 ± 0.1	0	
Glucosa 30	Z69wt	0.104 ± 0.005	0*	0
Xilitol 10	Z69wt	0*	0.047 ± 0.004*	

*Datos tomados de (Malan 2011)

5.4.1 Especificidad de sustrato de la enzima xilosa deshidrogenasa

Se determinó la actividad deshidrogenasa utilizando diferentes sustratos para la reacción en extractos celulares de Z69 y Z69 Δ *fabG* crecidos en medio LGI con 30g/l de xilosa. En la Figura 25 se muestran los resultados obtenidos, en donde se observa que en el extracto celular de la cepa salvaje se puede detectar actividad deshidrogenasa a NADH utilizando D-xilosa, D-glucosa o L-arabinosa como sustratos, aunque la actividad detectada con estos dos últimos es prácticamente la mitad de la actividad detectada con D-xilosa como sustrato.

Además, en el mutante Z69 Δ *fabG* la actividad deshidrogenasa se redujo un 82% con respecto a la de cepa salvaje cuando se adicionó xilosa como sustrato. El mismo comportamiento se observa cuando se utiliza glucosa como sustrato de la reacción, mientras que cuando se utiliza arabinosa como sustrato para la reacción, la actividad enzimática del mutante Z69 Δ *fabG* sólo se reduce un 25%.

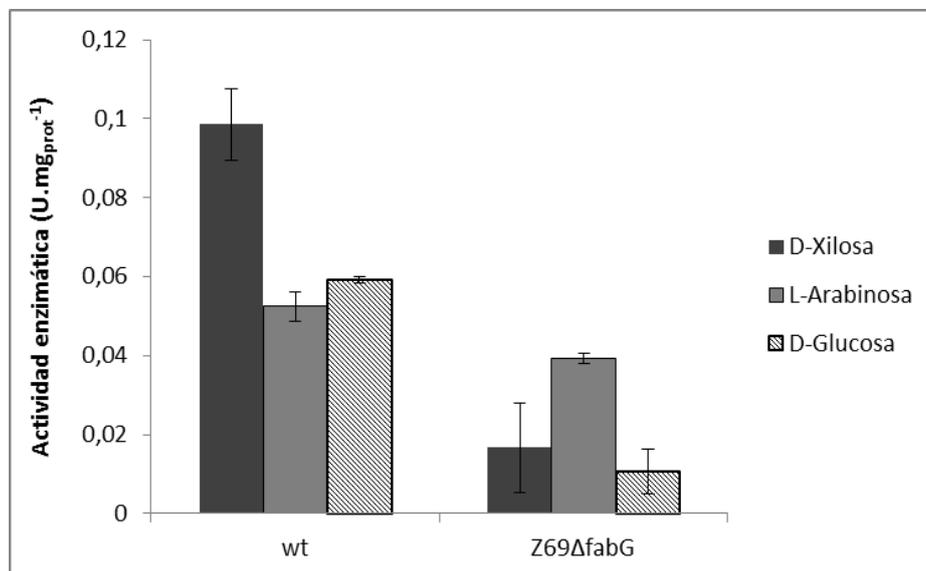


Figura 25: Especificidad de sustrato de la enzima xilosa deshidrogenasa. Actividad xilosa deshidrogenasa determinada sobre otros sustratos.

5.5 Obtención de datos experimentales y reconstrucción de la red metabólica

5.5.1 Obtención de datos experimentales en estado *pseudo*- estacionario

5.5.1.1 Cultivo en lote en Erlenmeyer

Se analizó el perfil de crecimiento y la producción de PHB en la cepa salvaje y en el mutante *Z69ΔfabG* cultivados en matraces Erlenmeyer con xilosa (30g/l) como única fuente carbonada. Este ensayo se efectuó como un paso previo antes de escalar el proceso a condiciones de biorreactor (a escala de laboratorio), en dónde se determinaron estados *pseudo*-estacionarios, condición necesaria para el análisis de balance de flujos. En la Figura 26 se muestra el perfil de crecimiento y acumulación de PHB por la cepa salvaje y el mutante *Z69ΔfabG*. En este caso la velocidad máxima de crecimiento, calculada utilizando la biomasa total en g/l, fue de $0,20h^{-1}$ para la cepa salvaje y $0,11h^{-1}$ para la mutante. Si se realiza el mismo cálculo empleando los datos de densidad óptica, ambas velocidades resultan iguales a $0,13h^{-1}$. No se pudo calcular la velocidad de crecimiento empleando los datos de biomasa residual debido a la falta de datos de concentración de PHB en la fase exponencial.

En este cultivo, el porcentaje máximo de acumulación de PHB de la cepa salvaje fue de 44% a las 23 horas, lo que representa una productividad de $0,069 g_{PHB} \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$, mientras que el mutante *Z69ΔfabG* acumuló un máximo de 56% de PHB al final del cultivo (48 horas), con una productividad de $0,083 g_{PHB} \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$.

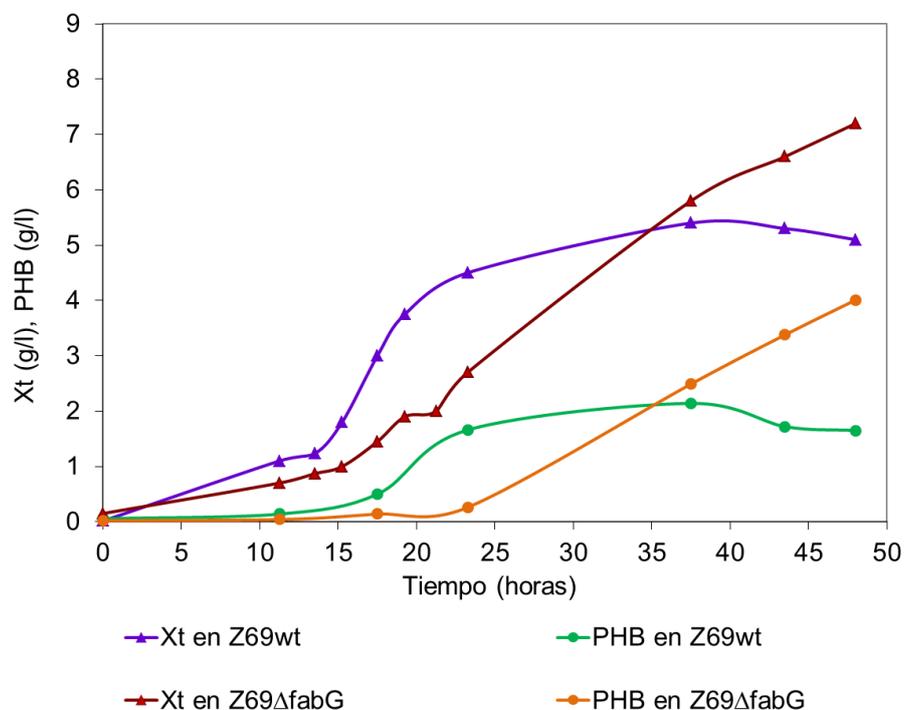


Figura 26: Perfil de crecimiento y acumulación de PHB por la cepa salvaje y mutante *Z69ΔfabG* crecidos en Erlenmeyer con agitación orbital y medio LGI con 30g/l de xilosa inicial.

5.5.1.2 Cultivo en lote de la cepa salvaje de *H. seropedicae* Z69

En la Figura 27 se muestran el perfil de producción de biomasa y PHB, así como el consumo de xilosa y amonio para la cepa salvaje cultivada en biorreactor. Este cultivo en lote presentó una limitación de amonio a las 10 horas, en donde se detuvo la fase de crecimiento y comenzó a aumentar la concentración de PHB intracelular, llegando al 22% del peso seco celular hacia el final del cultivo (41,5 horas). La productividad máxima de PHB fue de $0,052 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ y se alcanzó a las 15 horas de cultivo con una acumulación de PHB del 18%.

Luego de tomar la muestra correspondiente a las 18 horas de incubación, se le adicionó un pulso de xilosa hasta llegar a una concentración final de 30 g/l aproximadamente, con el objetivo, aunque sin éxito, de aumentar la producción de PHB.

En este cultivo en lote se pudieron identificar 3 estados *pseudo*-estacionarios en donde las velocidades específicas de crecimiento, producción de PHB y consumo de xilosa y amonio permanecieron constantes. Los dos primeros estados (4 a 7 horas y 7 a 9 horas) están caracterizados por la producción de biomasa y PHB, consumiendo xilosa y amonio. El tercer estado *pseudo*-estacionario (de las 12 a las 18 horas) está caracterizado por la producción de PHB sin aumento de la biomasa (residual), consumiendo solamente xilosa, ya que no habría casi amonio remanente en el medio. Estos datos se resumen en la Tabla 13. En el Anexo 10.4.1 se muestran con más detalle las aproximaciones utilizadas para calcular estas velocidades.

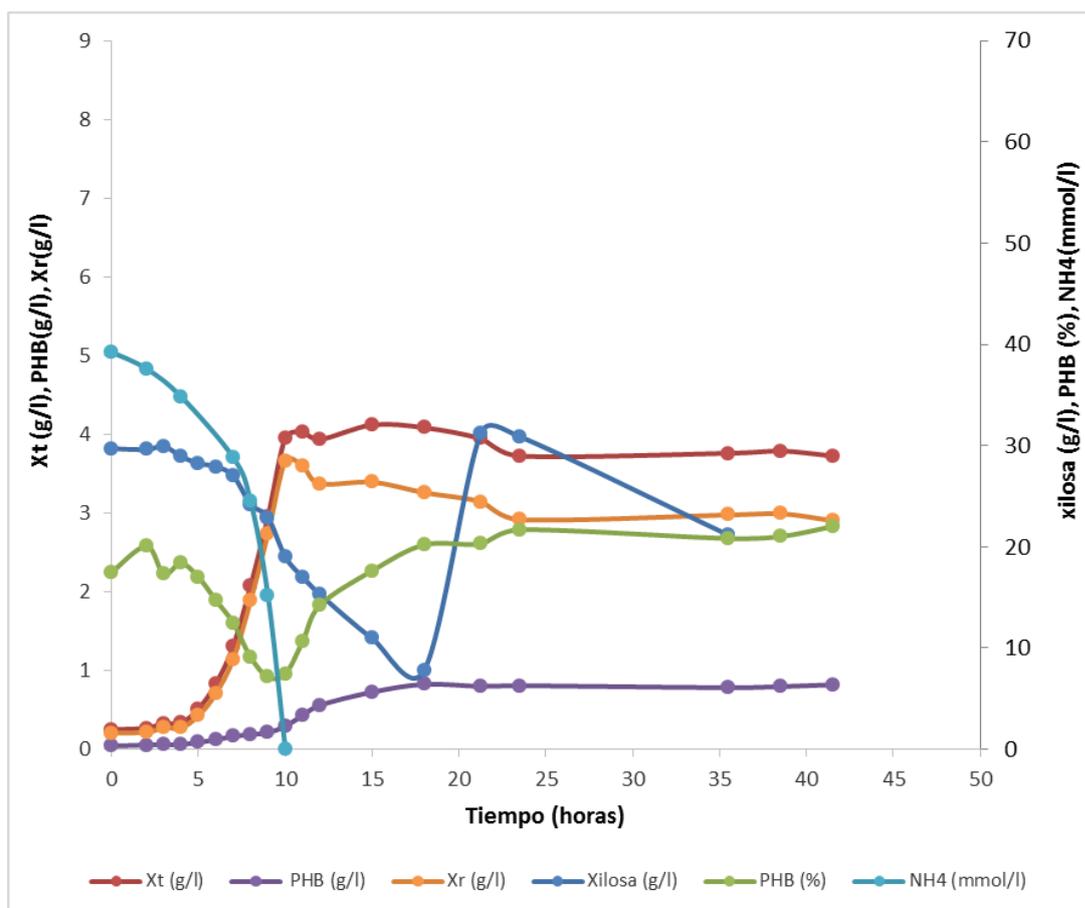


Figura 27: Perfil de crecimiento, acumulación de PHB y consumo de xilosa y amonio en *H. seropedicae* Z69 salvaje. Ensayo realizado en biorreactor. A las 20 horas se le dio un pulso de xilosa.

Tabla 13: Velocidades específicas de cada estado *pseudo*-estacionario encontrados en el cultivo en lote realizado en biorreactor con la cepa salvaje de *H. seropedicae* Z69.

Tiempo (hs)	μ (h^{-1})	q_{PHB} ($\text{mmol. g}_{\text{Xr}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	q_{xilosa} ($\text{mmol. g}_{\text{Xr}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	q_{NH_4} ($\text{mmol. g}_{\text{Xr}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
4-7	0,65	0,87	11	5,7
7-9	0,65	2,3	11	5,7
12-18	-0,011*	0,12	2,2	0

*En este caso se considera $\mu=0$, es decir que no hay crecimiento.

5.5.1.3 Cultivo en lote del mutante Z69 Δ fabG

En la Figura 28 se muestra el perfil de crecimiento, producción de PHB y consumo de sustratos para el cultivo en lote de la cepa mutante Z69 Δ fabG. En este cultivo se pudieron definir tres estados *pseudo*-estacionarios con velocidades específicas de crecimiento, producción de PHB y consumo de sustrato constantes (Tabla 14). Los dos primeros estados *pseudo*-estacionarios (4-10 horas y 11-15,5 horas) se caracterizan por la producción de biomasa y PHB consumiendo xilosa y amonio, mientras que en el tercer estado *pseudo*-estacionario (18,5 a 27,5 horas) no se produce biomasa, observándose la producción PHB a partir de la xilosa. Cabe mencionar que a las 17 horas se agotó el amonio en el medio de cultivo, lo que coincide con un detenimiento del crecimiento celular y un aumento en la producción de PHB, llegando a un máximo de 49% del peso seco celular a las 38 horas. La productividad máxima de PHB se alcanzó a las 27,5 horas, siendo la misma de $0,11 \text{ g.l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, con una acumulación de PHB del 42%.

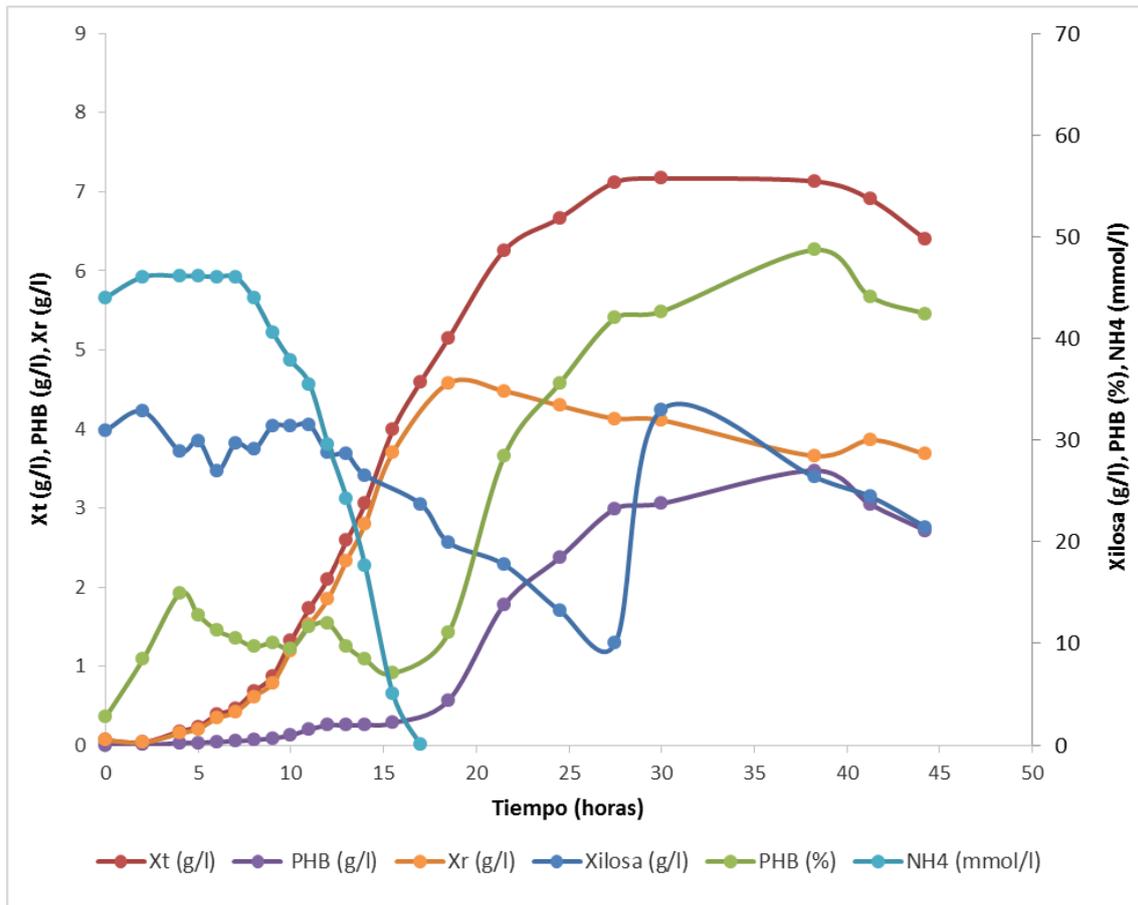


Figura 28: Perfil de crecimiento, acumulación de PHB y consumo de xilosa y amonio en el mutante Z69ΔfabG durante un cultivo en lote realizado en biorreactor. A las 27 horas, luego de sacar la muestra, se le dio un pulso de xilosa.

Tabla 14: Velocidades específicas de cada estado *pseudo*-estacionario encontrados en el cultivo en lote realizado en biorreactor con el mutante Z69Δfab.

Tiempo (hs)	μ (h^{-1})	q_{PHB} ($mmol. g_{Xr}^{-1}.h^{-1}$)	q_{xilosa} ($mmol. g_{Xr}^{-1}.h^{-1}$)	q_{NH4} ($mmol. g_{Xr}^{-1}.h^{-1}$)
4-10	0,41	0,46	ND	4,9
11-15,5	0,20	0,053	5,0	2,3
18,5-27,5	-0,011*	0,50	1,6	0

* En este caso se considera $\mu=0$, es decir que no hay crecimiento. ND: no determinado, en este caso no se pudieron ajustar los datos para calcular el consumo de xilosa.

5.5.1.4 Cultivo en lote alimentado de *H. seropedicae* Z69

En la Figura 29 se observa el perfil de crecimiento, producción de PHB y consumo de xilosa y amonio por *H. seropedicae* Z69 en un cultivo en lote alimentado llevado a cabo en biorreactor. En las primeras 5 horas del proceso las células fueron cultivadas en lote (sin alimentación). A las 5 horas se comenzó a alimentar de forma continua con xilosa y amonio. Luego de las 31 horas se detuvo la alimentación y el cultivo entró en régimen lote nuevamente. El cultivo alimentado estuvo limitado en amonio y excedido en xilosa, al punto de que ésta se acumuló en el medio de cultivo llegando a 31g/l a las 31 horas. Esto fue debido a que la velocidad de alimentación de xilosa (4,07g/hora) fue mayor a la velocidad de consumo (1,29g/hora).

En este tipo de cultivo las velocidades volumétricas tanto de producción, como de consumo de sustratos son constantes, mientras que las velocidades específicas cambian continuamente, tal como se muestra en la Tabla 15. En los períodos de cultivo en lote (inicial y final) no se pudo encontrar ningún estado *pseudo*-estacionario con velocidades específicas constantes.

El porcentaje de PHB dentro de la célula aumentó a cada momento en la fase alimentada llegando a un 53-55% del peso seco celular, con una productividad máxima de 0,105 g.l⁻¹.h⁻¹, pero luego en la etapa de cultivo en lote con exceso de fuente carbonada, sin amonio disponible, se llegó a un máximo de acumulación de PHB del 58% del peso seco celular, con una productividad de 0,104 g.l⁻¹.h⁻¹.

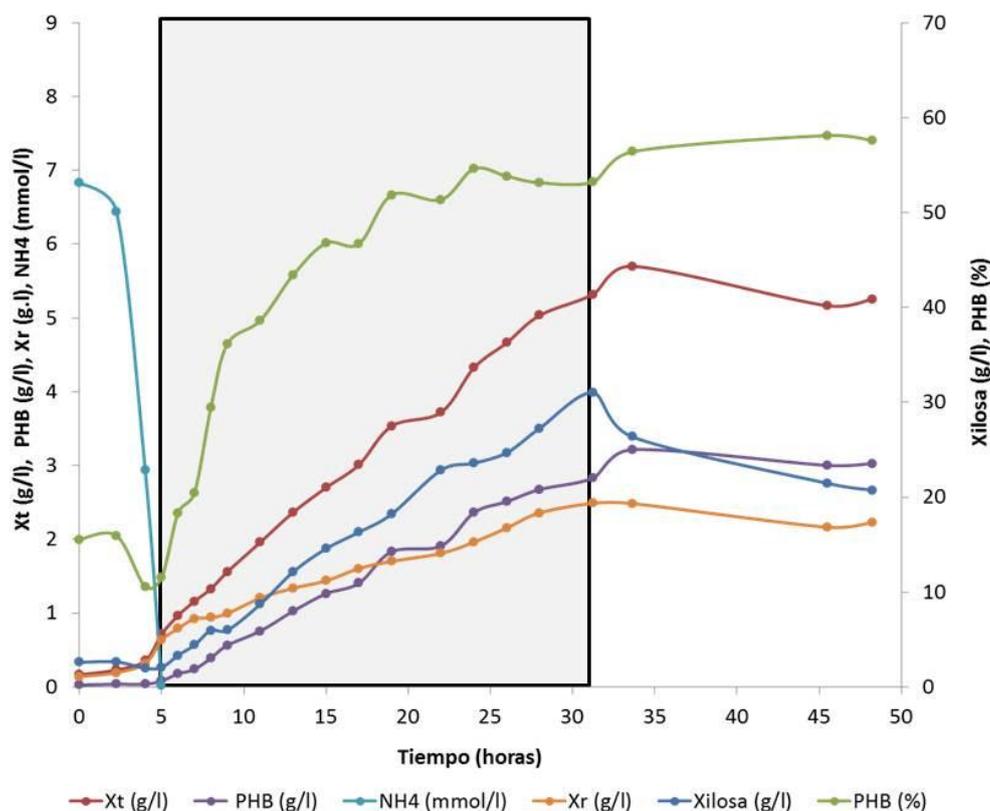


Figura 29: Cultivo en lote alimentado limitado en NH₄⁺ de la cepa salvaje *H. seropedicae* Z69. En el recuadro se marca el período en donde se alimentó el cultivo con una solución de 320g/l de xilosa y 78,6 mmol/l de (NH₄)₂SO₄ con un flujo de 0,21ml/min. En los períodos fuera del recuadro el cultivo no se alimentó.

Tabla 15: Velocidades específicas para cada punto del cultivo en lote alimentado de la cepa salvaje de *H. seropedicae* Z69.

Tiempo (horas)	μ (h^{-1})	q_{PHB} ($mmol \cdot g_{Xr}^{-1} \cdot h^{-1}$)	q_{xilosa} ($mmol \cdot g_{Xr}^{-1} \cdot h^{-1}$)	q_{NH_4} ($mmol \cdot g_{Xr}^{-1} \cdot h^{-1}$)
6	0,11	2,2	5,5	1,7
7	0,094	1,8	4,6	1,3
8	0,091	1,8	4,5	1,1
9	0,084	1,6	4,1	1,0
11	0,068	1,3	3,3	0,96
13	0,060	1,2	2,9	0,77
15	0,055	1,1	2,7	0,68
17	0,048	0,93	2,4	0,62
19	0,045	0,86	2,2	0,55
22	0,042	0,79	2,0	0,51
24	0,038	0,73	1,9	0,47
26	0,034	0,65	1,7	0,43
28	0,031	0,59	1,5	0,39

5.5.1.5 Cultivo en lote alimentado del mutante Z69ΔfabG

En la Figura 30 se muestra el perfil de crecimiento, producción de PHB y consumo de sustratos en un cultivo en lote y lote alimentado realizado con la cepa mutante Z69ΔfabG. Si bien el cultivo se comenzó a alimentar a las 4 horas, éste se comportó como un cultivo en lote con todos los nutrientes en exceso hasta las 9 horas. En este período se logró determinar un estado *pseudo*-estacionario con velocidades específicas de crecimiento y consumo de amonio constantes, similares a las encontradas en el primer estado *pseudo*-estacionario del cultivo en lote mostrado en la Figura 28. Cuando el amonio dejó de ser detectable en el medio de cultivo, a las 11 horas, el cultivo entró en régimen de lote alimentado. Las velocidades específicas de crecimiento, producción y consumo de sustrato calculadas para cada momento se muestran en la Tabla 16.

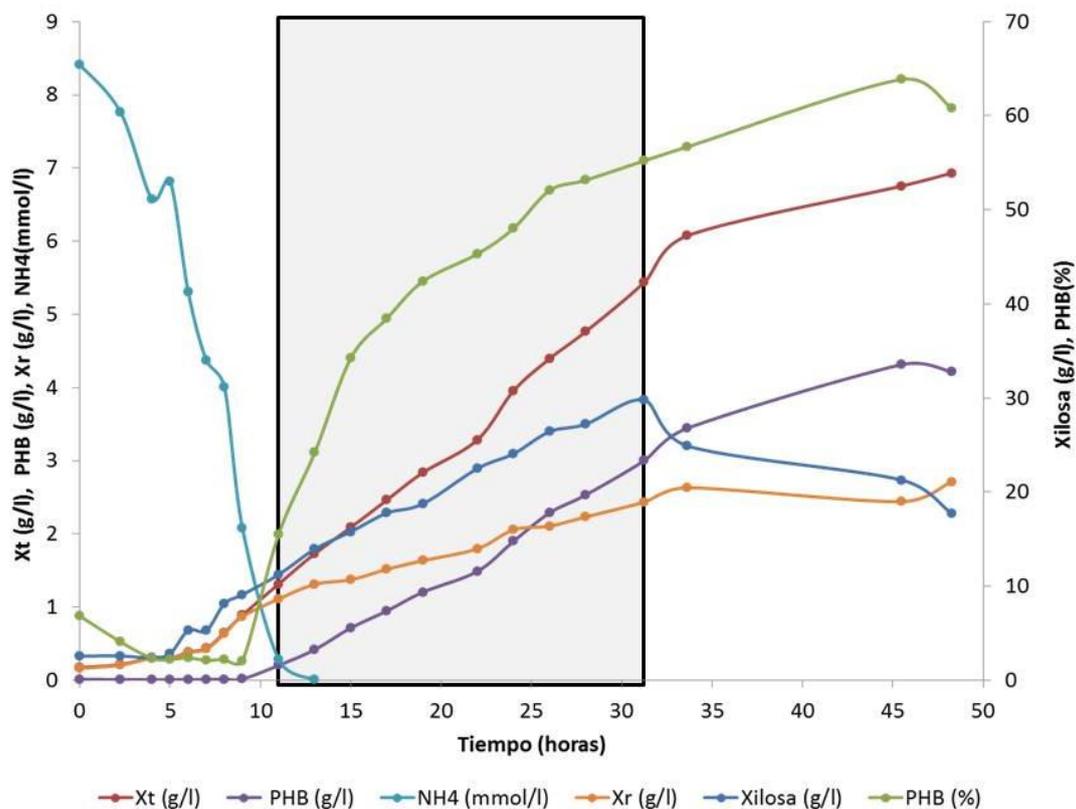


Figura 30: Cultivo en lote alimentado limitado en NH₄⁺ del mutante Z69ΔfabG. El cultivo se comenzó a alimentar a las 4 horas de inoculado con una solución de 296g/l de xilosa y 75,3mmol/l de (NH₄)₂SO₄ a un flujo de 0,21ml/min. El recuadro en gris marca el tiempo en que este cultivo se comportó como un verdadero cultivo alimentado, ya que, si bien entre las 4 y las 11 horas estaba siendo alimentado, éste se comportó como un cultivo en lote en donde todos los nutrientes estaban en exceso.

La xilosa se alimentó a 3,79g/hora, mientras que fue consumida a sólo 0,15g/hora. Esto determinó que la concentración de xilosa aumentara en el medio, llegando a 30g/l a las 31 horas.

El contenido de PHB fue aumentando a lo largo del cultivo en lote alimentado limitado en amonio, llegando a un máximo de 55% del peso seco celular con una productividad de 0,103 g.l⁻¹.h⁻¹. Luego en la etapa de cultivo en lote con exceso de xilosa, y sin amonio detectable en el medio, las células continuaron acumulando PHB, llegando al 64% de su peso seco a las 45,5 horas de cultivo, con una productividad de PHB de 0,102 g.l⁻¹.h⁻¹.

Tabla 16: Velocidades específicas calculadas para cada momento del cultivo en lote alimentado de la cepa mutante Z69ΔfabG.

Tiempo (horas)	μ (h ⁻¹)	q_{PHB} (mmol.g _{Xr} ⁻¹ .h ⁻¹)	q_{xilosa} (mmol.g _{Xr} ⁻¹ .h ⁻¹)	q_{NH4} (mmol.g _{Xr} ⁻¹ .h ⁻¹)
*	0,42	0,097	-	4,3
11	0,075	1,7	4,3	0,84
13	0,062	1,4	3,5	0,70
15	0,058	1,3	3,3	0,65
17	0,052	1,2	2,9	0,58
19	0,047	1,1	2,7	0,53
22	0,042	0,96	2,4	0,47
24	0,036	0,83	2,1	0,41
26	0,035	0,80	2,0	0,40
28	0,033	0,75	1,9	0,37
31	0,030	0,67	1,7	0,33

* Estado *pseudo*-estacionario encontrado entre las 5 y 9 horas de cultivo en lote, en donde el mutante creció a su máxima velocidad, sin limitación de nutrientes. En este caso no se pudo determinar la velocidad específica de consumo de xilosa debido a la dispersión de los datos.

No se detectó la presencia de ácidos orgánicos, por HPLC-UV, en ninguno de los sobrenadantes de los cultivos en lote o lote alimentado tanto en la cepa salvaje como en la mutante Z69ΔfabG.

5.5.2 Construcción de la red metabólica

Se construyó la red metabólica de *H. seropedicae* Z69 teniendo como base la red metabólica del metabolismo central de *E. coli* (Orth et al. 2010), los datos disponibles en la bibliografía y los obtenidos en éste y otros trabajos. A esta red se le adicionaron dos reacciones para la ruta de Entner Doudoroff, dos reacciones para la síntesis de PHB y su intercambio y reacciones para las rutas de Weimberg y oxo-reductiva involucradas en el catabolismo de xilosa. A su vez, se eliminaron algunas reacciones cambiando los límites superior e inferior a cero. Así se eliminó la enzima fosfofructoquinasa ('PFK'), correspondiente a la glicólisis, por no encontrarse en el genoma de *H. seropedicae* SmR1 (Pedrosa et al. 2011). También se eliminó la reacción de la enzima fosfogluconato deshidrogenasa ('GND'), que permite el catabolismo de glucosa vía pentosas fosfato, ya que, no se ha podido encontrar actividad de esta enzima en extractos celulares de *H. seropedicae* Z69 en trabajos previamente realizados en nuestro laboratorio (datos no publicados). A su vez, se eliminaron las enzimas de síntesis, excreción e intercambio del formiato, ya que éste metabolito no es producido ni secretado por *H. seropedicae* Z69 en las condiciones analizadas, además, de que la ruta propuesta para *E. coli* no coincide con la ruta propuesta para *H. seropedicae* SmR1 en las bases de datos BioCyc y KEGG.

En ensayos previamente realizados en nuestro laboratorio y repetidos recientemente en el Departamento de Microbiología del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de San Pablo (Brasil), se logró establecer que la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa puede utilizar tanto NAD^+ como NADP^+ como cofactores, siendo la actividad específica de esta enzima $0,018 \pm 0,002 \text{ U/mg}_{\text{prot}}$ y $0,024 \pm 0,002 \text{ U/mg}_{\text{prot}}$, respectivamente. Por este motivo, se decidió adicionar una reacción al modelo, 'G6PDH3r', en donde esta enzima puede utilizar NAD^+ como cofactor (el NADP^+ lo utilizaría en la reacción 'G6PDH2r' proveniente del modelo original).

No se agregó a la red metabólica la reacción llevada a cabo por la enzima glucosa deshidrogenasa periplasmática dependiente de PQQ, ya que la misma no es funcional en las condiciones ensayadas en este trabajo.

Como no se empleó glucosa como fuente de carbono la reacción de intercambio de glucosa se fijó en cero.

Finalmente, el modelo quedó compuesto de 110 reacciones y 82 metabolitos. Salvo en los casos mencionados, los límites superiores de las reacciones se acotaron en 1000 y los límites inferiores en 0 para las reacciones irreversibles y -1000 para las reacciones reversibles. El límite superior para la reacción de intercambio de xilosa se acotó en -20, salvo que se indique lo contrario. En el Anexo 10.5 se detallan todas las reacciones del modelo con sus límites superiores e inferiores y los metabolitos propuestos.

5.5.3 Ajuste de la red metabólica a los datos experimentales

En el cultivo en lote de la cepa salvaje de *H. seropedicae* Z69 se encontraron tres estados *pseudo*-estacionarios con velocidades específicas constantes. Los dos primeros estados *pseudo*-estacionarios corresponden a la fase de crecimiento exponencial y están caracterizados por la producción de biomasa y PHB a partir de xilosa y amonio. Si se realiza un análisis de balance de flujos utilizando como restricciones las velocidades específicas de consumo de xilosa y la velocidad específica de producción PHB halladas en el primer estado

pseudo-estacionario y se elige como función objetivo maximizar el crecimiento, se obtiene como resultado una distribución de flujos que distribuye el 83% del flujo de entrada de xilosa a través de la ruta oxo-reductiva y el resto a través de la ruta de Weimberg. En este caso se prevé una velocidad de crecimiento de $0,6635\text{h}^{-1}$; la velocidad de crecimiento encontrada experimentalmente ($0,65\text{h}^{-1}$) es un 2% menor a la calculada.

Si se realiza otro análisis de balance de flujos utilizando las restricciones mencionadas anteriormente, más la restricción de flujo cero a través de la reacción de la enzima xilitol deshidrogenasa (XOLDH) (imposibilitando el uso de la ruta oxo-reductiva, tal como ocurriría en la cepa salvaje, ver Tabla 12), se obtiene como resultado una distribución de flujos que permite un crecimiento celular a una velocidad de $0,6364\text{h}^{-1}$, siendo 2% menor a la observada experimentalmente ($\mu_{\text{exp}}=0,65\text{h}^{-1}$).

Si se realiza FBA con las mismas restricciones empleando los datos correspondientes al segundo estado *pseudo*-estacionario (7- 9 horas), se obtiene una velocidad de crecimiento de $0,4543\text{h}^{-1}$, siendo ésta 30% menor a la velocidad observada experimentalmente ($0,65\text{h}^{-1}$). En la Figura 31 se muestra la distribución de flujos calculada en este caso. En cambio si se permite que el sistema utilice cualquiera de las dos rutas propuestas para el catabolismo de xilosa se obtiene una velocidad de crecimiento de $0,5707\text{h}^{-1}$ (12% menor a la experimental) y el 85% del flujo catabólico de xilosa se distribuye por la ruta oxo-reductiva. Cabe mencionar que los valores de velocidad de crecimiento determinados con el modelo deberían ser superiores o iguales a los encontrados experimentalmente, lo que no ocurre en estos casos, en la discusión se profundizará en el posible origen de esta discrepancia.

Finalmente, si se realiza un análisis de balance de flujos utilizando como restricciones las velocidades específicas de consumo de xilosa y amonio y la de producción PHB, con flujo cero a través de la reacción de la enzima xilitol deshidrogenasa (XOLDH) (imposibilitando el uso de la ruta oxo-reductiva) y se elige como función objetivo maximizar el crecimiento, se obtiene como resultado una distribución de flujos que permite un crecimiento celular a una velocidad de $0,4097\text{h}^{-1}$ para el primer estado *pseudo*-estacionario y $0,0785\text{h}^{-1}$ para el segundo estado. Además, la distribución de flujos calculada prevé la excreción de glutamato a una velocidad de $3,466\text{mmol.g}_{\text{Xr}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para el primer estado y $5,292\text{mmol.g}_{\text{Xr}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para el segundo estado. Esto plantea el cuestionamiento sobre si *H. seropedicae* excreta glutamato en las condiciones experimentales estudiadas. No se pudo realizar ningún ensayo con el objetivo de confirmar o descartar la presencia de glutamato en los sobrenadantes de las muestras tomadas a diferentes tiempos en el biorreactor.

El tercer estado *pseudo*-estacionario hallado, entre las 12 y las 18 horas del cultivo en lote de la cepa salvaje, está caracterizado por la acumulación de PHB a partir de xilosa, sin crecimiento celular y sin consumo de amonio. Por este motivo, en los FBA de este estado se maximizó el flujo a través de la reacción de síntesis de PHB. La distribución de flujos resultante prevé una producción de PHB de $1,7052\text{mmol.g}_{\text{Xr}}^{-1}.\text{h}^{-1}$, sin crecimiento celular, distribuyendo el flujo de xilosa, casi en su totalidad por la ruta oxo-reductiva. Si se bloquea la ruta oxo-reductiva, con flujo 0 a través de la reacción de la enzima XOLDH, la solución lleva a una producción de PHB de $1,1\text{mmol.g}_{\text{Xr}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ sin producción de biomasa. En la Figura 31 se muestra la distribución de flujos hallada en este caso. En ninguno de los casos se prevé la excreción de metabolitos carbonados (excepto el CO_2).

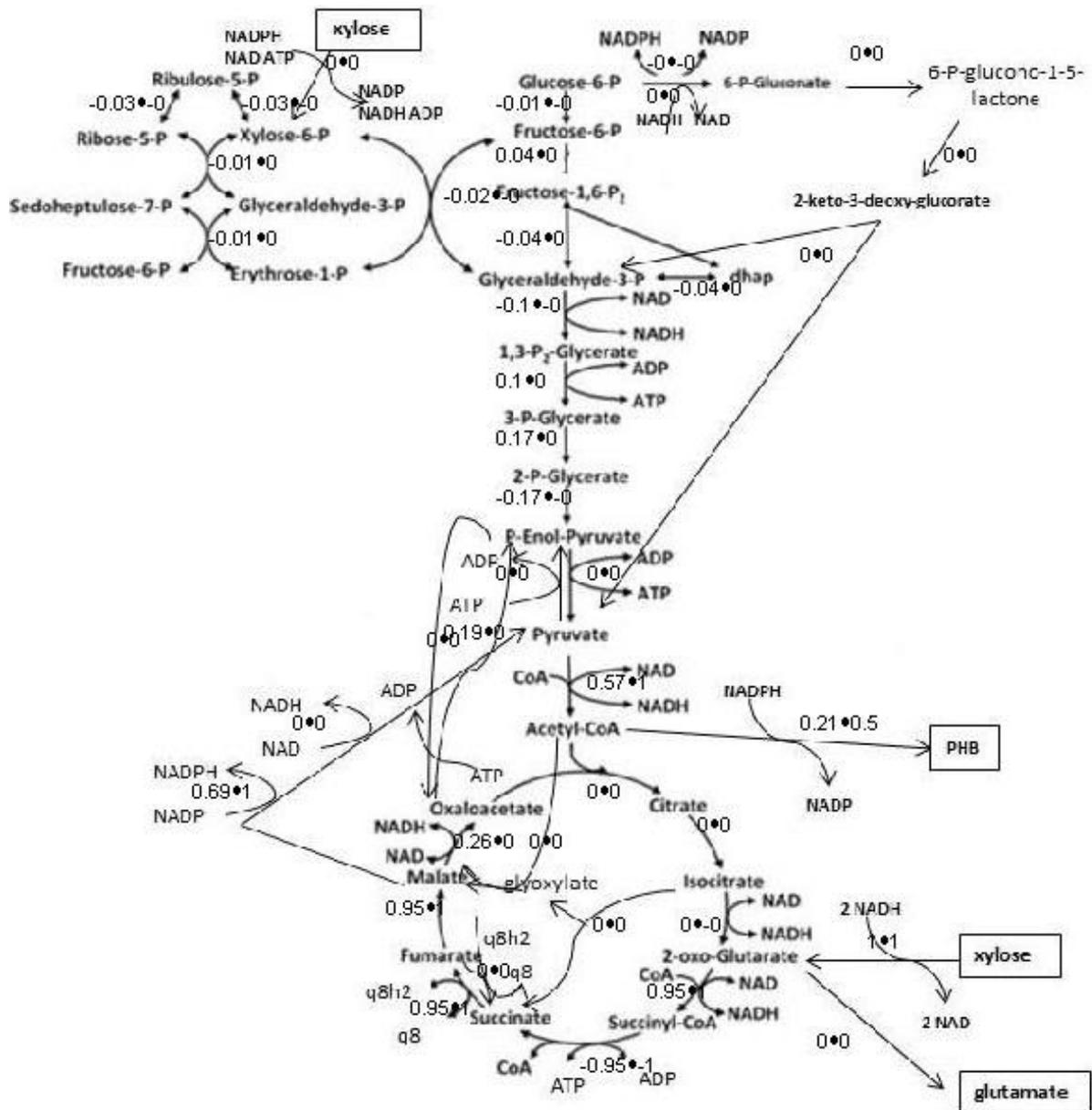


Figura 31: Distribución de flujos para *H. seropedicae* Z69 crecida en cultivos en lote, calculada con FBA restringido con los datos experimentales del consumo de xilosa y flujo 0 a través de XOLDH. El valor numérico a la izquierda de cada flujo muestra el resultado hallado para el segundo estado *pseudo*-estacionario en donde se maximizó el crecimiento y la velocidad de síntesis de PHB hallada experimentalmente se utilizó como restricción adicional. A la derecha se muestran los valores de flujos calculados para el tercer estado *pseudo*-estacionario, dónde se maximizó la síntesis de PHB. Los recuadros marcan los metabolitos que se intercambian con el exterior celular, a excepción del PHB. Los valores numéricos están normalizados con respecto al flujo de consumo de xilosa.

En el cultivo en lote del mutante *Z69ΔfabG* se encontraron tres estados *pseudo*-estacionarios. Los datos correspondientes al primer estado no se utilizaron como restricciones para realizar FBA, ya que no fue posible determinar la velocidad de consumo de xilosa, que es una de las restricciones más importantes a la hora de realizar los cálculos.

El segundo estado encontrado (entre las 11 y las 15,5 horas) se caracteriza por la producción de PHB y biomasa, consumiendo xilosa y amonio. Si se realiza un FBA utilizando como restricción el consumo de xilosa y la producción de PHB y se maximiza el crecimiento celular, la solución predice una velocidad de crecimiento de $0,2993 \text{ h}^{-1}$. Cabe recordar, que la velocidad de crecimiento encontrada experimentalmente para este estado es de $0,20 \text{ h}^{-1}$. En este caso la solución hallada prevé que el 83% del flujo de entrada de xilosa se distribuya a través de la ruta oxo-reductiva, y el resto a través de la ruta de Weimberg, tal como se muestra en la Figura 32.

Al igual que lo acontecido con la cepa salvaje, si se realiza un FBA utilizando como restricción el consumo de xilosa, amonio y la producción de PHB y se maximiza el crecimiento celular, la solución predice una velocidad de crecimiento de $0,2271 \text{ h}^{-1}$ y la excreción de glutamato a una velocidad de $1,0614 \text{ mmol.g}_{\text{xr}}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

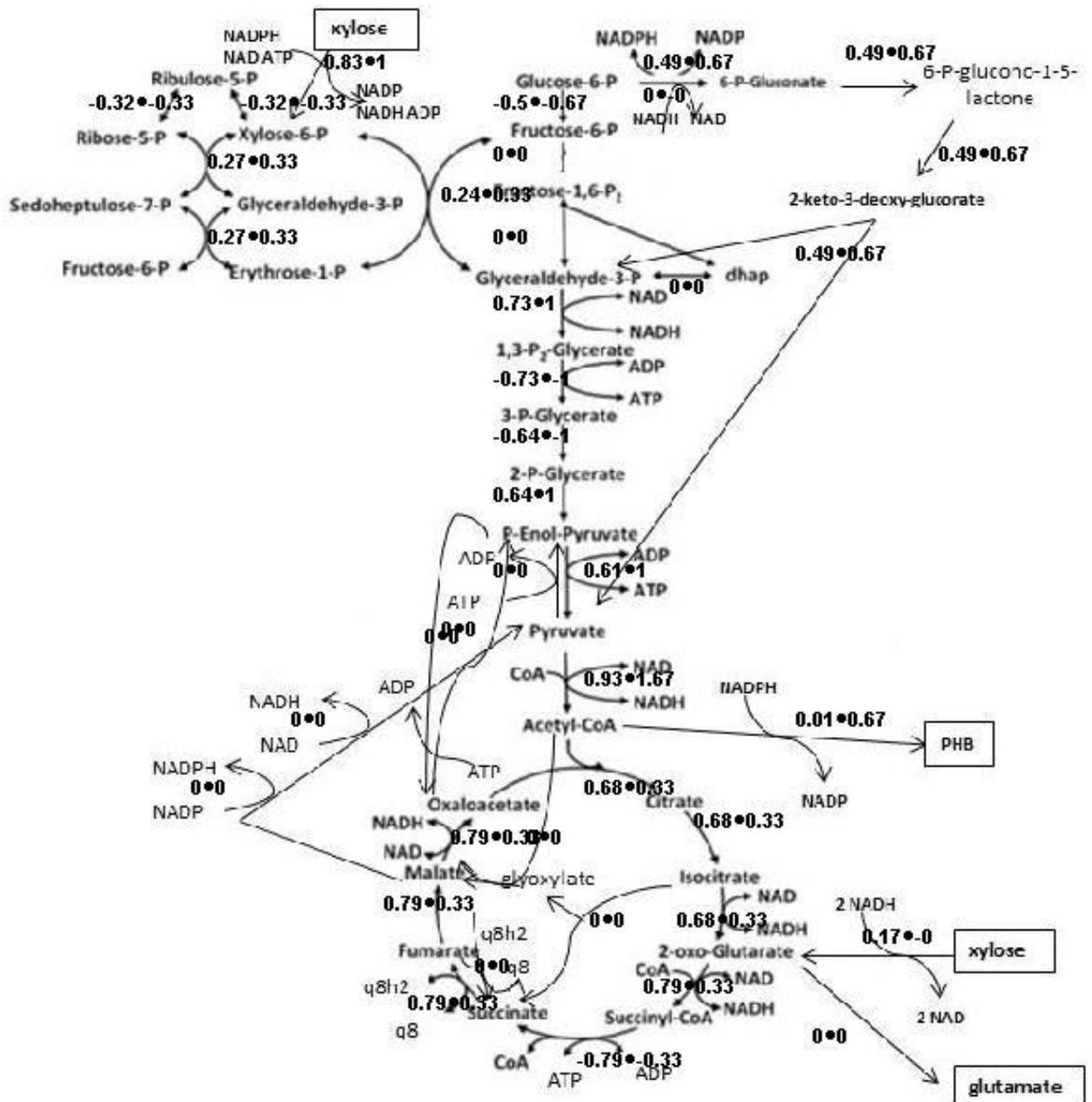


Figura 32: Distribución de flujos calculada utilizando FBA y los datos experimentales de consumo de xilosa encontrados en el segundo estado (izquierda) y el tercer estado (derecha) *pseudo*-estacionario del cultivo en lote de la cepa mutante Z69ΔfabG. En el primer caso se optimizó el crecimiento utilizando la velocidad de producción de PHB como una restricción extra. En el segundo caso se maximizó la producción de PHB. Los recuadros marcan los metabolitos que se intercambian con el exterior celular, a excepción del PHB. Los valores numéricos están normalizados con respecto al flujo de consumo de xilosa.

En este mismo cultivo en lote se logró determinar un tercer estado *pseudo*-estacionario (entre las 18,5 y las 27,5 horas) caracterizado por la acumulación de PHB sin crecimiento ni consumo de amonio. Se realizó un FBA maximizando la producción de PHB y usando como restricción el consumo de xilosa y amonio experimental. La solución obtenida propone que la velocidad de producción de PHB sería de $1,0674 \text{ mmol.g}_{\text{Xr}}^{-1}.\text{h}^{-1}$, sin crecimiento, y que el flujo de xilosa se distribuiría totalmente por la ruta oxo-reductiva, tal como se muestra en la Figura 32.

Además de los cultivos en lote ya mencionados, se realizaron, para cada cepa, cultivos en lote alimentado en dónde no es posible determinar estados *pseudo*-estacionarios, ya que las velocidades específicas cambian continuamente, pero las mismas se pueden determinar en cada punto generando un amplio conjunto de datos experimentales.

Se realizó FBA con el conjunto de datos obtenidos en el cultivo en lote alimentado de la cepa salvaje, en dónde se acotaron los límites de las reacciones de intercambio de xilosa y PHB con los datos experimentales, flujo 0 a través de XOLDH y se maximizó el flujo a través de la reacción de biomasa. Las velocidades de crecimiento previstas son menores a las experimentales, tal como se muestra en la Figura 33. Si se realiza FBA con las mismas restricciones, pero permitiendo que el sistema utilice cualquiera de las dos rutas para el catabolismo de xilosa, la velocidad de crecimiento prevista es mayor a la experimental, pero las distribuciones de flujos halladas prevén que la xilosa se catabolice principalmente por la ruta oxo-reductiva, tal como se muestra en la figura 33 B.

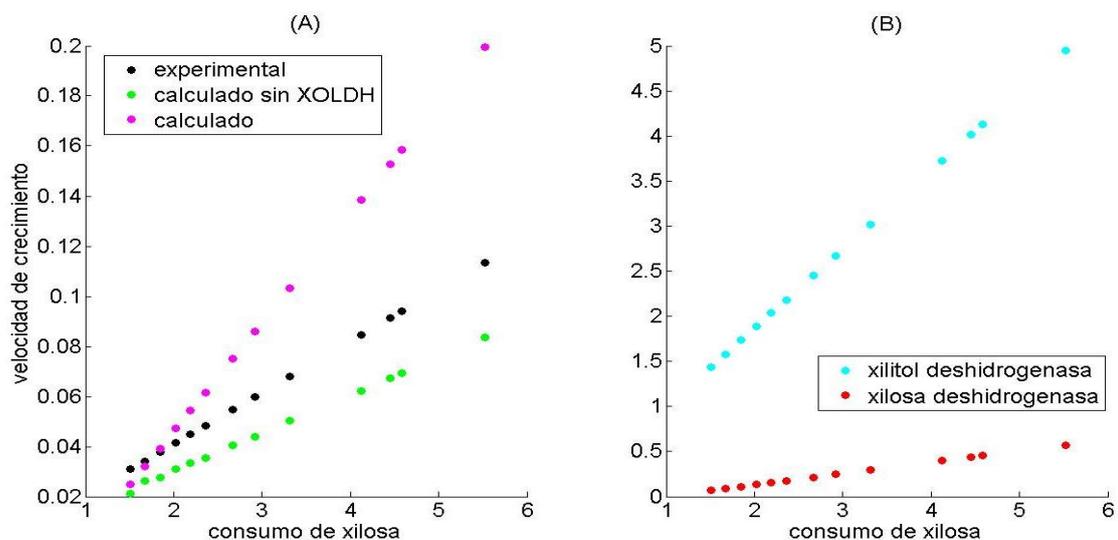


Figura 33: Velocidades específicas de crecimiento para cada punto del cultivo en lote alimentado de la cepa salvaje de *H. seropedicae* Z69. (A) En negro se muestran los datos experimentales. En verde se muestran las velocidades de crecimiento calculadas con FBA acotando los flujos de consumo de xilosa y producción de PHB a los datos experimentales e imponiendo flujo 0 a través de XOLDH, de modo que la xilosa sólo se pueda catabolizar a través de la ruta de Weimberg. En magenta se muestran las velocidades específicas de crecimiento calculadas con FBA con la red metabólica planteada (que puede utilizar cualquiera de las dos rutas propuestas para el catabolismo de xilosa), acotando los flujos de intercambio de xilosa y PHB con los datos experimentales y maximizando el flujo a través de la ecuación de biomasa. (B) Se muestran los flujos a través de dos enzimas claves para el catabolismo de xilosa calculados para cada punto en este último FBA. Los datos graficados representan velocidades específicas (flujos) y están expresados en $\text{mmol.g}_{\text{Xr}}^{-1}.\text{h}^{-1}$, excepto el crecimiento que tiene unidades de h^{-1} .

Luego, se realizó FBA, acotando los límites de las reacciones de intercambio de xilosa y biomasa según los datos experimentales, flujo 0 a través de XOLDH y maximizando el flujo a través de la reacción de síntesis de PHB. En todos los casos se encontró solución, pero la predicción de flujo a través de la reacción de producción de PHB es levemente menor al obtenido experimentalmente, tal como se muestra en la Figura 34. Dado que los flujos predichos de síntesis de PHB son menores que los experimentales, se realizó un nuevo análisis de balance de flujos para cada punto (en las mismas condiciones que el anterior), pero quitando la restricción de flujo cero a través de la enzima xilitol deshidrogenasa (XOLDH), de modo que la red metabólica, ahora sería capaz de utilizar cualquiera de las dos rutas propuestas para el catabolismo de xilosa. Los resultados se muestran en la Figura 34, donde se observa que los flujos predichos de síntesis de PHB son mayores a los determinados experimentalmente, pero el catabolismo de la xilosa se da mayoritariamente a través de la ruta oxo-reductiva.

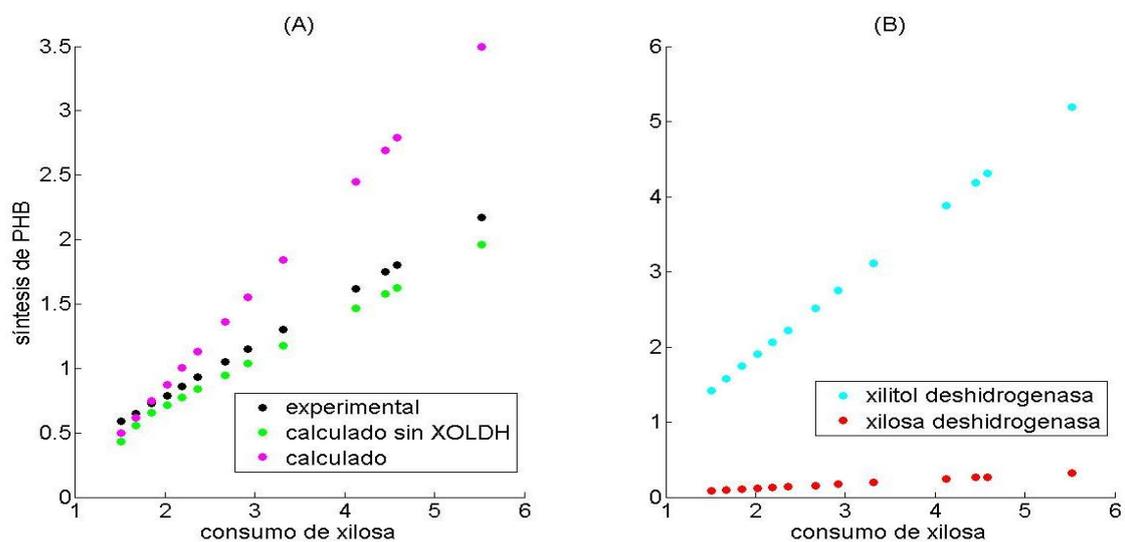


Figura 34: Velocidades específicas de producción de PHB para cada punto del cultivo en lote alimentado de la cepa salvaje de *H. seropedicae* Z69. (A) En negro se muestran las velocidades específicas de producción de PHB determinadas experimentalmente. En magenta y verde se muestran las velocidades específicas de producción de PHB calculadas mediante FBA con la red metabólica propuesta, acotando los flujos de intercambio de xilosa y biomasa con los datos experimentales y optimizando la producción de PHB. Los puntos verdes fueron calculados imponiendo, además, la restricción de flujo 0 a través de la enzima XOLDH, de modo que la xilosa sólo se podría catabolizar por la ruta de Weimberg. Los puntos magenta fueron calculados sin dicha restricción, de modo que la xilosa se puede catabolizar por cualquiera de las dos rutas propuestas; en B se muestran los flujos calculados correspondientes a reacciones claves en estas rutas en este último FBA. Los datos graficados están expresados en $\text{mmol.g}_{Xr}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Las velocidades específicas de consumo de xilosa y producción de PHB halladas experimentalmente para cada punto del cultivo en lote alimentado del mutante Z69Δ*fabG* se utilizaron como restricción para realizar un análisis de balance de flujos para cada punto, maximizando el flujo a través de la reacción de biomasa. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 35, en donde se observa que las velocidades de crecimiento predichas son mayores a las velocidades experimentales. Además la distribución de flujos muestra que la xilosa se catabolizaría principalmente por la ruta oxo-reductiva. En la Figura 36 se muestran los resultados obtenidos con FBA restringiendo los flujos de intercambio de xilosa y crecimiento con los datos experimentales y maximizando la síntesis de PHB. Los resultados obtenidos en este caso, son similares a los obtenidos en el FBA de la Figura 35.

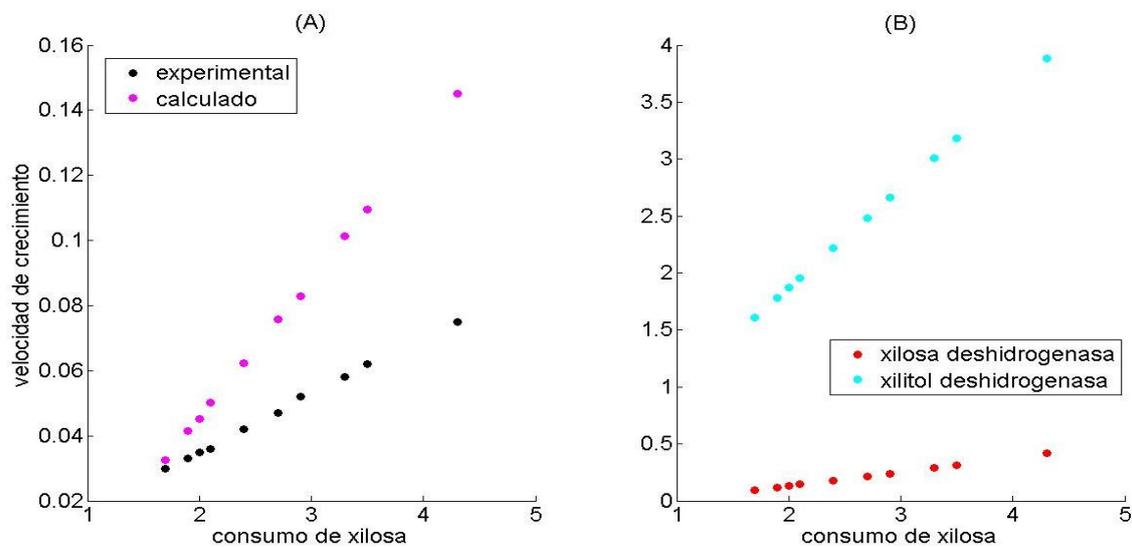


Figura 35: Velocidades específicas de crecimiento para cada punto del cultivo en lote alimentado del mutante Z69Δ*fabG*. A) En negro se muestran los datos experimentales. En magenta se muestran las velocidades específicas calculadas con balance de flujos con la red metabólica propuesta, acotando los flujos de intercambio de xilosa y producción de PHB con los datos experimentales y optimizando la producción de biomasa. En B se muestran los flujos a través de reacciones características de cada ruta catabólica de xilosa. Los datos graficados están expresados en $\text{mmol}\cdot\text{g}_{\text{Xr}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, excepto la velocidad de crecimiento que tiene unidades h^{-1} .

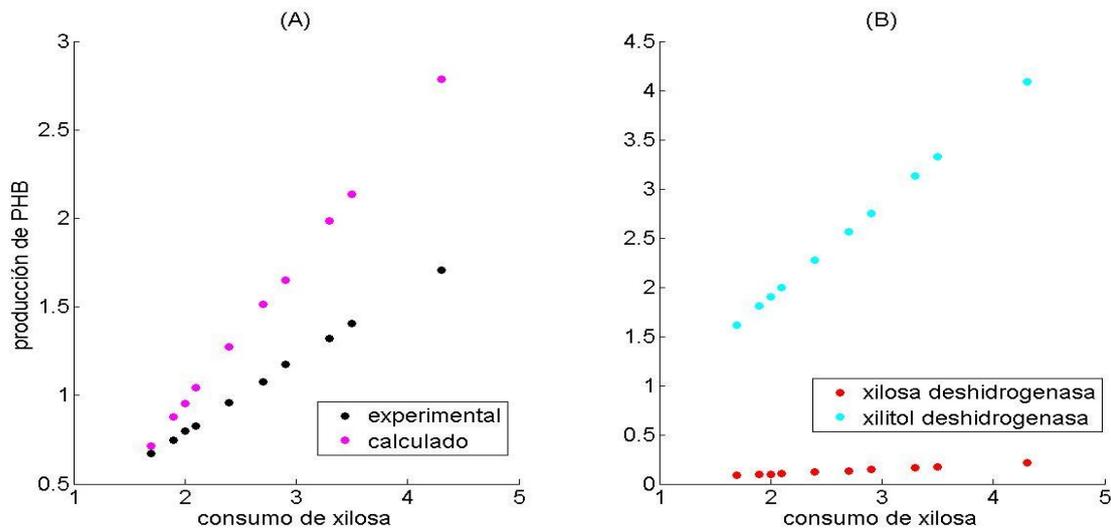


Figura 36: Velocidades específicas de síntesis de PHB para cada punto del cultivo en lote alimentado del mutante Z69ΔfabG. (A) En negro se muestran los datos experimentales. En magenta se muestran las velocidades específicas calculadas con análisis balance de flujos utilizando la red metabólica propuesta, acotando los flujos de intercambio de xilosa y biomasa con los datos experimentales y optimizando la producción de PHB. En B se muestran los flujos a través de reacciones características de cada ruta catabólica de xilosa. Los datos graficados están expresados en $\text{mmol.g}_{\text{Xr}}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

5.5.4 Predicción de mutaciones

Se realizó FBA con la red metabólica propuesta para estudiar el efecto que generarían mutaciones causantes de la eliminación de una reacción en *H. seropedicae* sobre su capacidad de crecer o acumular PHB.

Utilizando la red metabólica propuesta, con un flujo máximo de consumo de xilosa de $-11 \text{ mmol.g}_{\text{Xr}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ y maximizando la producción de biomasa, se realizó FBA simulando la eliminación de cada una de las reacciones, marcando flujo 0 a través de cada una de ellas. Con estos datos, la máxima velocidad de crecimiento posible es de $0,7201\text{h}^{-1}$ cuando no hay ninguna mutación, mientras que si se anula el flujo por la reacción 11 correspondiente al ATP de mantenimiento (ATPM), la velocidad de crecimiento podría ser de $0,7613\text{h}^{-1}$. Como era de esperar, ninguna otra mutación aumentó la velocidad de crecimiento. También hay reacciones que parecen ser esenciales para este modelo, sin las cuales no hay crecimiento y esas son las reacciones que permiten el consumo de xilosa, amonio y oxígeno por la célula, y las implicadas en la regeneración del poder reductor.

El mismo trabajo se realizó, pero maximizando la producción de PHB. Así se lograría una velocidad de producción de PHB máxima de $9,1667 \text{ mmol.g}_{\text{Xr}}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Nuevamente y como era de esperar la eliminación de ninguna de las reacciones ocasiona un aumento en la producción de PHB, mientras que algunas reacciones serían esenciales, sin las cuales no habría producción de PHB. Ellas son las involucradas en la internalización de xilosa y oxígeno a la célula, las encargadas de la producción de PHB y las involucradas en la regeneración del poder reductor.

Cabe mencionar que la velocidad de producción de PHB máxima obtenida con FBA se logra cuando se distribuye el flujo catalítico de xilosa enteramente por la ruta oxo-reductiva. Si se

impone flujo 0 a través de XOLDH, lo que equivaldría a mutar la ruta oxo-reductiva, se obtiene una producción de PHB de $5,500 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{Xr}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ en las mismas condiciones y la xilosa se catabolizaría por la ruta de Weimberg.

6. DISCUSIÓN

6.1 Elucidación de las rutas implicadas en el catabolismo de xilosa y validación mediante el análisis fenotípico de mutantes en genes clave

Para determinar cuál/es rutas estaban presentes en *H. seropedicae* para catabolizar la xilosa se realizaron alineamientos de secuencias de enzimas caracterizadas en otros microorganismos contra el genoma traducido de *H. seropedicae* SmR1. Además, se analizó el genoma anotado usando el servidor RAST de *H. seropedicae* SmR1. De esta manera se encontraron genes candidatos a codificar para enzimas de las rutas de Weimberg y oxo-reductiva. Para corroborar la implicancia de estos genes en el catabolismo de xilosa se construyeron mutantes de *H. seropedicae* Z69 en uno o más genes. Los mutantes se construyeron utilizando la técnica de mutagénesis mediada por *cross-over* PCR que permite retirar el gen deseado sin introducir genes de selección (resistencia a antibiótico) ni alterar el marco de lectura, para no afectar así a otros genes que pudiesen encontrarse en el mismo operón (Sukdeo & Charles 2003).

6.1.1 Xilosa deshidrogenasa

El gen *fabG* (*Hsero_4497*), fue originalmente anotado como codificante de una deshidrogenasa de cadena corta (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/_NC_014323). La anotación automática del servidor RAST lo identificó como codificante de una xilosa deshidrogenasa. Cabe mencionar que este gen es contiguo al operón *xyl*, que contiene ORFs que codificarían para los transportadores característicos de xilosa (Figura 8). Por todos los motivos anteriormente expuestos, este gen parecía ser un buen candidato a estar involucrado en el metabolismo de xilosa y para confirmar esta hipótesis se construyeron mutantes mediante la eliminación parcial de la región codificante de este gen.

La actividad xilosa deshidrogenasa en el mutante *Z69ΔfabG* disminuyó considerablemente con respecto a la cepa salvaje, siendo la actividad remanente en el mutante 17% o 28% de la actividad encontrada en la cepa salvaje, según si el extracto celular provino de células crecidas en presencia de 30g/l o 10g/l de xilosa (Tabla 12). El mutante *Z69ΔfabG* sigue siendo capaz de crecer en xilosa como única fuente carbonada, aunque con una velocidad de crecimiento menor que la cepa salvaje (aproximadamente la mitad). La actividad xilosa deshidrogenasa remanente en el mutante *Z69ΔfabG* podría deberse a otras deshidrogenasas presentes en la célula que estén llevando a cabo esta actividad de forma inespecífica. Estos resultados indicarían que este gen codifica para una xilosa deshidrogenasa.

Además, se observó que el perfil de crecimiento de la cepa mutante está caracterizado por dos velocidades de crecimiento: una primera etapa con velocidad de crecimiento más rápida y una segunda etapa más lenta, indicando que habría un cambio metabólico durante el crecimiento exponencial, que podría estar inducido por la concentración de xilosa, o el número de células u otros factores que son difíciles de controlar en cultivos en placa de microtitulación.

También se observó que las velocidades máximas de crecimiento tanto de la cepa salvaje como de la mutante *Z69ΔfabG* se vieron afectadas por la concentración de xilosa inicial en el medio de cultivo. En el caso de la cepa salvaje, μ_{max} disminuyó al aumentar la concentración de

xilosa, quizás por inhibición por sustrato o por la excreción de compuestos que resultan tóxicos y/o cambios en el pH del medio. Este comportamiento ya se había observado previamente en *R. eutropha* al crecer con diferentes concentraciones de glucosa (Mozumder et al. 2014). En cambio, en el mutante *Z69ΔfabG*, la μ_{max} con 30g/l de xilosa determinada fue levemente mayor a la detectada en cultivos con 10g/l de xilosa.

Para determinar la especificidad de sustrato de la enzima codificada por el gen *fabG*, se determinó la actividad deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ sobre diferentes sustratos, a partir de extractos celulares de la cepa salvaje y del mutante *Z69ΔfabG* crecidos con xilosa como única fuente carbonada. Como se mencionó anteriormente, la actividad específica xilosa deshidrogenasa del mutante *Z69ΔfabG* utilizando xilosa como sustrato, se redujo un 82% con respecto a la de la cepa salvaje. El mismo comportamiento se observó cuando se utilizó glucosa como sustrato de la reacción, mientras que cuando se utilizó arabinosa, la actividad específica del mutante *Z69ΔfabG* sólo se redujo un 25%. Estos datos sugieren que la enzima xilosa deshidrogenasa podría utilizar como sustratos, de forma indistinta, xilosa o glucosa, de acuerdo a los datos observados en la Figura 25. Sin embargo, la enzima codificada por el gen *fabG* no sería esencial en el catabolismo de glucosa, ya que el mutante *Z69ΔfabG* no vio alterado su crecimiento en presencia de esta fuente de carbono. Estas observaciones concuerdan con datos publicados previamente, en donde se observó que la xilosa deshidrogenasa de otros microorganismos puede utilizar como sustrato D-glucosa, L-arabinosa y otros compuestos, aunque con menor afinidad que la xilosa (Johnsen & Schonheit 2004)(Bonete et al. 1996).

Cabe mencionar que esta enzima se expresa aun cuando *H. seropedicae* crece en presencia de glucosa, lo que podría indicar que no habría represión catabólica por glucosa (Figura 24). Sin embargo, se observa que esta enzima no se expresa cuando crece con otra fuente de carbono no relacionada como el xilitol, lo que sugeriría que su expresión es inducida por la presencia de xilosa o glucosa en el medio de cultivo. Este dato es muy interesante y alentador, porque cabe la posibilidad de que si *H. seropedicae* *Z69* no presentara represión catabólica, no estaría obligada a utilizar primero la glucosa y luego la xilosa. Los microorganismos más estudiados y utilizados en la industria hoy en día no son capaces de utilizar al mismo tiempo xilosa y glucosa debido a la represión catabólica causada por la glucosa (Görke & Stülke 2008). Esto aumenta los tiempos de cultivo y reduce la eficiencia de estos microorganismos a la hora de producir de forma industrial algún compuesto de interés a partir en hidrolizados de biomasa, ricos en xilosa y glucosa. Sin embargo, para corroborar esta hipótesis sería necesario realizar cultivos en lote de *H. seropedicae* en medio mínimo con xilosa y glucosa y observar el crecimiento y el consumo de estos sustratos a lo largo del tiempo.

Por otro lado, la actividad deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ se vio levemente disminuida en el mutante *Z69ΔfabG* con respecto a la cepa salvaje cuando se utilizó arabinosa como sustrato para medir la actividad enzimática (Figura 25). Esto sugiere que la enzima codificada por el *fabG* podría no estar involucrada en la reacción enzimática en presencia de arabinosa y que las actividades detectadas con arabinosa en la cepa salvaje y mutante serían derivadas de otras deshidrogenasas presentes en la célula. O quizás en el mutante *Z69ΔfabG* se exprese/n otra/s deshidrogenasa/s que no se expresarían en la cepa salvaje y estos perfiles de actividad de la cepa salvaje y mutante sean independientes y particulares de cada enzima. Esto dejaría en evidencia que, a pesar de que la ruta de Weimberg es análoga a la ruta propuesta para el

catabolismo de arabinosa en *H. seropedicae* (Mathias et al. 1989), la enzima xilosa deshidrogenasa codificada por el gen *fabG* no estaría implicada mayormente en el catabolismo de arabinosa, ya que el crecimiento en este sustrato por parte del mutante $Z69\Delta fabG$ no se vio alterado. Hasta el momento no se saben cuáles son los genes que codifican para las enzimas involucrados en el catabolismo de arabinosa en *H. seropedicae* (Pedrosa et al. 2011).

6.1.1.1 Complementación del mutante $Z69\Delta fabG$

Para verificar que el fenotipo observado en el mutante $Z69\Delta fabG$ se debía únicamente a la eliminación del gen que codifica para la enzima xilosa deshidrogenasa, se transfirió a dicho mutante una copia salvaje del gen *fabG* clonado en el vector de expresión pBBR1MSC-2 o en el vector suicida *pK18mobsacB* (que se co-integró en el genoma de $Z69\Delta fabG$), y se evaluó la recuperación del fenotipo salvaje.

Cuando se expresó la copia salvaje del gen *fabG* en $Z69\Delta fabG$ bajo la regulación del promotor fuerte *plac* presente en el vector pBBR1MSC-2, ésta no recuperó totalmente el fenotipo salvaje. La cepa complementada creció mejor que la mutante en presencia de 10g/l de xilosa, pero sin poder recuperar totalmente el crecimiento, mientras que con 30g/l de xilosa se comportó igual que la cepa mutante. Al contrario de lo esperado, la cepa complementada creció mucho menos que la salvaje y la mutante $Z69\Delta fabG$ en glucosa. La actividad xilosa deshidrogenasa en esta cepa complementada fue 10 veces mayor a la actividad detectada en la cepa salvaje en las mismas condiciones (Tabla 12), lo que indicaría que la alteración en el crecimiento en esta cepa podría deberse a la sobreexpresión de la enzima xilosa deshidrogenasa, lo que llevaría a un desbalance metabólico.

Por este motivo, se decidió utilizar otra estrategia para complementar, que involucra volver a introducir la copia salvaje del gen en el genoma, para que el mismo se exprese bajo la influencia de su propio promotor en su contexto genómico, no generándose así un exceso de copias de la enzima. La cepa complementada con esta estrategia recuperó totalmente el fenotipo salvaje en cuanto a su capacidad de crecer en distintas concentraciones de xilosa, indicando que el gen *fabG* sería responsable del fenotipo observado en el mutante $Z69\Delta fabG$. Además, la técnica utilizada para complementar funcionó según lo esperado y sería adecuada para complementar otros mutantes en *H. seropedicae*. Sería interesante medir la actividad xilosa deshidrogenasa en esta cepa complementada y comparar los resultados con la cepa complementada utilizando el vector pBBR1MSC-2.

6.1.2 Glucosa deshidrogenasa

El hecho de que el mutante $Z69\Delta fabG$ sea capaz de continuar creciendo apreciablemente en xilosa (Figura 18), a pesar de tener considerablemente disminuida la actividad de la enzima xilosa deshidrogenasa (Tabla 12), estaría indicando que existe una ruta alternativa para catabolizar la xilosa, y/o que existen una o más enzimas redundantes responsables de la actividad remanente. En otras bacterias, como *G. oxidans* y *P. putida*, la xilosa es transformada en xilonolactona por la glucosa deshidrogenasa periplasmática dependiente de PQQ, luego ésta sería transformada en xilonato, el cual sería internalizado para poder continuar su catabolismo por la ruta de Weimberg (Zhang et al. 2013)(Meijnen et al. 2009). En el genoma de

H. seropedicae SmR1 se encuentra el gen *Hsero_1671*, candidato a codificar para una glucosa deshidrogenasa periplasmática dependiente de PQQ. Esta enzima podría estar contribuyendo a transformar la xilosa en xilonolactona en el periplasma. Para poder verificar esta hipótesis se construyeron dos cepas mutantes: *Z69ΔHsero_1671* y *Z69ΔfabGΔHsero_1671* esperando que este último mutante no creciera en xilosa como única fuente carbonada. Por el contrario, estas cepas mutantes se comportaron igual a sus cepas parentales, no viéndose afectado el crecimiento en xilosa, ni glucosa como únicas fuentes carbonadas. A su vez, no se encontró actividad glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ en extractos celulares de la cepa salvaje crecida con glucosa ni con xilosa como única fuente carbonada. Estos resultados estarían indicando que este gen no se expresaría en *H. seropedicae* o que la proteína expresada no es funcional. Recientemente, se reportó que *H. seropedicae* Z67 no sería capaz de sintetizar el cofactor PQQ. Pero si se expresan de forma heteróloga los genes necesarios para su producción en esta cepa, la glucosa deshidrogenasa periplasmática dependiente de PQQ se expresa y es funcional. Además, esta cepa recombinante que expresa la enzima glucosa deshidrogenasa y es capaz de sintetizar su cofactor, mejoró su capacidad de crecer en glucosa y xilosa y comenzó a excretar gluconato en presencia de glucosa (este compuesto no es excretado por la cepa salvaje) (Wagh et al. 2014).

En resumen, la glucosa deshidrogenasa periplasmática dependiente de PQQ, codificada por el gen *Hsero_1671*, no está involucrada en el catabolismo de xilosa ni de glucosa en *H. seropedicae* Z69 en las condiciones ensayadas, por lo tanto esta derivación de la ruta de Weimberg descrita en otros microorganismos no sería la ruta alternativa responsable de que el mutante *Z69ΔfabG* continúe creciendo en xilosa en las condiciones estudiadas en este trabajo.

6.1.3 Xilitol deshidrogenasa

La ruta oxo-reductiva, clásica de hongos y levaduras, transforma la xilosa en xilitol por medio de la xilosa reductasa y luego el xilitol en xilulosa por la enzima xilitol deshidrogenasa (Figura 3) (Jin & Jeffries 2004). En *H. seropedicae* Z69 se detectó actividad xilitol deshidrogenasa en extractos celulares crecidos en presencia de xilitol, pero no se detectó en extractos celulares crecidos con glucosa o xilosa como fuente carbonada (Figura 24). Esto indica que, en la cepa salvaje, esta enzima estaría involucrada en el catabolismo del xilitol, pero no estaría implicada en la degradación de xilosa. Por otro lado se observó que la expresión de esta enzima no sería constitutiva, sino que estaría inducida por la presencia de xilitol (Figura 24).

Interesantemente, en extractos celulares del mutante *Z69ΔfabG* crecido con única xilosa como fuente de carbono se logró determinar actividad xilitol deshidrogenasa, al contrario de lo observado en la cepa salvaje bajo las mismas condiciones. Esto permite plantear la hipótesis de que cuando se bloquea la ruta de Weimberg (o al menos de forma parcial), *H. seropedicae* estaría activando la ruta oxo-reductiva para catabolizar la xilosa. Para verificar esta hipótesis se construyeron cepas mutantes en el ORF *Hsero_3396*, que, según la anotación del genoma de *H. seropedicae* SmR1 disponible (www.ncbi.nlm.nih.gov, NC_014323) y la anotación hecha con el servidor RAST, codificaría para una enzima con actividad xilitol deshidrogenasa. Sin embargo, tanto la mutante *Z69ΔHsero_3396* como la doble mutante *Z69ΔfabGΔHsero_3396* se comportaron igual que las cepas parentales en cuanto a su crecimiento en xilosa, xilitol o glucosa como únicas fuentes carbonadas. En los extractos celulares de la doble mutante

Z69Δ*fabG*Δ*Hsero_3396* crecida en presencia de xilosa se detectó una actividad xilitol deshidrogenasa similar a la encontrada en la mutante Z69Δ*fabG*. Estos resultados en conjunto, estarían indicando que el gen *Hsero_3396* no codifica para la enzima xilitol deshidrogenasa en *H. seropedicae* o que hay otras enzimas que están cumpliendo esa función. Para verificar estas hipótesis es necesario analizar con más detenimiento el genoma de *H. seropedicae* en busca de genes candidatos a codificar para la enzima xilitol deshidrogenasa u otras enzimas que sean capaces de oxidar el xilitol. También se podría realizar una mutación al azar en *H. seropedicae* con posterior secuenciación de las regiones mutadas en los clones incapaces o con capacidad reducida de crecer en xilitol, pero esta técnica no es eficiente si la actividad xilitol deshidrogenasa es redundante, es decir, si puede ser llevada a cabo por varias enzimas a la vez.

Los resultados obtenidos sugieren que la ruta oxo-reductiva es funcional y que es la encargada de catabolizar la xilosa en ausencia de la ruta de Weimberg. Sin embargo, para verificar esta hipótesis habría que determinar la actividad xilosa reductasa, primera enzima de esta ruta, en extractos celulares de Z69Δ*fabG* crecida en presencia de xilosa. Hasta el momento no hay indicios de cuál podría ser el gen encargado de codificar para esta enzima en *H. seropedicae* o en otras bacterias. Quizás, esta función se lleva a cabo por reductasas endógenas que reconocen de forma inespecífica la xilosa, pero es necesario desarrollar más estudios al respecto.

6.1.4 Xilonato deshidratasa

La xilonato deshidratasa es la tercera enzima involucrada en la ruta de Weimberg y transforma el D-xilonato en 2-ceto-3-deoxi-xilonato (Figura 5) (Stephens et al. 2007). En el genoma publicado de *H. seropedicae* SmR1 (www.ncbi.nlm.nih.gov, NC_014323) no hay ningún gen candidato que codifique para esta enzima. Sin embargo, mediante la anotación hecha en el servidor RAST, el gen *Hsero_4498* codificaría para esta enzima. Además, mediante búsqueda de homología usando la secuencia proteica de la xilonato deshidratasa de *C. crescentus* se encontró el gen (*Hsero_4498*), contiguo a *fabG*, y el gen *ilvD* como candidatos a codificar para esta enzima (Malan 2011). Con el fin de estudiar cuál de estos genes codificaría para la enzima xilonato deshidratasa, se construyeron los mutantes Z69Δ*Hsero_4498* y Z69Δ*ilvD*.

Si la función xilonato deshidratasa sólo se pudiera llevar a cabo por la enzima codificada por el gen *Hsero_4498*, se esperaría que este mutante tuviese un crecimiento en xilosa comparable al observado en el mutante Z69Δ*fabG* por tratarse de enzimas de la misma ruta catabólica. Sin embargo, el mutante Z69Δ*Hsero_4498* presentó un crecimiento igual que la cepa salvaje cuando la xilosa se usó como única fuente de carbono, indicando que el producto de este gen no estaría involucrado en el catabolismo de xilosa o que hay otras enzimas que puedan suplir esa función sin alterar el comportamiento de la cepa mutante. Además, la actividad xilitol deshidrogenasa en el extracto celular del mutante Z69Δ*Hsero_4498* fue casi nula, al igual que en la cepa salvaje, indicando que tampoco se estaría expresando en esta mutante la ruta oxo-reductiva alternativa a la ruta de Weimberg.

El crecimiento del mutante Z69Δ*ilvD* también fue igual al de la cepa salvaje cuando se utilizó 10g/l de xilosa como fuente de carbono en el medio de cultivo, pero cuando se utilizó 30g/l de xilosa, este mutante presentó una reducción en su crecimiento con respecto a la cepa salvaje.

Esta reducción de crecimiento es muy similar a la observada en el mutante Z69 Δ fabG. Esto estaría indicando que la enzima codificada por este gen estaría involucrada en el catabolismo de xilosa, pero que habría otras enzimas que podrían estar sufriendo esta función cuando se utilizan 10g/l de xilosa en el medio de cultivo. Esa disminución en el crecimiento del mutante Z69 Δ ilvD que se observada solamente con 30g/l de xilosa inicial en el medio de cultivo también podría deberse a una mayor acumulación de xilonato intracelular, que resultaría tóxico. Esta reducción del crecimiento podría ser causada por un aumento en el consumo de xilosa y el consecuente aumento de flujo de xilosa a través de la enzima xilosa deshidrogenasa. Esto generaría una acumulación de xilonato, que no podría ser degradado lo suficientemente rápido por una disminución en la actividad xilonato dehidratasa. Otra hipótesis es que la expresión de este gen esté inducida por altas concentraciones de xilosa en el medio de cultivo, o por metabolitos que sólo se producirían en estas condiciones, y que el mismo no se expresaría con concentraciones de 10g/l de xilosa, por lo que su mutación no afectaría el comportamiento de la cepa mutante cuando se crece con 10g/l de xilosa inicial. Para poder verificar las hipótesis anteriormente expuestas sería muy importante medir actividad xilonato dehidratasa en todos los mutantes, por problemas logísticos esta actividad no se pudo realizar en este trabajo, pero se realizará en el futuro.

También, sería importante determinar la actividad xilitol deshidrogenasa en extractos celulares del mutante Z69 Δ ilvD crecido con 10g/l y con 30g/l de xilosa para observar la expresión de la ruta oxo-reductiva propuesta como ruta alternativa cuando no se encuentra la ruta de Weimberg en *H. seropedicae*.

Además, sería de gran interés construir un mutante en ambos genes propuestos, *Hsero_4498* e *ilvD*, ya que quizás estos genes codifiquen para enzimas con la misma actividad y cuando uno es mutado, la enzima codificada por el otro está sufriendo la actividad y por eso no se observan diferencias con respecto a la cepa salvaje. Si esto fuera así, sería novedoso, ya que en otras bacterias la actividad xilonato dehidratasa está solamente dada por la expresión de un solo gen y no puede ser reemplazada por otras enzimas de la célula, como ocurre con el gen *xyID* en *C. crescentus* (Stephens et al. 2007). En un trabajo realizado en *P. putida* expresando el operón *xyIXABCD* de *C. crescentus*, se encontró que el único gen del operón *xyI* esencial para catabolizar la xilosa es el *xyID* (que codifica para la xilonato dehidratasa), y que las funciones de las otras enzimas pueden ser llevadas a cabo por enzimas endógenas de la célula que reconocerían de forma inespecífica los metabolitos de la ruta de Weimberg. Los investigadores de este trabajo además, proponen genes de la propia célula con secuencias proteicas similares a los encontrados en *C. crescentus* que podrían estar llevando a cabo estas actividades. Es interesante notar que los genes de *P. putida* similares al gen *xyID* de la enzima xilonato dehidratasa son el *IlvD* y *Edd*, aunque como se mencionó previamente no serían funcionales en el catabolismo de la xilosa en esta cepa (Meijnen et al. 2009).

6.2 Análisis de balance de flujos

6.2.1 Reconstrucción de la red metabólica

Se construyó una red del metabolismo central carbonado en *H. seropedicae* a partir del modelo de metabolismo central propuesto por Orth y col. (2010). De acuerdo al fenotipo de

los diferentes mutantes construidos y las actividades enzimáticas determinadas en la cepa salvaje y los mutantes, se adicionaron reacciones para las rutas de Weimberg y oxo-reductiva para catabolizar la xilosa y reacciones para la síntesis de PHB. De este modo, se construyó una red metabólica con 110 reacciones y 82 metabolitos, que es capaz de producir PHB y simular el crecimiento celular a partir de xilosa como única fuente carbonada.

Para la reacción de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se incluyeron dos reacciones independientes, una utilizando como cofactor el NAD^+ y en la otra el NADP^+ . De este modo, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa del modelo sería dual, pudiendo usar cualquiera de los dos cofactores sin ninguna restricción, de acuerdo a las determinaciones enzimáticas efectuadas. Se ha propuesto que en algunas bacterias la forma más importante de regular y mantener el balance redox se procesa mediante enzimas duales, principalmente la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Fuhrer & Sauer 2009).

En esta red metabólica no se incluyó la reacción catalizada por la glucosa deshidrogenasa periplasmática dependiente de PQQ, ya que la misma no es funcional en las condiciones ensayadas en este trabajo. Si se realizara una reconstrucción más completa de la red metabólica, se debería incluir esta reacción, además de una reacción para internalizar PQQ del exterior y otra para regenerarlo, así, en este modelo más completo, esta enzima sería funcional si se encuentra PQQ en el medio de cultivo.

6.2.2 FBA restringido con datos experimentales

El análisis de balance de flujo asume que los metabolitos internos se encuentran balanceados. Para ello, los datos con los que se ajusta el modelo deben obtenerse cuando el cultivo se encuentra en estado *pseudo*-estacionario (Orth et al. 2010). Con este fin, se realizaron cultivos en lote y lote alimentado de la cepa salvaje de *H. seropedicae* Z69 y del mutante Z69 Δ fabG.

Cuando se realizó FBA restringido con los parámetros cinéticos determinados en el primer estado *pseudo*-estacionario del cultivo en lote de la cepa salvaje, se logró reproducir el crecimiento encontrado experimentalmente, ya sea si se utiliza la ruta de Weimberg para catabolizar de xilosa, o si el flujo se distribuye mayoritariamente por la ruta oxo-reductiva.

Al realizar FBA restringiendo el consumo de xilosa y síntesis de PHB con los valores encontrados en el segundo estado *pseudo*-estacionario del cultivo en lote de la cepa salvaje y maximizando el crecimiento la solución a la que se arriba prevé una velocidad de crecimiento 30% menor a la experimental. En este caso se permitió que el sistema sólo utilice la ruta de Weimberg para catabolizar la xilosa. Si se realiza FBA con las mismas restricciones pero permitiendo que se utilicen cualquiera de las dos rutas para el catabolismo de xilosa, la solución a la que se arriba prevé un 12% menor al encontrado experimentalmente, pero el flujo se distribuye mayoritariamente por la ruta oxo-reductiva. Esto no sería lo que ocurriría en la cepa salvaje en donde no se detectó actividad xilitol deshidrogenasa cuando la misma es crecida con xilosa como única fuente de carbono (Tabla 12), indicando que esta ruta no sería activa en estas condiciones.

La menor cantidad de biomasa predicha por FBA con respecto al valor experimental, puede deberse, además de a posibles errores experimentales, a falta de reacciones, a restricciones mal impuestas o a errores en la ecuación de biomasa.

Si además se restringe el consumo de amonio en los cálculos de FBA, las distribuciones de flujo a las que se arriba prevén una importante excreción de glutamato, el cual no se sabe si es producido experimentalmente en esas condiciones. Si se bloquea su excreción, imponiendo flujo 0 en la reacción de intercambio, el FBA no arriba a ninguna solución, indicando que para que la red metabólica propuesta funcione con ese consumo de xilosa y amonio, se tiene que excretar el exceso de amonio. Si bien no se sabe si *H. seropedicae* excreta glutamato en las condiciones ensayadas, es probable que el mismo no sea producido y que lo observado en FBA se deba al exceso de restricciones impuestas, ya que los datos experimentales tienen errores asociados que no se consideraron al realizar FBA y los mismos pueden no ajustarse exactamente a la estequiometría propuesta, generando así este tipo de inconvenientes.

Cabe mencionar además, que si se realiza FBA imponiendo como restricciones el consumo de amonio y xilosa y la velocidad de crecimiento hallada experimentalmente, optimizando la producción de PHB, tampoco se encuentra solución, lo que nuevamente puede deberse a un conflicto entre los datos experimentales con sus errores y las restricciones estequiométricas.

El tercer estado *pseudo*-estacionario hallado, entre las 12 y 18 horas del cultivo en lote de la cepa Z69, está caracterizado por la acumulación de PHB a partir de xilosa, sin crecimiento celular y sin consumo de amonio. Por este motivo, en los FBA de este estado *pseudo*-estacionario se maximizó la producción de PHB como función objetivo. La distribución de flujos resultante prevé una producción de PHB ampliamente mayor a la encontrada experimentalmente, sin crecimiento celular. La velocidad de acumulación de PHB es aún mayor si se deja que la red metabólica emplee cualquiera de las dos rutas propuestas, dirigiendo principalmente el flujo de xilosa a través de la ruta oxo-reductiva. Estos datos indican que la máxima producción posible de PHB, para ese consumo de xilosa sería de $1,7052 \text{ mmol.g}_{\text{Xr}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ si se emplea la ruta oxo-reductiva o de $1,1 \text{ mmol.g}_{\text{Xr}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ si la xilosa se cataboliza por la ruta de Weimberg. Esto estaría indicando que la ruta oxo-reductiva es más eficiente que la de Weimberg y que, a partir de la misma cantidad de xilosa se podría sintetizar más PHB. Cabe mencionar que FBA maximiza la función objetivo, PHB en este caso, y da como resultado la distribución de flujos que predice el mayor flujo a través de esa reacción (Orth et al. 2010) Este comportamiento no necesariamente es el que ocurre en la célula, en donde probablemente no se esté dirigiendo todo el carbono y el poder reductor hacia la síntesis de PHB. Además, este tipo de modelos se basa solamente en la estequiometría, no teniendo en cuenta la regulación, que en este caso podría ser un factor importante.

Si analizamos las distribuciones de flujos halladas para el segundo estado *pseudo*-estacionario (Figura 31) en donde *H. seropedicae* Z69 crece y acumula PHB se observa que el flujo carbonado se cataboliza por la ruta de Weimberg, entra en el ciclo de Krebs y luego, principalmente a través de la enzima málica, genera piruvato y NADPH. Luego este piruvato genera acetil-CoA para el crecimiento celular y la síntesis de PHB. Para generar los demás componentes de la biomasa es necesario realizar gluconeogénesis. En cambio, en el tercer estado *pseudo*-estacionario, cuando se da la producción de PHB sin crecimiento celular, no se prevé que haya flujo a través de la gluconeogénesis. En ninguno de los casos se prevé que el ciclo de Krebs se realice en su totalidad, así como tampoco se prevén flujos mayores a 0 a través de la ruta de Entner Duodoroff y el ciclo del gioxilato.

En el cultivo en lote del mutante *Z69ΔfabG* se encontraron tres estados *pseudo*-estacionarios. Los datos calculados a partir de las mediciones realizadas en el primer estado *pseudo*-estacionario encontrado (4 a 10 horas de cultivo) no se utilizaron para realizar FBA debido a la falta de datos de consumo de xilosa, que es una de las restricciones más importantes, porque si se deja libre el consumo de xilosa (entre -1000 y 1000) ésta se consume en grandes cantidades, no representando la realidad.

El segundo estado encontrado (entre las 11 y las 15,5 horas) se caracteriza por la producción de PHB y biomasa, consumiendo xilosa y amonio. Si se realiza un FBA utilizando como restricción el consumo de xilosa, y la producción de PHB y se maximiza el crecimiento celular, la solución predice una velocidad de crecimiento de $0,2993\text{h}^{-1}$. Este valor es mayor al valor encontrado experimentalmente de $0,20\text{h}^{-1}$. La solución calculada prevé que un 17% del flujo de xilosa se distribuya por la ruta de Weimberg y un 83% por la ruta oxo-reductiva. En las medidas de actividades enzimáticas (Tabla 12) se determinó que en los extractos celulares del mutante *Z69ΔfabG* crecido con 30g/l de xilosa, se mantenía un 17% de actividad xilosa deshidrogenasa (XDH) remanente, mientras que, en los extractos celulares del mutante *Z69ΔfabG* crecido con 10g/l de xilosa, se retenía un 28% de actividad XDH remanente con respecto a la encontrada en la cepa salvaje. Esto estaría indicando que por la ruta de Weimberg podría haber un flujo de estas dimensiones, y que los resultados predichos con FBA estarían cercanos a la realidad. Cabe mencionar que si se realiza FBA imponiendo flujo 0 por la enzima XDH (xilosa deshidrogenasa de la ruta de Weimberg), la solución prevé un crecimiento de $0,2986\text{h}^{-1}$, un resultado muy similar al anterior, y levemente más cercano al experimental.

El tercer estado *pseudo*-estacionario está caracterizado por la acumulación de PHB a partir de xilosa, sin crecimiento celular. La solución que se obtiene con FBA restringido por el consumo de xilosa y amonio experimentales y optimizando la síntesis de PHB prevé un valor máximo de síntesis de PHB de $1,07\text{ mmol.g}_{\text{Xr}}^{-1}.\text{h}^{-1}$, distribuyendo el flujo de xilosa totalmente por la ruta oxo-reductiva. Este valor es más del doble del valor obtenido experimentalmente, pero este sería el valor máximo teórico si la célula maximizara la producción de PHB. En las condiciones experimentales la célula probablemente no esté maximizando la producción de PHB, sino que lo esté produciendo para canalizar el exceso de acetil-CoA y NADPH, y recuperar los cofactores reducidos que le permiten continuar con su metabolismo a través del ciclo de Krebs (Kessler & Witholt 2001).

La distribución de flujos encontrada con FBA, restringido con datos experimentales del segundo estado *pseudo*-estacionario (Figura 32), estaría representando los flujos intracelulares del mutante *Z69ΔfabG* mientras crece y acumula PHB. En la figura se observa que los flujos se distribuyen a través de la vía de las pentosas fosfato, donde luego los metabolitos allí producidos serían degradados por la parte baja de la ruta de glicólisis y Entner Doudoroff para continuar por el ciclo de ciclo de Krebs. No se observaría flujo por el ciclo del glioxilato, ni gluconeogénesis. Una distribución de flujos muy similar se obtiene aplicando FBA con las restricciones experimentales del tercer estado *pseudo*-estacionario caracterizado por la acumulación de PHB sin crecimiento celular (Figura 32).

Los resultados calculados con FBA restringido con los datos experimentales del mutante *Z69ΔfabG* son mayores a los encontrados experimentalmente. Este resultado es satisfactorio

teniendo en cuenta que la solución prevista por FBA representa las capacidades máximas de la red estequiométrica, ya que no incluye las restricciones cinéticas ni regulatorias.

Se constata que las distribuciones de flujo previstas para la cepa salvaje con respecto a las previstas para el mutante *Z69ΔfabG* son muy diferentes, y que los patrones difieren en que vías se utilizan en cada caso. Esto no estaría de acuerdo con el criterio de la minimización de los ajustes metabólicos que sugiere como criterio que el sistema se ajusta de forma que la diferencia entre los flujos correspondientes sea mínima (Segrè et al. 2002).

Utilizando las velocidades específicas calculadas para cada punto de los cultivos en lote alimentado, tanto de la cepa salvaje como del mutante *Z69ΔfabG*, se realizó FBA restringido. En el caso de la cepa salvaje, los resultados predichos de biomasa o PHB son menores a los hallados experimentalmente. Si se permite que la red metabólica utilice la ruta oxo-reductiva, quitando la restricción de flujo 0 por XOLDH, los valores obtenidos son mayores a los experimentales, pero el flujo de xilosa se distribuiría principalmente por la ruta oxo-reductiva y eso no es lo que parece ocurrir en la práctica, donde no se ha detectado actividad xilitol deshidrogenasa en extractos celulares de la cepa salvaje crecida con xilosa, indicando que el flujo catalítico de la xilosa no se distribuiría por esa ruta. Cabe mencionar que las medidas de actividad enzimáticas de este trabajo se realizaron en extractos celulares provenientes de cultivos que se encontraban en el final de su fase exponencial en cultivos en lote. Para corroborar con certeza cuál/es rutas están activas bajo cada condición metabólica, sería importante determinar, en cada momento del cultivo en lote alimentado y/o en cada estado *pseudo*-estacionario del cultivo en lote de la cepa salvaje, cómo varían las actividades de las enzimas xilitol deshidrogenasa y xilosa reductasa de la ruta oxo-reductiva y la xilosa deshidrogenasa de la ruta de Weimberg.

Finalmente, al igual que las soluciones halladas con los datos de los estados *pseudo*-estacionarios del cultivo en lote de la cepa salvaje, se puede decir que la red metabólica propuesta no reproduce exactamente la realidad y que es necesario rever las reacciones involucradas y/o las restricciones impuestas. Dado que la red metabólica explicaría mejor la realidad del mutante *Z69ΔfabG*, se podría comenzar revisando la porción de la red metabólica involucrada cuando se cataboliza la xilosa por la ruta de Weimberg (reacciones de la ruta de Weimberg, enzima málica, fosfoenolpiruvato carboquinasa, gluconeogénesis), ya que la misma es la que no se logró ajustar a los datos experimentales.

Para poder tener un panorama más amplio del metabolismo sería interesante contar una red metabólica reconstituida a escala genómica, en donde se predicen todas las reacciones involucradas en el metabolismo a partir de datos genómicos (Thiele & Palsson 2010). Para ello, se necesitaría contar con el genoma secuenciado de la cepa Z69 de *H. seropedicae*, ya que hasta ahora todos los datos se obtuvieron del genoma de la cepa SmR1.

A su vez, es necesario revisar la cantidad de ATP que se destina al mantenimiento celular (ATPM), ya que no todas las células necesitan la misma cantidad. Por ejemplo, se ha observado que *R. eutropha* H16, clásico organismo productor de PHB, necesita solamente $3 \text{ mmoles}_{\text{ATP}} \cdot \text{g}_{\text{Xr}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Park et al. 2011), mientras que el modelo utilizado en este trabajo, basado en el modelo de *E. coli* necesita $8,39 \text{ mmoles}_{\text{ATP}} \cdot \text{g}_{\text{Xr}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Thiele & Palsson 2010). Utilizando la red metabólica propuesta, y las restricciones experimentales encontradas en este trabajo, se observó el efecto de bajar el límite inferior de la reacción de ATPM, lo que causó un leve aumento en la tasa de

crecimiento o en la producción de PHB, pero no fue posible llegar a los valores determinados experimentales, por lo que se decidió no modificar ese parámetro. Para calcular este valor es necesario realizar ensayos en cultivo continuo o quimiostato, y luego graficar el consumo de ATP en función de la velocidad de dilución (que es igual a la velocidad de crecimiento). La pendiente de esta recta indica el GAM, la cantidad de ATP que se utiliza para la formación de biomasa, mientras que la intersección con el eje de las ordenadas indica el NGAM, la cantidad de ATP que se utiliza para mantenimiento, es decir todo el ATP que no va directamente a la biomasa (Thiele & Palsson 2010), pero que se necesita para mantener los gradientes a través de la membrana, el movimiento flagelar, etc.

Finalmente, sería de gran relevancia corroborar las rutas expresadas en *H. seropedicae* durante el catabolismo de xilosa, ya que cabe la posibilidad de que no se hayan tenido en cuenta todas las reacciones involucradas en el proceso. Para ello se podrían realizar experimentos con ^{13}C -xilosa y observar la distribución de la marca ^{13}C en los aminoácidos proteínogénicos presentes en la biomasa, así si se utiliza $[1-^{13}\text{C}]$ xilosa y la misma se cataboliza solamente por la ruta de Weimberg, se esperaría que los únicos aminoácidos marcados sean prolina y glutamina, que son los provenientes del α -cetoglutarato, ya que éste luego se descarboxila en la siguiente reacción del ciclo de Krebs perdiendo la marca. Si la xilosa se catabolizara por otras rutas se tendría una marcación isotópica diferente en los aminoácidos dependiendo de la ruta empleada. Esta técnica, además de ser útil para identificar rutas metabólicas, permite estimar flujos intracelulares (Köhler et al. 2015).

6.2.3 Elección de la función objetivo

El enfoque matemático utilizado en el análisis de balance de flujos utiliza un criterio de optimización para seleccionar la distribución de flujos de un espacio de soluciones posibles delimitado por las reacciones metabólicas con algunas restricciones, asumiendo que el metabolismo celular se encuentra en estado estacionario. De este modo, la solución hallada depende de la función objetivo utilizada y por eso es muy importante elegir la función objetivo que mejor represente el metabolismo celular que se quiere estudiar (Orth et al. 2010). Según los casos presentados en este trabajo, las funciones objetivo que mejor representarían el metabolismo celular serían la maximización del crecimiento celular o la maximización de la producción de PHB. Es lógico pensar que en fase exponencial, un cultivo maximiza su crecimiento, ya que está creciendo a la máxima velocidad posible con todos los nutrientes disponibles. En fase estacionaria, en donde no hay crecimiento y sólo se observa la acumulación de PHB, la mejor función objetivo podría ser maximizar la síntesis de PHB.

Sin embargo, en este trabajo se observó que la producción de PHB está parcialmente ligada al crecimiento y éste comportamiento no se logra reproducir con FBA y la red propuesta, en donde la célula sólo crece o produce PHB, pero no las dos cosas al mismo tiempo (a menos que se usen las restricciones que se impusieron en todos los casos anteriores). Por eso sería necesario revisar el modelo y la forma de asociar la producción de PHB al crecimiento, al menos bajo determinadas condiciones experimentales. Una forma de asociar el crecimiento y la producción de PHB sería empleando una función objetivo que sea una combinación lineal del flujo a través de la ecuación de biomasa y el flujo a través de la reacción de síntesis de PHB, de modo que cuando se realiza FBA se maximice el crecimiento y la producción de PHB. Con

los datos obtenidos en este trabajo se realizó esta aproximación, incluso utilizando diferentes coeficientes, pero, en ninguno de los casos se logró reproducir exactamente los resultados experimentales (datos no mostrados).

Además, hay que destacar que este tipo de modelos sólo tienen en cuenta la estequiometría y no la regulación (Orth et al. 2010), y que el incremento de la acumulación de PHB probablemente esté mediada por un complejo sistema regulatorio (Kadowaki et al. 2011) que no se tiene en cuenta en este tipo de modelado.

6.2.4 Predicción de mutaciones

Utilizando la red metabólica propuesta, con las dos rutas catabólicas para xilosa, se realizó FBA maximizando la producción de biomasa o la síntesis de PHB. Se simuló el efecto de la eliminación de cada una de las reacciones de la red metabólica anulando el flujo a través de cada una de ellas. Como era de esperar, en ninguno de los casos se logró predecir un aumento de la velocidad de crecimiento o la síntesis de PHB.

Maximizando la síntesis de PHB, se lograría una velocidad máxima de $9,1667 \text{ mmol.g}_{x_r}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ y el flujo catabólico de xilosa se distribuiría principalmente por la ruta oxo-reductiva. Si se impone flujo 0 a través de XOLDH, lo que equivale a mutar la ruta oxo-reductiva se obtiene una velocidad de síntesis de PHB de $5,500 \text{ mmol.g}_{x_r}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, catalizando la xilosa exclusivamente por la ruta de Weimberg. Estos resultados indicarían que la ruta oxo-reductiva sería más eficiente en transformar la xilosa en PHB. Algo similar ocurre al maximizar el crecimiento, en donde se obtiene una tasa de crecimiento máximo de $0,7184 \text{ h}^{-1}$ si se emplea la ruta oxo-reductiva y un crecimiento de $0,6923 \text{ h}^{-1}$ si se emplea la ruta de Weimberg. Esto se debe a que cuando se cataboliza la xilosa por la ruta oxo-reductiva, y luego a través de la ruta de las pentosas fosfato, se obtiene más NADPH y compuestos generadores de biomasa que si emplea la ruta de Weimberg. Cabe recordar que el NADPH es esencial para la producción de PHB y para la síntesis de biomasa.

6.3 Análisis de parámetros de cultivo y de la síntesis de PHB en cepas Z69 y Z69 Δ fabG cultivadas en presencia de xilosa como única fuente de carbono.

6.3.1 Cultivos en lote en Erlenmeyer

Se realizaron cultivos en lote de la cepa salvaje y del mutante Z69 Δ fabG en matraces Erlenmeyer conteniendo medio LGI con 30g/l de xilosa inicial. Al igual que lo observado en las curvas de crecimiento en placa de microtitulación, la velocidad de crecimiento máxima de la cepa salvaje fue casi el doble que la del mutante Z69 Δ fabG. A pesar de esto, Z69 Δ fabG fue capaz de alcanzar un valor de biomasa más alto y acumular un porcentaje mayor de PHB que la cepa salvaje en las mismas condiciones, lo que podría estar indicando que el metabolismo llevado a cabo por éste (posiblemente a través de la ruta oxo-reductiva), sería más eficiente que el metabolismo llevado a cabo por la cepa salvaje a través de la ruta de Weimberg. Estos

resultados se confirmaron con los cultivos en biorreactor, en donde la cepa mutante produjo más biomasa y alcanzó un porcentaje de PHB mayor que la cepa salvaje en las mismas condiciones. Los análisis de balance de flujo muestran que la ruta oxo-reductiva sería más eficiente que la ruta de Weimberg y que a partir del mismo consumo de xilosa se puede lograr una mayor producción de PHB o de biomasa.

6.3.2 Cultivo en lote de la cepa salvaje de *H. seropedicae* Z69 en fermentador

En la Figura 27 se muestra el perfil de crecimiento y acumulación de PHB, así como el consumo de xilosa y amonio de un cultivo en lote en biorreactor de la cepa salvaje. Se puede observar que el cultivo comienza con una fase *lag* durante las primeras 4 horas. Esta fase *lag* se trata de evitar en los ensayos de producción de PHB ya que baja la productividad del mismo. Para ello, se crece el inóculo en medio mínimo con la fuente de carbono a ensayar, para que cuando las células sean introducidas en el fermentador ya estén adaptadas a las condiciones de cultivo. Así, al crecer el inóculo en medio LGI con 10g/l de xilosa se logró disminuir la fase *lag* a 4 horas con respecto a las 8-10 horas observadas en los ensayos en placas de microtitulación de 96 pocillos, en donde se inoculó con células crecidas en medio rico TY.

Además, con esa relación C/N, en donde el nutriente limitante es la fuente de carbono, se prevé una acumulación de PHB mínima, permitiendo comenzar el cultivo en el biorreactor con una cantidad de PHB baja para poder estudiar su acumulación.

Luego de las 4 a 10 horas el cultivo entró en fase exponencial, en donde la velocidad de crecimiento del cultivo es máxima y se consumen los sustratos a la máxima velocidad. Para el caso de la cepa salvaje cultivada con xilosa, la velocidad máxima de crecimiento fue de $0,65 \text{ h}^{-1}$, la máxima velocidad específica de consumo de xilosa fue de $11 \text{ mmol.g}_{\text{Xr}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ y la velocidad máxima de consumo de amonio fue de $5,7 \text{ mmol.g}_{\text{Xr}}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Dentro de esta fase exponencial pueden distinguirse dos etapas, diferenciadas por la velocidad de acumulación de PHB. De las 4 a las 7 horas de cultivo el PHB se acumuló lentamente, con una velocidad de $0,87 \text{ mmol.g}_{\text{Xr}}^{-1}.\text{h}^{-1}$, mientras que de las 7 a las 9 horas, la síntesis de PHB se tornó más rápida, con una velocidad específica de $2,3 \text{ mmol.g}_{\text{Xr}}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Esto estaría indicando que la síntesis de PHB está sujeta a algún tipo de regulación, ya que aparentemente no se afectó ningún parámetro y hacia el final de la fase de crecimiento exponencial aumentó la síntesis de PHB. Se ha observado que la expresión del gen *phbF* en *H. seropedicae* aumenta bruscamente en la fase exponencial de crecimiento, inhibiendo la expresión de los genes que codifican para las enzimas involucradas en la síntesis de PHB, las fascinas y otras proteínas del gránulo de PHB. Sin embargo, PhbF se puede unir fuertemente al PHB que se encuentra en los gránulos dejando de reprimir los genes en cuestión. Así, a medida que aumenta la cantidad de oligómeros de PHB, la proteína PhbF es secuestrada, permitiendo el inicio de la transcripción de los genes que antes estaban reprimidos (Kadowaki et al. 2011). De este modo, parece que hay una cantidad de PHB intracelular crítica para que se desbloquee la inhibición de los genes involucrados en el proceso y se dispare la acumulación del mismo. Esto puede ser lo que sucede hacia el final de la fase exponencial, en donde aumenta la velocidad de síntesis de PHB, sin cambio en las velocidades específicas de los flujos medidos.

En otras bacterias, la síntesis de PHB está inducida por un aumento de acetil-CoA con respecto al CoA libre y/o por la relación NAD(P)H/NAD(P) (Kessler & Witholt 2001), mientras que en *H.*

seropedicae no se ha estudiado como afectan las cantidades y relaciones entre estos metabolitos a la producción de PHB ni al metabolismo celular en general.

En la fase exponencial, el contenido intracelular de PHB (%) disminuyó. Esto es debido a que la velocidad de crecimiento es mayor a la velocidad de producción de PHB. Sin embargo, la cantidad neta de PHB no está disminuyendo, sólo se está produciendo a una tasa menor que la de crecimiento.

A las 10 horas el amonio dejó de ser detectable en el medio, ingresando el cultivo en fase estacionaria con detenimiento del crecimiento celular. A partir de este momento el contenido intracelular de PHB comenzó a aumentar, llegando a un máximo del 20%, siendo producido a una velocidad específica de $0,12 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{Xr}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Esta velocidad parece muy pequeña si la comparamos con la velocidad de acumulación de PHB del final de la fase exponencial, pero como el crecimiento celular está detenido, con esta velocidad tan baja alcanza para aumentar el contenido de PHB dentro de cada célula.

Luego de coleccionar la muestra a las 21 horas de incubación, al cultivo se le adicionó xilosa hasta llegar a una concentración igual a la inicial, aproximadamente 30g/l de xilosa. Esto se hizo con el fin, aunque sin éxito, de fomentar la acumulación de PHB bajo condiciones de exceso de fuente carbonada y limitación de amonio. En esta etapa del cultivo *H. seropedicae* no produjo biomasa ni PHB. Esto puede deberse a la falta de amonio en el medio, el cual es necesario para el crecimiento y parecería ser necesario para alcanzar una máxima velocidad de acumulación de PHB, la cual se da al final de la fase exponencial donde aún hay amonio remanente en el medio de cultivo. Este efecto observado hacia el final del cultivo, luego de las 21 horas, en donde se da un consumo de xilosa de $1,5 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{Xr}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, sin la producción de biomasa ni de PHB, podría deberse al mantenimiento celular, es decir, a la cantidad de energía que se está consumiendo solamente para mantener en funcionamiento la célula.

Con estas observaciones se podría decir que la acumulación de PHB en *H. seropedicae* está parcialmente asociada al crecimiento, siendo máxima cuando aún hay amonio remanente en el medio de cultivo. En todos los casos se supone que el resto de los nutrientes adicionados en el medio de cultivo se encuentran en exceso durante todo el ensayo, no siendo limitantes ni afectando la producción de PHB.

Finalmente, en este cultivo se logró un máximo de acumulación de PHB del 22%, lo cual es muy bajo en comparación con cultivos realizados en matraces Erlenmeyer anteriormente, en donde se logró una acumulación de PHB del 44-50% (ver Figura 26)(Malan 2011).

6.3.3 Cultivo en lote de la cepa mutante Z69 Δ fabG en fermentador

Se realizó un cultivo en lote del mutante Z69 Δ fabG en biorreactor. Se cuantificó, a diferentes tiempos, la biomasa y el PHB producido, así como la concentración remanente en el medio de cultivo de xilosa y amonio. Tal como se muestra en la Figura 28 el cultivo comenzó con una fase *lag* de aproximadamente 4 horas, igual a lo ocurrido con la cepa salvaje. Luego, el cultivo presentó dos fases de crecimiento exponencial, una entre las 4 y 10 horas caracterizada por una velocidad de crecimiento específica de $0,41 \text{ h}^{-1}$, una velocidad de producción de PHB de $0,46 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{Xr}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ y un consumo de amonio de $4,9 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{Xr}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. En este caso no fue posible determinar la velocidad de consumo de xilosa debido a la dispersión de los datos. En una

segunda fase de crecimiento exponencial, entre las 11 y 15,5 horas, la velocidad de crecimiento fue menor a la anterior ($0,20h^{-1}$), la velocidad de producción de PHB fue considerablemente menor ($0,053 \text{ mmol.g}_{\text{Xr}}^{-1}.h^{-1}$), y el consumo de amonio también fue menor ($2,3 \text{ mmol.g}_{\text{Xr}}^{-1}.h^{-1}$). En este caso el consumo de xilosa fue de $4,8 \text{ mmol.g}_{\text{Xr}}^{-1}.h^{-1}$. Este cambio en la velocidad de crecimiento ya se había observado en los ensayos en placa de microtitulación realizados previamente, pero ahora queda demostrado que este cambio es real y no se debe a un artefacto debido a la metodología de placa de microtitulación, en donde el cultivo se incubaba sin agitación y al final del mismo las células se encuentran precipitadas, alterando la medida de densidad óptica. Este cambio de velocidad de crecimiento, que no se observa en la cepa salvaje, podría reflejar un cambio en el metabolismo celular, que aparentemente no tendría que ver con la cantidad de xilosa presente en el medio de cultivo, ya que al comienzo de la segunda etapa de crecimiento aún quedaban 30g/l de xilosa remanente. Además, este comportamiento también se observó en los ensayos de crecimiento realizados en placa de microtitulación con 10 g/l de xilosa inicial.

Cabe mencionar que todas las medidas de actividad enzimática descritas previamente se realizaron a partir de extractos celulares de cultivos hacia el fin de su fase exponencial o principio de la fase estacionaria, entonces las conclusiones sobre las rutas metabólicas expresadas en la cepa mutante son válidas para esta segunda fase de crecimiento exponencial, no pudiendo afirmar nada de lo que ocurriría en esa primera fase de crecimiento rápido. Sería muy interesante medir actividades xilosa deshidrogenasa y xilitol deshidrogenasa a diferentes tiempos de cultivo, para así tener datos de qué ocurre en esa primera fase de crecimiento exponencial.

En este cultivo en lote, a las 17 horas, la concentración de amonio dejó de ser detectable en el medio, lo que coincide con el comienzo de la fase de crecimiento estacionario, en donde no hay un aumento de biomasa residual. En esta etapa, de las 18,5 horas hasta las 27,5 horas, la velocidad de acumulación de PHB fue de $0,50 \text{ mmol.g}_{\text{Xr}}^{-1}.h^{-1}$, siendo la máxima velocidad de producción de PHB registrada en este cultivo. Así, se llegó a un porcentaje máximo de acumulación de PHB de 49% a las 38 horas (a las 27,5 había un 42% de acumulación de PHB). Si se tienen en cuenta esos datos, parecería nuevamente que la producción de PHB está parcialmente ligada al crecimiento, aunque en este caso, también se da una importante producción de PHB sin el aumento de la biomasa residual.

A las 30 horas de comenzado el cultivo, se le adicionó un pulso de xilosa, hasta llegar a una concentración de xilosa similar a la inicial de 30 g/l . La idea era promover la síntesis de PHB bajo un exceso de fuente carbonada, sin el consumo de amonio. En este caso el contenido intracelular se logró aumentar de un 42% a un 49%, pero luego el contenido intracelular de PHB comenzó a disminuir, pese al exceso de fuente carbonada. Hacia el final del cultivo, donde no había más producción de biomasa ni de PHB, se continuó registrando un consumo de xilosa de $1,2 \text{ mmol.g}_{\text{Xr}}^{-1}.h^{-1}$, la que quizás se haya utilizado para el mantenimiento celular.

6.3.4 Cultivos en lote alimentado

Se realizaron cultivos en lote alimentado en biorreactor, tanto de la cepa salvaje de *H. seropedicae* Z69 como el mutante Z69 Δ fabG.

Ambos cultivos exhibieron, nuevamente, una fase *lag* de 4-5 horas. Luego, se comenzó la alimentación con una solución de xilosa y amonio a un flujo de 0,21ml/min. En el caso de la cepa salvaje, cuando se comenzó la alimentación, el cultivo ya estaba limitado en amonio, por lo que enseguida comenzó con el comportamiento característico de un cultivo en lote alimentado. Debido a que la cepa mutante presenta un crecimiento y un consumo de nutrientes más lento que la cepa salvaje, cuando se comenzó con la alimentación, la concentración de amonio remanente en el medio de cultivo no era limitante, por lo que el cultivo se comportó, a pesar de estar alimentado, como un cultivo en lote. Así, desde las 5 a las 9 horas, el mutante Z69 Δ fabG creció en forma exponencial sin, presuntivamente, la limitación de nutrientes, con una velocidad específica de crecimiento de $0,42\text{h}^{-1}$ y un consumo de amonio de $4,3\text{mmol}\cdot\text{g}_{\text{Xr}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Estos datos son prácticamente iguales a los hallados en la primera fase de crecimiento exponencial del cultivo en lote realizado anteriormente. Además, en este caso tampoco fue posible calcular la velocidad específica de consumo de xilosa debido a la dispersión de los datos; esto podría estar indicando errores en la medición de la xilosa o que aún no se ha alcanzado el estado *pseudo*-estacionario.

A diferencia de lo observado en el cultivo anterior, la velocidad de síntesis de PHB en este caso fue mucho menor, siendo $0,097\text{mmol}\cdot\text{g}_{\text{Xr}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Luego de que la concentración de amonio dejara de ser detectable en el medio de cultivo, aproximadamente a las 11 horas, este cultivo comenzó a crecer con las características de un cultivo en lote alimentado de forma continua.

Tanto la cepa salvaje como el mutante Z69 Δ fabG crecieron de forma controlada por la limitación de amonio y con un exceso de fuente de carbono, lo que promovió un aumento del PHB intracelular llegando a un contenido del 53% en la cepa salvaje y un 55% en el mutante. En ambos casos, la velocidad volumétrica con la que la xilosa ingresó al biorreactor fue mayor a la velocidad de consumo por las células, lo que ocasionó una acumulación de la misma en el medio de cultivo llegando a aproximadamente 30g/l a las 30 horas. Por este motivo se cortó la alimentación y se dejó que el cultivo continuara en lote, para fomentar el consumo de xilosa y la acumulación de PHB. Así, se llegó a un máximo de acumulación de PHB de 58% en la cepa salvaje y 64% en el mutante Z69 Δ fabG, cuando aún quedaban 20g/l de xilosa remanente en el medio. No fue posible prolongar el cultivo, ya que, en ambos casos, en el punto final, a las 48 horas, la concentración y el contenido de PHB ya habían comenzado a disminuir, posiblemente indicando que el cultivo estaba entrando en la fase de muerte y que la xilosa remanente no iba a ser consumida.

Pese a las diferencias observadas en el contenido intracelular de PHB entre ambas cepas, la productividad global de PHB en ambos casos fue similar. En el caso del mutante Z69 Δ fabG, la productividad de PHB determinada en el cultivo en lote alimentado fue similar a la encontrada en el cultivo en lote, mientras que la de la cepa salvaje fue casi el doble de la productividad determinada en el cultivo en lote, indicando una vez más que el cultivo en lote realizado con la cepa salvaje no se comportó como en ensayos anteriores (Malan 2011).

Con los resultados a la vista, la estrategia de cultivo en lote alimentado parece mejor para la producción de PHB que el cultivo en lote, ya que se logró una mayor acumulación de PHB

intracelular y productividad en el caso de la cepa salvaje. Sin embargo, se debe calcular nuevamente la velocidad de alimentación de xilosa, de modo que ésta no se acumule en el medio, o si se acumula, que luego sea consumida totalmente para producir PHB; ya que si se piensa en producción industrial, no es rentable desperdiciar esa cantidad de fuente de carbono.

En comparación con datos obtenidos en una planta piloto en Brasil en funcionamiento actualmente, en dónde se produce PHB a partir de sacarosa con una productividad de $1,44 \text{ g}_{\text{PHB}} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ y una acumulación de PHB de 65-70% (Nonato et al. 2001), nuestros datos experimentales de productividad son casi diez veces menores. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en *H. seropedicae* Z69 las condiciones de producción de PHB están aún sin optimizar y que, además, esta cepa es capaz de crecer en glucosa, xilosa y arabinosa, por lo que podría ser posible producir PHB a partir de biomasa lignocelulósica hidrolizada permitiendo disminuir los costos de producción. Para ello es necesario llevar a cabo más estudios y desarrollo en la materia.

7. CONCLUSIONES

- La cepa salvaje de *H. seropedicae* Z69 emplearía la ruta de Weimberg para catabolizar la xilosa en las condiciones ensayadas.
- El gen *fabG* (*Hsero_4497*) codifica para una enzima con actividad xilosa deshidrogenasa en *H. seropedicae* Z69.
- La enzima codificada por el gen *fabG* no estaría mayormente involucrada en la oxidación de la arabinosa, habiendo otras enzimas endógenas capaces de llevar a cabo este proceso. Esta enzima, además, sería capaz de utilizar glucosa como sustrato, pero la misma no sería esencial para el crecimiento de *H. seropedicae* Z69 en glucosa.
- El mutante *Z69ΔfabG* es capaz de crecer en xilosa empleando la ruta oxo-reductiva. Esta ruta se comenzaría a expresar cuando la ruta de Weimberg no es activa o se encuentra disminuída.
- El gen *Hsero_1671* no estaría involucrado en el catabolismo de xilosa o glucosa en *H. seropedicae* Z69 en las condiciones ensayadas.
- El gen *Hsero_4498*, candidato a codificar para la xilonato deshidratasa, no estaría involucrado en el catabolismo de xilosa o habría otras enzimas que estarían supliendo esa función.
- El gen *ilvD*, candidato a codificar la xilonato deshidratasa, podría estar involucrado en el catabolismo de xilosa en *H. seropedicae*Z69, pero es necesario realizar más estudios.
- El gen *Hsero_3396* no codificaría para la enzima xilitol deshidrogenasa o habría otras enzimas que estarían supliendo esta función en las condiciones ensayadas.
- Utilizando la red metabólica propuesta en este trabajo, y realizando FBA con las restricciones experimentales no se pudo reproducir exactamente el crecimiento o la producción de PHB encontradas experimentalmente en la cepa salvaje, indicando que faltarían considerar reacciones en esta red, que hay limitaciones mal impuestas y/o que la ecuación de biomasa no es la adecuada.
- El mutante *Z69ΔfabG*, que emplearía principalmente la ruta oxo-reductiva para catabolizar la xilosa, sería más eficiente que la cepa salvaje para transformar la xilosa en biomasa y PHB, de acuerdo a lo observado experimentalmente y a las soluciones calculadas con FBA.
- Con esta red metabólica y de acuerdo a los datos encontrados con FBA, no se prevé que la eliminación de una sola reacción (mutantes en una enzima) aumente el crecimiento o la producción de PHB.

8. PERSPECTIVAS

- Secuenciar el genoma de *H. seropedicae* Z69, ensamblarlo, anotararlo y reconstituir la red metabólica a escala genómica.
- Identificar todos los genes implicados en la ruta de Weimberg en *H. seropedicae*.
- Identificar los genes que codifican para la enzima xilitol deshidrogenasa y xilosa reductasa de la ruta oxo-reductiva en *H. seropedicae*
- Validar la red metabólica reconstituida a escala genómica con los datos experimentales, utilizando xilosa como única fuente carbonada.
- Verificar *in vivo* las rutas propuestas para el catabolismo de xilosa y determinar las distribuciones de flujos entre ambas rutas utilizando xilosa marcada isotópicamente estable.
- Emplear FBA como una de las herramientas útiles para estudiar las condiciones óptimas de síntesis de PHB (condiciones de cultivo, mutantes simples y dobles).
- Determinar si *H. seropedicae* excreta glutamato al crecer en presencia de xilosa en las condiciones de cultivo ensayadas.
- Determinar la actividad xilosa reductasa y xilonato dehidratasa en la cepa salvaje y en los mutantes en las condiciones ensayadas.
- Estudiar la regulación que dirige la expresión de las diferentes enzimas encargadas del catabolismo de xilosa, por una u otra ruta.
- Determinar si existe represión catabólica en *H. seropedicae* al crecer en presencia de glucosa y xilosa como fuentes de carbono.
- Estudiar la capacidad de crecer y acumular PHB en *H. seropedicae* a partir de hidrolizados de biomasa lignocelulolítica.

9. REFERENCIAS

- Ausubel, F.M. et al., 1992. *Short Protocols in Molecular Biology* Second Edi., United States of America: Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc.
- Aziz, R.K. et al., 2008. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC genomics*, 9(1), p.75. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/9/75> [Accessed July 9, 2014].
- Babaei, P., Ghasemi-Kahrizsangi, T. & Marashi, S.-A., 2014. Modeling the Differences in Biochemical Capabilities of Pseudomonas Species by Flux Balance Analysis: How Good Are Genome-Scale Metabolic Networks at Predicting the Differences? *The Scientific World Journal*, 2014. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3953581&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Baldani, J.I. et al., 1986. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a Root- Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 36, pp.86–93.
- Baldani, J.I. et al., 1997. Recent advances en BFN with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 29, pp.911– 922.
- Bazzani, S., 2014. Promise and Reality in the Expanding Field of Network interaction Analysis: Metabolic Networks. *Bioinformatics and Biology Insights*, 8, pp.83–91.
- Beringer, J., 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology*, 84, pp.188– 198.
- Bertani, G., 1951. Studies on lysogenesis.I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62, pp.293–300.
- Bonete, M.J. et al., 1996. Glucose dehydrogenase from the halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei*: Enzyme purification, characterisation and N-terminal sequence. *FEBS Letters*, 383, pp.227–229.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), pp.248–254.
- Buchert, J. & Viikari, L., 1988. Oxidative D-xylose metabolism of *Gluconobacter oxydans*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 29, pp.375–379.
- Bugnicourt, E. et al., 2014. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters*, 8(11),

- pp.791–808. Available at: <http://www.expresspolymlett.com/letolt.php?file=EPL-0005219&mi=c> [Accessed October 3, 2014].
- Castilho, L.R., Mitchell, D.A. & Freire, D.M.G., 2009. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 100(23), pp.5996–6009. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.088>.
- Catalán, A.I. et al., 2007. Production of polyhydroxyalkanoates by *Herbaspirillum seropedicae* grown with different sole carbon sources and on lactose when engineered to express the *lacZlacY* genes. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, pp.1352–1357.
- Cavalcante, V.A. & Döbereiner, J., 1988. A new acid-tolerant nitrogen fixing bacteria associated with sugarcane. *Plant Soil*, 108, pp.451–456.
- Cesário, M.T. et al., 2014. Enhanced bioproduction of poly-3-hydroxybutyrate from wheat straw lignocellulosic hydrolysates. *New biotechnology*, 31(1), pp.104–113. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24157713> [Accessed October 20, 2014].
- Cherubini, F., 2010. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, 51(7), pp.1412–1421. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196890410000373> [Accessed July 9, 2014].
- Choon, Y.W. et al., 2014. Differential Bees Flux Balance Analysis with OptKnock for in silico microbial strains optimization. *PloS one*, 9(7), p.e102744. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4105462&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 29, 2014].
- Copeland, W.B. et al., 2012. Computational tools for metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, 14(3), pp.270–280. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096717612000250> [Accessed May 26, 2014].
- Dahms, A.S., 1974. 3-Deoxy-D-pentulosonic acid aldolase and its role in a new pathway of D-xylose degradation. *Biochemical and biophysical research communications*, 60(4), pp.1433–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4423285> [Accessed October 12, 2014].
- Dishisha, T. et al., 2014. Flux analysis of the *Lactobacillus reuteri* propanediol-utilization pathway for production of 3-hydroxypropionaldehyde, 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol. *Microbial cell factories*, 13(1), p.76. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4045878&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 12, 2014].

- Ditta, G. et al., 1980. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(12), pp.7347–7351.
- Dumon, C. et al., 2012. Progress and future prospects for pentose-specific biocatalysts in biorefining. *Process Biochemistry*, 47(3), pp.346–357. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511311002194> [Accessed October 12, 2014].
- Edwards, J.S. & Palsson, B.O., 2000. Robustness analysis of the *Escherichia coli* metabolic network. *Biotechnology progress*, 16(6), pp.927–939. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11101318> [Accessed October 22, 2014].
- El-Hadi, A. et al., 2002. Correlation between degree of crystallinity, morphology, glass temperature, mechanical properties and biodegradation of poly (3-hydroxyalkanoate) PHAs and their blends. *Polymer Testing*, 21(6), pp.665–674. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142941801001428> [Accessed March 11, 2015].
- FitzPatrick, M. et al., 2010. A biorefinery processing perspective: treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresource technology*, 101(23), pp.8915–8922. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20667714> [Accessed July 10, 2014].
- Fuhrer, T. & Sauer, U., 2009. Different biochemical mechanisms ensure network-wide balancing of reducing equivalents in microbial metabolism. *Journal of bacteriology*, 191(7), pp.2112–2121. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2655529&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 12, 2014].
- Gómez, J. et al., 1996. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. *Applied microbiology and Biotechnology*, 45, pp.785–791.
- Gonzalez, O. et al., 2010. Characterization of growth and metabolism of the haloalkaliphile *Natronomonas pharaonis*. *PLoS computational biology*, 6(6), p.e1000799. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2881530&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 21, 2014].
- Görke, B. & Stülke, J., 2008. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature reviews. Microbiology*, 6(8), pp.613–624. Available at: <http://www.nature.com.proxy.timbo.org.uy:443/nrmicro/journal/v6/n8/full/nrmicro1932.html> [Accessed July 10, 2014].

- Jeffries, T.W., 2006. Engineering yeasts for xylose metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(3), pp.320–326. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16713243>.
- Jiang, Y. et al., 2008. High poly(β -hydroxybutyrate) production by *Pseudomonas fluorescens* A2a5 from inexpensive substrates. *Enzyme and microbial technology*, 42(2), pp.167–172. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022907003079> [Accessed October 20, 2014].
- Jin, Y.-S. & Jeffries, T.W., 2004. Stoichiometric network constraints on xylose metabolism by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic engineering*, 6(3), pp.229–238. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15256213> [Accessed August 30, 2010].
- Johnsen, U. et al., 2009. D-Xylose Degradation Pathway in the Halophilic Archaeon *Haloferax volcanii*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(40), pp.27290– 27303.
- Johnsen, U. & Schönheit, P., 2004. Novel Xylose Dehydrogenase in the Halophilic Archaeon *Haloarcula marismortui*. *Journal of Applied Microbiology*, 186(18), pp.6198–6207.
- Kadowaki, M.A.S. et al., 2011. Identification and characterization of PhbF: a DNA binding protein with regulatory role in the PHB metabolism of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. *BMC microbiology*, 11(1), p.230. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3206438&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 17, 2014].
- Kennedy, I.R., Choudhury, A.T.M.A. & Kecskés, M.L., 2004. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology and Biochemistry*, 36(8), pp.1229–1244. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071704001221> [Accessed August 30, 2010].
- Kessler, B. & Witholt, B., 2001. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *Journal of Biotechnology*, 86(2), pp.97–104. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165600004041>.
- Köhler, K.A.K. et al., 2015. D-Xylose assimilation via the Weimberg pathway by solvent-tolerant *Pseudomonas taiwanensis* VLB120. *Environmental microbiology*, 17(1), pp.156– 170. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24934825> [Accessed November 3, 2014].
- Koller, M. et al., 2010. Microbial PHA Production from Waste Raw Materials. In G. G.-Q. Chen, ed. *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 85–119.

- Kovach, M.E. et al., 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 166(1), pp.175–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8529885>.
- Latendresse, M., 2014. Efficiently gap-filling reaction networks. *BMC bioinformatics*, 15, p.225. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4094995&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Laycock, B. et al., 2014. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Progress in Polymer Science*, 39(2), pp.397–442. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670013000798> [Accessed May 22, 2014].
- Lee, G.N. & Na, J., 2013. Future of microbial polyesters. *Microbial cell factories*, 12(1), p.54. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3680211&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 14, 2014].
- Leong, Y.K. et al., 2014. Current trends in polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis: insights from the recombinant *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology*, 180, pp.52–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24698847> [Accessed July 10, 2014].
- Liguori, R., Amore, A. & Faraco, V., 2013. Waste valorization by biotechnological conversion into added value products. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(14), pp.6129–47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23749120> [Accessed October 12, 2014].
- Llaneras, F. & Picó, J., 2008. Stoichiometric modelling of cell metabolism. *Journal of bioscience and bioengineering*, 105(1), pp.1–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18295713> [Accessed May 26, 2014].
- Lopes, M. et al., 2009. Screening of bacteria to produce polyhydroxyalkanoates from xylose. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, pp.1751–1756.
- Lopes, M.S.G., Gomez, J.G.C. & Silva, L.F., 2009. Cloning and overexpression of the xylose isomerase gene from *Burkholderia sacchari* and production of polyhydroxybutyrate from xylose. *Canadian Journal of Microbiology*, 55, pp.1012–1015.
- Madison, L.L. & Huisman, G.W., 1999. Metabolic Engineering of Poly (3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), pp.21–53.
- Mahadevan, R. & Schilling, C.H., 2003. The effects of alternate optimal solutions in constraint-based genome-scale metabolic models. *Metabolic Engineering*, 5(4), pp.264–276. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096717603000582> [Accessed October 22, 2014].

- Malan, A., 2011. *Estudio de la producción de poli-3-hidroxi-butirato en Herbaspirillum seropedicae Z69 a partir de azúcares presentes en la hemicelulosa*. Licenciatura en Bioquímica. Universidad de la República. Available at: <http://www.bib.fcien.edu.uy/files/etd/pasan/uy24-15241>.
- Mathias, A.L. et al., 1989. L-arabinose metabolism in *Herbaspirillum seropedicae*. *Journal of Bacteriology*, 171(9), pp.5206–5209. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=210343&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Meijnen, J.-P., de Winde, J.H. & Ruijsenaars, H.J., 2009. Establishment of oxidative D-xylose metabolism in *Pseudomonas putida* S12. *Applied and environmental microbiology*, 75(9), pp.2784–2791. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2681702&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 12, 2014].
- Menon, V. & Rao, M., 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38(4), pp.522–550. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S036012851200007X> [Accessed July 12, 2014].
- Mihasan, M. et al., 2013. Evidence of a plasmid-encoded oxidative xylose-catabolic pathway in *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1. *Research in microbiology*, 164(1), pp.22–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23063486> [Accessed October 5, 2014].
- Mozumder, M.S.I. et al., 2014. A robust fed-batch feeding strategy independent of the carbon source for optimal polyhydroxybutyrate production. *Process Biochemistry*, 49(3), pp.365–373. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511313006880> [Accessed November 17, 2014].
- Muthukumarasamy, R. et al., 2006. N-fertilizer saving by the inoculation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* sp. in micropropagated sugarcane plants. *Microbiological research*, 161(3), pp.238–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16765840>.
- Nonato, R., Mantelatto, P. & Rossell, C., 2001. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, pp.1–5. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s002530100732> [Accessed October 20, 2014].
- O'Connor, S. et al., 2013. The anti-cancer activity of a cationic anti-microbial peptide derived from monomers of polyhydroxyalkanoate. *Biomaterials*, 34(11), pp.2710–2718. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23343631> [Accessed November 20, 2014].
- Ojumu, T.V., Yu, J. & Solomon, B.O., 2004. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology*, 3(1), pp.18–24.

- Orth, J.D., Thiele, I. & Palsson, B.Ø., 2010. What is flux balance analysis? *Nature biotechnology*, 28(3), pp.245–248. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3108565&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 9, 2014].
- Palsson, B.Ø., 2006. *Systems Biology: Properties of Reconstructed Networks*, Cambridge University Press. Available at: <http://books.google.com/books?id=Q-EvI9j0B7YC&pgis=1> [Accessed July 8, 2014].
- Pan, W. et al., 2012. Production of polyhydroxyalkanoates by Burkholderia cepacia ATCC 17759 using a detoxified sugar maple hemicellulosic hydrolysate. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 39(3), pp.459–469. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21953365> [Accessed October 20, 2014].
- Papin, J.A. et al., 2004. Comparison of network-based pathway analysis methods. *Trends in biotechnology*, 22(8), pp.400–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15283984> [Accessed May 11, 2014].
- Park, J.M., Kim, T.Y. & Lee, S.Y., 2011. Genome-scale reconstruction and in silico analysis of the Ralstonia eutropha H16 for polyhydroxyalkanoate synthesis, lithoautotrophic growth, and 2-methyl citric acid production. *BMC systems biology*, 5(1), p.101. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3154180&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 12, 2014].
- Pedrosa, F.O. et al., 2011. Genome of Herbaspirillum seropedicae Strain SmR1, a Specialized Diazotrophic Endophyte of Tropical Grasses P. M. Richardson, ed. *PLoS Genetics*, 7(5), p.e1002064. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1002064> [Accessed May 19, 2011].
- Resquin, F. et al., 2011. Biomasa: Fuente de Energía Renovable para la Matriz Energética del Uruguay. *Revista INIA*, 24, pp.41–46.
- Riis, V. & Mai, W., 1988. Gas chromatographic determination of poly-B-hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *Journal of Chromatography*, 455, pp.285–289.
- Rosconi, F. et al., 2006. Iron depletion affects nitrogenase activity and expression of nifH and nifA genes in Herbaspirillum seropedicae. *FEMS Microbiology Letters*, 258(2), pp.214–219. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16640576> [Accessed October 21, 2014].
- Saha, B.C., 2003. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology*, 30(5), pp.279–291.
- Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning A Laboratory Manual Second Edi.*, United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Schäfer, A. et al., 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, 145(1), pp.69–73. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378111994903247> [Accessed June 3, 2014].
- Schellenberger, J. et al., 2011. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nature protocols*, 6(9), pp.1290–1307. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2011.308> [Accessed July 15, 2014].
- Segrè, D., Vitkup, D. & Church, G.M., 2002. Analysis of optimality in natural and perturbed metabolic networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(23), pp.15112–7. Available at: <http://www.pnas.org/content/99/23/15112.short> [Accessed April 23, 2015].
- Silva, L. et al., 2004. Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 31, pp.245–254.
- Sindhu, R. et al., 2013. Pentose-rich hydrolysate from acid pretreated rice straw as a carbon source for the production of poly-3-hydroxybutyrate. *Biochemical Engineering Journal*, 78, pp.67–72. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X1200352X> [Accessed October 20, 2014].
- Snell, K.D. & Peoples, O.P., 2009. PHA bioplastic: A value-added coproduct for biomass biorefineries. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*, 3, pp.456–467.
- Soares-Ramos, J.R.L. et al., 2003. Comparative molecular analysis of *Herbaspirillum* strains by RAPD, RFLP, and 16S rDNA sequencing. *Genetics and Molecular Biology*, 26(4), pp.537–543. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572003000400019&lng=en&nrm=iso&tlng=en.
- Stephanopoulos, G.N., Aristidou, A.A. & Nielsen, J., 1998. *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies*, Orlando, Florida, USA: Academic Press. Available at: <http://books.google.com/books?id=9mGzks04NVQC&pgis=1> [Accessed July 8, 2014].
- Stephens, C. et al., 2007. Genetic analysis of a novel pathway for D-xylose metabolism in *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*, 189(5), pp.2181–2185. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1855722&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 5, 2010].
- Sukdeo, N. & Charles, T.C., 2003. Application of crossover-PCR-mediated deletion-insertion mutagenesis to analysis of the *bdhA-xdhA2-xdhB2* mixed-function operon of *Sinorhizobium meliloti*. *Archives of microbiology*, 179(4), pp.301–304. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12632261> [Accessed June 3, 2014].

- Tan, G.-Y.A. et al., 2014. Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. *Polymers*, 6(3), pp.706–754. Available at: <http://www.mdpi.com/2073-4360/6/3/706/> [Accessed September 30, 2014].
- Thiele, I. & Palsson, B.Ø., 2010. A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nature protocols*, 5(1), pp.93–121. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3125167&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 16, 2014].
- Toya, Y. & Shimizu, H., 2013. Flux analysis and metabolomics for systematic metabolic engineering of microorganisms. *Biotechnology advances*, 31(6), pp.818–826. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23680193> [Accessed April 28, 2014].
- Trinh, C.T., Wlaschin, A. & Sreenc, F., 2009. Elementary mode analysis: a useful metabolic pathway analysis tool for characterizing cellular metabolism. *Applied microbiology and biotechnology*, 81(5), pp.813–826. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2909134&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 25, 2014].
- Urtuvia, V. et al., 2014. Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. *International journal of biological macromolecules*, 70, pp.208–213. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24974981> [Accessed September 24, 2014].
- Varma, A. & Palsson, B.O., 1994. Metabolic Flux Balancing: Basic Concepts, Scientific and Practical Use. *Nature Biotechnology*, 12, pp.994–998.
- Verlinden, R.A.J. et al., 2007. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, 102(6), pp.1437–49. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17578408> [Accessed August 20, 2010].
- Wagh, J. et al., 2014. Heterologous expression of pyrroloquinoline quinone (pqq) gene cluster confers mineral phosphate solubilization ability to *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(11), pp.5117–29. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24682480> [Accessed November 4, 2014].
- Weimberg, R., 1961. Pentose oxidation by *Pseudomonas fragi*. *The Journal of biological chemistry*, 236, pp.629–635. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13783864> [Accessed October 12, 2014].
- Weiner, M. et al., 2014. Improvement of constraint-based flux estimation during L-phenylalanine production with *Escherichia coli* using targeted knock-out mutants. *Biotechnology and bioengineering*, 111(7), pp.1406–1416. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24449451> [Accessed October 19, 2014].

- Wu, X., Wang, X. & Lu, W., 2014. Genome-scale reconstruction of a metabolic network for *Gluconobacter oxydans* 621H. *BioSystems*, 117, pp.10–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24418346> [Accessed October 21, 2014].
- Yogesh, C., Pathak, B. & Fulekar, M.H., 2012. PHA - Production Application and its Bioremediation in Environment. *I Research Journal of Environment Sciences*, 1(2), pp.46–52.
- Yu, J. & Si, Y., 2004. Metabolic Carbon Fluxes and Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates in *Ralstonia eutropha* on Short Chain. *Biotechnology Progress*, 20, pp.1015–1024.
- Yu, J. & Stahl, H., 2008. Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. *Bioresource Technology*, 99(17), pp.8042–8048. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18474421> [Accessed October 20, 2014].
- Zhang, M. et al., 2013. Genetic analysis of D-xylose metabolism pathways in *Gluconobacter oxydans* 621H. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 40(3-4), pp.379–388. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23381123> [Accessed October 12, 2014].

10. Anexos

10.1 Medios de cultivo y soluciones utilizadas

- **TY (Tryptona- Extracto de Levadura)** (Beringer 1974)

Tryptona.....	5g
Extracto de Levadura.....	3g
CaCl ₂	0,05g
H ₂ O.....	c.s.p. 1 litro
Agar.....	18g (en caso de preparar medio sólido)

- **LGI**(Cavalcante & Döbereiner 1988)

NH ₄ Cl.....	2,14g
KH ₂ PO ₄ Anidro.....	11,9 g
K ₂ HPO ₄ Anidro.....	2,13 g
MgSO ₄	0,1 g
CaCl ₂	15 mg
FeCl ₂ .6H ₂ O.....	10 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O.....	2 mg
H ₂ O.....	c.s.p. 1 litro

Se ajustó el pH del medio a 7,0 con NaOH

La fuente de carbono se esterilizó por separado en autoclave (20 minutos a 121 °C) y se adicionó al medio a la concentración final indicada en cada caso.

- **LGI modificado**

(NH ₄) ₂ SO ₄	2,64g
KH ₂ PO ₄ Anidro.....	3 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	19 mg
FeCl ₂ .6H ₂ O.....	10 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O.....	2 mg
Solución de elementos traza.....	1ml
H ₂ O.....	c.s.p. 1 litro

Se ajustó el pH del medio a 7,0 con NaOH

La fuente de carbono se esterilizó por separado en autoclave (20 minutos a 121 °C) y se adicionó al medio a la concentración final indicada en cada caso.

La solución de elementos traza contiene (en g/l):

H ₃ BO ₃	0,30
CoCl ₂ .6H ₂ O.....	0,20
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	0,10
MnCl ₂ .4H ₂ O.....	0,03
NaMoO ₄ .2H ₂ O.....	0,03
NiCl ₂ .6H ₂ O.....	0,02
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0,01

- LB (Luria-Bertani) (diluído al ½)(Bertani 1951)

Triptona.....	5g
Extracto de levadura.....	3g
NaCl.....	5g
H ₂ O.....	c.s.p. 1 litro
Agar.....	18g (en caso de preparar medio sólido)

Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave (20 minutos a 121 °C)

- Solución de glicerol (Ausubel et al. 1992)

65%(v/v) glicerol
0,1M MgSO ₄
0,025M Tris.HCl, pH=8,0
Se esterilizó en autoclave (20 minutos a 121 °C).

10.2 Técnicas de Biología Molecular

10.2.1 Lisados celulares

Se prepararon lisados celulares de *H. seropedicae* para obtener el ADN molde que se utilizó en cada reacción de PCR. Para ello se resuspendieron dos o tres colonias crecidas 24 horas en placa de TY en 100 µl de agua milliQ autoclavada. Esta suspensión celular se incubó durante 15 minutos a 100 °C e inmediatamente se incubó a -20 °C por 20 minutos. Finalmente se centrifugó a 12.000 rpm por 5 minutos y el sobrenadante obtenido se utilizó como templado para la reacción de PCR.

10.2.2 Electroforesis en gel de agarosa

Se prepararon geles de agarosa 1%(p/v) en buffer TAE 1X para llevar a cabo los análisis de electroforesis que se desarrollaron en una cuba de electroforesis horizontal de la marca Sigma-Aldrich (EEUU). Se colocaron en cada carril diferentes volúmenes de muestras: 5µl en caso de reacciones de PCR, 3µl en caso de ADN plasmídico o 7µl en caso de restricciones (en los casos en lo que luego se deseaba aislar el fragmento de ADN se sembraron 40-50µl de muestra). La electroforesis se desarrollaron a 100v por 1 hora aproximadamente. El ADN se visualizó bajo luz UV, ya que se utilizaron como agentes intercalantes GelGreen (Biotium, México) incorporado en el gel a una concentración final de 0,67X o Good View (SBS, China) incorporado en el gel (1,8µl para 45ml de gel).

En todos los casos se corrió alguno de los marcadores de peso molecular mostrados en la Figura 37, en las cantidades recomendadas por el fabricante.

TAE 50X (*buffer de electroforesis Tris-acetato/EDTA*) (Sambrook et al. 1989)

Tris base.....242g

Ácido acético glacial.....57ml

EDTA 0,5M pH=8,0.....100ml

H2O.....c.s.p. 1litro

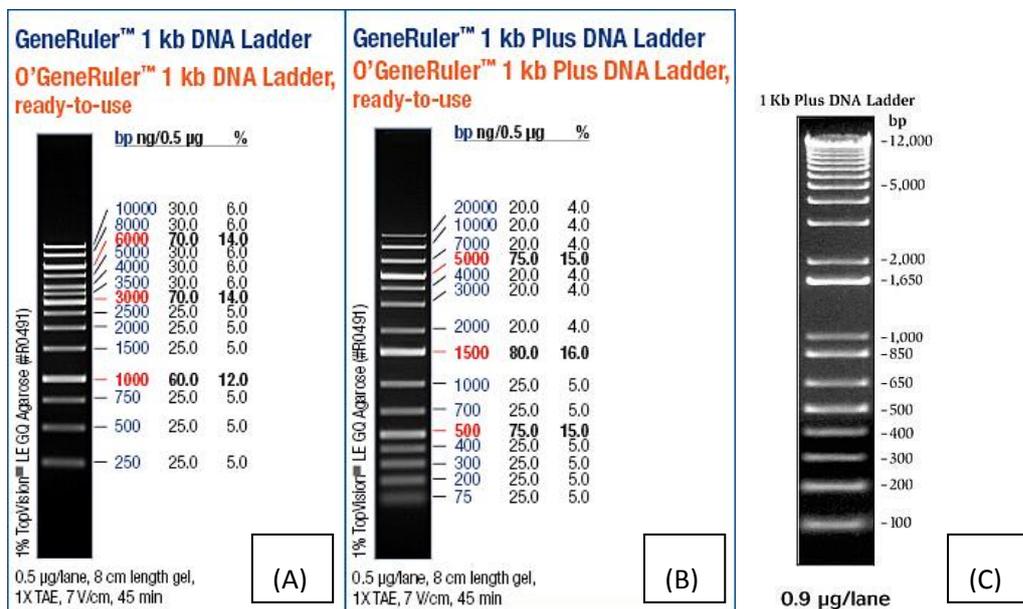


Figura 37: Marcadores de peso molecular utilizados en las electroforesis en gel de agarosa. A) 1Kb DNA Ladder (Fermentas), B) 1Kb Plus DNA Ladder (Fermentas), C) 1Kb Plus DNA Ladder (Life Technologies).

10.2.3 Preparación de células competentes de *E. coli* (Sambrook et al. 1989)

Para preparar las células competentes se inoculó 300ml de caldo LB con 5ml de un cultivo de *E. coli* Top 10 en caldo LB incubado durante toda la noche a 30°C en un agitador orbital a 200rpm. El cultivo se incubó a 30°C y agitación a 200rpm hasta que llegó a una densidad óptica (a 600nm) de 0,2- 0,3 (aproximadamente 3 horas). Se colectaron las células por centrifugación a 5000rpm por 10 minutos y se lavaron en frío dos veces con 10ml de CaCl₂ 0,1M bajo las mismas condiciones de centrifugación. Finalmente, este *pellet* se suspendió en 5ml de CaCl₂ 0,1M y se incubó 1 hora en hielo. Luego se centrifugó, se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 2ml de CaCl₂ 0,1M- glicerol 20% (v/v). Finalmente, se transfirieron volúmenes de 100µl de esta suspensión celular a tubos de microfuga de 1,5ml y se guardaron a -80°C durante un período máximo de 6 meses, hasta su posterior utilización.

10.2.4 Transformación de *E. coli* TOP10 competentes

Se adicionó la mezcla de ligación a las células competentes de *E. coli* TOP10 en condiciones asépticas. Se incubó en baño de hielo entre 20 y 40 minutos. Luego se incubó 2 minutos a 42°C y 2 minutos más en hielo. Inmediatamente se le agregó 1ml de caldo LB a cada tubo de reacción y se incubó 1 hora a 37°C y con agitación a 220rpm. Finalmente se sembró por rastrillado en superficie 100µl de esta suspensión celular en placas con LB-Km⁵⁰-Xgal²⁰, que se incubaron 20 horas a 37°C.

Se realizó un control negativo siguiendo el mismo protocolo pero sin la introducción de ADN foráneo.

10.2.5 Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina. Protocolo extraído y modificado (Ausubel et al. 1992)

Los tubos conteniendo 5 ml de medio LB, antibiótico y un inóculo de células se incubaron a 30°C y 200rpm durante toda la noche. Se colectaron las células en tubos de microfuga de 1,5ml. Para ello, el cultivo se centrifugó a 12.000rpm por 1 minuto y se descartó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió 3 veces (preparación plasmídica a partir de 4,5ml de cultivo). Se retiró totalmente el medio de cultivo del tubo de 1,5ml con un *tip*, las células se resuspendieron en 300µl de solución I y se adicionó 5 µl de ARNasa 10mg/ml. Luego se agregó 300µl de solución II y se mezcló invirtiendo el tubo 4 veces. A continuación se agregó 300µl de cloroformo y luego 300µl de solución III. El tubo con la mezcla de reactivos se mezcló en vortex manteniendo el tubo con la tapa al revés en cada caso. Se centrifugó a 14.000rpm por 10 minutos a 4°C, se transfirió la fase acuosa (la de arriba) a un tubo de 1,5ml limpio y se le agregó 660µl de isopropanol para precipitar el ADN. Se continuó centrifugando durante 30 minutos a 14.000rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante. El *pellet* se lavó con etanol 70% (v/v), se secó por centrifugación al vacío en un equipo de la marca Labconco (Inglaterra) y se resuspendió en 50µl de agua milliQ estéril.

Solución I

50mM glucosa

25mM Tris.CL (pH=8,0)

10mM EDTA (pH=8,0)

Esterilizada en autoclave y guardada en heladera.

Solución II (solución de lisis)

Se prepara en el momento de su uso

0,2N NaOH (diluida de un stock 10N)

1% SDS (diluido de un stock 10%)

Solución III (solución de neutralización)

60ml acetato de potasio 5M

11,5ml ácido acético glacial

28,5ml H₂O

10.2.6 Conjugación triparental

Se utilizaron tres cepas: *E. coli* TOP10 pRK2013 (cepa "helper"), *E. coli* TOP10 pK18*mobsacB*(cepa donadora) con la construcción de interés y *H. seropedicae* Z69 (cepa receptora). Cada una de las cepas se cultivó con agitación durante toda la noche en 5ml de medio líquido LB-Km⁵⁰ a 37°C o en TY a 30°C, según corresponda. Al otro día se inocularon 5ml de medio líquido TY con 100µl del cultivo obtenido de *H. seropedicae* Z69 y se incubó a 30°C y 200rpm. Al mismo tiempo se inocularon, por separado, tubos conteniendo 5ml de medio LB sin antibiótico con 5µl o con 20µl de los cultivos de *E. coli* y se incubaron a 37°C y 200rpm. Luego de 4 horas se eligió un tubo de cultivo de cada cepa que exhibiera visualmente un crecimiento similar y se mezcló 30µl de cada uno formando una gota en el centro de una placa de Petri con medio TY sólido para iniciar así el proceso de conjugación. Esta placa se incubó durante 24 horas a 30°C. Luego, las células presentes en la gota fueron transferidas con ansa estéril a un tubo de microfuga de 1,5ml estéril y se resuspendieron en 1ml de TY líquido. Se sembró 100µl de esta suspensión celular mediante rastrillado en placas con TY-Km⁵⁰-NaI⁵⁰ y se incubó a 30°C por 72 horas.

Al término de la incubación, las colonias que se desarrollaron en las placas con TY-Km⁵⁰-NaI⁵⁰ fueron repicadas a nuevas placas con el mismo medio. Simultáneamente y de la misma forma, se realizaron los controles negativos conteniendo solamente *H. seropedicae* Z69 o ambas cepas de *E. coli*.

10.3 Análisis de PHB

10.3.1 Propanólisis (Riis & Mai 1988)

Se pesó 10-15mg de células liofilizadas en una balanza de precisión. A cada muestra se le adicionó 200µl de estándar interno (ácido benzoico en N-propanol 4% (m/v)), 2ml de N-propanol-HCl (4:1) y 2ml de 1,2 dicloroetano. Los tubos se cerraron fuertemente (se utilizó teflón), se agitaron vigorosamente en un vortex y se incubaron 3 horas en baño de agua hirviendo. A la media hora de incubación se agitó cada tubo vigorosamente en vortex hasta disolver totalmente la biomasa.

Luego de la incubación en agua hirviendo los tubos se dejaron enfriar. A cada tubo se le adicionó 4ml de agua desionizada, se agitó vigorosamente en vortex, se esperó hasta que se separaran las fases de solventes y se extrajo la fase acuosa (la de arriba). A la fase orgánica se le adicionó Na₂SO₄anh. para quitar el remanente de agua y la muestra orgánica líquida se pasó a viales adecuados para su posterior análisis por GC-FID.

Para realizar la curva de calibración se pesaron en una balanza de precisión diferentes cantidades (entre 2 y 10 mg) de polímero P(HB-HV)(14% de HV) producido en el Departamento de Microbiología del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de San Pablo, Brasil y se siguió el mismo procedimiento que para las muestras.

10.3.2 Condiciones del ensayo cromatográfico en GC-FID (Gómez et al. 1996)

Se utilizó un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama de la marca Agilent Technologies con una columna capilar apolar HP-1 (30m x 0,32mm x 0,25µm) de Agilent Technologies. Se inyectaron 2µl de muestra con un split 20:1, la temperatura del inyector fue de 250°C. Se utilizó el siguiente programa de temperaturas: 100°C (3 min)- 8°C/min (180°)- 30 min. Se usó N₂ ultrapuro como gas de arrastre con un flujo de 0,6ml/min. La temperatura del detector FID fue de 300 °C.

10.4 Cálculos de velocidades específicas para cada estado *pseudo-estacionario* en cultivos en lote

10.4.1 *H. seropedicae* Z69

Como el volumen del cultivo en el biorreactor varió más de un 10% del volumen original (incluso dentro del cada estado *pseudo-estacionario*), se procedió a corregir todos los datos con los volúmenes extraídos y agregados a los efectos de considerar gramos formados o consumidos al momento de cada muestreo. En la Figura 38 se muestran los gráficos que se realizaron para ajustar los datos experimentales a una línea de tendencia lineal para los dos primeros estados *pseudo-estacionarios* encontrados, caracterizados por un crecimiento exponencial.

En la Figura 39 se muestran las regresiones realizadas para calcular las velocidades específicas en el tercer estado *pseudo*-estacionario de este cultivo. En la Tabla 17 se detalla cómo se calcula cada velocidad en función de las pendientes calculadas en los gráficos.

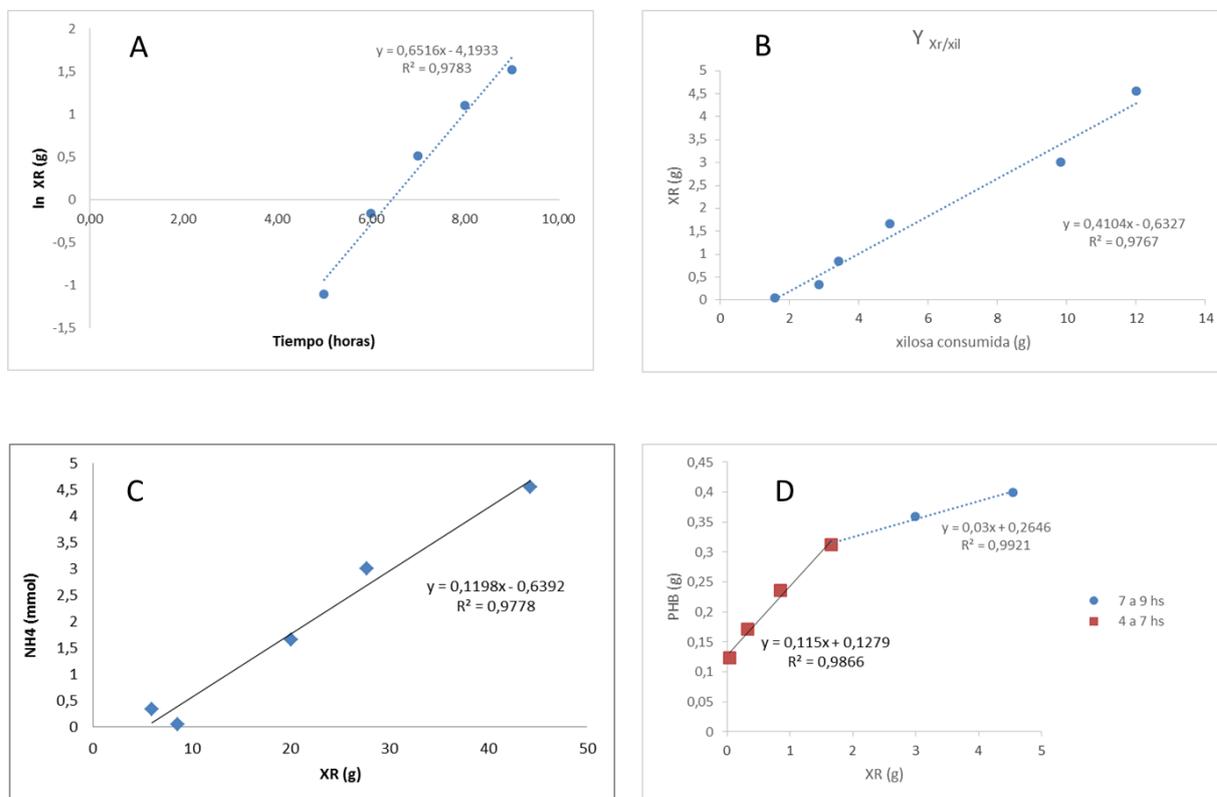


Figura 38: Gráficos de ajuste lineal realizados para calcular las velocidades específicas del cultivo en lote de la cepa salvaje de *H. seropedicae* Z69, en donde se encontraron dos estados *pseudo*-estacionarios caracterizados por la misma tasa de crecimiento, consumo de xilosa y amonio, pero con diferentes velocidades de producción de PHB.

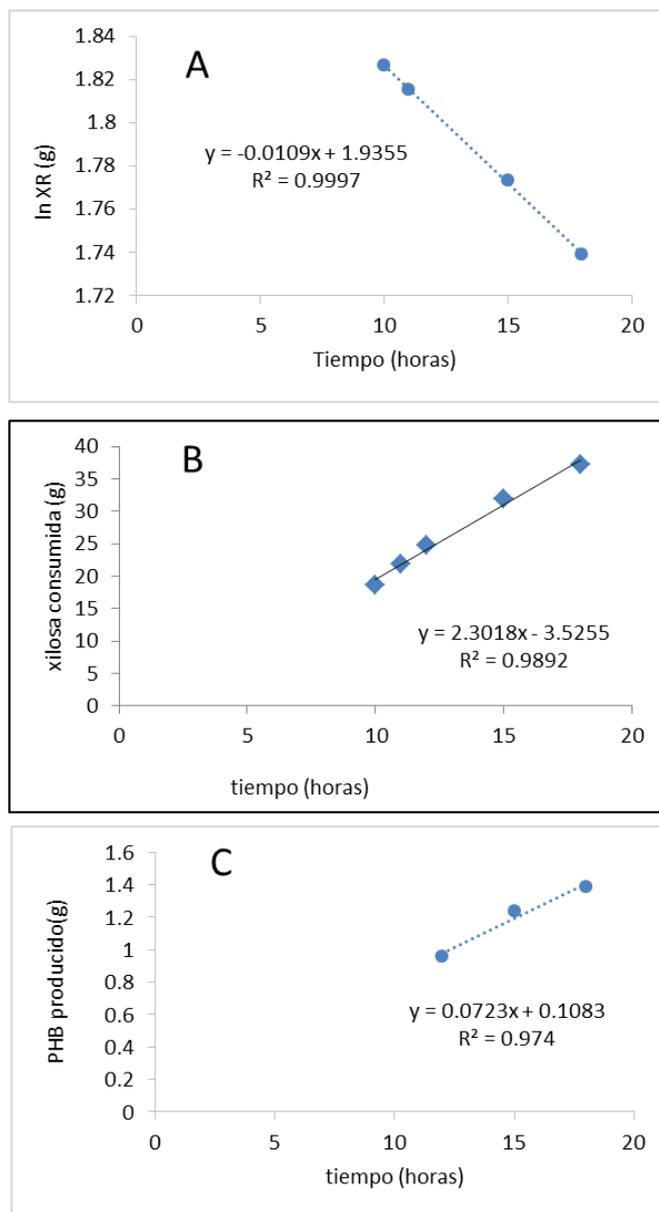


Figura 39: Ajuste de los datos empleados para calcular las velocidades específicas en el estado *pseudo*-estacionario entre las 12 y 18 horas del cultivo en lote de la cepa salvaje de *H. seropedicae* Z69.

Tabla 17: Procedimiento para calcular las velocidades específicas dependiendo del tipo de cultivo y de la fase de crecimiento. Las pendientes se calcularon en rangos de linealidad. \bar{X}_r es el promedio de la biomasa residual en ese intervalo de tiempo. En el cultivo en lote las velocidades específicas se calcularon en función de la biomasa para cada tiempo.

Velocidad específica	Cultivo en lote Fase exponencial	Cultivo en lote Fase estacionaria	Cultivo en lote alimentado
Crecimiento (μ)	$\mu = \frac{d(\ln X_r)}{dt}$	$\mu = \frac{d(\ln X_r)}{dt}$	$\mu = \frac{dX_r}{dt} * \frac{1}{X_r}$
Producción de PHB (q_{PHB})	$q_{PHB} = \frac{dPHB}{dX_r} * \mu$	$q_{PHB} = \frac{dPHB}{dt} * \frac{1}{\bar{X}_r}$	$q_{PHB} = \frac{dPHB}{dt} * \frac{1}{X_r}$
Consumo de xilosa (q_{xil})	$q_{xil} = \frac{dX_r}{dxil} * \frac{1}{\mu}$	$q_{xil} = \frac{dxil}{dt} * \frac{1}{\bar{X}_r}$	$q_{xil} = \frac{dxil}{dt} * \frac{1}{X_r}$
Consumo de amonio (q_{NH_4})	$q_{NH_4} = \frac{dNH_4}{dX_r} * \mu$	---	$q_{NH_4} = \frac{dNH_4}{dt} * \frac{1}{X_r}$

10.4.2 Z69 Δ fabG

En las Figuras 40, 41 y 42 se muestran las regresiones lineales que se realizaron con los datos experimentales obtenidos del cultivo en lote de Z69 Δ fabG para calcular las velocidades específicas, como se muestra en la Tabla 11. En este cultivo se determinaron tres estados *pseudo*-estacionarios.

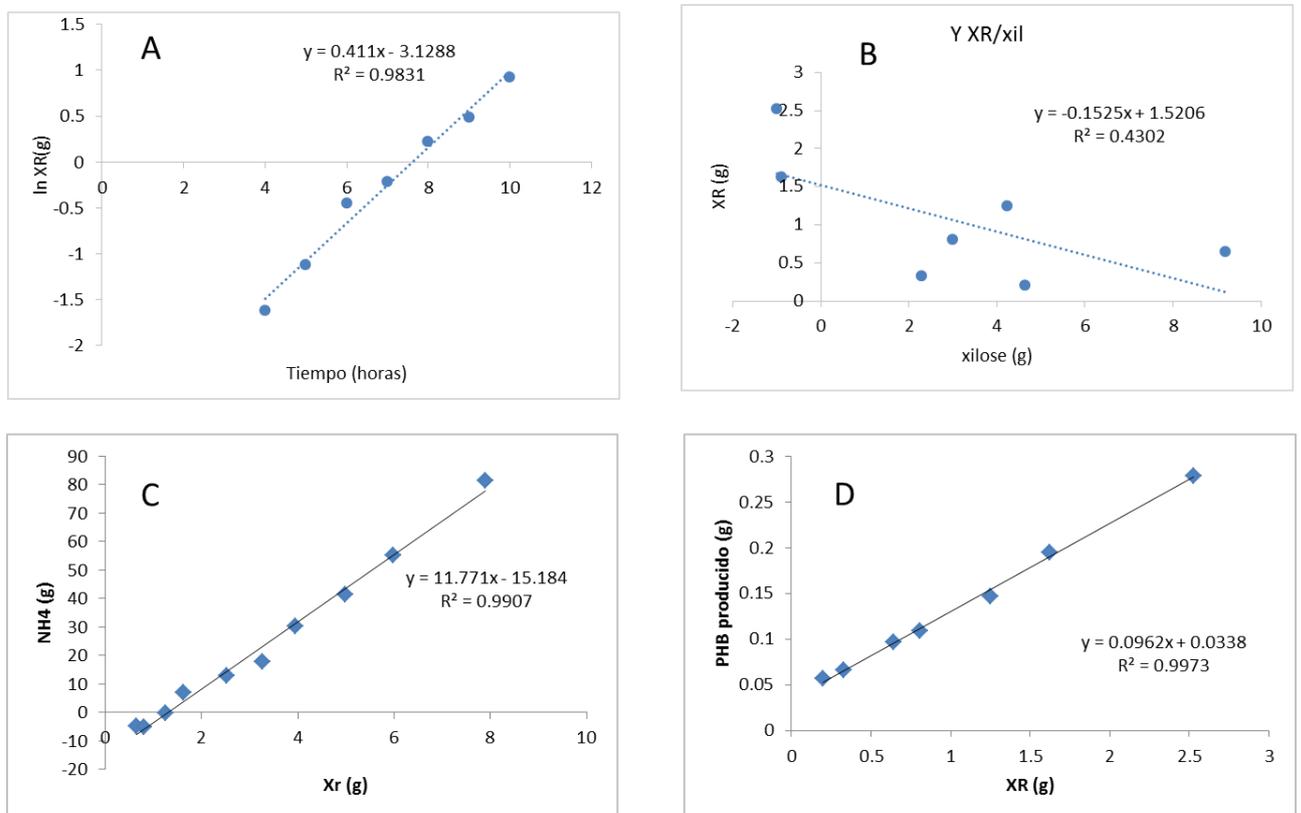


Figura 40: Ajustes de los datos para calcular las velocidades específicas correspondientes al primer estado *pseudo*-estacionario (4 a 10horas) del cultivo en lote del mutante Z69 Δ fabG.

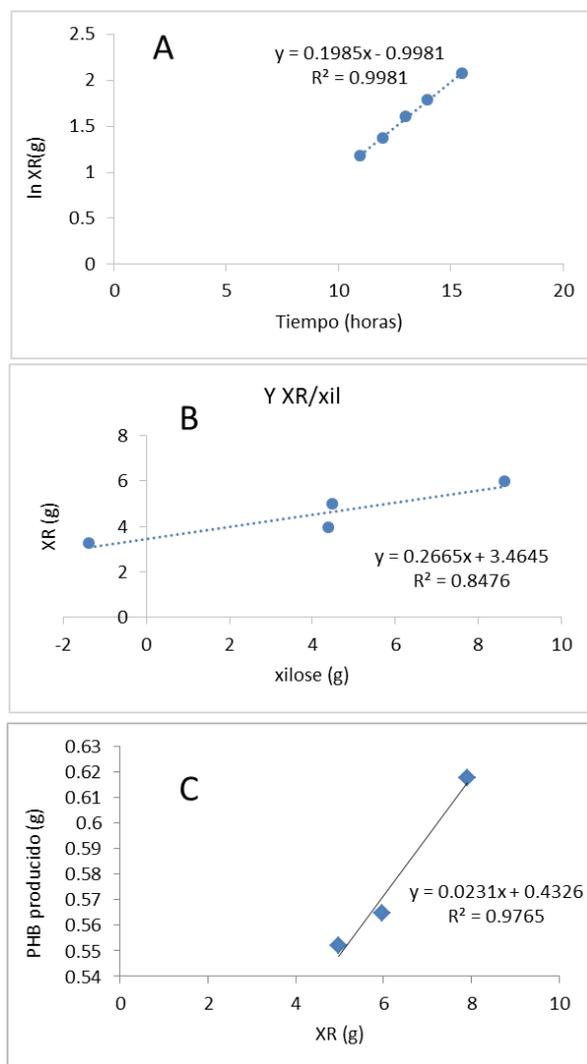


Figura 41: Ajustes de los datos para calcular las velocidades específicas correspondientes al segundo estado *pseudo*-estacionario (11 a 15,5 horas) del cultivo en lote del mutante Z69 Δ fabG.

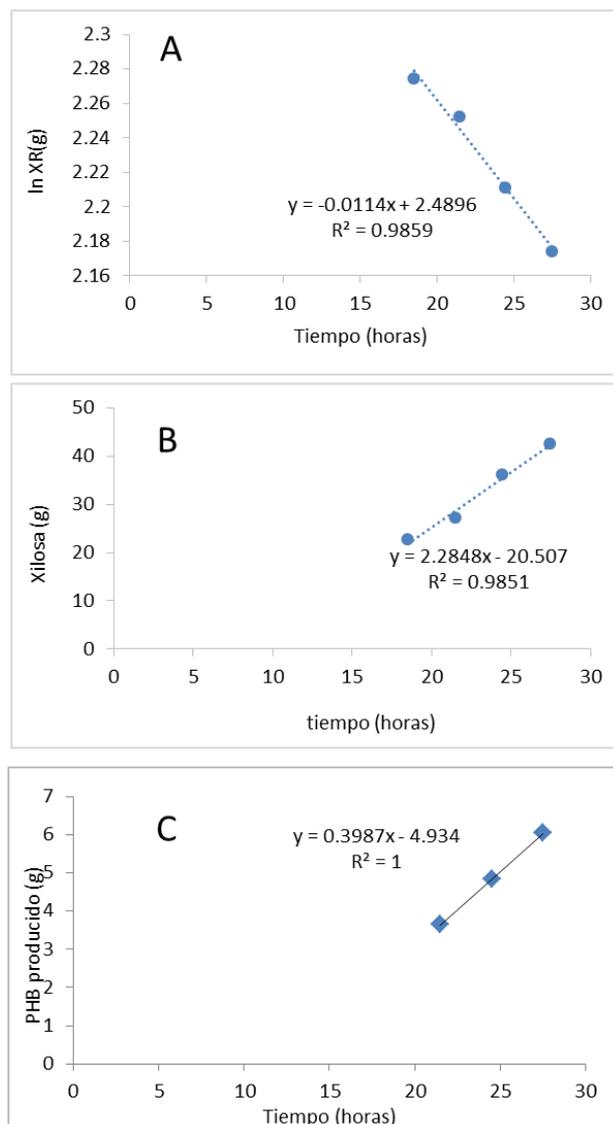


Figura 42: Ajustes de los datos para calcular las velocidades específicas correspondientes al tercer estado *pseudo*-estacionario (18,5 a 27,5 horas) encontrado en el cultivo en lote del mutante Z69Δ*fabG*.

10.5 Red metabólica

En la Tabla 18 se muestran las reacciones y sus límites tanto superior como inferior correspondientes a la red metabólica construida para *H. seropedicae* Z69 en este trabajo. En la Tabla 19 se muestran los metabolitos y sus abreviaciones, empleados en esta red metabólica.

Tabla 18: Red metabólica de *H. seropedicae* Z69 utilizada en este trabajo. rxn = reacción, lb= límite inferior y ub= límite superior de la reacción.

rxnIDs	rxns	rxnNames	rxn	lb	ub
1	'ACALD'	'acetaldehyde dehydrogenase (acetylating)'	'acald[c] + coa[c] + nad[c] <=> accoa[c] + h[c] + nadh[c] '	-1000	1000
2	'ACALDt'	'acetaldehyde reversible transport'	'acald[e] <=> acald[c] '	-1000	1000
3	'ACKr'	'acetate kinase'	'ac[c] + atp[c] <=> actp[c] + adp[c] '	-1000	1000
4	'ACONTa'	'aconitase (half-reaction A, Citrate hydro-lyase)'	'cit[c] <=> acon-C[c] + h2o[c] '	-1000	1000
5	'ACONTb'	'aconitase (half-reaction B, Isocitrate hydro-lyase)'	'acon-C[c] + h2o[c]<=> icit[c] '	-1000	1000
6	'Act2r'	'acetate reversible transport via proton symport'	'ac[e] + h[e] <=> ac[c] + h[c] '	-1000	1000
7	'ADK1'	'adenylate kinase'	'amp[c] + atp[c] <=> 2 adp[c] '	-1000	1000
8	'AKGDH'	'2-Oxoglutarate dehydrogenase'	'akg[c] + coa[c] + nad[c] -> co2[c] + nadh[c] + succoa[c] '	0	1000
9	'AKGt2r'	'2-oxoglutarate reversible transport via symport'	'akg[e] + h[e] <=> akg[c] + h[c] '	-1000	1000
10	'ALCD2x'	'alcohol dehydrogenase (ethanol)'	'etoh[c] + nad[c] <=> acald[c] + h[c] + nadh[c] '	-1000	1000
11	'ATPM'	'ATP maintenance requirement'	'atp[c] + h2o[c] -> adp[c] + h[c] + pi[c] '	8,39	1000
12	'ATPS4r'	'ATP synthase (four protons for one ATP)'	'adp[c] + 4 h[e] + pi[c] <=> atp[c] + h2o[c] + 3 h[c] '	-1000	1000
13	'Biomass_Ecoli_core_w_GAM'	'Biomass Objective Function with GAM'	1.496000 3pg[c] + 3.747800 accoa[c] + 59.810000 atp[c] + 0.361000 e4p[c] + 0.070900 f6p[c] + 0.129000 g3p[c] + 0.205000 g6p[c] + 0.255700 gln-L[c] + 4.941400 glu-L[c] + 59.810000 h2o[c] + 3.547000 nad[c] + 13.027900 nadph[c] + 1.786700 oaa[c] + 0.519100 pep[c] + 2.832800 pyr[c] + 0.897700 r5p[c] -> 59.810000 adp[c] + 4.118200 akg[c] + 3.747800 coa[c] + 59.810000 h[c] +	0	1000

3.547000 nadh[c] + 13.027900 nadp[c] + 59.810000 pi[c]					
14	'CO2t'	'CO2 transporter via diffusion'	'co2[e] <=> co2[c] '	-1000	1000
15	'CS'	'citrate synthase'	'accoa[c] + h2o[c] + oaa[c] -> cit[c] + coa[c] + h[c] '	0	1000
16	'CYTBD'	'cytochrome oxidase bd (ubiquinol-8: 2 protons)'	'2 h[c] + 0.5 o2[c] + q8h2[c]-> h2o[c] + 2 h[e] + q8[c] '	0	1000
17	'D_LACT2'	'D-lactate transport via proton symport'	'h[e] + lac-D[e]<=> h[c] + lac-D[c] '	-1000	1000
18	'ENO'	'enolase'	'2pg[c]<=> h2o[c] + pep[c] '	-1000	1000
19	'ETOHT2r'	'ethanol reversible transport via proton symport'	'etoh[e] + h[e] <=> etoh[c] + h[c] '	-1000	1000
20	'EX_ac(e)'	'Acetate exchange'	'ac[e] <=> '	0	1000
21	'EX_acald(e)'	'Acetaldehyde exchange'	'acald[e] <=> '	0	1000
22	'EX_akg(e)'	'2-Oxoglutarate exchange'	'akg[e] <=> '	0	1000
23	'EX_co2(e)'	'CO2 exchange'	'co2[e] <=> '	-1000	1000
24	'EX_etoh(e)'	'Ethanol exchange'	'etoh[e] <=> '	0	1000
25	'EX_for(e)'	'Formate exchange'	'for[e] <=> '	0	0
26	'EX_fru(e)'	'D-Fructose exchange'	'fru[e] <=> '	0	1000
27	'EX_fum(e)'	'Fumarate exchange'	'fum[e] <=> '	0	1000
28	'EX_glc(e)'	'D-Glucose exchange'	'glc-D[e] <=> '	0	0
29	'EX_gln_L(e)'	'L-Glutamine exchange'	'gln-L[e] <=> '	0	1000
30	'EX_glu_L(e)'	'L-Glutamate exchange'	'glu-L[e] <=> '	0	1000
31	'EX_h(e)'	'H+ exchange'	'h[e] <=> '	-1000	1000
32	'EX_h2o(e)'	'H2O exchange'	'h2o[e] <=> '	-1000	1000

33	'EX_lac_D(e)'	'D-Lactate exchange'	'lac-D[e] <=> '	0	1000
34	'EX_mal_L(e)'	'L-Malate exchange'	'mal-L[e] <=> '	0	1000
35	'EX_nh4(e)'	'Ammonium exchange'	'nh4[e] <=> '	-1000	1000
36	'EX_o2(e)'	'O2 exchange'	'o2[e] <=> '	-1000	1000
37	'EX_pi(e)'	'Phosphate exchange'	'pi[e] <=> '	-1000	1000
38	'EX_pyr(e)'	'Pyruvate exchange'	'pyr[e] <=> '	0	1000
39	'EX_succ(e)'	'Succinate exchange'	'succ[e] <=> '	0	1000
40	'FBA'	'fructose-bisphosphate aldolase'	'fdp[c] <=> dhap[c] + g3p[c] '	-1000	1000
41	'FBP'	'fructose-bisphosphatase'	'fdp[c] + h2o[c] -> f6p[c] + pi[c] '	0	1000
42	'FORT2'	'formate transport via proton symport (uptake only)'	'for[e] + h[e] -> for[c] + h[c] '	0	0
43	'FORTi'	'formate transport via diffusion'	'for[c] -> for[e] '	0	0
44	'FRD7'	'fumarate reductase'	'fum[c] + q8h2[c] -> q8[c] + succ[c] '	0	1000
45	'FRUpts2'	'Fructose transport via PEP:Pyr PTS (f6p generating)'	'fru[e] + pep[c] -> f6p[c] + pyr[c] '	0	1000
46	'FUM'	'fumarase'	'fum[c] + h2o[c] <=> mal-L[c] '	-1000	1000
47	'FUMt2_2'	'Fumarate transport via proton symport (2 H)'	'fum[e] + 2 h[e] -> fum[c] + 2 h[c] '	0	1000
48	'G6PDH2r'	'glucose 6-phosphate dehydrogenase'	'g6p[c] + nadp[c] <=> 6pgl[c] + h[c] + nadph[c] '	-1000	1000
49	'GAPD'	'glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase'	'g3p[c] + nad[c] + pi[c] <=> 13dpg[c] + h[c] + nadh[c] '	-1000	1000

50	'GLCpts'	'D-glucose transport via PEP:Pyr PTS'	'glc-D[e] + pep[c] -> g6p[c] + pyr[c] '	0	1000
51	'GLNS'	'glutamine synthetase'	'atp[c] + glu-L[c] + nh4[c] -> adp[c] + gln-L[c] + h[c] + pi[c]	0	1000
52	'GLNabc'	'L-glutamine transport via ABC system'	'atp[c] + gln-L[e] + h2o[c] -> adp[c] + gln-L[c] + h[c] + pi[c]	0	1000
53	'GLUDy'	'glutamate dehydrogenase (NADP)'	'glu-L[c] + h2o[c] + nadp[c] <=> akg[c] + h[c] + nadph[c] + nh4[c] '	-1000	1000
54	'GLUN'	'glutaminase'	'gln-L[c] + h2o[c]-> glu-L[c] + nh4[c] '	0	1000
55	'GLUSy'	'glutamate synthase (NADPH)'	'akg[c] + gln-L[c] + h[c] + nadph[c] -> 2 glu-L[c] + nadp[c] '	0	1000
56	'GLUt2r'	'L-glutamate transport via proton symport, reversible (periplasm)'	'glu-L[e] + h[e]<=> glu-L[c] + h[c] '	-1000	1000
57	'GND'	'phosphogluconate dehydrogenase'	'6pgc[c] + nadp[c] -> co2[c] + nadph[c] + ru5p-D[c] '	0	0
58	'H2Ot'	'H2O transport via diffusion'	'h2o[e] <=> h2o[c] '	-1000	1000
59	'ICDHyr'	'isocitrate dehydrogenase (NADP)'	'icit[c] + nadp[c] <=> akg[c] + co2[c] + nadph[c] '	-1000	1000
60	'ICL'	'Isocitrate lyase'	'icit[c] -> glx[c] + succ[c] '	0	1000
61	'LDH_D'	'D lactate dehydrogenase'	'lac-D[c] + nad[c] <=> h[c] + nadh[c] + pyr[c] '	-1000	1000
62	'MALS'	'malate synthase'	'accoa[c] + glx[c] + h2o[c] -> coa[c] + h[c] + mal-L[c] '	0	1000
63	'MALt2_2'	'Malate transport via proton symport (2 H)'	'2 h[e] + mal-L[e]-> 2 h[c] + mal-L[c] '	0	1000
64	'MDH'	'malate dehydrogenase'	'mal-L[c] + nad[c] <=> h[c] + nadh[c] + oaa[c] '	-1000	1000
65	'ME1'	'malic enzyme (NAD)'	'mal-L[c] + nad[c] -> co2[c] + nadh[c] + pyr[c] '	0	1000
66	'ME2'	'malic enzyme (NADP)'	'mal-L[c] + nadp[c] -> co2[c] + nadph[c] + pyr[c] '	0	1000
67	'NADH16'	'NADH dehydrogenase (ubiquinone-8 &3 protons)'	'4 h[c] + nadh[c] + q8[c] -> 3 h[e] + nad[c] + q8h2[c] '	0	1000
68	'NADTRHD'	'NAD transhydrogenase'	'nad[c] + nadph[c] -> nadh[c] + nadp[c] '	0	1000

69	'NH4t'	'ammonia reversible transport'	'nh4[e] <=> nh4[c] '	-1000	1000
70	'O2t'	'o2 transport via diffusion'	'o2[e] <=> o2[c] '	-1000	1000
71	'PDH'	'pyruvate dehydrogenase'	'coa[c] + nad[c] + pyr[c] -> accoa[c] + co2[c] + nadh[c] '	0	1000
72	'PFK'	'phosphofructokinase'	'atp[c] + f6p[c] -> adp[c] + fdp[c] + h[c] '	0	0
73	'PFL'	'pyruvate formate lyase'	'coa[c] + pyr[c] -> accoa[c] + for[c] '	0	0
74	'PGI'	'glucose-6-phosphate isomerase'	'g6p[c] <=> f6p[c] '	-1000	1000
75	'PGK'	'phosphoglycerate kinase'	'3pg[c] + atp[c] <=> 13dpg[c] + adp[c] '	-1000	1000
76	'PGL'	'6-phospho gluconolactonase'	'6pgl[c] + h2o[c]-> 6pgc[c] + h[c] '	0	1000
77	'PGM'	'phosphoglycerate mutase'	'2pg[c] <=> 3pg[c] '	-1000	1000
78	'Pit2r'	'phosphate reversible transport via proton symport'	'h[e] + pi[e] <=> h[c] + pi[c] '	-1000	1000
79	'PPC'	Phosphoenol pyruvate carboxylase	'co2[c] + h2o[c] + pep[c] -> h[c] + oaa[c] + pi[c] '	0	1000
80	'PPCK'	phosphoenolpyruvate carboxykinase	'atp[c] + oaa[c] -> adp[c] + co2[c] + pep[c] '	0	1000
81	'PPS'	phosphoenolpyruvate synthase	'atp[c] + h2o[c] + pyr[c] -> amp[c] + 2 h[c] + pep[c] + pi[c]	0	1000
82	'PTAr'	'phospho transacetylase'	'accoa[c] + pi[c] <=> actp[c] + coa[c] '	-1000	1000
83	'PYK'	'pyruvate kinase'	'adp[c] + h[c] + pep[c] -> atp[c] + pyr[c] '	0	1000
84	'PYRt2r'	'pyruvate reversible transport via proton symport'	'h[e] + pyr[e] <=> h[c] + pyr[c]	-1000	1000
85	'RPE'	'ribulose 5-phosphate 3-epimerase'	'ru5p-D[c]<=> xu5p-D[c] '	-1000	1000

86	'RPI'	'ribose-5-phosphate isomerase'	'r5p[c]<=> ru5p-D[c] '	-1000	1000
87	'SUCct2_2'	'succinate transport via proton symport (2 H)'	'2 h[e] + succ[e] -> 2 h[c] + succ[c] '	0	1000
88	'SUCct3'	'succinate transport out via proton antiport'	'h[e] + succ[c] -> h[c] + succ[e] '	0	1000
89	'SUCDi'	'succinate dehydrogenase (irreversible)'	'q8[c] + succ[c] -> fum[c] + q8h2[c] '	0	1000
90	'SUcoAS'	'succinyl-CoA synthetase (ADP-forming)'	'atp[c] + coa[c] + succ[c] <=> adp[c] + pi[c] + succoa[c] '	-1000	1000
91	'TALA'	'transaldolase'	'g3p[c] + s7p[c]<=> e4p[c] + f6p[c] '	-1000	1000
92	'THD2'	'NAD(P) transhydrogenase'	'2 h[e] + nadh[c] + nadp[c] -> 2 h[c] + nad[c] + nadph[c] '	0	1000
93	'TKT1'	'transketolase'	'r5p[c] + xu5p-D[c]<=> g3p[c] + s7p[c] '	-1000	1000
94	'TKT2'	'transketolase'	'e4p[c] + xu5p-D[c]<=> f6p[c] + g3p[c] '	-1000	1000
95	'TPI'	'triose-phosphate isomerase'	'dhap[c] <=> g3p[c] '	-1000	1000
96	'ED1'	'6-fosfogluconato dehidratasa'	'6pgc[c]<=> h2o[c] + KDPG[c] '	-1000	1000
97	'ED2'	'2-ceto-4hidroxi-glutarato aldolasa'	'KDPG[c] <=> g3p[c] + pyr[c] '	-1000	1000
98	'Ex_HB[c]'	'Ex_HB[c]'	'HB[c] -> '	0	1000
99	'sintPHB'	'síntesis de PHB'	'2 accoa[c] + h[c] + nadph[c] <=> 2 coa[c] + nadp[c] + HB[c] '	0	1000
100	'Ex_xylt[e]'	'Ex_xylt[e]'	'<=> xylt[e] '	-20	0
101	'XYLtr'	'transporte de xilosa'	'atp[c] + h2o[c] + xylt[e] <=> adp[c] + pi[c] + xyl[c] '	-1000	1000
102	'XDH'	'xilosa deshidrogenasa'	'nad[c] + xyl[c] <=> h[c] + nadh[c] + xl[c] '	-1000	1000
103	'XYL2'	'xilolactonasa'	'h2o[c] + xl[c]<=> xyoh[c] '	-1000	1000

104	'XYL3'	xilonato dehidratasa	'xyoh[c] <=> h2o[c] + 2k3dx[c] '	-1000	1000
105	'XYL4'	2-ceto-3-deoxi-xilonato dehidratasa	'2k3dx[c]<=> h2o[c] + aks[c] '	-1000	1000
106	'XYL5'	alfa-cetoglutaric-semialdehído deshidrogenasa	'nad[c] + aks[c] <=> akg[c] + h[c] + nadh[c] '	-1000	1000
107	'XYLRD'	xilosa reductasa	'h[c] + nadph[c] + xyl[c] <=> nadp[c] + xoh[c] '	-1000	1000
108	'XOLDH'	xilitol deshidrogenasa	'nad[c] + xoh[c] <=> h[c] + nadh[c] + xul[c] '	-1000	1000
109	'XULK'	xilulosa quinasa	'atp[c] + xul[c] <=> adp[c] + xu5p-D[c] '	-1000	1000
110	'G6PDH3r'	'glucose dehydrogenase'	6-phosphate 'g6p[c] + nad[c] <=> 6pgl[c] + h[c] + nadp[c] '	-1000	1000

Tabla 19: Metabolitos y sus abreviaciones de la red metabólica de *H. seropedicae*. met= metabolito

mets	metNames
'13dpg[c]'	'3-Phospho-D-glyceroyl-phosphate'
'2pg[c]'	'D-Glycerate-2-phosphate'
'3pg[c]'	'3-Phospho-D-glycerate'
'6pgc[c]'	'6-Phospho-D-gluconate'
'6pgl[c]'	'6-phospho-D-glucono-1-5-lactone'
'ac[c]'	'Acetate'
'ac[e]'	'Acetate'
'acald[c]'	'Acetaldehyde'
'acald[e]'	'Acetaldehyde'
'accoa[c]'	'Acetyl-CoA'
'acon-C[c]'	'cis-Aconitate'
'actp[c]'	'Acetyl-phosphate'
'adp[c]'	'ADP'
'akg[c]'	'2-Oxoglutarate'
'akg[e]'	'2-Oxoglutarate'
'amp[c]'	'AMP'
'atp[c]'	'ATP'
'cit[c]'	'Citrate'
'co2[c]'	'CO2'
'co2[e]'	'CO2'
'coa[c]'	'Coenzyme-A'
'dhap[c]'	'Dihydroxyacetone-phosphate'
'e4p[c]'	'D-Erythrose-4-phosphate'
'etoh[c]'	'Ethanol'
'etoh[e]'	'Ethanol'
'f6p[c]'	'D-Fructose-6-phosphate'
'fdp[c]'	'D-Fructose-1-6-bisphosphate'
'for[c]'	'Formate'
'for[e]'	'Formate'
'fru[e]'	'D-Fructose'
'fum[c]'	'Fumarate'
'fum[e]'	'Fumarate'
'g3p[c]'	'Glyceraldehyde-3-phosphate'

'g6p[c]'	'D-Glucose-6-phosphate'
'glc-D[e]'	'D-Glucose'
'gln-L[c]'	'L-Glutamine'
'gln-L[e]'	'L-Glutamine'
'glu-L[c]'	'L-Glutamate'
'glu-L[e]'	'L-Glutamate'
'glx[c]'	'Glyoxylate'
'h2o[c]'	'H2O'
'h2o[e]'	'H2O'
'h[c]'	'H'
'h[e]'	'H'
'icit[c]'	'Isocitrate'
'lac-D[c]'	'D-Lactate'
'lac-D[e]'	'D-Lactate'
'mal-L[c]'	'L-Malate'
'mal-L[e]'	'L-Malate'
'nad[c]'	'Nicotinamide-adenine-dinucleotide'
'nadh[c]'	'Nicotinamide-adenine-dinucleotide-reduced'
'nadp[c]'	'Nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate'
'nadph[c]'	'Nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate-reduced'
'nh4[c]'	'Ammonium'
'nh4[e]'	'Ammonium'
'o2[c]'	'O2'
'o2[e]'	'O2'
'oaa[c]'	'Oxaloacetate'
'pep[c]'	'Phosphoenolpyruvate'
'pi[c]'	'Phosphate'
'pi[e]'	'Phosphate'
'pyr[c]'	'Pyruvate'
'pyr[e]'	'Pyruvate'
'q8[c]'	'Ubiquinone-8'
'q8h2[c]'	'Ubiquinol-8'
'r5p[c]'	'alpha-D-Ribose-5-phosphate'
'ru5p-D[c]'	'D-Ribulose-5-phosphate'
's7p[c]'	'Sedoheptulose-7-phosphate'

'succ[c]	'Succinate'
'succ[e]	'Succinate'
'succoa[c]	'Succinyl-CoA'
'xu5p-D[c]	'D-Xylulose-5-phosphate'
'KDPG[c]	2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato
'HB[c]	hidroxibutirato
'xylt[e]	xilosa
'xyl[c]	xilosa
'xl[c]	xilonolactona
'xyoh[c]	ácido xilónico
'2k3dx[c]	2-ceto-3-deoxi-xilonato
'aks[c]	alfa-cetoglutaric-semialdehído
'xoh[c]	xilitol
'xul[c]	xilulosa
