Tesis de Doctorado
Facultad de Química, Universidad de la República
PEDECIBA

Ana Inés Catalán

Desarrollo de estrategias dirigidas a modificar el metabolismo de *Herbaspirillum seropedicae* para mejorar la producción de polihidroxialcanoatos

Orientadores

Dra. Silvia Batista y Dr. Fernando Ferreira

Unidad de Microbiología Molecular

Departamento de Bioquímica y Genómica Microbiana

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)

Montevideo, Uruguay

2016

Agradecimientos

Estuve pensando la forma de cómo comenzar a escribir los agradecimientos para hacerlo diferente a lo que siempre se escribe. Luego de un rato frente a la computadora no se me ocurrió nada original asi que….

A la primera persona que quiero y debo agradecer es a Silvia. Por muchos años trabajando juntas, por no bajar los brazos y empujarme a seguir y apostar a que continuara con mi formación. Sé que por muchos momentos hubiera querido ahorcarme y quizás lo merecía! Son muchas mas las cosas que debería agradecerle pero la redacción y el escribir lindo no es lo mío.

A Karen, como parte del grupo PHAs, le agradezco la ayuda en los temas informáticos con los softwares para el análisis de flujo. Entre las tres formamos un buen grupo que nos permitió avanzar en los trabajos de investigación incorporando nuevas herramientas, fuimos capaces de organizar un curso CABBIO, compartimos viajes y anécdotas.

A Gregorio Cabrera-Gómez, por recibirme en su laboratorio de la Universidad de San Pablo e introducirme en el mundo de los Modos Elementales de flujo. A Pablo Nikel por la buena onda y la disponibilidad para ayudarme a la distancia y con varias horas de diferencia.

A Verónica Saravia y demás gente del departamento de Bioingeniería de la Facultad de Ingeniería, por la ayuda con los reactores para los cultivos contínuos.

A Fernando Ferreira, le doy las gracias porque a pesar de no vernos y no estar físicamente en el mismo laboratorio me aceptó como estudiante, me apoyó y confió en que podía realizar esta tesis. Dentro del Laboratorio de Carbohidratos y Glicoconjugados quiero agradecer a Inés Bessio que siempre me alentó en el trabajo y por la gran ayuda con el HPLC, liofilizador, etc, etc!

Del laboratorio, a la toda la gente de Unidad de Microbiología Molecular y LEM, por aguantar mis quejas, cuentos y el “no saben lo que me pasó”. A Maria Morel, mil gracias por la ayuda en la compaginación de la tesis, el índice!! A Daniella, por las largas charlas de la mañana. Dentro de este grupo de gente también se encuentra Manuel, mil gracias a él por la ayuda con las muestras del GC-MS, y por ser un excelente compañero de trabajo.

A los viejos del antiguo Departamento de Bioquímica, a través de Natalia y Gastón, como únicos representantes que va quedando, les doy las gracias por la amistad que tenemos.

A mis “amigas BQ” de la Facultad de toda la vida!

A mis “amigas invisibles” del piso 15 del Hospital de Clínicas, les agradezco por apoyarme a que realizara el doctorado hace mas de 3 años y gracias por recibirme ahora nuevamente con alegría de que terminara.

A mi familia, que sin entender mucho permitieron que continuara con mi formación, me apoyaron económicamente y cuidaron de Martina cuando me tenía que quedar largas jornadas en el laboratorio. A Martina, le pido disculpas por malos humores, por no estar tan presente, por dejarla sin vacaciones este último año, por olvidarme algunas noches de hacerle la cena y corregirle los deberes. Por todo le doy las gracias por aguantarme!

Finalmente agradezco a los organismos financiadores: ANII, PEDECIBA, FSE, CYTED

RESUMEN

La contaminación ambiental generada por la acumulación de desechos plásticos y el agotamiento de las reservas de petróleo en un futuro incierto, ha promovido el desarrollo de materiales alternativos. Entre ellos se encuentran los polihidroxialcanoatos (PHAs), poliésteres de origen microbiano con propiedades termoplásticas y biodegradables. Los microorganismos acumulan estos poliésteres como reserva de carbono y energía. Se sintetizan en condiciones desbalanceadas de crecimiento, en presencia de un exceso de fuente de carbono. Dentro de la familia de los PHAs se encuentra el poli-3-hidroxibutirato (PHB) y el copolímero compuesto por 3-hidroxibutirato y 3-hidroxivalerato P(3HB-*co*-3HV). La producción industrial de PHAs se inició en la década del 80 y actualmente varias compañías producen este material, en general a escala piloto, dados los altos costos de producción. El factor que más afecta el precio de los PHAs es el costo de la fuente carbonada. Para la síntesis de P(3HB-*co*-3HV) se suele utilizar la mezcla de un carbohidrato y ácido propiónico como fuentes de carbono. El propiónico se adiciona para generar el 3HV a partir del intermediario metabólico propionil-CoA. Para incrementar la eficiencia de síntesis de 3HV se han construido mutantes derivadas de los organismos productores incapaces de metabolizar propionil-CoA. Esta estrategia permitió obtener rendimientos de transformación del ácido propiónico cercanos al valor teórico.

La cepa Z69 de *Herbaspirillum seropedicae* fue capaz de acumular PHB hasta 60% de su peso seco al crecer en glucosa en cultivos en lote. El rendimiento de transformación de glucosa en PHB ($Y_{PHB/glu}$) obtenido fue menor al 50% del rendimiento teórico. El objetivo de este trabajo de tesis fue optimizar la producción de PHB y P(3HB-*co*-3HV) por *H. seropedicae* Z69 mediante el aumento del rendimiento de transformación de glucosa y propionato de sodio en polímero. Se plantearon dos estrategias. Una de ellas abarca la eliminación de las rutas catabólicas del propionil-CoA mediante ingeniería genética. Se construyó un mutante (Z69Prp) en la enzima 2-metilcitrato sintasa (PrpC) del ciclo del 2-metilcitrato (2MCC) para el catabolismo del propionato, Z69Prp fue incapaz de crecer en propionato de sodio y en cultivos con glucosa-propionato fue capaz de acumular 50% de copolímero, con 8,6 mol% de 3HV, mayor al de la cepa control (1 mol%). El rendimiento obtenido fue 0,44 g/g, por debajo del rendimiento teórico (1,35 g/g). Este rendimiento teórico se calcula asumiendo que todo el ácido propónico se transforma en monómeros de 3HV.

En el caso de glucosa se implementó una estrategia de análisis de rutas metabólicas mediante análisis de modos elementales de flujos (AMEF). Se analizó el crecimiento y producción de PHB por la cepa Z69 en cultivos continuos y en lote en bio-reactor, utilizando glucosa como fuente de carbono. Los parámetros analizados en los cultivos continuos permitieron determinar que la acumulación de PHB está parcialmente asociada al crecimiento. Los cultivos en lote presentaron un perfil donde la fase exponencial se comportaba como un período *pseudo*-estacionario. Los datos de los cultivos continuos y del período *pseudo*-estacionario fueron usados para desarrollar un análisis de MEF. Los datos de los cultivos continuos generaron 9 modos elementales (ME) y los del cultivo en lote fueron 13. En ambos casos fue posible identificar un ME el cual se ajustó mejor a los datos experimentales, con un flujo de carbono por la vía de Embden Doudoroff (ED) lineal. Por otro lado, el ME que maximiza la producción de PHB posee el mayor flujo por la vía de ED cíclica. El funcionamiento cíclico de ED generaría más poder reductor como NADPH, lo cual está de acuerdo con los requerimientos de precursores para la síntesis de PHB. A partir de los MEF, se determinó una correlación positiva entre el flujo por la enzima fructosa 1,6 bifosfatasa (FbPasa) y el rendimiento de transformación de glucosa en PHB. El aumento en el número de copias del gen *fbp* que codifica para dicha enzima en Z69(pRK767::*fbp*) se tradujo en un leve aumento en la actividad fructosa 1,6 bifosfatasa. Los cultivos en lote en condiciones de bio-reactor de la cepa Z69(pRK767::*fbp*) presentaron una menor velocidad de crecimiento con un rendimiento $Y_{PHB/glu}$ mayor que la cepa control. Sin embargo, el $Y_{PHB/glu}$ obtenido fue muy bajo y alejado del valor esperado por el análisis de modos elementales de flujo.

Este trabajo de tesis permitió avanzar en el conocimiento de *H. seropedicae* en cuanto a su metabolismo carbonado, fisiología y síntesis de PHAs. Esto permitirá diseñar una estrategia de cultivos (alimentados o continuos) que aumente la producción de PHAs y la eficiencia en el uso del sustrato carbonado.

Indice

RESUMEN 3

Indice 5

Indice de figuras 10

Indice de tablas 14

Abreviaciones 16

1. INTRODUCCIÓN 19

1.1 Panorama Mundial de los plásticos petroquímicos 19

1.2 Bioplásticos 19

1.3 Polihidroxialcanoatos (PHAs) 23

1.3.1 Metabolismo de los PHAs 27

1.3.1.1. Síntesis de PHB y P(3HB-*co*-3HV) 28

1.3.2. Proceso fermentativo para la producción de PHA 31

1.3.3 Modificaciones genéticas orientadas a mejorar la producción de PHB y P(3HB-*co*-3HV) 33

1.4 Ingeniería Metabólica 34

1.4.1. Análisis de la red metabólica: análisis de flujos metabólicos 36

1.4.2. Análisis de rutas metabólicas: Modos elementales de flujo (MEF) 38

1.4.3 Análisis de flujos metabólicos por marcación isotópica con ^{13}C 41

1.5 *Herbaspirillum seropedicae* 50

2. HIPOTESIS Y OBJETIVO 55

3. CAPITULO 1-Optimización de la síntesis de P(3HB-*co*-3HV) por *H. seropedicae* Z69 57

3.1 Objetivo específico 57

3.2 Estrategia experimental 57

3.3 Materiales y Métodos 57

3.3.1 Cepas, plásmidos y medios de cultivo 57

3.3.2 Identificación de rutas metabólicas y genes diana en el genoma de *H. seropedicae* SmR1 59

3.3.3 Reacciones de PCR 60

3.3.4 Construcción de los fragmentos para la obtención de mutantes dirigidas por *knock-out* 60

3.3.5 Técnicas genéticas y de ADN recombinante 63

3.3.6 Técnicas genéticas: Conjugaciones triparentales 64

3.3.7 Construcción de mutantes dirigidas: transferencia de pK18mob*sac*B::PCR3 a Z69 y selección de dobles recombinantes 64

3.3.8 Análisis de secuencia de los fragmentos 65

3.3.9 Perfiles de crecimiento 65

3.3.10 Ensayos de producción de polímero a partir de cultivos en matraces 66

3.3.10.1. Cultivo en lote de la cepa Z69 66

3.3.10.2. Cultivo en lote de la cepa mutante Z69Prp 67

3.3.11 Determinaciones analíticas 68

3.4 Resultados y discusión 73

3.4.1 Determinación de parámetros de crecimiento y evaluación de la síntesis de copolímero por *H. seropedicae* Z69 en presencia de propionato y propionato-glucosa (P/G) como fuente de carbono 73

3.4.1.1 Perfil de crecimiento en propionato de sodio 73

3.4.1.2 Análisis de síntesis de P(3HB-*co*-3HV) por *H. seropedicae* Z69 cultivada en una mezcla de glucosa y propionato (G/P) 74

3.4.2 Obtención de mutantes de la cepa Z69 incapaces de metabolizar propionil CoA y cálculo del rendimiento de transformación de propionato en 3HV 77

3.4.2.1 Identificación de genes diana en el genoma de las cepas SmR1 y Z67. 77

3.4.2.2. Construcción de mutantes en los genes *prp*C, *mms*A y *cai*A 82

3.4.3. Fenotipo de los mutantes en los genes *prp*C y *prp*C*mms*A 86

3.4.3.1 Perfiles de crecimiento 86

3.4. 3.2. Complementación de función del mutante Z69Prp 88

3.4.3.3. Capacidad de sintetizar monómeros 3HV 90

3.4.4. Análisis del rendimiento de transformación de propionato en 3HV en cultivos en lote de las cepas Z69 y Z69Prp 92

3.4.4.1 Ensayo en dos etapas 93

3.4.4.2. Ensayo en una etapa utilizando una mezcla G/P como única fuente de carbono 98

3.5 Discusión general 103

4. CAPITULO 2-Optimización de la síntesis de PHB por *H. seropedicae* Z69 107

4.1 Objetivo específico 107

4.2 Estrategia experimental 107

4.3 Materiales y Métodos 107

4.3.1 Cultivos en bio-reactor 108

4.3.1.1 Cultivos continuos 108

4.3.1.2 Cultivo en lote y lote-alimentado 109

4.3.2 Determinación de actividad enzimática FbPasa 112

4.3.3 Perfil de crecimiento 114

4.3.4 Análisis de rutas metabólicas: determinación de modos elementales de flujo (software Metatool) 115

4.3.4.1 Construcción del modelo metabólico 115

4.3.4.2 Análisis de la red metabólica 115

4.3.5 Análisis de flujos metabólicos usando marcación isotópica (^{13}C-glucosa) 116

4.3.5.1 Ajuste del protocolo de análisis de aminoácidos por GC-MS 116

4.3.5.2 Ensayos para marcación isotópica y análisis de los aminoácidos proteinogénicos 117

4.3.5.3. Determinación del patrón de marcación ^{13}C por GC-MS 118

4.3.5.4 Análisis de flujos metabólicos 119

4.6 Resultados y discusión 122

4.6.1 Análisis de crecimiento y síntesis de PHB por *H.seropedicae* cultivada en bio-reactor en presencia de glucosa como única fuente de carbono 122

4.6.1.1 Cultivos continuos de *H. seropedicae* Z69..... 122

4.6.1.2 Cultivos en lote de *H. seropedicae* Z69 125

4.6.2 Análisis de rutas metabólicas mediante el análisis de modos elementales de flujo (Metatool) 135

4.6.2.1 Análisis de modos elementales de flujo (AMEF) a partir de los resultados obtenidos de cultivos contínuos..... 135

4.6.2.2 Análisis de modos elementales de flujo (AMEF) a partir de los resultados obtenidos de cultivos en lote..... 144

4.6.3.1 Aumento del número de copias del gen fbp que codifica para la enzima FbPasa en *H. seropedicae* Z69 152

4.6.3.2 Análisis del crecimiento y producción de PHB de la cepa transformada Z69(pRK767::*fbp*). 155

4.6.3.3. Análisis de flujos metabólicos de las cepas Z69(pRK767::*fbp*) y Z69(pRK767) mediante marcación isotópica con ^{13}C-glucosa 160

4.6.3.4 Análisis de relación de flujos metabólicos (*Metabolic flux ratio analysis*) basado en ^{13}C..... 165

4.7 Discusión general 166

5. CONCLUSIONES 172

6. PERSPECTIVAS 174

7. REFERENCIAS 175

8. ANEXOS..... 185

Anexo 1 185

Anexo 2 187

Anexo 3 193

Anexo 4 195

Indice de figuras

Figura 1.3.1. Microfotografía de transmisión electrónica de *Pseudomonas putida* Se observan los gránulos de PHA acumulados en el citoplasma. 24

Figura 1.3.2 Estructura general de los PHAs. 24

Figura 1.3.3 Estructura química del PHB, P(3HB-*co*-3HV) y PHA-MCL. 25

Figura 1.3.4 Ruta metabólica para la síntesis de P(3HB-*co*-3HV) en *R. eutropha* y *Burkholderia sacchari* 29

Figura 1.3.5 Posibles fuentes de propionil-CoA 30

Figura 1.4 Etapas que involucra la Ingeniería Metabólica 35

Figura 1.4.1 Esquema del principio matemático para la elaboración de la matriz estequiométrica 36

Figura 1.4.2 Esquema del análisis de rutas metabólicas 39

Figura 1.4.3 Esquema de las situaciones que no se resuelven por AFM estequiométrico 41

Figura 1.4.4 Destino de la marcación isotópica de la glucosa al piruvato según la ruta metabólica empleada. 42

Figura 1.4.5 Esquema del empleo del sustrato uniformemente marcado para discriminar entre vías donde ocurren re-arreglos del esqueleto carbonado (ruta de las pentosas fosfato). 43

Figura 1.4.6 Esquema de los dos tipos de métodos para la determinación de la distribución de flujos empleando marcación 13C y análisis por RMN o MS. 46

Figura 1.4.7 Modelo de la red de reacciones del metabolismo central de *E. coli*. . 47

Figura 1.4.8 Distribución del flujo de carbono determinado por METAFoR en microorganismos metabólicamente diferentes 49

Figura 3.3.1 Esquema de la estrategia para la obtención de mutantes dirigidos no polares 62

Figura 3.4.1 Perfil de crecimiento de la cepa Z69 en presencia de propionato de sodio 73

Figura 3.4.2 Esquema de las rutas metabólicas para el propionato obtenidas de la base de datos KEGG para *H. seropedicae* SmR1..... 78

Figura 3.4.3 Mapa de las enzimas del metabolismo del propionato de acuerdo a la anotación del RAST..... 79

Figura 3.4.4 Organización de los genes del metabolismo del propionato en el genoma de las cepas Z67 y SmR1de *H. seropedicae.*..... 81

Figura 3.4.5 Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR 1 y 2. 83

Figura 3.4.6 Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos de la reacción PCR3: 84

Figura 3.4.7 Perfiles de crecimiento de las cepas mutantes y salvaje en presencia de diferentes concentraciones de propionato de sodio 87

Figura 3.4.8 Perfil de crecimiento en medio LGI con 1 g/l de propionato y Km50 de la cepa Z69Prp (pBBR1MSC2::*prp*Cwt) 89

Figura 3.4.9 Cromatograma obtenido por derivatización del polímero purificado a partir de cultivos de Z69 (3,5mg) y Z69Prp (2,1mg) en LGI glucosa y propionato..... 90

Figura 4.3.1 Bio-reactor utilizado para los cultivos continuos (Departamento de Bioingeniería, Facultad de Ingeniería). 109

Figura 4.3.2 Bio-reactor Biostat B utilizado para el cultivo en lote-alimentado (Laboratorio de Microbiología, Universidad de San Pablo)..... 110

Figura 4.3.3 Bio-reactor L.E. Marubishi utilizado en los ensayos en lote (Unidad de Microbilogía Molecular, IIBCE). 111

Figura 4.3.4 Ventana correspondiente al módulo Ratio. 120

Figura 4.3.5 Ventana correspondiente al módulo Netto. 121

Figura 4.6.1 Gráfico que representa la productividad y producciónde Xr y PHB en función de la velocidad de dilución (D). 124

Figura 4.6.2 Relación de la velocidad de síntesis de PHB con la velocidad de dilución. 125

Figura 4.6.3. Perfil de crecimiento, síntesis de PHB, concentración de glucosa y amonio en el sobrenadante correspondiente al ensayo LGI-50. 127

Figura 4.6.4 Perfil de crecimiento, síntesis de PHB, concentración de glucosa y amonio correspondiente al ensayo MM-G-50. 128

Figura 4.6.5 Perfil de crecimiento de la cepa Z69 en bio-reactor manteniendo el oxígeno disuelto entre un 10-20% de saturación..... 130

Figura 4.6.6 Perfil de crecimiento, síntesis de PHB y concentración de glucosa y amonio en el sobrenadante en función del tiempo en cultivo en lote con alimentación. 132

Figura 4.6.7 Concentración de ácidos orgánicos en el sobrenadante a lo largo del tiempo de la fermentación. 133

Figura 4.6.8 Representación gráfica del conjunto de enzimas (MEF) y los flujos, correspondiente a la reacción global que mejor se ajusta a los datos experimentales 137

Figura 4.6.9 Distribución de flujos del metabolismo central que mejor representa los datos experimentales del cultivo de *H. seropedicae* en quimiostato a D=0.07h-1.138

Figura 4.6.10 Representación gráfica del conjunto de enzimas y flujos correspondiente al MEF2 para cada condición ensayada. 140

Figura 4.6.11 Representación gráfica del conjunto de enzimas y los flujo correspondientes al MEF4 para cada condición ensayada 141

Figura 4.6.12. Distribución de flujos del metabolismo central que garantiza un mayor rendimiento de transformación de glucosa en PHB (MEF4). 142

Figura 4.6.13 Relación de los moles de biomasa total obtenida por mol de glucosa consumida en función del flujo de carbono por la enzima fructosa 1,6 bi fosfatasa (FbPasa). Cada punto del gráfico corresponde a un MEF. 143

Figura 4.6.14 Representación gráfica del conjunto de enzimas y los flujos, correspondiente a los MEF (7, 9, 12, 13) que se ajustan a los datos experimentales. 146

Figura 4.6.15 Representación gráfica del conjunto de enzimas y los flujos, correspondiente al MEF2 que garantiza el mejor rendimiento de transformación de glucosa en PHB. 147

Figura 4.6.16 Distribución de flujos del metabolismo central que mejor representa los datos experimentales del cultivo en lote de *H. seropedicae* (representación esquemática del MEF 12)..... 148

Figura 4.6.17 Distribución de flujos del metabolismo central que garantiza un mayor rendimiento de transformación de glucosa en PHB (MEF2)..... 149

Figura 4.6.18 Correlación entre los moles de biomasa total producida por mol de glucosa y el flujo por la enzima FbPasa 150

Figura 4.6.19 Perfil electroforético en gel de agarosa de los productos de PCR correspondientes al gen *fbp*. 152

Figura 4.6.20 Electroforesis en gel de agarosa correspondiente a los productos de digestión con las enzimas de restricción *Hind*III/*Xba*I del material plasmidico obtenido de las colonias 1, 2, 4 y 6 153

Figura 4.6.21 Perfil electroforético en gel de agarosa del ADN plasmídico extraído de los transconjugantes de *H. seropedicae* Z69..... 154

Figura 4.6.22 Perfiles de crecimiento de las cepas Z69(pRK767::*fbp*) y Z69(pRK767) en distintas fuentes de carbono. Se graficó el promedio de tres medidas y se calculó el desvío estándar correspondiente. 156

Figura 4.6.23 Perfil de crecimiento, concentración de PHB, glucosa y amonio en cultivos en bior-eactor en lote. (a) Z69(pRK767::*fbp*) y (b) Z69(pRK767). 158

Figura 4.6.24. Perfil de crecimiento de las cepas Z69(pRK767) y Z69(pRK767::*fbp*) incluyendo Xr en función del tiempo para el matraz control. 164

Indice de tablas

Tabla 1.2.1 Producción de PHAs en el mundo 21
Tabla 1.3.1 Propiedades de los PHAs y el polipropileno 26
Tabla 3.3.1 Listado de cepas y plásmidos empleados en este trabajo. 58
Tabla 3.3.2 Secuencia de todos los cebadores diseñados. 61
Tabla 3.3.3 Listado de fuentes de carbono y concentración utilizada. 66
Tabla 3.4.1 Resultados de los cultivos realizados en matraz de *H. seropedicae* Z69 .. 76
Tabla 3.4.2 Lista de enzimas del metabolismo del propionato presentes en *H. seropedicae* de acuerdo a la anotación KEGG y RAST. 80
Tabla 3.4.3 Tamaño del producto de PCR esperado según el genotipo salvaje (wt) o mutado 85
Tabla 3.4.4 Composición del polímero sintetizado en medio LGI con glucosa como única fuente de carbono 91
Tabla 3.4.5 Resultados del ensayo 3.4.4.1 94
Tabla 3.4.6 Resultados del Ensayo 3.4.4.2. 96
Tabla 3.4.7 Ensayo empleando una relación G/P 10:1 para la cepa Z69. 98
Tabla 3.4.8 Ensayo empleando una relación G/P 10:1 para la cepa Z69Prp. 99
Tabla 3.4.9 Ensayo empleando una concentración de propionato de 0,5 g/l en la mezcla inicial para la cepa Z69. 101
Tabla 3.4.10 Resultados del ensayo con una concentración de propionato en la mezcla inicial de 0,5 g/l para la cepa Z69Prp. 102
Tabla 4.3.1 Mezcla de reacción para la medida de la actividad de FbPasa. 113
Tabla 4.3.2 Lista de reactivos y concentraciones utilizados en la mezcla para la determinación de la actividad G6PDH. 114
Tabla 4.3.3 Listado de fuentes de carbono y concentración utilizada. 114
Tabla 4.6.1 Crecimiento, síntesis de PHB, consumo de glucosa y rendimientos de transformación de glucosa en biomasa y PHB a distintas velocidades de dilución, de cultivos de la cepa Z69 en quimiostato. 123
Tabla 4.6.2 Resultados obtenidos para cada uno de los tramos con velocidad constante de crecimiento en los cultivos en lote LGI-50 y MMG-50. 129
Tabla 4.6.4 Resumen de los resultados del cultivo en lote. Correspondientes a la fase exponencial de crecimiento (2-10 horas). 134

Tabla 4.6.5 Actividad enzimática de extractos de las cepas Z69(pRK767) y Z69(pRK767::*fbp*). 157
Tabla 4.6.6 Resumen de los resultados de cultivos en lote en condiciones de bio-reactor de las cepas Z69(pRK767::*fbp*) y Z69(pRK767) cultivadas en presencia de glucosa. 159
Tabla 4.6.7 Resultados de DO y glucosa obtenidos del matraz control (glucosa fría) y los matraces con ^{13}C-glucosa para ambas cepas a tiempo inicial, 12 y 15 horas de incubación. 162
Tabla 4.6.8 Resumen de los resultados del cultivo de las cepas Z69(pRK767::*fbp*) y Z69(pRK767) del matraz control. 164
Tabla A 4.1.1.1. Ecuación de Xt ingresada en Metatool. 196
Tabla A 4.1.2.1 % molar medio de Xr, PHB y Acido cítrico 201
Tabla A 4.1.2.2 Relaciones estequeométricas para cada uno de los MEF 202

Abreviaciones

2MCC: ciclo del 2 metilcitrato
3HB: 3-hidroxibutirato
3HV: 3-hidroxivalerato
AcCoA: acetil-Coenzima A
AcnD: 2 metilcitrato deshidratasa
AD1: piruvato carboxilasa
AD2: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
AFM: Análisis de flujos metabólicos
AMEF: Análisis de Modos Elementales de Flujo
BPG13: 1,3 bifosfoglicerato
^{13}C-MFA: Análisis de Flujos Metabólicos basados en marcación isotópica ^{13}C
C/N: relación de moles de carbono/moles de nitrógeno
CaiA: Acil-CoA deshidrogenasa
CAT: Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
CGLX1: isocitrato liasa
CGLX2: malato sintasa
Cit : citrato
CK1 o TCA1: citrato sintasa
CK2: aconitasa
CK3 o TCA2: isocitrato deshidrogenasa
CK4 o TCA3: 2-cetogluconato deshidrogenasa
CK5: succinil-CoA sintetasa
CK6: succinato deshidrogenasa
CK7 o TCA4: fumarasa
CK8 o Mdh: malato deshidrogenasa
CoASH: coenzima A
CPD: piruvato deshidrogenasa
DHP: dihidroxiacetona fosfato
DMF: dimetil formamida
E4P: eritrosa 4-fosfato
ED: Embden Doudoroff
ED1 o Edd: 6-fosfogluconato dehidratasa
ED2 o Eda: 2-ceto-3-deoxigluconato-6-fosfato aldolasa
EMP: Embden-Meyerhof-Parnas

EMP1: hexoquinasa

EMP10 o PyK: piruvato quinasa

EMP2 o Pgi: glucose 6-fosfato isomerasa

EMP4 o Ald: aldolasa

EMP5: triosafosfato isomerasa

EMP6 o Gap: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

EMP7 o Pgk: fosfoglicerato quinasa

EMP8: fosfoglicerato mutasa

EMP9: enolasa

FBA: Análisis de balance de flujos

F16P: frutosa 1,6 bifosfato

F6P: fructosa 6-fosfato

Fum: fumarato

G/P: relación gramos de glucosa/gramos de propionato

G3P: glicerladehído 3-fosfato

G6P: glucosa 6-fosfato

Gliext: glucosa externa

GLN3: fructose 1,6 bifosfatasa

GLX: glioxilato

Gnd: 6-fosfogluconato deshidrogenasa

HA: hidroxiácido

HA-CoA: 3-hidroxiacil-CoA

HA-mcl: Hidroxiácido con largo de cadena media (“medium-chain-length)

HA-scl: Hidroxiácido con largo de cadena corta (“short-chain-length”)

IsoCit: isocitrato

KDPG: 2-ceto-3-deoxi-fosfogluconato aldolasa

KDPG2: 2-ceto-3-deoxigluconato 6-fosfato

KG2: 2-cetogluconato o α-cetogluconato

Mal: malato

ME: Modo elemental

MEF: Modos elementales de flujo

MICDH: 2 metilisocitrato deshudratasa

MmsA: Metilmalonato semialdehido deshidrogenasa

MTBSTFA: *N*-*tert*-Butil dimetillsilil-*N*-metiltrifluoroacetamida

O: oxígeno

OAA: oxalacetato

Paaf: 3-hidroxi isobutiril-CoA hidrolasa

P(3HB-*co*-3HV): Poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato)

PEP: fosfoenolpiruvato

PG2: 2-fosfoglicerato

PG3: 3-fosfoglicerato

PG6: 6-fosfogluconato

Pfk: fosfofructoquinasa

PHA-MCL: Polihidroxiaclancoatos compuestos por hidroxiácidos con largo de cadena media (HA-mcl)

PHAs: Polihidroxialcanoatos

PHA-SCL: Polihidroxiaclancoatos compuestos por hidroxiácidos con largo de cadena corta (HA-scl)

PHB: Poli(3-hidroxibutirato)

PIR o PYR: piruvato

PP: Pentosas Fosfato

PrpB: 2 metilisocitrato liasa

PrpC: 2 metilcitrato sintasa

PrpE: propionato-CoA ligasa

*q*PHB: velocida de síntesis de PHB

*q*S: velocida de consumo de sustrato

Rb5P: ribosa 5-fosfato

Rbl5P: ribulosa 5-fosfato

S7P: sedoheptulosa 7-fosfato

Suc: succinato

SucCoA: succinil-Coenzima A

TPI: triosa fosfato isomerasa

VP1 o Zwf: glucose 6-fosfato deshidrogenasa

VP10 o TktB: transquetolasa

VP6: ribulosa 5-fosfato isomerasa

VP7: ribulosa 5-fosfato 3 epimerasa

VP8 o TktA: transquetolasa

VP9 o Tal: transaldolasa

vvm: volumen de aire/volumen de medio x minuto

X5P: xilosa 5-fosfato

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Panorama Mundial de los plásticos petroquímicos

Se define a los plásticos como aquellas sustancias que poseen elasticidad y flexibilidad en un cierto rango de temperaturas, pudiendo ser moldeadas para adoptar diferentes formas. En un sentido más común, se considera plástico a todo aquel polímero derivado por síntesis química a partir del petróleo u otras sustancias naturales.

Los plásticos tienen variadas aplicaciones en la vida diaria. En el correr del siglo pasado fueron determinantes para el desarrollo de la sociedad, al mejorar las condiciones de vida del hombre y promover avances en la ciencia y tecnología. Sin embargo, desde hace más de dos décadas se ha incrementado la preocupación por el efecto que provocan en el medio ambiente, ya que estos materiales provienen de fuentes limitadas no renovables, requieren muchos años para su degradación biológica y se acumulan en el planeta alterando los ecosistemas.

El aumento de los desechos plásticos está directamente relacionado con el crecimiento de la población, el desarrollo tecnológico, los hábitos de consumo y la creciente producción industrial. Sólo en Estados Unidos, el consumo de artículos plásticos creció más de seis veces entre los años 1960 y 2008 (Eco-cycle, 2010, www.ecocycle.org). Los plásticos petroquímicos son recalcitrantes a la degradación microbiana y algunos de ellos requieren cientos de años para degradarse. Esta problemática ha sido parcialmente resuelta mediante el reciclado y reutilización, que disminuye la cantidad de residuos que se destinan a los vertederos.

El anunciado agotamiento de las reservas de petróleo y los efectos adversos sobre el medio ambiente, han impulsado la búsqueda de alternativas a estos productos como, por ejemplo, los bioplásticos.

1.2 Bioplásticos

Los bioplásticos constituyen una familia de materiales que pueden ser agrupados en tres categorías:

-*Plásticos producidos a partir de fuentes fósiles pero biodegradables*, como el PBAT (adipato tereftalato de polibutileno).

-Plásticos obtenidos de fuentes biológicas (Biobased) o parcialmente biobased, que provienen de fuentes renovables pero no son biodegradables. Los plásticos disponibles de este tipo son: *biobased* PE (polietileno), PP (polipropileno) y PET (tereftalato de polietileno). Todos ellos poseen las mismas propiedades que su análogo petroquímico. Un ejemplo de *biobased* material es el PE verde producido bajo la marca *I'am green*^{TM}, por Braskem (http://www.braskem.com). La materia prima es el bioetanol de primera generación producido a partir de caña de azúcar. El etanol es transformado químicamente a etileno para su posterior polimerización. Este PE verde no es biodegradable, aunque proviene de fuentes renovables y es 100% reciclable.

-Plásticos obtenidos de fuentes biológicas y biodegradables. Dentro de este grupo se encuentra el PLA (poli-láctico), los PHAs (polihdroxialcanoatos) y PBS (polibutilen-succinato o politetrametilen-succinato), todos ellos poliésteres lineales.

Los PHAs son una familia de poliésteres microbianos que han atraído la atención de investigadores, industriales y consumidores como posibles sustitutos de los plásticos petroquímicos. Son polímeros biodegradables y bio-compatibles de alto peso molecular (50.000 a 1.000.000 Da), poseen propiedades termoplásticas y provienen de fuentes renovables. Estas propiedades hacen que estos compuestos sean de interés biotecnológico, ya que pueden ser usados como sustitutos "amigables con el medio ambiente" de los plásticos petroquímicos (Chen et al. 2015). Dada la naturaleza química de los PHAs, se han descrito otras aplicaciones que abarcan su empleo en el área médica, hasta el uso de los monómeros como biocombustibles y como precursores para síntesis química de compuestos más complejos entre otras (Gao et al. 2011; Chen et al. 2015).

La primera iniciativa de producción industrial de PHAs comenzó en la década de los 80. A lo largo de estos años de investigación y desarrollo, diferentes empresas intentaron producir estos polímeros. Actualmente, son varias las compañías en el mundo que están produciendo estos polímeros, principalmente a escala piloto. En la tabla 1.2.1 se incluyen las compañías que produjeron y las que están produciendo estos materiales, la capacidad de producción de las mismas y sus aplicaciones. Los trabajos de investigación y desarrollo en este tema continúan, aunque la producción de los PHAs no se ha podido establecer a escala industrial como el caso de los PLAs (poliésteres de ácido láctico), por el alto costo de producción. El factor que más

contribuye en el precio final de los PHAs es el costo de la materia prima (fuente carbonada) y las bajas relaciones de conversión de las mismas en el producto final (Castilho et al. 2009).

Tabla 1.2.1 Producción de PHAs en el mundo (Extraída y modificada de Chen et al. 2015)

Compañía	Tipo de PHA	Producción (toneladas/año)	Período	Aplicaciones
ICI, UK	P(3HB-co-3HV)	300	1980s a 1990s	Embalaje
Chemie Linz, Austria	PHB	20–100	1980s	Embalaje y dispositivos para la liberación de drogas
btF, Austria	PHB	20–100	1990s	Embalaje y dispositivos para la liberación de drogas
Biomers, Alemania	PHB	desconocido	1990s al presente	Embalaje y dispositivos para la liberación de drogas
BASF, Alemania	PHB, P(3HB-co-3HV)	Escala piloto	1980s a 2005	Embalaje y dispositivos para la liberación de drogas
Metabolix, USA	PHA diversos	desconocido	1980s al presente	Embalaje
Tepha, USA	PHA diversos	PHA implantes médicos	1990s al presente	Bio-implantesmédicos
ADM, USA (con Metabolix)	PHA diversos	50.000	2005 al presente	Materia prima
P&G, USA	PHA diversos	*"ContractManufacture"*	1980s a 2005	Embalaje
Monsanto, USA	PHB, P(3HB-co-3HV)	Producción PHA en plantas	1990s	Materia prima
Meredian, USA	PHA diversos	10.000	2007 al presente	Materia prima
Kaneka, Japón (con P&G)	PHA diversos	desconocido	1990s al presente	Embalaje
Mitsubishi, Japón	PHB	10	1990s	Embalaje
Biocycles, Brazil	PHB	100	1990s al presente	Materia prima

Bio-on, Italia	PHA	10.000	2008 al presente	Materia prima
Zhejiang Tian an, China	P(3HB-co-3HV)	2000	1990s al presente	Materia prima
Jiangmen Biotech Ctr, China	P(3HB-co-3HHx)	desconocido	1990s	Materia prima
Yikeman, Shan-dong, China	PHA	3000	2008 al presente	Materia prima
Tianjin Northern Food, China	PHB	Escala piloto	1990s	Materia prima
Shantou Lianyi Biotech, China	PHA diversos	Escala piloto	1990s a 2005	Embalaje y área medica
Jiang su Nan Tian, China	PHB	Escala piloto	1990s al presente	Materia prima
Shenzhen O'Bioer, China	PHA diversos	desconocido	2004 al presente	
Tianjin Green Bio-Science (+DMS)	P(3HB-co-4HB)	10.000	2004 al presente	Materia prima y embalaje
Shandong Lukang, China	PHA diversos	Escala piloto	2005 al presente	Materia prima y embalaje

PHB (poli-3-hidroxibutirato); P(3HB-co-3HV) (poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato); P(3HB-co-3-HHX (poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidrohexanoato); P(3HB-co-4HB) (poli(3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato)

Por lo tanto, en la actualidad la investigación sobre este tema está orientada principalmente a la utilización de sustratos baratos, a la optimización del proceso fermentativo, la búsqueda de nuevas cepas bacterianas y/o introducción de modificaciones genéticas en cepas productoras para mejorar su eficiencia mediante cambios del metabolismo celular. En lo que refiere al empleo de sustratos de bajo costo derivados de emprendimientos agro-industriales, se tiende a incorporar la producción de PHAs en cadenas industriales o biorefinerías, como por ejemplo, las asociadas a la producción de biocombustibles.

1.3 Polihidroxialcanoatos (PHAs)

Los PHAs son polímeros sintetizados naturalmente por una amplia variedad de bacterias Gram- y Gram+, arqueas, cianobacterias y bacterias fotosintéticas (Chen 2010; Koller et al. 2007; Chee et al. 2010). Estos polímeros constituyen una forma de almacenamiento de carbono y energía, siendo acumulados en el citoplasma en forma de gránulos (figura 1.3.1)(Anderson & Dawes 1990; Madison & Huisman 1999; Pieja et al. 2011).Una de las ventajas que tienen los organismos al sintetizar los PHAs es la posibilidad de acumular grandes cantidades de carbono reducido sin afectar la presión osmótica de la célula. La acumulación de este material ocurre cuando el crecimiento microbiano se ve desfavorecido por las condiciones del ambiente (medio de cultivo o ambiente natural), dado por la limitación de algún nutriente esencial (nitrógeno, fósforo, oxígeno) en presencia de un exceso de fuente de carbono (Anderson & Dawes 1990; Madison & Huisman 1999). Cuando las condiciones de crecimiento se restauran, las células degradan este material de reserva utilizándolo como fuente de carbono. En condiciones de acumulación, los gránulos de PHAs pueden llegar a representar hasta el 80% del peso de la célula bacteriana (Luengo et al. 2003).

En cuanto a la estructura química, los PHAs constituyen una familia de poliésteres cuya fórmula general se muestra en la figura 1.3.2. Las unidades monoméricas de estos polímeros son los hidroxiácidos (HAs), unidos mediante enlace éster. En 1925, el microbiólogo Maurice Lemoigne describió la presencia de PHB (poli-3-hidroxibutirato) en la bacteria *Bacillus megaterium*, constituyéndose en el primer PHA identificado. El PHB es el representante de los PHAs más abundante entre los diferentes géneros bacterianos analizados y por lo tanto el más estudiado. En el correr de los años fueron identificados varios tipos de PHAs con más de 150 diferentes unidades monoméricas (Steinbüchel & Valentin 1995).

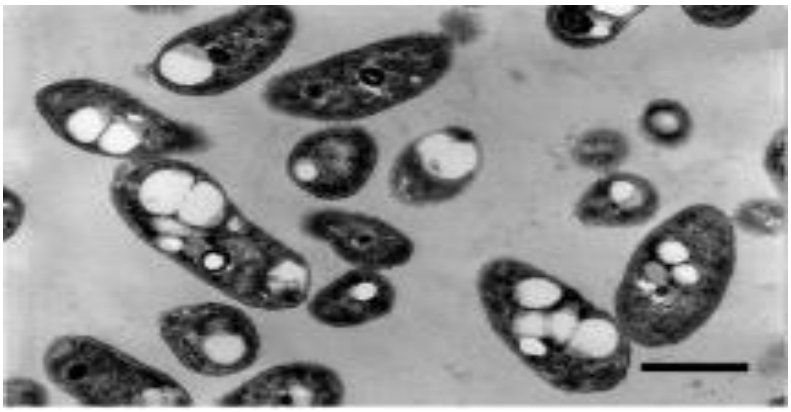


Figura 1.3.1. Microfotografía de transmisión electrónica de *Pseudomonas putida* Se observan los gránulos de PHA acumulados en el citoplasma. (Foto extraída de Luengo et al. 2003)

Todos los HAs componentes de los PHAs poseen configuración absoluta *R*, ya que la enzima que los reconoce y polimeriza, la PHA sintasa, es esteroespecifica y no polimeriza el enantiómero *S* (Anderson & Dawes 1990; Madison & Huisman 1999; Park et al. 2012).

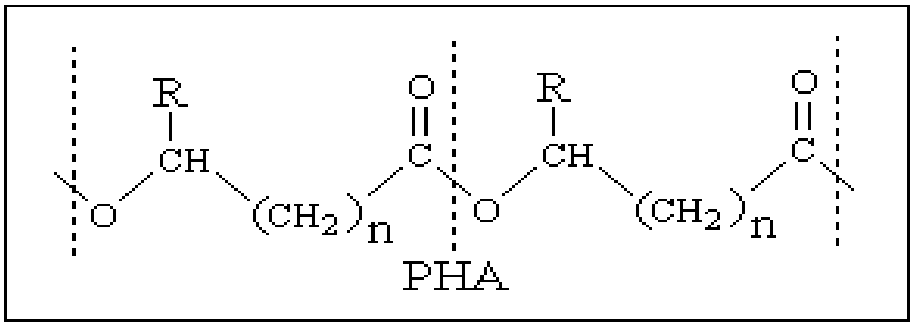
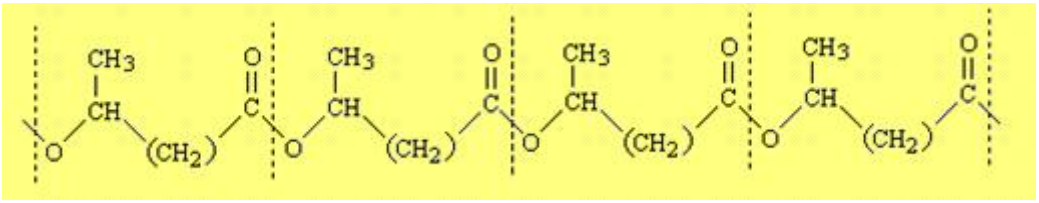


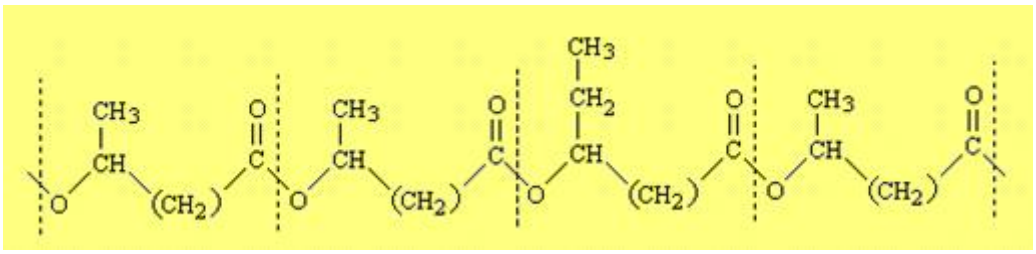
Figura 1.3.2 Estructura general de los PHAs.

R: H, CH_3, CH_2CH_3, $CH_2CH_2CH_3$, $(CH_2)_4CH_3$, $(CH_2)_8CH_3$, $(CH_2)_mAr$

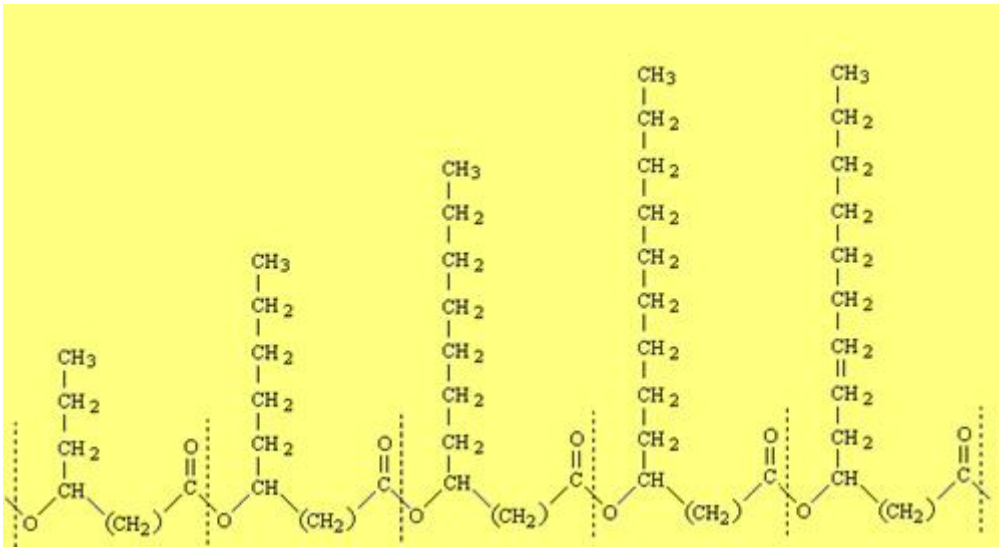
n = 1, 2, 3



PHB



P(3HB-*co*-3HV)



PHA MCL

Figura 1.3.3 Estructura química del PHB, P(3HB-*co*-3HV) y PHA-MCL.

Los PHAs se clasifican de acuerdo al largo de cadena carbonada de los HAs que los constituyen. Los PHA-SCL, (“Short-Chain-Length”), contienen monómeros con cadena carbonada de 3 a 5 átomos de carbono (HA-scl). Dentro de este grupo se encuentra el PHB. Los PHA-MCL,(“Medium-Chain-Length”) están compuestos por HAs con cadenas carbonadas entre 6 y 14 átomos de carbono (HA-mcl) (Anderson & Dawes 1990; Madison & Huisman 1999; Khanna & Srivastava 2005; Chen et al. 2015). A su vez, los PHAs compuestos por un solo tipo de HA se denominan homopolímeros. Los

copolímeros poseen dos tipos de monómeros y los terpolímeros más de dos (figura 1.3.3).

La composición química determina las propiedades plásticas, como la elasticidad y dureza. La composición también afecta la biodegradabilidad del producto (Khanna & Srivastava 2005; Madison & Huisman 1999). En la tabla 1.3.1 se muestran las propiedades físicas de distintos PHAs comparadas con las del polipropileno. El PHB es quebradizo (bajo % de elongación) y posee una alta temperatura de fusión. Sin embargo, dentro de la clase de PHA-SCL, el copolímero Poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) [P(3HB-*co*-3HV)], posee una menor temperatura de fusión (Tm entre 160 y 75 ºC), y es menos quebradizo que el PHB. Estas propiedades dependen del porcentaje de 3HV presente en el copolímero (0-40mol%) y de su distribución en el mismo (Savenkova et al. 2000). El P(3HB-*co*-3HV) tiene una mayor aplicabilidad en virtud de exhibir un mejor perfil de propiedades físicas y químicas.

Tabla 1.3.1 Propiedades de los PHAs y el polipropileno (Tabla extraída y modificada de Madison & Huisman, 1999)

Parámetros	***Polímeros*[a]**				
	PHB	**P(3HB-co-3HV)**	**P(3HB-co-4HB)**	**P(3HO-co-3HH)**	**PP**
***Tm (ºC)*[b]**	177	145	150	61	176
***Tg (ºC)*[c]**	2	-1	-7	-36	-10
Cristalinidad (%)	70	56	45	30	60
Extensibilidad (%)	5	50	444	300	400

[a]P(3HB-*co*-3HV) es poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) con un 20mol% de 3HV; P(3HB-*co*-4HB) es poli(3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato) con 16mol% de 4HB; P(3HO-*co*-3HH) es poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) con 11mol% de 3HH, y PP es polipropileno.
[b]*Tm* temperatura de fusión ("melting temperature")
[c]*Tg* temperatura de transición de vidrio ("glass transition temperature")

Los polímeros con contenidos de 5 a 20 mol% de monómeros HV mejoran las propiedades del producto, comparables a las de las poliolefinas como el polietileno (PE) y polipropileno (PP). Además, los copolímeros se funden a temperaturas menores que el homopolímero, mejorando el procesamiento del material fundido. En general son utilizados para la elaboración de envases y para otros artículos difíciles de reciclar como los dispositivos médicos que resultan contaminados durante su uso. Por otro lado, los PHA-MCL poseen en general una baja temperatura de fusión y un alto porcentaje de estiramiento, comportándose como verdaderos elastómeros.

1.3.1 Metabolismo de los PHAs

La composición del PHA que un microorganismo puede sintetizar depende del sustrato carbonado agregado al medio de cultivo, de las rutas metabólicas y de la especificidad de la enzima PHA sintasa que reconoce los HAs y los polimeriza.

La biosíntesis de los PHAs se puede separar en dos etapas. La primera etapa abarca la síntesis de los tioésteres de HAs, con la estructura (*R*)-hidroxiacil-CoA (HA-CoA). Estos tioésteres son los verdaderos sustratos de la PHA sintasa. Para la síntesis de los HAs participan diferentes vías metabólicas del metabolismo central, la rutas catabólicas de carbohidratos (Embden-Meyerhof-Parnas, Embden Doudoroff, Pentosas Fosfato), la β-oxidación o la síntesis de “novo” de ácidos grasos (Chen 2010). El metabolismo de carbohidratos, ácidos grasos y otros, generan intermediarios como por ejemplo acetil-CoA, (*S)*-hidroxiacil-CoA o *(R)*-hidroxiacil-ACP, los cuales gracias a las enzimas presentes en los organismos productores de PHAs van a ser transformados al correspondiente tioéster *(R)*-HA-CoA de conformación adecuada (Chen 2010).

La segunda etapa abarca la polimerización, la cual ocurre mediante la formación del enlace éster entre los HA-CoA, reacción catalizada por la enzima PHA sintasa (PhaC), con la concomitante liberación de CoA. Además de ser esteroespecífica, la enzima PhaC tiene cierta selectividad en cuanto al largo de cadena del monómero que reconoce (Luengo et al. 2003; Park et al. 2012). Las PHA sintasas bacterianas se clasifican en cuatro grupos de acuerdo a la especificidad de sustrato, la estructura primaria deducida a partir de las secuencias nucleotídicas y al número de diferentes subunidades que constituyen la enzima activa (Rehm 2003). La **clase I** comprende

enzimas con una sola subunidad PhaC (codificada por el gen *phaC*). Estas enzimas reconocen preferencialmente HA-scl y están presentes en aquellos microorganismos que acumulan el homopolimero PHB, y el copolímero P(3HB-*co*-3HV). La **clase II** de PhaC es similar a la clase I pero reconoce preferencialmente HA-mcl. Estas enzimas han sido identificadas en *Pseudomonas*. Las enzimas de las **clases III** y **IV** reconocen monómeros de cadena corta pero están formadas por subunidades diferentes a las de las clase I y II (PhaC y PhaE o PhaC y PhaR). Las PHA sintasas clase III son características de *Allochromatium vinosum* y *Thiocystis violace.*

1.3.1.1. Síntesis de PHB y P(3HB-*co*-3HV)

La vía clásica de síntesis de (*R*)-3-hidroxibutiril-CoA (3HB-CoA), precursor del monómero que forma parte del PHB y del P(3HB-*co*-3HV), ocurre a partir del acetil-CoA. Dos moléculas de acetil-CoA se condensan formando acetoacetil-CoA (o 3-cetobutiril-CoA) por acción de la enzima 3-cetotiolasa (gen *phb*A). Este tioéster se reduce luego a (*R*)-3-hidroxibutiril-CoA en un paso catalizado por la enzima acetoacetil-CoA reductasa dependiente de NADPH (gen *phb*B). Finalmente, el 3HB-CoA es incorporado en la cadena de PHB por la PHB sintasa (Steinbüchel 2001) (figura 1.3.4). Algunos microorganismos como *Rhodospirillum rubrum* expresan la ruta clásica de síntesis de PHB, aunque la reducción del acetoacetil-CoA es catalizada por una reductasa dependiente de NADH. Esta enzima reduce el acetoacetil-CoA a (*S)*-3HB-CoA, el cual es luego convertido a (*R*)-3HB-CoA, reacción mediada por una enoil-CoA hidratasa esteroespecífica vía crotonil-CoA (Anderson y Dawes, 1990).

La organización de los genes que codifican para la enzimas de la ruta clásica de síntesis están localizados en “tándem” y forman el operón biosintético *phb* en bacterias como *Ralstonia eutropha*, *Acinetobacter* y *Alcaligenes latus,*entre otras (Madison & Huisman 1999). Por otro lado, en *Zooglena ramigera*, *Sinorhizobium meliloti, R. rubrum*, *Rhodobacter capsulatus,* los genes *phbAB* y *phbC* están separados en el genoma (Madison & Huisman 1999).

La ruta clásica de síntesis de PHB requiere como molécula clave el acetil-CoA. Sin embargo, en *Aeromonas caviae,* cuando la fuente de carbono es un ácido graso de cadena par, se obtiene 3HB-CoA a partir del crotonil-CoA (intermediario de la β-

oxidación) mediante la acción de la enzima enoil-CoA hidratasa (gen *phaJ*) (Fukui & Doi 1997; Fukui et al. 1998).

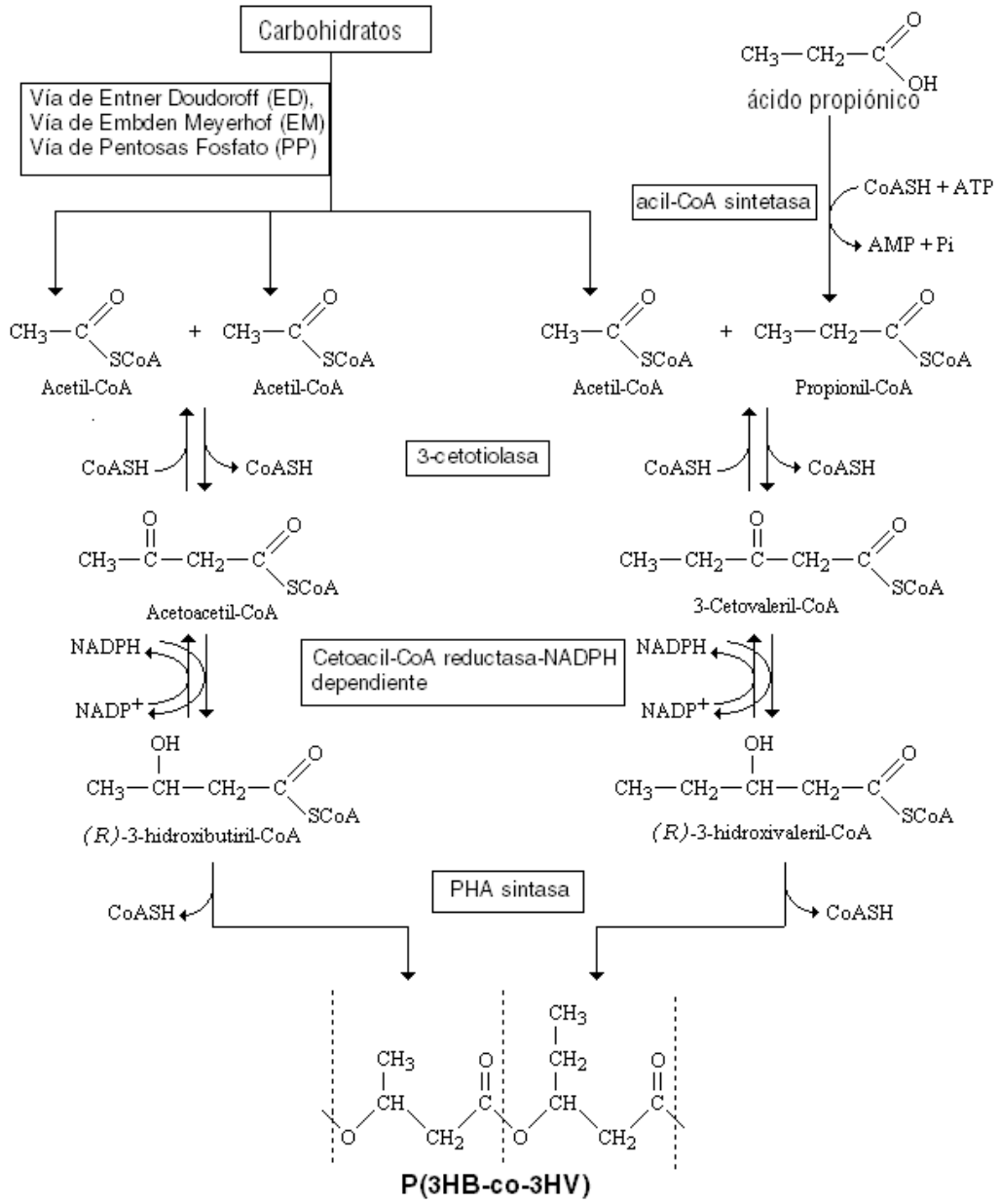


Figura 1.3.4 Ruta metabólica para la síntesis de P(3HB-*co*-3HV) en *R. eutropha* y *Burkholderia sacchari* (Figura extraída y modificada de Cabrera Gómez, curso Cabbio 2009).

La biosíntesis de P(3HB-*co*-3HV) requiere además del 3HB-CoA el (*R*)-3-hidroxivaleril-CoA (3HV-CoA). El 3HV-CoA puede obtenerse de la condensación de una molécula de acetil-CoA con una de propionil-CoA, generando el 3-cetovaleril-CoA, prosiguiendo luego por la ruta clásica de síntesis hasta el tioéster 3HV-CoA (figura 1.3.4). En *R. eutropha* se ha descrito una enzima homóloga a la 3-cetotiolasa, codificada en este caso por el gen *bkt*. Esta enzima es capaz de reconocer propionil-CoA y catalizar su condensación con una molécula de acetil-CoA (Slater et al. 1998). En la figura 1.3.4 se muestra las vías de síntesis por la ruta clásica tanto del monómero 3HB y 3HV para *R. eutropha* y *B. sacchari* a partir de acetil-CoA y propionil-CoA.

A diferencia del acetil-coA que es un intermediario del metabolismo central independiente de la fuente de carbono utilizada, el propionil-CoA sólo es sintetizado bajo ciertas condiciones fisiológicas y a partir de un acotado número de sustratos. En la figura 1.3.5 se muestran las posibles fuentes de propionil-coA para la síntesis de 3HV-CoA.

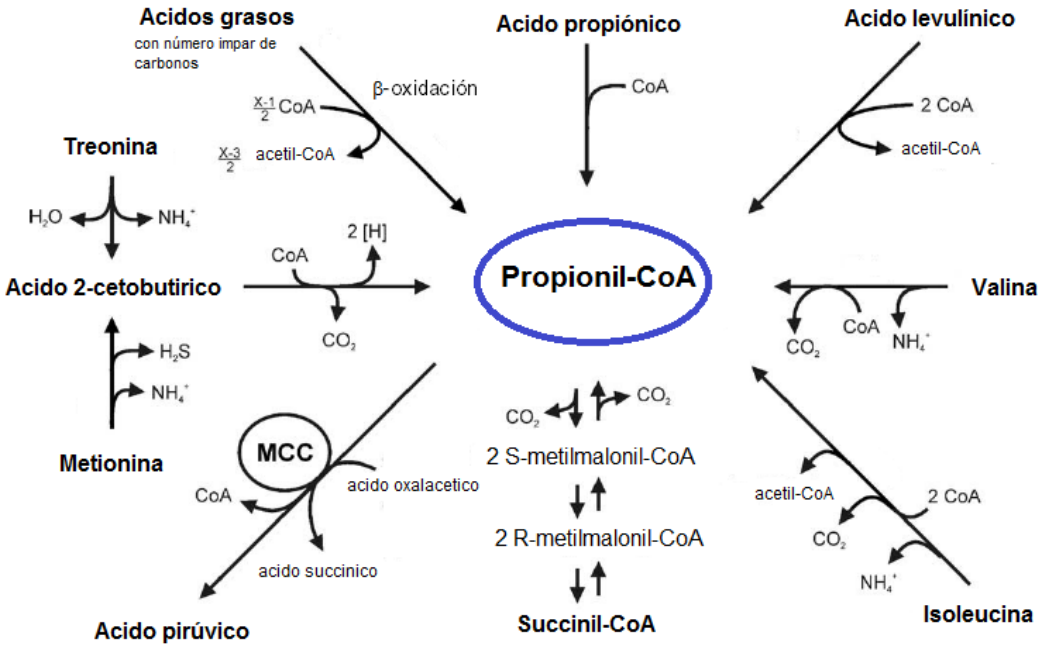


Figura 1.3.5 Posibles fuentes de propionil-CoA (Figura extraída y modificada de Steinbüchel & Lütke-Eversloh, 2003).

Generalmente, para la síntesis de P(3HB-*co*-3HV) se adiciona ácido propiónico al medio de cultivo. Por otro lado, el monómero 3HV-CoA puede obtenerse a partir de la degradación de un ácido graso de número impar de átomos de carbono, el cual es degradado por la vía de β-oxidación. De esta manera se generan intermediarios como cetovaleril-CoA (de la misma forma que sucede con el crotonil-CoA), que pueden ser reducidos directamente al enantiómero *R* de 3HV-CoA.

1.3.2. Proceso fermentativo para la producción de PHA

En los microorganismos que acumulan PHAs, la síntesis de estos polímeros compite con el crecimiento por la fuente de carbono. Los organismos productores de PHAs se dividen en dos grupos. Uno está constituido por microorganismos que acumulan estos polímeros en la fase estacionaria de crecimiento y el otro comprende los microorganismos en los cuales la síntesis de PHAs ocurre asociada al crecimiento. Para ambos grupos de microorganismos productores, el proceso fermentativo se basa en una primer etapa en la cual se prioriza la generación de biomasa y en una segunda etapa en la cual, mediante la limitación en algún nutriente esencial para el crecimiento, se incrementa la síntesis del polímero.

En general, la producción industrial de PHAs se efectúa mediante fermentación alimentada (*fed-batch*) en bio-reactor. La solución de alimentación se modifica durante el proceso. En la primera etapa, la solución de alimentación es la adecuada para generar biomasa y luego se la modifica para promover la limitación del cultivo en algún nutriente esencial, como por ejemplo el nitrógeno. Como consecuencia se logra una eficiente síntesis de PHAs a partir de la biomasa generada en la fase anterior (Madison & Huisman 1999; Khanna & Srivastava 2005). En el caso de los microorganismos que sintetizan PHAs en fase estacionaria de crecimiento, la etapa de producción es óptima cuando la concentración del nutriente limitante es indetectable en el medio de cultivo. *R. eutropha*, por ejemplo, acumula cerca de un 80 % (w/w) de PHB cuando la concentración de nitrógeno o fósforo en el medio se torna indetectable (Khanna & Srivastava 2005; Shang et al. 2003). En el caso de bacterias que acumulan polímero asociado al crecimiento, la solución de alimentación debe asegurar una adecuada relación de nutrientes (relación óptima de concentraciones de fuente de carbono y

nutriente(s) limitante(s), para balancear el crecimiento celular y la acumulación de PHA (Lee, 1996).

Los cultivos continuos con doble limitación de nutrientes (sustrato carbonado y algún nutriente esencial para el crecimiento) han permitido alcanzar niveles de acumulación de PHA comparables a los de cultivos con exceso de fuente de carbono y limitación de un nutriente esencial (Poblete-Castro et al., 2012; Zinn et al., 2004). Esta estrategia permite mejorar el aprovechamiento del sustrato carbonado, lo cual se traduce en una disminución del costo de generación de los polímeros.

En la década del 90, para la producción industrial (ICI, Imperial Chemical Industries) de P(3HB-*co*-3HV) por *R. eutropha* se empleaba una mezcla de glucosa y ácido propiónico como fuente de carbono en cultivos alimentados. Esta iniciativa industrial no prosperó, debido al costo de la materia prima, el ácido propiónico es un sustrato relativamente costoso. El desarrollo de la investigación ha permitido diseñar nuevas estrategias para producir el copolímero de forma más económica y eficiente. Una de ellas es la construcción de cepas recombinantes que mediante la expresión o eliminación de genes promuevan la producción endógena de propionil-CoA sin la necesidad de adicionar un co-sustrato. En la figura 1.3.5 se muestran diferentes rutas del metabolismo central que pueden aportar dicho intermediario. Este es el caso de una cepa recombinante de *Salmonella entérica* serovar *typhimurium* capaz de producir propionil-CoA a partir del succinil-CoA derivado del ciclo de los ácidos tricarboxilicos (CAT). También se diseñó una cepa de *E. coli* capaz de sintetizar el propionil-CoA a través del 2-cetobutirato derivado de la desaminación de treonina (Aldor et al. 2002; Chen et al. 2011; Yang et al. 2014). En ambos casos, estas cepas recombinantes también fueron mutadas en el gen *prpC*, que codifica para la enzima 2-metilcitrato sintasa del ciclo del 2-MetilCitrato (2MCC) de degradación del propionil-CoA. Otra estrategia consiste en la modificación de cepas productoras naturales de PHB como *R. eutropha* o *B. saccarhi* capaces de consumir ácido propiónico como fuente de carbono. Estas cepas fueron mutadas en el gen *prp*C de la ruta del 2MCC, permitiendo derivar este intermediario a la síntesis de 3HV. En el caso de la cepa IPT198 de *B. sacchari* mutante en el ciclo del 2MCC, incapaz de crecer en ácido propiónico, fue capaz de transformar este sustrato en monómeros de 3HV con una eficiencia próxima a la teórica cuando se cultivó bajo régimen alimentado utilizando como fuente de carbono una mezlca de sacarosa y ácido propiónico en una relación fija y una velocidad de

alimentación controlada (Rocha et al. 2008). En estos casos, la combinación de modificaciones genéticas con una adecuada estrategia de fermentación permitió alcanzar rendimientos muy próximos al teórico.

1.3.3 Modificaciones genéticas orientadas a mejorar la producción de PHB y P(3HB-*co*-3HV)

Se han desarrollado varios estudios que involucran la incorporación de modificaciones genéticas a organismos productores de PHA, en donde se aumentó el número de copias de genes relevantes para la síntesis del polímero. Estas modificaciones fueron generadas para aumentar el contenido de PHA o modificar la composición del mismo (Aldor & Keasling 2003). En general, estas modificaciones no han incrementado la producción en niveles destacables. Por ejemplo, *R. eutropha* portando una copia extra del gen *pha*C exhibió un mayor porcentaje de monómeros 3HV en P(3HB-*co*-3HV) que la cepa salvaje, pero el contenido (peso de polímero/peso seco de células totales) total de polímero producido fue similar. Por otro lado, *Alcaligenes latus* portando una copia extra de su propio gen *pha*C, exhibió un aumento del contenido (g PHB/g peso celular seco) de PHB, de 50,2% a 65%. En este caso, la copia extra del gen *phaC* promovió un aumento de la actividad específica de las tres enzimas involucradas en la síntesis de PHB (β-cetotiolasa, acetoacetil-CoA reductasa y PHB sintasa (Lee et al. 2000). En otro estudio, una cepa recombinante de *R. eutropha* portando el operón *phaCBA* en un plásmido, exhibió un pequeño aumento del contenido de PHB de 33 a 40%. Este aumento fue pequeño comparado con el que exhibieron las actividades específicas de las enzimas involucradas, de 1,5 a 3 veces (Park et al. 1995). Los estudios posteriores con esta cepa recombinante en condiciones de cultivo en *fed batch* mostraron un aumento de la productividad, con una reducción en el tiempo de fermentación del 20% (Park et al. 1995).

En otro estudio se transfirió el operón *phaCAB* de *R. eutropha* a una cepa de *Synechocystis* que acumula normalmente PHAs cuando crece en varias fuentes de carbono. En este caso sólo se observó un leve cambio en la acumulación de PHA, a pesar de que la actividad específica de la enzima PHA sintasa se duplicó. En este caso, la producción aumentó levemente en presencia de condiciones limitantes de nitrógeno y con acetato como fuente de carbono (Madison & Huisman 1999).

Estos resultados sugieren que la acumulación de polímero no depende exclusivamente de las enzimas involucradas en su síntesis y que el metabolismo central ejerce un control importante del proceso, posiblemente debido a los niveles intracelulares de poder reductor.

1.4 Ingeniería Metabólica

El empleo de microorganismos para la obtención de productos biotecnológicos como combustible (Lu 2010), aminoácidos (Park & Lee 2008), compuestos bio-farmacéuticos (Demain & Vaishnav 2009), bioplásticos (Wang et al. 2014) entre otros, se ha incrementado en los últimos años. El crecimiento celular (biomasa) y la síntesis de productos requieren moléculas precursoras, suministradas por la acción de diferentes rutas metabólicas interconectadas. El aumento de la productividad de compuestos de interés mediante la inactivación o sobre-expresión de genes por ingeniería genética no siempre ha sido exitoso. Los cambios genéticos pueden promover una resistencia del metabolismo a esas alteraciones, generándose en ocasiones fenotipos no esperados. Se requiere una mejor comprensión de las vías metabólicas para poder definir los cambios genéticos de forma más adecuada y exitosa.

El estudio del metabolismo integrado como sistema (Biología de Sistemas), constituye un área de investigación relativamente reciente, aplicada con bastante éxito al estudio de microorganismos y en estado incipiente al trabajar con eucariotas como las plantas (Fuhrer et al. 2005; Roessner-Tunali et al. 2004) y tejidos humanos (Shlomi et al. 2008). El metabolismo controla las condiciones físicas y químicas intracelulares de un organismo, lo que le permite cumplir con sus actividades fisiológicas y crecer de forma óptima en determinadas condiciones. En la actualidad se considera que el mejoramiento en la productividad requiere la manipulación de las actividades de múltiples enzimas en diferentes puntos del metabolismo celular (Stephanopoulos 1999). Para optimizar la formación de un producto, se debe identificar, conocer y manipular las vías metabólicas activas en distintas condiciones de crecimiento.

Es así que surge el concepto de Ingeniería Metabólica. Bailey (Bailey 1991) definió la Ingeniería Metabólica como “el mejoramiento de las actividades celulares por manipulación de funciones enzimáticas, transporte y regulatorias de la célula, empleando la tecnología del ADN recombinante”. Actualmente, la Ingeniería

Metabólica puede considerarse como un proceso cíclico (Nielsen 2001) comprendiendo los siguientes pasos: 1) análisis del funcionamiento metabólico de un organismo, 2) identificación de las modificaciones genéticas que permitan mejorar su desempeño en la biosíntesis de un producto de interés y 3) construcción de una nueva cepa recombinante (figura 1.4).

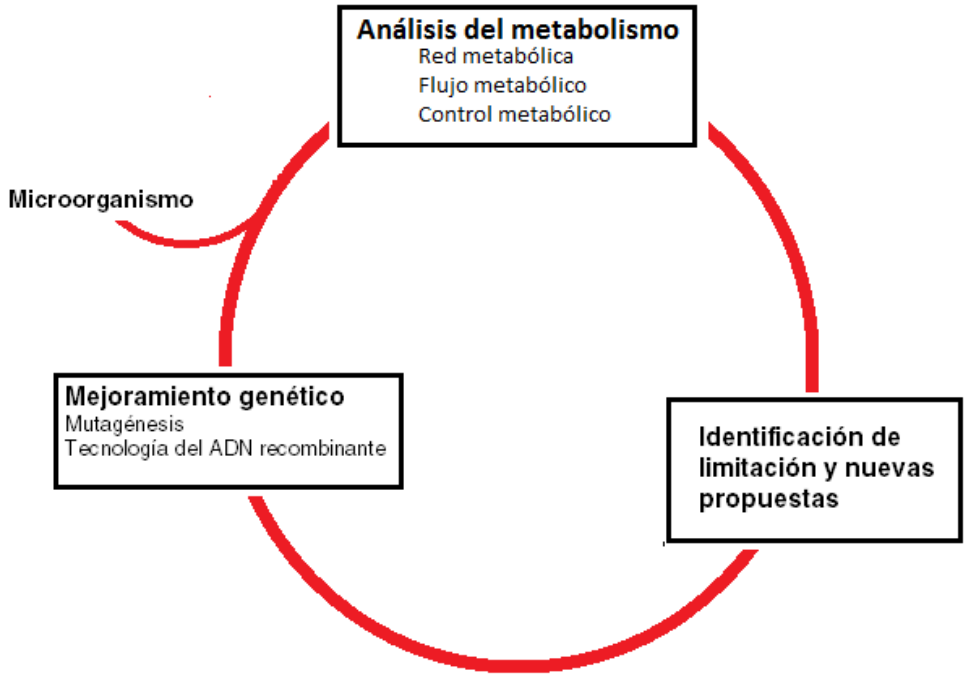


Figura 1.4 Etapas que involucra la Ingeniería Metabólica (Figura extraída y modificada de clase CABBIO 2008 Gregorio Gomez).

Esta tercera etapa abarca técnicas ampliamente difundidas de ingeniería genética. Los dos primeros pasos definen el blanco más adecuado de manipulación genética para una mejora del proceso de biosíntesis. Para ello es necesario analizar el funcionamiento real de la red metabólica mediante un análisis cuantitativo de las vías y buscar la situación óptima y factible, desde el punto de vista metabólico, para la producción del producto de interés.

1.4.1. Análisis de la red metabólica: análisis de flujos metabólicos

La aplicación de herramientas matemáticas permite analizar el metabolismo celular mediante la determinación de flujos metabólicos. El metabolismo celular (red metabólica) se representa en forma matemática como un conjunto de metabolitos (nodos) conectados por reacciones bioquímicas (flechas). Un flujo se define como la velocidad a la que un sustrato se convierte en un producto, vía una reacción bioquímica dentro de una red metabólica. La distribución de flujos metabólicos define el fenotipo celular en una condición de crecimiento dada.

Los flujos metabólicos son calculados en base a un modelo estequiométrico (mapa de vías), describiendo las reacciones metabólicas (n) del sistema y aplicando el principio de conservación de masas para cada metabolito (m) dentro de dicho sistema. El sistema de ecuaciones así generado se puede expresar en forma de matriz estequiométrica, lo que representa la topología de la red metabólica (figura 1.4.1).

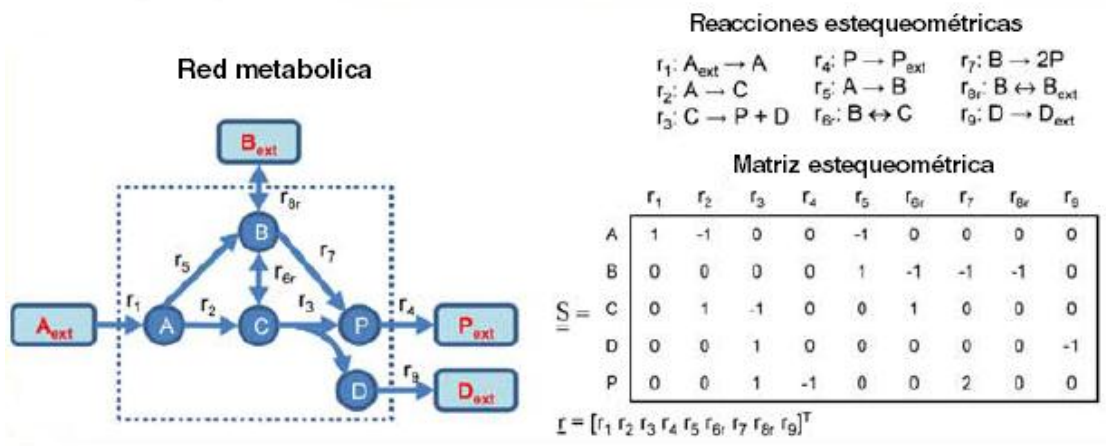


Figura 1.4.1 Esquema del principio matemático para la elaboración de la matriz estequiométrica (Figura obtenida y modificada de Trinh et al. 2009).

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

$$\frac{dc}{dt} = S \times r \qquad (1)$$

En esta ecuación, *c* ($c_1, c_2, \ldots, c_m$) es el vector con la concentración intracelular de los metabolitos, r=($r_1, r_2, \ldots, r_n$) es el vector con los flujos a través de cada reacción, y *S es la matriz estequiométrica* de m x n, cuyos elementos s_{ij} representan el coeficiente estequiométrico del elemento *i* involucrado en la reacción *j.* Para la resolución del sistema de ecuaciones se requiere de los datos generados bajo ciertas condiciones experimentales. El cultivo debe encontrarse en un estado estacionario o *cuasi*-estacionario (*i.e.*, la concentración intracelular de cada metabolito y el flujo asociado al mismo deben ser constantes durante el experimento) (Stephanopoulos 1999). Las condiciones de estado estacionario se alcanzan en cultivos continuos (quimióstatos) o bajo ciertas condiciones, en la fase exponencial de un cultivo *batch* o *fed-batch* (en este último caso, con variaciones mínimas en la tasa de alimentación del bio-reactor). Para cualquiera de estas condiciones de equilibrio estacionario no existe acumulación neta de cada metabolito, ya que en estas condiciones la suma de los flujos "de entrada" para cada metabolito iguala a la suma de los flujos "de salida". Considerando un cultivo microbiano en condiciones de equilibrio estacionario, las concentraciones de biomasa (X), producto (P) y sustrato (S) remanente se mantienen constantes.

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). Teniendo en cuenta estos supuestos, los balances de masa de cada metabolito pueden ser descritos por un sistema homogéneo de ecuaciones lineales:

$$S.r = 0 \qquad (2)$$

En cuanto a la termodinámica, las reacciones deben proceder en la dirección apropiada. Esto determina una nueva restricción al sistema, ya que en las reacciones irreversibles el valor del flujo debe ser positivo:

$$ri \geq 0$$

En el metabolismo celular, normalmente se dispone de más reacciones (*n*) que metabolitos (*m*), por lo que el sistema es indeterminado. El número de metabolitos define el número de balances mientras que el número de reacciones es desconocido. En el ejemplo de la figura 1.4.1 existen 5 metabolitos y 9 flujos para determinar. El espacio definido por la ecuación (2) es indeterminado con *n-m* grados de libertad (Llaneras & Picó 2008). Dadas las restricciones termodinámicas, las reacciones deben proceder en la dirección apropiada.

Son varias las estrategias que se han desarrollado para resolver este problema (métodos para estudiar los flujos *in vivo*): 1) Análisis de balance de flujos (FBA) (Price et al. 2004; Kauffman et al. 2003); 2) Análisis de rutas metabólicas (Klamt & Stelling 2003); 3) Análisis de Flujos Metabólicos basados en marcación isotópica ^{13}C (^{13}C-MFA) (Fischer et al. 2004; Stephanopoulos 1999).

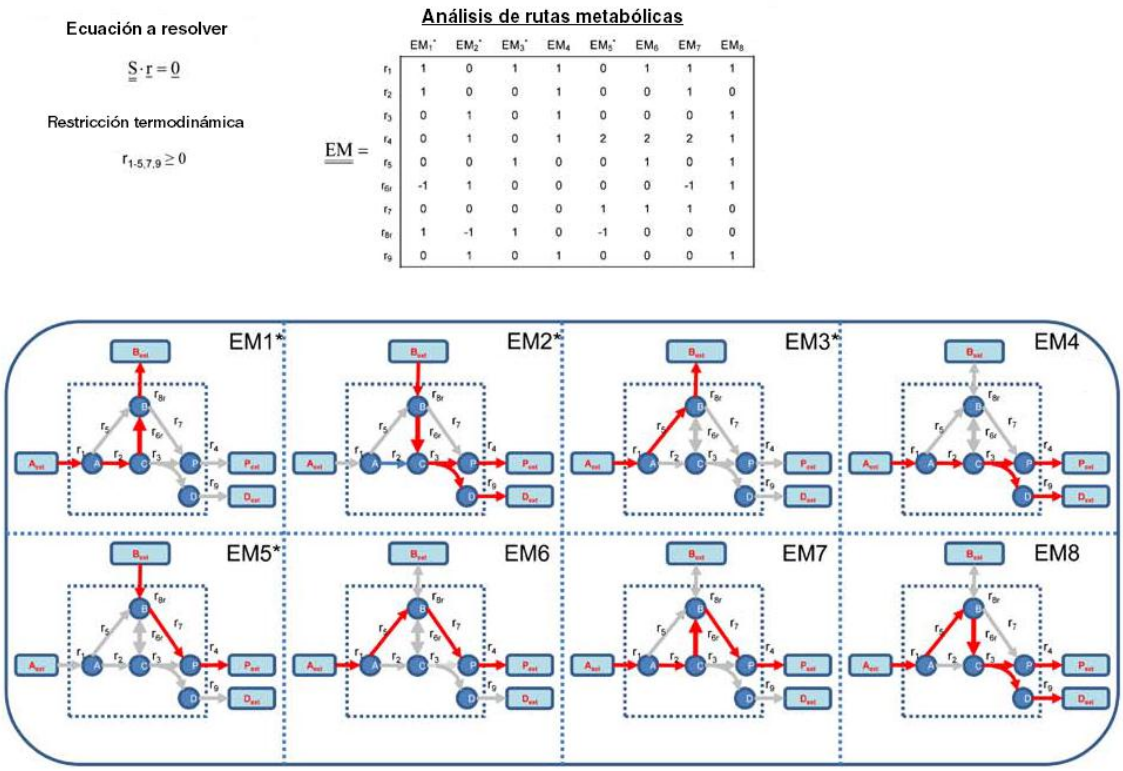
En este trabajo se van a describir el análisis de rutas metabólicas y el análisis de flujos metabólicos basados en marcación isotópica.

1.4.2. Análisis de rutas metabólicas: Modos elementales de flujo (MEF)

En general, el análisis de rutas metabólicas identifica la topología “estructura” del metabolismo celular, basado únicamente en la estequiometria y las restricciones termodinámicas de las reacciones. El análisis de modos elementales de flujos (AMEF) es una de las técnicas que permiten analizar rutas metabólicas. En el AMEF se descompone la compleja red metabólica en pequeños grupos de reacciones (enzimas), denominados modos elementales (ME). Un ME satisface el balance de masas de intermediarios y cofactores y no se puede descomponer (Papin et al. 2003; Trinh et al. 2009). Esto último, se traduce en que si una de las reacciones es eliminada del modo, ese modo deja de ser funcional (Papin et al. 2004). Siguiendo el ejemplo de

la red presentada anteriormente (figura 1.4.1), el AMEF se muestra en la figura 1.4.2. El AMEF permite identificar todos los posibles estados metabólicos inherentes a la red sin requerimientos de medida de flujos (por ejemplo velocidad de consumo de sustrato, velocidad de síntesis de productos, etc), ni imponiendo funciones objetivo como en el caso de Análisis de balance de flujo (Trinh et al. 2009).

Considerando un cultivo bacteriano donde el sustrato es un carbohidrato y el producto es simplemente la biomasa, la conexión entre ellos es a través de reacciones que representan un modo elemental, el cual puede ser interpretado como una reacción bioquímica global. Es posible adicionar restricciones extras para acotar el número de soluciones y dichas restricciones pueden generarse a partir de datos experimentales.



	EM_1^*	EM_2^*	EM_3^*	EM_4	EM_5^*	EM_6	EM_7	EM_8
r_1	1	0	1	1	0	1	1	1
r_2	1	0	0	1	0	0	1	0
r_3	0	1	0	1	0	0	0	1
r_4	0	1	0	1	2	2	2	1
r_5	0	0	1	0	0	1	0	1
r_{Br}	-1	1	0	0	0	0	-1	1
r_7	0	0	0	0	1	1	1	0
r_{Br}	1	-1	1	0	-1	0	0	0
r_9	0	1	0	1	0	0	0	1

Figura 1.4.2 Esquema del análisis de rutas metabólicas (Figura extraída de Trinh et al., 2009).

El análisis de esas rutas metabólicas permite determinar la capacidad y función celular bajo diferentes condiciones de estudio (Radhakrishnan et al. 2010; Unrean & Nguyen 2012). De esta manera, se puede predecir *in silico,* el fenotipo que se presentaría si la red se perturba ya sea por cambios del medio ambiente y/o por manipulación genética como eliminación o sobreexpresión de genes (Poblete-Castro et al. 2013). Así, el análisis de modos elementales es una herramienta adecuada para diseñar un sistema celular eficiente, dado que es posible predecir los blancos de manipulación genética que lleven a la mejora de la producción del producto deseado (Poblete-Castro et al. 2013; Gruchattka & Kayser 2015).

El AMEF ha sido usado para modificar cepas de forma racional, orientado a la producción de compuestos de interés. Se han publicado varios trabajos usando *E. coli* como organismo de estudio, dado que se conoce muy bien su genética, fisiología y metabolismo. Por ejemplo, esta estrategia permitió modificar una cepa de *E. coli* para crecer y producir isobutanol a partir de glucosa en condiciones anaeróbicas (Trinh et al. 2011). Asimismo, esta misma aproximación permitió optimizar la síntesis de carotenoides, biomasa y etanol por cepas de *E. coli* (Unrean et al. 2010; Trinh et al. 2006; Trinh et al. 2008). Esta estrategia también se ha aplicado a otros microorganismos de interés industrial como *Corynebacterium glutamicum*. En este caso, el AMEF se utilizó para caracterizar el fenotipo de esta bacteria y su capacidad para sintetizar varios aminoácidos (Gayen & Venkatesh 2006; Radhakrishnan et al. 2010). La cepa KT2440 de *Pseudomonas putida* acumula PHA-MCl cuando crece en presencia de ácidos grasos y en forma menos eficiente cuando la glucosa es el sustrato carbonado. Los ácidos grasos no son fuentes económicamente convenientes desde un punto de vista industrial. Poblete-Castro y colaboradores (2013) desarrollaron un AMEF *in silico* de manera de identificar reacciones blancos de modificación genética que lleven a una mejor producción de PHA-MCL a partir de glucosa. Utilizando el software FluxDesign y mediante un análisis de correlación de flujo entre la reacción blanco (síntesis de PHA) y cada una de las reacciones de la red, pudieron identificar reacciones con correlación positiva, cuyo aumento de flujo generaba un aumento de la síntesis de PHA, así como también reacciones con correlaciones negativas, en las que la eliminación de las mismas permitía un aumento en la síntesis de PHA. De esta manera, se identificaron blancos genéticos para

eliminar o sobre-expresar. En este trabajo los resultados experimentales corroboraron los datos obtenidos *in silico* para *P. putida*.

1.4.3 Análisis de flujos metabólicos por marcación isotópica con ^{13}C

El AFM permite resolver el sistema mencionado anteriormente mediante la determinación experimental de los flujos de reacciones que involucran compuestos extracelulares: velocidad de consumo de un sustrato y velocidad de síntesis de metabolito excretado o producto (Varma & Palsson 1994). Sin embargo, muchas veces existen limitaciones y el sistema permanece indeterminado. Ejemplos de estas limitaciones se ilustran en la figura 1.4.3. Ellas son la presencia de vías metabólicas paralelas que conducen al mismo metabolito (a), ciclos metabólicos en los cuales no se puede medir directamente al menos un flujo interno en el ciclo (b), la existencia de vías metabólicas bidireccionales que operan al mismo tiempo en ambos sentidos (c) (por ejemplo, reacciones catalizadas por las enzimas transaldolasa y transcetolasa en la vía de pentosas fosfato) y dificultades en el balance de co-factores, por ciclos fútiles (d) (Wiechert 2001). Por lo tanto, se requiere un abordaje diferente para poder determinar la distribución de flujos. Uno es el AFM utilizando un sustrato marcado con el isótopo estable ^{13}C.

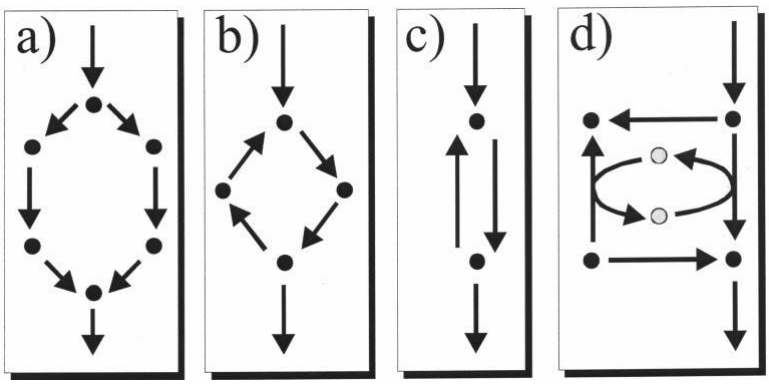


Figura 1.4.3 Esquema de las situaciones que no se resuelven por AFM estequiométrico (Figura extraída de Wiechert 2001).

El uso de un ^{13}C-sustrato asociado al balance de metabolitos del AFM en estado estacionario (discutido anteriormente), es probablemente uno de los mejores abordajes para cuantificar los flujos en el metabolismo central (Wiechert 2001).

Las rutas que generan diferentes patrones de marcación en un producto pueden ser discriminadas aunque presenten la misma estequiometria. Basados únicamente en el patrón de marcación, es posible cuantificar la contribución relativa de rutas paralelas o los flujos de intercambio. Una de las claves del desarrollo del experimento radica en la adecuada elección de la fuente de carbono marcada (Wiechert 2001; Wittmann & Heinzle 2001). Por ejemplo, el piruvato generado por la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) y la vía de Entner-Doudoroff (ED) puede ser discriminado utilizando un sustrato marcado posicionalmente como es la glucosa marcada en el carbono 1 (1-^{13}C-glucosa) (figura 1.4.4).

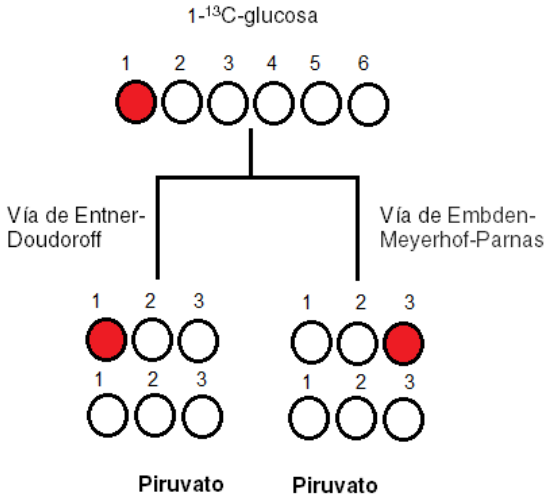


Figura 1.4.4 Destino de la marcación isotópica de la glucosa al piruvato según la ruta metabólica empleada.

Por otro lado, en el caso de re-arreglos del esqueleto carbonado por clivaje y formación de nuevos enlaces (por ejemplo, ruta de las pentosas fosfato, anaplerosis, CAT), es adecuado el empleo de una mezcla de sustrato uniformemente marcado (U-

^{13}C-glucosa) y sustrato sin marcar, lo cual genera diferentes patrones de marcación (Figura 1.4.5).

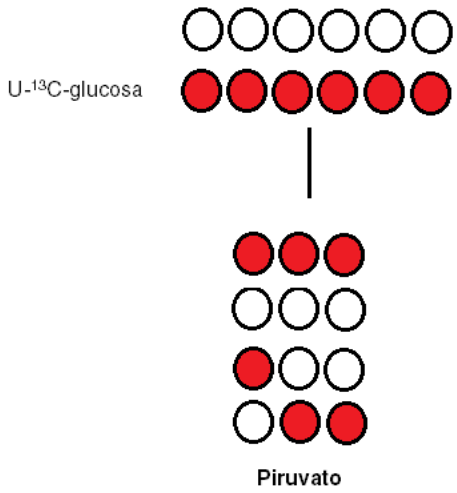


Figura 1.4.5 Esquema del empleo del sustrato uniformemente marcado para discriminar entre vías donde ocurren re-arreglos del esqueleto carbonado (ruta de las pentosas fosfato).

En resumen, los experimentos empleando marcación isotópica se basan en la administración de un sustrato marcado con ^{13}C, el cual es catabolizado y el átomo de carbono marcado se distribuye por toda la red metabólica. De esta manera, el *pool* de metabolitos intracelulares enriquecido en dicho isótopo es determinado por análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y/o Espectrometría de masas (MS) (Szyperski 1995; Sonntag et al. 1995; Wiechert 2001; Sauer 2006). El método más usado es GC-MS (cromatografía gaseosa-espectrometría de masas). Este método requiere la derivatización de los compuestos a analizar para incrementar su volatilidad. También se aumenta la masa del compuesto derivatizado, lo cual reduce la interferencia, mejora la detección y puede resultar en una fragmentación más específica (Wittmann 2007; Fischer & Sauer 2003).

La distribución de flujos en un organismo determina un patrón específico de marcado de los metabolitos (Wiechert 2001). Para comprender el concepto de la técnica se debe introducir la definición de isotopómero. La definición de isotopómero combina el

concepto isómero+isótopo y corresponde a uno de los diferentes estados de marcación en el cual se puede encontrar un metabolito. Consideremos un metabolito con *n* átomos de carbono, los cuales pueden estar o no marcados con ^{13}C en cada uno de ellos. Se considera que dicho metabolito posee 2^n diferentes estados de marcación, lo que significa que hay 2^n isotopómeros diferentes (Wiechert 2001). La distribución isotopomérica de un metabolito con n átomos de carbono corresponde al porcentaje de cada isotopómero dentro del *pool* del metabolito (fracción de isotopómero). El estado de marcación de la célula es por lo tanto cuantificado por la distribución isotopomérica de todos los metabolitos.

Los metabolitos intracelulares intermediarios del metabolismo central se encuentran en baja concentración. Su naturaleza química es diversa y tienen una alta tasa de *turnover*, lo que genera serios desafíos técnicos de preparación de la muestra y separación. Las proteínas son una fuente estable y abundante de información de marcación, por lo que se analiza el patrón de distribución de ^{13}C de 10 a 15 aminoácidos para la estimación de flujos en estado estacionario. Los aminoácidos mantienen el esqueleto carbonado y también reflejan la abundancia relativa de sus precursores. Es así que se aplica una estrategia de estudio retro-biosintético, infiriendo los metabolitos precursores a partir de la determinación de sus productos derivados (Szyperski 1995; Fischer & Sauer 2003).

Para traducir los datos de marcación con ^{13}C de los aminoácidos obtenidos tanto por RMN o MS a datos de flujos, se han desarrollado dos tipos de abordajes (Sauer et al. 1997; Portais et al. 2002; Fischer & Sauer 2003). En el primer abordaje, los datos de distribución de marca con ^{13}C en los aminoácidos, los flujos extracelulares determinados experimentalmente y los requerimientos biosintéticos (composición de la biomasa), son integrados en un modelo matemático. Luego, para poder asignar los flujos metabólicos, se diseña un modelo de perfil de isotopómeros de los metabolitos ajustado a los datos experimentales generados por RMN y MS. A ese perfil de isotopómeros le corresponde un perfil de flujos metabólicos, definido mediante un proceso iterativo. La distribución de flujos se identifica como aquella solución donde la diferencia entre el perfil de isótopos observado y simulado es mínimo. Estos ajustes se efectúan mediante programas diseñados a tal fin empleando métodos iterativos (Wiechert 2001). Con esta metodología se obtienen flujos netos (valores de velocidades en $mmol.g^{-1}.h^{-1}$).

El segundo tipo de metodología se basa en el análisis en puntos de ramificación o nodos del metabolismo central, que son puntos clave donde convergen diferentes rutas metabólicas. Mediante ecuaciones probabilísticas se cuantifica la contribución relativa de las rutas que convergen para la formación de un metabolito en particular (relación de flujos), incorporando los datos experimentales de RMN o MS (Szyperski 1995; Fischer & Sauer 2003). Ese tipo de método se denomina METAFoR (*Metabolic Flux Ratios*). En la figura 1.4.6 se muestra un esquema de las dos metodologías descritas (esquema extraído del Sauer, 2006).

METAFoR permite estimar en forma independiente cada relación de flujos y no requiere de otra información fisiológica. Este tipo de análisis permite identificar rutas activas o ausentes mediante la cuantificación de la contribución relativa de las vías que convergen en la formación de un metabolito específico. Fischer y Sauer (2003) desarrollaron una nueva metodología para el análisis de relaciones de flujo (METAFoR) mediante el estudio por GC-MS de los aminoácidos proteinogénicos obtenidos de experimentos utilizando tanto 1-[^{13}C]–glucosa y U-[^{13}C]-glucosa.

Fischer y Sauer (2003) describieron así algunas relaciones de flujos en *E. coli* como la actividad de la ruta de las pentosas fosfato (PP). La glucosa se cataboliza a través de las triosas por 3 rutas: ED, EMP y PP. La contribución de cada una de ellas se ve reflejada en la distribución de marcación del fosfoenolpiruvato (PEP), pentosa-5-fosfato (P5P) y eritrosa-4-fosfato (E4P), que está determinada por la distribución de masa del aminoácido derivado correspondiente (ver figura 1.4.7). Tanto ED como EMP generan triosas que no se clivan, por lo que la contribución de estas rutas no se distingue con el sustrato marcado uniformemente. Sin embargo fue posible determinar las contribuciones de las actividades transcetolasa y transaldolasa de la rama no oxidativa de las PP. Por otro lado, las contribuciones del Ciclo de los Acidos tricarboxílicos (CAT) y anaplerosis pudieron ser determinadas en experimentos con U-^{13}C-glucosa y se distinguió así el oxalacetato (OAA) producido vía unidades de 4 carbonos (CAT) o del PEP más CO_2, vía la reacción anaplerótica catalizada por la PEP carboxilasa.

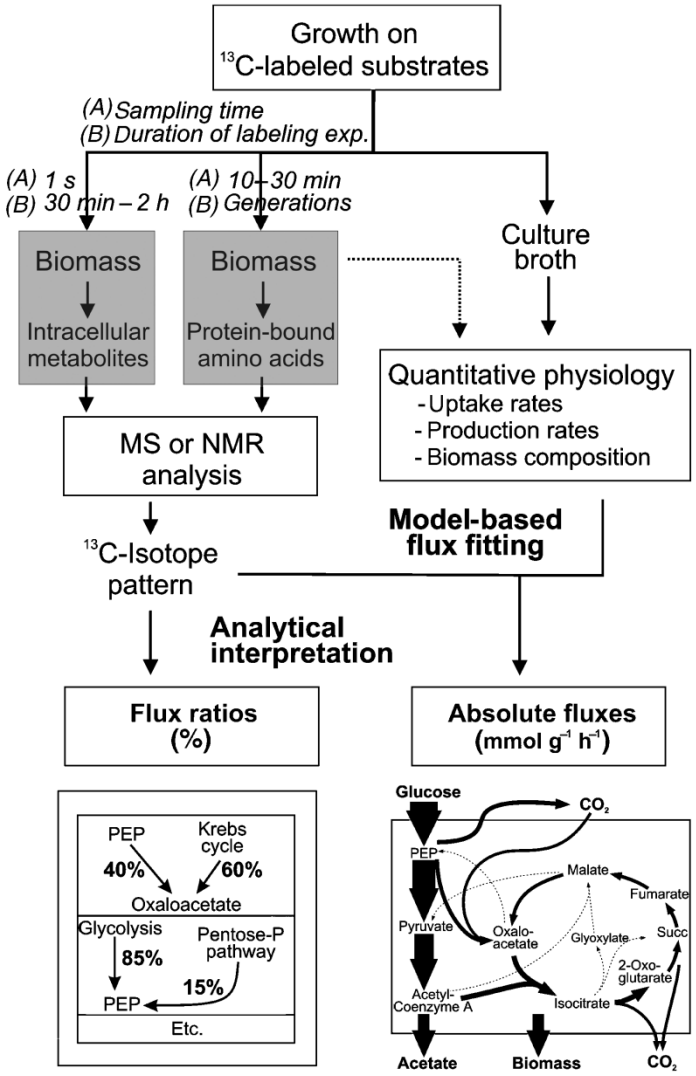


Figura 1.4.6 Esquema de los dos tipos de métodos para la determinación de la distribución de flujos empleando marcación 13C y análisis por RMN o MS **(**Figura extraída de Sauer 2006).

La determinación de relaciones de flujo utilizando 1-^{13}C-glucosa permite obtener información más precisa de la actividad *in vivo* de las rutas PP y ED y de la PEP carboxiquinasa. La rama oxidativa PP o ED generan triosas no marcadas, mientras que EMP genera triosas, 50% marcada y 50% sin marcar. Si la ruta ED es activa, entonces se introduce una marca adicional a nivel del piruvato. La ruta ED genera piruvato marcado en la posición 1, mientras que el piruvato de EMP está marcado en la posición 3. La fracción de moléculas de piruvato marcado en el C1 puede ser calculada por la diferencia entre piruvato C1-C3 y piruvato C2-C3. Esta información se

usa para verificar que la marca es introducida por ED y no por reacciones de gluconeogénesis. Finalmente, se determina la fracción de PEP (C1-C2) del OAA C1-C2 vía PEP carboxiquinasa.

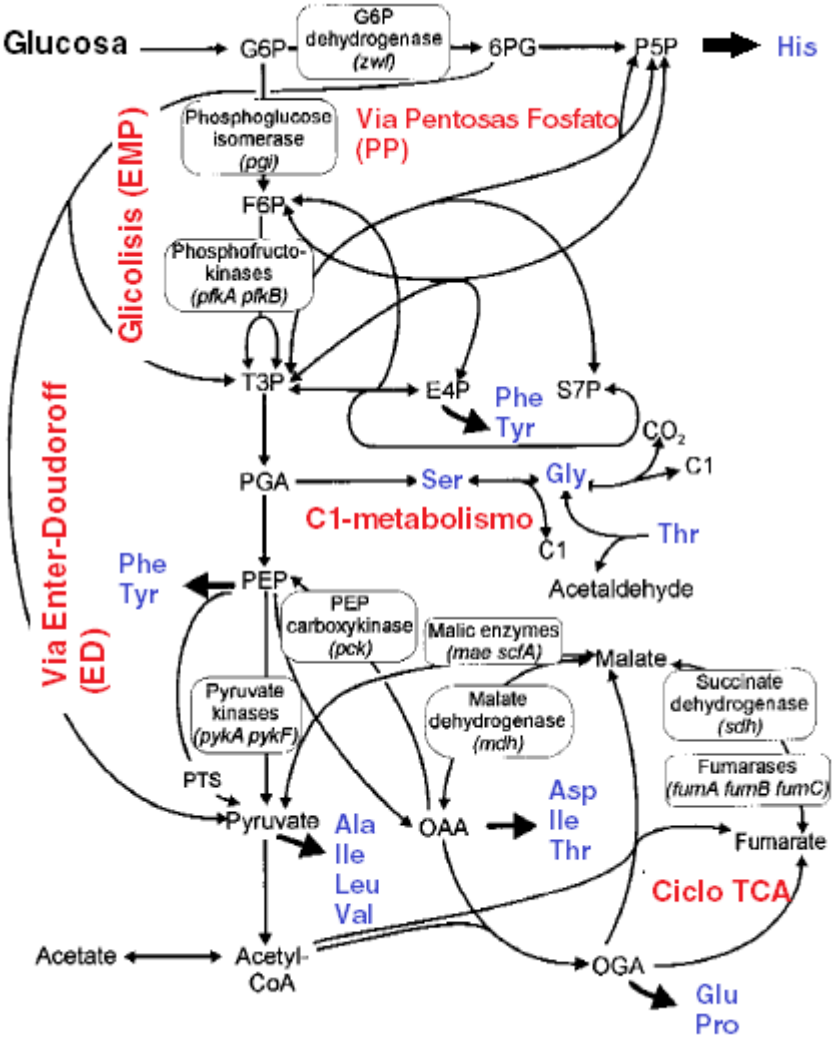


Figura 1.4.7 Modelo de la red de reacciones del metabolismo central de *E. coli*.
Las flechas en negrita indican los precursores de los aminoácidos que se analizan por GC-MS. Abreviaciones: 6PG (6-fosfogluconato), S7P (seudoheptulosa-7-fosfato), T3P (triosa-3-fosfato), PGA (3-fosfoglicerato). (Esquema extraído y modificado de Fischer & Sauer, 2003).

Esta metodología fue aplicada para el estudio de cultivos de *E. coli* en la fase exponencial de crecimiento empleando diferentes escalas de cultivo (matraces, tubos y

placas de 96 pocillos), demostrando su potencial para el desarrollo de un "*high-throughput*" análisis de flujos (Fischer et al. 2004). En el trabajo de Fischer et al, (2004), se desarrolló una nueva aproximación denominada "^{13}C-constrained flux balancing", la cual consiste en introducir como restricción adicional al sistema de ecuaciones lineales que resulta del balance de metabolitos, los datos obtenidos por METAFoR, de modo de obtener una solución global de flujo neto (Software FiatFlux). Cuando se dispone de un modelo de red metabólica válido y la cuantificación de compuestos extracelulares se hace de forma precisa y considera todos los compuestos que participan en el sistema, se puede efectuar un balance de átomos de carbono (ingreso versus egreso). En ese caso, los resultados obtenidos por METAFoR y por análisis de flujos netos basado en balance de isotopómeros, tienen una buena correlación (Emmerling et al. 2002).

Uitlizando METAFoR y "^{13}C-constrained flux balancing", se analizó en un grupo de microorganismos (anaerobios, aerobios, fotoheterótrofos y quimioheterótrofos) con diferentes estilos de metabolismo, el funcionamiento del metabolismo, las rutas activas y se cuantificó el flujo de carbono intracelular. En la figura 1.4.8 se muestra un esquema de la distribución de flujos obtenida en el trabajo de Fuhrer et al. (2005).

Se observa una diferencia en la distribución de flujos para cada microorganismo en estudio. La participación de una u otras rutas determinadas en este análisis estuvo de acuerdo con datos del metabolismo carbonado de estos microorganismos obtenidos por otros métodos. Esta misma aproximación se aplicó para analizar la relevancia en *P. putida* KT2440 de las rutas ED, PP y EMP (en dirección de la gluconeogénesis, ya que carece de fosfofructoquinasa). Se logró así establecer un funcionamiento cíclico del metabolismo, que involucra reacciones de las rutas PP, ED y EMP (Nikel et al. 2015). Estos resultados fueron obtenidos combinando otras herramientas. Además del AFM por marcación isotópica, se realizaron estudios de actividad enzimática y análisis de metabolitos intracelulares (metabolómica).

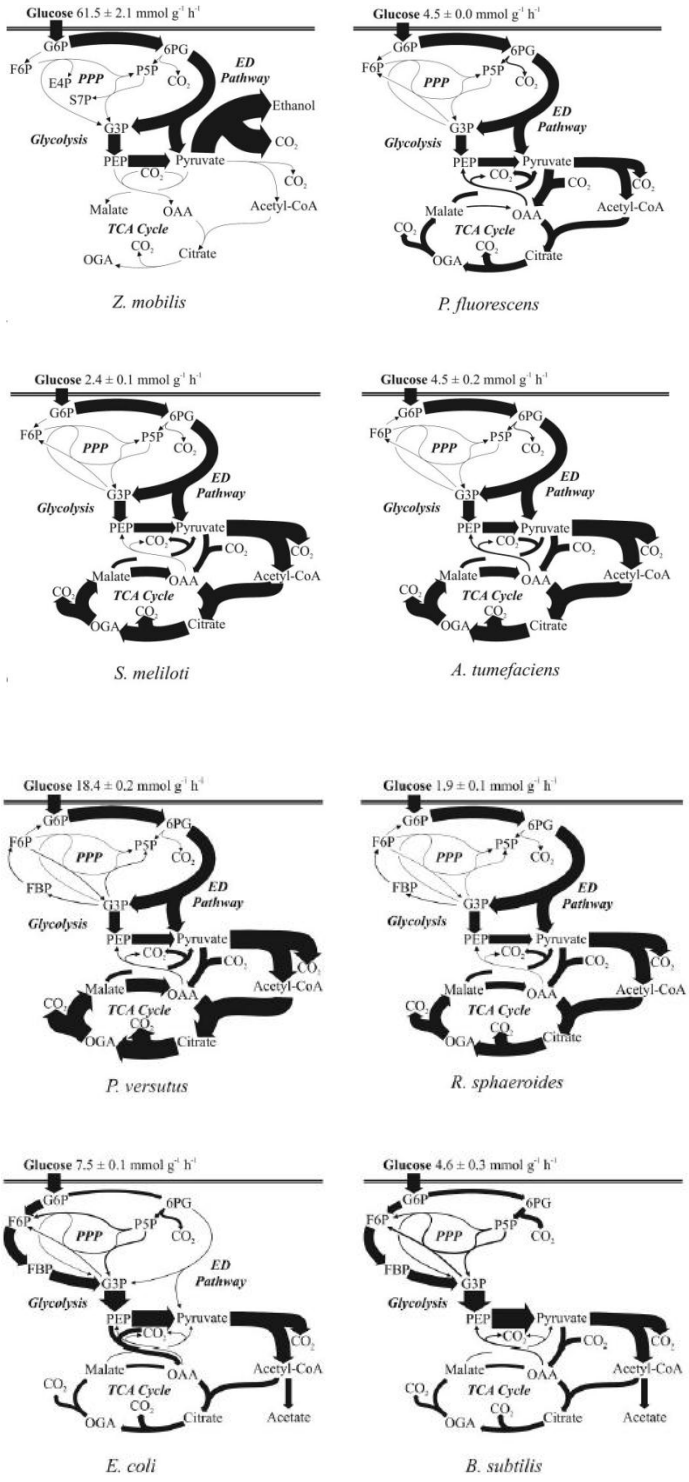


Figura 1.4.8 Distribución del flujo de carbono determinado por METAFoR en microorganismos metabólicamente diferentes. (Figura extraída de Fuhrer et al., 2005).

En la actualidad son muchos los trabajos de investigación que abordan el estudio del metabolismo empleando análisis con marcación isotópica para identificar dentro de diferentes contextos genómicos (utilización de mutantes o cambios en las condiciones de cultivo), la participación e importancia de las rutas metabólicas que conforman el metabolismo de determinado carbohidrato.

1.5 *Herbaspirillum seropedicae*

Herbaspirillum seropedicae pertenece a la subclase β de Proteobacterias. Es un microorganismo Gram negativo, aerobio y diazótrofo (Baldani et al. 1986). Es capaz de asociarse endofíticamente con diversas plantas como sorgo, maíz, ananá, banana, arroz, pastos forrajeros y caña de azúcar (Cavalcante & Döbereiner 1988). La variedad de ambientes que *H. seropedicae* puede colonizar está probablemente relacionada con su capacidad de crecer en diversos sustratos carbonados, incluyendo ácidos orgánicos (fumarato, succinato, citrato, piruvato), carbohidratos, polioles (glicerol) y ácidos grasos (Baldani et al. 1986; Baldani et al. 2016). Es capaz de consumir monosacáridos como glucosa, fructosa, galactosa, arabinosa o xilosa. Sin embargo, es incapaz de crecer en disacáridos como sacarosa y lactosa. *H. seropedicae* tolera un amplio rango de pH. Su temperatura óptima de crecimiento es 34°C, pero crece bien a 30°C, y no se observa crecimiento al ser incubado a 22°C o a 38°C.La cepa tipo de la especie (Z78) es susceptible a varios antibióticos, como cloramfenicol, tetraciclina, gentamicina, kanamicina, eritromicina y estreptomicina, pero es resistente a penicilina (Baldani et al. 1986). Cuando se lo cultiva en el laboratorio no requiere vitaminas ni cofactores y posee un tiempo de generación relativamente corto. Es una bacteria aeróbica, pero es capaz de crecer en condiciones de microaerofilia (Baldani et al. 1986).

La mayoría de los trabajos de investigación con este microorganismo se centran principalmente en su propiedad como fijador de nitrógeno y/o promotor del crecimiento vegetal (Baldani et al. 1986; James et al. 1997; Divan Baldani et al. 2000; James et al. 2002; Silva et al. 2003; Batista et al. 2015). Los trabajos publicados están orientados al estudio del metabolismo nitrogenado y los mecanismos de interacción con la planta hospedera. En la década de los 90, en el Departamento de Bioquímica del IIBCE, estudiamos el metabolismo carbonado de *H. seropedicae*. Las medidas de actividades

enzimáticas en extractos celulares obtenidos a partir de cultivos crecidos en glucosa, permitió establecer la presencia de la ruta ED completa y la ruta de PP en el sentido biosintético o no oxidativo, ya que no se detectó actividad correspondiente a la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa (Gnd). Asimismo, no se detectó actividad de la enzima 6-fosfofructoquinasa (Pfk) de la ruta EMP. También se detectó actividad de enzimas claves del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) (Datos no publicados).

A fines de la década de los 90 se estableció por primera vez que las cepas Z67, Z69 y Z78 de *H. seropedicae* eran capaces de acumular PHB, alcanzándose un contenido de PHB de 40% (w/w) en cultivos que contenían glucosa como fuente de carbono (Catalán et al. 2007). Las determinaciones de actividades enzimáticas permitieron establecer que la cepa Z69 posee la ruta clásica de síntesis de PHB, que involucra las enzimas PhbB y PhbA, 3-cetotiolasa y acetoaceti-CoA reductasa, respectivamente (Catalán et al. 2007). *H. seropedicae* es capaz también de acumular el copolímero P(3HB-*co*-3HV) cuando crece en presencia del ácido graso de 9 átomos de carbono, ácido nonanoico (Catalán et al. 2007).

En la actualidad se encuentra disponible el genoma secuenciado de las cepas SmR1 (derivada espontánea de Z78, Sm^r) y Z67 (GenBank). Confirmando los resultados obtenidos 10 años atrás, el análisis del genoma de la cepa SmR1 permitió identificar los genes que estarían involucrados en la ruta ED, PP, ciclo del CAT, así como la ausencia del gen *pfk* que codificaría para la enzima 6-fosfofructoquinasa. Asimismo, el análisis *in silico* del genoma identificó 13 potenciales genes involucrados en el metabolismo del PHB, entre los cuales se encuentran los genes que codifican para las enzimas de la ruta clásica de síntesis de PHB (Pedrosa et al. 2011). Se detectaron tres genes *phbA* que codificarían para una acetil-CoA acil transferasa (denominada 3-cetotiolasa en la dirección de hidrólisis). Una de estas enzimas podría ser la que reconoce el propionil-CoA durante la síntesis del monómero 3HV en *H. seropedicae,* al igual que lo descrito en *R. eutropha* (Slater et al. 1998).

En el laboratorio hemos desarrollado diferentes estrategias para optimizar la acumulación de PHB en la cepa Z69 de *H. seropedicae*. Mediante experimentos de diseño factorial con punto central se determinó el efecto de la concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno en el crecimiento y acumulación de PHB. Este estudio permitió determinar una relación C/N de 22-25 (moles de átomos de carbono/moles de átomos de nitrógeno) óptima para la acumulación de polímero. Utilizando esta relación

en ensayos en matraces con agitación y empleando medio definido con glucosa como fuente de carbono, se alcanzó un contenido de PHB del 60%. La síntesis de PHB por la ruta clásica requiere como molécula clave el acetil-CoA. Este intermediario del metabolismo puede ingresar al CAT y/o ser utilizado para la síntesis de PHB. Con el objetivo incrementar el flujo de moléculas de acetil-CoA hacia la síntesis de PHB y así mejorar la acumulación de PHB, se transfirió a la cepa Z69 el plásmido de amplio espectro pBBR1MSC2 conteniendo el gen *phb*C (enzima PHB sintasa) de *R. eutropha*. Por otro lado, se transfirió también este mismo vector con el operón completo *phb*CBA. Los resultados de crecimiento, acumulación y rendimiento de transformación de glucosa en PHB se compararon con los de la cepa control Z69(pBBR1MSC2). Ambas cepas recombinantes Z69(pBBR1MSC2::*phb*C) y Z69(pBBR1MSC2::*phb*CBA) cultivadas en matraces con glucosa como fuente de carbono, no mostraron diferencias en la velocidad de crecimiento, producción de biomasa y de PHB, comparadas con la cepa control. Sin embargo, si se observó un pequeño aumento en el rendimiento de transformación de glucosa en PHB y en biomasa en la cepa transformada con el plásmido pBBR1MSC2::*phb*CBA. Para verificar que alguno de estos genes de *R. eutropha* se expresaba en *H. seropedicae,* se complementó un mutante *phb*C de *H. seropedicae* (no acumula PHB) con el gen *phb*C clonado en el vector de amplio espectro pMP220. La cepa mutante con el plásmido pMP220::*phb*C fue capaz de sintetizar y acumular PHB al igual que la cepa salvaje. Resultados similares se obtuvieron en cultivos de *R. eutropha* portando copias extras del operón *phb*CBA. En ese trabajo se determinó un aumento de 1,5 y 3 veces en la actividad específica de las enzimas de la ruta clásica, lo cual no se vio reflejado en el contenido de PHB cuyo aumento fue pequeño de 33 al 40%.

En resumen, el aumento del número de copias de genes heterólogos *phbCBA* no mostró un aumento de la síntesis de este polímero en *H. seropedicae* en las condiciones ensayadas, aunque si un leve incremento en la eficiencia de transformación de glucosa en PHB. Estos resultados, junto con los descritos para otros microorganismos, indican el control que ejerce el metabolismo central en la síntesis de PHB.

Como se mencionó anteriormente, *H. seropedicae* es capaz de sintetizar P(3HB-*co*-3HV) cuando se cultiva con ácido nonanoico como única fuente de carbono. Este resultado indica que *H. seropedicae* sintetiza el monómero de 3HV a partir del

propionil-CoA o de algún intermediario de la β-oxidación como el cetovaleril-CoA. La concentración de ácido nonanoico utilizada para el cultivo debe ser menor o igual a 5mM, dada su toxicidad. Por lo tanto, el uso de este sustrato como única fuente de carbono para la síntesis del copolímero es antieconómica e inviable. El uso de cultivos con dos sustratos, utilizando ácido propiónico como co-sustrato para la síntesis de 3HV, es una estrategia alternativa para producir el copolímero de manera más económica. En estudios preliminares realizados en el laboratorio pudimos determinar la capacidad de *H. seropedicae* de crecer en presencia de propionato de sodio como única fuente de carbono a concentraciones de 1g/l, por lo que estimamos que podría ser utilizado como co-sustrato al igual que lo descrito en otros microorganismos (Ramsay et al. 1990).

La producción de PHAs puede abaratarse usando sustratos económicos (residuos agroindustriales) así como mediante una optimización del rendimiento de transformación del sustrato carbonado en polímero. El rendimiento teórico estequeométrico de conversión de glucosa en PHB es 0,477 (g/g). Por cada mol de glucosa se podrían obtener dos moles de acetil-CoA, equivalentes a un mol de 3HB. El rendimiento determinado experimentalmente a partir de cultivos de *H. seropedicae* ensayados en condiciones de laboratorio, fue de aproximadamente un 50% del valor teórico. Las modificaciones genéticas de la cepa Z69 efectuadas por incorporación del operón *phb*CBA exhibieron una leve mejora en el rendimiento de transformación de glucosa en PHB, que paso de un 46% a un 55% del valor teórico.

En este trabajo de tesis estudiamos la producción de polihidroxialcanoatos (PHAs): PHB y P(3HB-*co*-3HV) por *H. seropedicae,* usando glucosa y una mezcla glucosa-propionato de sodio como fuente de carbono. El trabajo se orientó a optimizar la síntesis de estos PHAs mediante el aumento en la eficiencia de transformación del sustrato carbonado en polímero, aplicando una estrategia de análisis de rutas metabólicas y herramientas clásicas de ingeniería genética. La estrategia de análisis de rutas metabólicas en cultivos en presencia de glucosa permite verificar la red metabólica propuesta para *H. seropedicae* en cuanto al catabolismo de glucosa. Esta estrategia permite también identificar posibles blancos de modificaciones genéticas, analizando las distribuciones de flujos que optimicen la síntesis de PHB. De este modo, puede transformarse *H. seropedicae* Z69 en una cepa más eficiente en el uso de la fuente de carbono hacia la síntesis de polímero. En el caso del la síntesis del

copolímero, se plantea el mismo objetivo de aumentar el rendimiento del ácido propiónico en monómeros de 3HV mediante ingeniería genética clásica.

2. HIPOTESIS Y OBJETIVO

Hipotesis

Es posible mejorar en *Herbaspirillum seropedicae* la eficiencia de conversión de las fuentes de carbono glucosa y ácido propiónico en Poli(3-hidroxibutirato) y Poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato).

Objetivo

Optimizar la producción de Poli(3-hidroxibutirato) y Poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) por *H. seropedicae* Z69 al consumir glucosa y ácido propiónico, mediante el aumento del rendimiento de transformación de dichas fuentes de carbono en polímero.

A partir del planteo del objetivo general, este trabajo de tesis se va a presentar en dos capítulos, uno dedicado al estudio del P(3HV-*co*-3HB) (Capitulo 1) y el otro al PHB (Capitulo 2)

CAPITULO 1

Optimización de la síntesis de P(3HB-*co*-3HV) por *H. seropedicae* Z69

3. CAPITULO 1-Optimización de la síntesis de P(3HB-*co*-3HV) por *H. seropedicae* Z69

3.1 Objetivo específico

Optimizar la síntesis de co-polímero por *H. seropedicae* al crecer en presencia de una mezcla de glucosa y propionato de sodio.

3.2 Estrategia experimental

1- Determinar el crecimiento y acumulación de P(3HB-*co*-3HV) por la cepa Z69 cultivada en presencia de propionato de sodio y en una mezcla de glucosa y propionato de sodio como fuentes carbonadas.
2- Identificar las potenciales rutas implicadas en el catabolismo del propionato de sodio en *H. seropedicae* Z69 mediante el análisis del genoma anotado de *H. seropedicae* SmR1 y Z67.
3- A partir del análisis del genoma, construir mutantes que sean incapaces de catabolizar el metabolito propionil-CoA.
4- Evaluar el rendimiento de transformación del propionato de sodio en monómeros de 3HV en cultivos en lote de las cepas mutantes, empleando una mezcla glucosa/propionato de sodio como fuente de carbono.

3.3 Materiales y Métodos

3.3.1 Cepas, plásmidos y medios de cultivo

Las cepas bacterianas y plásmidos empleados en este trabajo se describen en la Tabla 3.3.1. La cepa salvaje Z69 y mutantes derivadas de *Herbaspirillum seropedicae* (Baldani et al. 1986) fueron cultivadas a 30°C en medio rico TY (Beringer 1974), medio mineral LGI (Cavalcante & Döbereiner 1988) o medio mineral MM-G (modificado de Ramsay,1990) con y sin agregado de agar 1,8%. La cepa salvaje y mutantes se conservaron refrigeradas por hasta dos semanas en medio rico sólido TY-agar 1,8 % y por períodos prolongados a -80°C en suspensión con glicerol 20% (Ausubel et al. 1992).

Tabla 3.3.1 Listado de cepas y plásmidos empleados en este trabajo.

Cepas y plásmidos	***Características relevantes***	***Referencias***
Herbaspirillum seropedicae		
Z69	Cepa salvaje aislada de plantas de arroz, Nal^r	Baldani et al. 1986; Ureta et al. 1995
Z78	Cepa salvaje, aislada de plantas de sorgo, Nal^r	Baldani et al. 1986; Ureta et al. 1995
Z69Prp	Z69 *prp*C, Nal^r	Este trabajo
Z69PrpMms	Z69 *prp*C *mms*A, Nal^r	Este trabajo
Escherichia coli		
S17.1	Sm^r Tp^r derivado de *E. coli* 294 *pro recA hsdR* 31 con plásmido[RP4 (IncP):2 *kan*::Tn7 *tet*::Mu] cointegrado en el cromosoma	Simon et al. 1983
TOP10	F- *mcr*A _(*mrr-hsdRMS- araD139* _(*ara leu*) 7697 *galU galK rpsL* (Str^r) *endA1 nup*G *mcrBC*) Φ80*lacZ*_M15 _*lac*X74 *recA1*	Invitrogen Corp.
Plásmidos		
pCR® 2.1-TOPO®	Origen de replicación pUC y f1, Amp^r, Km^r	Invitrogen Corp.
pBBR1MSC-2	Vector de expresión de amplio espectro, utilizado para ensayos de complementación de función, Km^r	Kovach, M.E. et al., 1995
pK18mob*sac*	Vector suicida en *H. seropedicae*, con el gen *sacB*, Km^r	Schäfer et al., 1994
pRK767	Derivado de pRK290, vector de amplio espectro, Tc^r	(Gill & Warren 1988)
pRK2013	Replicón ColE1 conteniendo los genes *tra* de RK2. Usado para movilizar plásmidos del tipo IncP e IncQ. Km^r	(Ditta et al. 1980)
pRK767::*fbp*	Plásmido de amplio espectro con el gen *fbp* clonado en el sitio *Hind*III/*Xba*I Tc^r	Este trabajo

La fuente de nitrógeno utilizada en los medios minerales fue amonio (NH_4^+), tanto como NH_4Cl o $(NH_4)_2SO_4$ y la fuente de carbono, la indicada en cada caso. Las

concentraciones de NH_4Cl o $(NH_4)_2SO_4$ y fuente de carbono usadas en dichos medios se indican en cada experimento y las mismas se calcularon de manera de mantener una relación C/N inicial (molesC/molesN) de 22-25 (relación óptima para la acumulación de PHB, determinada previamente mediante una estrategia de superficie de respuesta con dos variables y un punto central). Los sustratos carbonados y nitrogenados se adicionaron al medio luego de esterilizados en autoclave.

Las cepas de *Escherichia coli* se mantuvieron y cultivaron en medio LB-agar 1,8% y caldo LB, respectivamente (Miller, 1972) La temperatura de incubación fue de 37°C.

Los antibióticos se adicionaron al medio de cultivo a las siguientes concentraciones finales: ácido nalidíxico (Nal^{50}), 50 µg/ml; kanamicina (Km^{50}), 50 µg/ml y tetraciclina (Tc^{10}), 10 µg/ml. El reactivo 5-bromo-4-cloro-3-indolil β-galactopiranósido (X-gal) se incorporó en el medio a una concentración final de 20 µg/ml.

La composición de todos los medios de cultivo se incluye en el ANEXO 1.

3.3.2 Identificación de rutas metabólicas y genes diana en el genoma de *H. seropedicae* SmR1

Para la identificación de las posibles rutas para el catabolismo del propionato y glucosa en *H. seropedicae* SmR1 y los genes presumiblemente involucrados con dichas vías, se utilizaron los datos del genoma disponible en (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Herbaspirillum+seropedicae) (NC_014323.1) y la base de datos Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (http://www.genome.jp/kegg/pathway.html). También se anotó el genoma de la cepa SmR1 y Z67 (NZ_CP011930.1) utilizando el servidor RAST (http://rast.nmpdr.org/) (Aziz et al. 2008).

Las secuencias del gen *fbp* que codifica para la enzima fructosa 1,6 bifosfatasa (FbP) y de los genes seleccionados de las rutas del propionato, se obtuvieron del genoma anotado de la cepa

SmR1 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Herbaspirillum+seropedicae

3.3.3 Reacciones de PCR

Todos los cebadores empleados en este trabajo se diseñaron utilizando el programa PrimerSelect de la compañía DNASTAR (http://www.dnastar.com/t-primerselect.aspx) y sus secuencias se incluyen en la tabla 3.3.2. Los mismos se sintetizaron en Macrogen (Corea del Sur).

En el caso del gen *fbp*, los cebadores se seleccionaron de modo de amplificar la región codificante y el presumible promotor del gen (se consideraron 312 nts precediendo el potencial codón de inicio).

El gen *prp*C salvaje (wt) que presumiblemente codifica para la enzima 2-metilcitrato sintasa, involucrada en el metabolismo del propionato, se amplificó mediante PCR utilizando el cebadores de avance (Fw) del PCR1 y reverso (Rev) del PCR2 (ver tabla 3.3.2). Para los ensayos PCR 1 y 2 se utilizó como templado 2 μl de una dilución al décimo de ADN genómico de la cepa Z69 purificado con el Kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research, USA) según lo especificado por el fabricante. En los demás PCR se utilizaron como templado 2 μl del lisado celular correspondiente (ver protocolo en ANEXO 2).

En ANEXO 2 se describen las condiciones de PCR y programas de ciclado para todos las reacciones.

3.3.4 Construcción de los fragmentos para la obtención de mutantes dirigidas por *knock-out*

La construcción de los mutantes dirigidos no polares se realizó según lo descrito por Sukdeo y Trevor (2003). Para ello se utilizaron las secuencias de los genes identificados y las regiones adyacentes para diseñar los cebadores necesarios. De acuerdo con esta estrategia, se diseñaron dos pares de cebadores específicos. Un par corresponde a la región que precede y parte del inicio del gen a mutar. El cebador *reverse* de esta amplificación incluye unos 21 nucleótidos en el extremo 5´ (PCR1). El otro par abarca el fin del gen y la región inmediatamente adyacente. El cebador *forward* de este par contiene 21 nucleótidos complementarios a los previamente mencionados en el extremo 5´ (PCR2).

Tabla 3.3.2 Secuencia de todos los cebadores diseñados.

Gen	fragmento (pb)		*Primers* 5´-3´	Tm
*mms*A (Hsero_3067)	PCR1 602	Fw	GCTCTCGCCCGCGTGATAAATG	60,8
		Rev	*GCCGTCCACCAGCGACAGGCA*GCCGTGACCTTCTGGACC	74,4
	PCR2 456	Fw	*TGCCTGTCGCTGGTGGACGGC*GTTCAATACGTCGCGCCACTCC	74,5
		Rev	GCGGGCGTCTATTCCAGCGTCTAC	63,4
*cai*A (Hsero_2798)	PCR1 406	Fw	CTCGTCTTTCAGGTTCAGCGTCAG	59,5
		Rev	*GCCGTCCACCAGCGACAGGCA*GCATGGCGGTTTCGGGTTTG	74,3
	PCR2 548	Fw	*TGCCTGTCGCTGGTGGACGGC*CATGATGACCGAGGCTTCCGT	74,8
		Rev	CGCATCCATTACGACCGCAGTTAC	60,1
*prp*C (Hsero_3119)	PCR1 557	Fw	GCGGAACGAGGAACGGAGGG	62,9
		Rev	*GCCGTCCACCAGCGACAGGCA*GCGCGCAAGCTCTCCAAGG	75,4
	PCR2 522	Fw	*TGCCTGTCGCTGGTGGACGGC*CAGTTCAGCAGCGGTGGGCAG	76,4
		Rev	GTTCGACCCCGCTGTTCACG	51,1
*mms*A (Hsero_4789)	PCR1 461	Fw	CGCATGTAGATCATGCCGTT	
		Rev	*GCCGTCCACCAGCGACAGGCA*AAAGCAGGGGTGGTTAGCAT	
	PCR2 518	Fw	*TGCCTGTCGCTGGTGGACGGC*GTTCTGCTCGATCAGTTCCTTGA	
		Rev	TCACGGGATTGGAGATGTGG	
fbp (Hsero_3549)	1329	Fw	GCGGCTGATTGCAGCTTATT	59,6
		Rev	CTTCTGCAACGGCAATCCCT	60,9

La secuencia entre * representa los 21 nucleótidos adicionados a los juegos de cebadores

Los ORFs a mutar fueron *prp*C, *mms*A y *cai*A, que codifican para las enzimas 2-metilcitrato sintasa, metilmalonato semialdehido deshidrogenasa y acil-CoA deshidrogenasa, respectivamente (tabla 3.3.2).

Los cebadores fueron diseñados de modo que los ORFs, manteniendo el codón de inicio y el marco de lectura, perdieran la mayor parte de la región codificante. De ese modo no se generan mutaciones polares.

A través de dos reacciones de PCR se generan dos productos con extremos complementarios (PCR1 y PCR2). En una tercera reacción de PCR, incluyendo como templado ambos productos, y como cebadores los oligonucleótidos de avance (del par que amplifica la región inicial, PCR1) y reverso (del par que amplifica la región terminal, PCR2), se obtuvo un producto (PCR3) que incluye las regiones inicial (*upstream*) y terminal (*downstream*) del ORF y un fragmento de 21 nucleótidos insertado en lugar de parte del ORF que se quiere eliminar (Figura 3.3.1).

Las condiciones de los PCR 1, 2 y 3 de detallan en ANEXO 2.

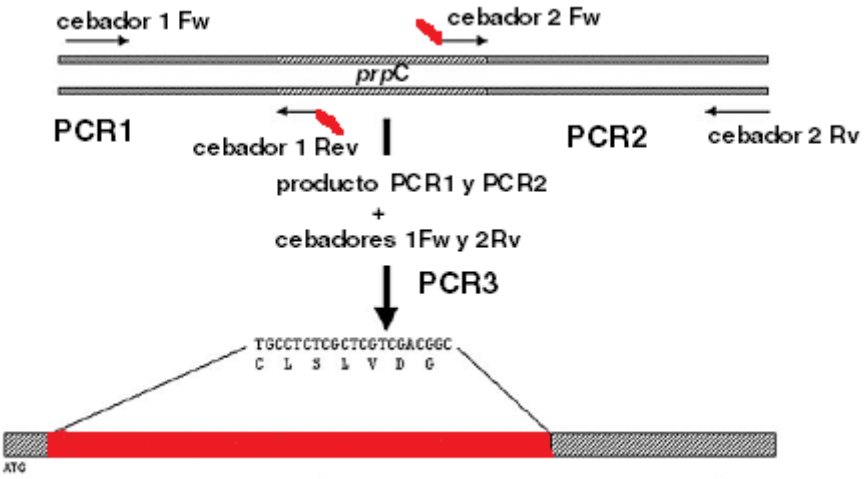


Figura 3.3.1 Esquema de la estrategia para la obtención de mutantes dirigidos no polares (Figura extraída y modificada de Sukdeo y Trevor, 2003).

3.3.5 Técnicas genéticas y de ADN recombinante

Los productos de PCR posteriormente utilizados para la construcción de mutantes *caiA*, *mmsA*, *prpC*, complementación de función 2-metilcitrato sintasa (gen + integro *prpC*wt) y aumento del número de copias del gen *fbp*, fueron clonados en primer lugar en el vector pCR 2.1 TOPO del kit TOPO TA cloning kit (Invitrogen, USA), según lo especificado por el fabricante.

Las reacciones de digestión con enzimas de restricción y ligación con T4-ligasa fueron efectuadas de acuerdo a las instrucciones anexas (ver ANEXO 2).

Los fragmentos PCR 3 generados para la construcción de los mutantes *prp*C, *mms*A y *cai*A, clonados en el vector pCR2.1 TOPO, se subclonaron luego en el sitio *Eco*RI del vector de selección negativa pK18mob*sacB*.

El producto de PCR correspondiente al gen *prpC* wt, fue subclonado en el sitio *Hind*III/*Xba*I del vector pBBRMSC1-2.

El producto de PCR correspondiente al gen *fbp* salvaje fue subclonado en el sitio *Hind*III/*Xba*I del vector pRK767.

Las reacciones de clonado en pCR 2.1 TOPO y de ligación en otros vectores se usaron para transformar células químicamente competentes de *E. coli* TOP10 (Str^r) según protocolo de Ausubel y col. (1992). Alícuotas de 100-200 μl de la transformación se sembraron en placas con medio LB agar, el antibiótico indicado en cada caso y X-gal en el caso que correspondiera. Las placas se incubaron a 37°C hasta la aparición de colonias.

Las colonias seleccionadas por presentar resistencia a antibiótico y, cuando correspondiera, exhibieran una coloración blanca por incapacidad de hidrolizar X-gal, fueron cultivadas en caldo LB con antibiótico. Se purificaron los plásmidos por el método de lisis alcalina (Ausubel y col. 1992) y se analizaron las preparaciones mediante digestión con enzimas de restricción. Las enzimas de restricción utilizadas se especifican en cada caso.

El tamaño, concentración e integridad de todos los productos de PCR, plásmidos y productos de restricción enzimática fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X (ver composición en ANEXO 1). Los fragmentos de ADN de interés se purificaron a partir del gel de agarosa utilizando el kit

Zymoclean™ (Zymo Research, USA), o PureLink (Invitrogen, Alemania), siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

3.3.6 Técnicas genéticas: Conjugaciones triparentales

En todos los casos, la transferencia de vectores a *H. seropedicae* se efectuó mediante conjugación triparental incluyendo *E. coli* TOP10(pRK2013) (Km^r) como cepa *helper* (ANEXO 2). Los transconjugantes fueron seleccionados en placas con medio TY Nal^{50} y el antibiótico correspondiente para la selección del plásmido a transferir. En el caso de transferir vectores de amplio espectro capaces de replicarse en *H. seropedicae*, se verificó la presencia de los mismos mediante el aislamiento de ADN plasmídico por lisis alcalina, como el empleado para *E. coli* y posterior análisis de restricción.

3.3.7 Construcción de mutantes dirigidas: transferencia de pK18mob*sac*B::PCR3 a Z69 y selección de dobles recombinantes

El plásmido pK18mob*sacB*::PCR3 contenido en *E. coli* TOP10, se transfirió a *H. seropedicae* Z69 (Nal^r). Los transconjugantes (simple recombinantes) obtenidos, contenían presumiblemente el plásmido pK18mob*sac*B::PCR3 cointegrado en el cromosoma en la región que presenta homología con parte del fragmento PCR3. Para resolver el cointegrado se cultivaron los transconjugantes seleccionados en TY sacarosa 1%. El gen *sacB* del vector pK18mob*sacB* promueve el fenotipo de sensibilidad a sacarosa a altas concentraciones y es por ello que este medio permite seleccionar aquellos clones que han perdido el vector cointegrado. La resolución del mismo puede generar células con el genotipo mutante buscado (pérdida del gen de interés) o clones con el genotipo salvaje, ambos capaces de crecer en TY sacarosa. Para ello, se sembró una de las colonias transconjugantes (simple recombinante) en 5 ml de caldo TY Km (Km^{50}) y se incubó con agitación a 30°C durante 24 horas. Para promover la resolución del cointegrado, una dilución adecuada del cultivo se sembró en placas de TY sacarosa 1%, las cuales fueron incubadas a 30ºC hasta la visualización de colonias. Los clones mutantes en el gen de interés se identificaron mediante PCR (mismas condiciones y cebadores que el PCR3), de acuerdo al tamaño esperado y por análisis de secuencia nucleotídica.

3.3.8 Análisis de secuencia de los fragmentos

En todos los casos, los plásmidos que presentaron inserto de acuerdo al perfil de restricción obtenido y los productos de PCR obtenidos de los mutantes, se secuenciaron en el Servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur (IP) de Montevideo a los efectos de confirmar la construcción correcta. El análisis de secuencia se realizó usando el programa blastp y el banco de datos del GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.3.9 Perfiles de crecimiento

Todos los perfiles de crecimiento fueron determinados mediante medidas de densidad óptica ($D.O._{620nm}$), a lo largo del tiempo. El inóculo se preparó cultivando las células durante 24 horas en caldo TY con antibiótico en los casos que correspondiera. Se colectaron las células por centrifugación (10.000 g por 5 minutos) y se resuspendieron en el mismo volumen de agua desionizada estéril.

Los perfiles de crecimiento fueron determinados en tubos de ensayo y placas de microtitulación conteniendo medio LGI con NH_4Cl 20mM y la fuente carbonada que se indique. Los tubos con 5 ml de medio se inocularon con 100 µl de la suspensión celular y se incubaron a 30°C a 190rpm. La D.O. se determinó en un colorímetro *Photoelectric Colorimeter* Erma, modelo EA-22, los tubos partieron con una DO incial de 0,05. En el otro sistema, las placas de microtitulación con 200 µl de medio LGI fueron inoculadas con 20 µl de la suspensión celular y luego fueron incubadas a 30°C. El crecimiento celular se monitoreó cada 2 horas en un equipo Varioskan™ Flash Multimode, versión 4.00.51 (Thermo Scientific), utilizando el programa SkanIt Software 2.4.3 RE.

En todos los casos los ensayos fueron realizados por triplicado y se incluyeron como controles una condición con glucosa como fuente de carbono y otra sin fuente de carbono. Las fuentes de carbono y concentraciones empleadas en los perfiles de crecimiento se detallan en la tabla 3.3.3.

Tabla 3.3.3 Listado de fuentes de carbono y concentración utilizada.

Fuente de carbono	***Concentración final (g/l)***
Glucosa	3 10
Propionato de sodio	0,5 1,0 2,0 3,0
Glicerol	10
Xilosa	10
Succinato de sodio	10

3.3.10 Ensayos de producción de polímero a partir de cultivos en matraces

Las cepas fueron cultivadas en matraces Erlenmeyer con medio LGI para evaluar la síntesis del copolímero P(3HB-*co*-3HV). La fuente de carbono utilizada fue propionato de sodio, glucosa o un mezcla glucosa/propionato y se adicionó al medio de cultivo luego de su esterilización a las concentraciones que se detallan en cada caso. Todos estos cultivos se incubaron a 30°C con agitación a 190 rpm. En todos los casos el volumen de medio de cultivo utilizado correspondió al 10% de la capacidad del matraz Erlenmeyer. Asimismo, el volumen del inóculo utilizado correspondió al 10% del volumen del cultivo a inocular, salvo excepciones que se explican en cada caso.

3.3.10.1. Cultivo en lote de la cepa Z69

En el caso de la cepa Z69, se realizó un ensayo en lote en 2 matraces de 1 L (A, B) conteniendo 100 ml de medio mínimo LGI, glucosa 10g/l y NH_4Cl 15mM. Cada uno de los matraces se inoculó con células recuperadas a partir de un solo cultivo en 25 ml de caldo TY, incubado por aproximadamente 20 horas con agitación a 30°C. Las células se colectaron por centrifugación (10.000 rpm por 10 min). El *pellet* celular se resuspendió en agua estéril, de modo que el agregado del inóculo en una dilución de aproximadamente 1/10 alcanzara una $D.O._{620nm}$ inicial de aproximadamente 0,5 en cada matraz. Se ajustaron los volúmenes de medio, de forma que la D.O. inicial fuese similar en los dos matraces. Los matraces se incubaron por 24 horas, y en ese

momento se determinó biomasa, PHB, concentración de amonio y glucosa (ver punto 3.3.11 Determinaciones analíticas). Luego se procedió de la siguiente manera:

matraz A sin modificación (control)

matraz B se le agregó propionato de sodio a una concentración final de 1 g/l y NH_4Cl para alcanzar una concentración final de 5mM.

Los matraces se continuaron incubando en las mismas condiciones por 24 horas más, el tiempo total del cultivo fue de 48 horas.

El polímero acumulado, ya sea como PHB y/o P(3HB-*co*-3HV), se determinó por gravimetría y se lo denominó en forma genérica PHA. La composición del PHA sintetizado se analizó por GC-FID, para determinar la presencia de monómeros de 3HV en los cultivos donde se agregó propionato (ver punto 3.3.11).

3.3.10.2. Cultivo en lote de la cepa mutante Z69Prp

Se ensayó una serie de cultivos en matraces Erlenmeyer para evaluar la síntesis de copolímero por la cepa Z69Prp. Los inóculos para todos los ensayos fueron preparados de la misma manera. En primer lugar se cultivaron las cepas en 5 ml de medio TY durante 24 horas. Estas células se utilizaron para inocular un matraz con 50 ml de medio LGI, glucosa 10 g/l y NH_4Cl 15mM. Estos matraces se incubaron durante 18 horas y las células, sin centrifugar, se utilizaron como inóculo, utilizando un volumen correspondiente al 10% del volumen a inocular.

Los ensayos se efectuaron del siguiente modo:

1. Se cultivaron las células en matraces de 2 L con 300 ml de medio LGI (NH_4Cl 15mM), 10 g/l de glucosa como fuente de carbono inicial. Se determinó la concentración de glucosa en el medio de cultivo mediante el sistema Accu chek Active (Roche Diagnostics, Alemania). A las 24 horas de cultivo se verificó que la concentración de glucosa era indetectable y se agregó una solución concentrada de propionato de sodio hasta alcanzar una concentración final de 1g/l. Se tomaron muestras al inicio del ensayo y a las 24 horas aproximadamente, para la determinación de $D.O._{620nm}$, biomasa, polímero sintetizado y concentración de glucosa en el sobrenadante. Una vez agregado el propionato de sodio, se continuó la incubación por 24 horas más. Al final del ensayo se evaluó biomasa, composición y concentración de

polímero y concentración de propionato de sodio en el sobrenadante (ver punto 3.3.11).

2. Cultivos en matraces de 6 L con 700 ml de medio LGI NH_4Cl 20mM. En este caso, se usó como fuente de carbono una mezcla compuesta por glucosa 10 g/l y propionato de sodio 2 g/l o 0,5 g/l de (concentración final). Ambas fuentes de carbono fueron agregadas al inicio del ensayo. A lo largo del tiempo se tomaron muestras para la determinación de: $D.O._{620nm}$, biomasa, concentración y composición de polímero, concentración de glucosa (mediante el sistema Accu chek Active) y propionato de sodio en el medio (ver punto 3.3.11).

3.3.11 Determinaciones analíticas

- *Biomasa total (Xt)*

Se define a partir del peso seco celular y se expresa en g/l. Se obtuvo por secado de las células en estufa a 60°C hasta peso constante o mediante liofilización de las mismas. Para ello se tomaron alícuotas de 1 a 10 ml de cultivo (dependiendo del ensayo) y se centrifugaron a 10.000 rpm por 10 min. El *pellet* celular se lavó dos veces con agua desionizada.

- *Biomasa residual (Xr)*

Se define como la diferencia entre Xt (g/l) y la concentración de PHA (g/l).

$$Xr = Xt - PHA$$

- *Análisis y cuantificación de PHA*

(1) Cromatografía gaseosa (GC):

Para el análisis y cuantificación de PHB y P(3HB-*co*-3HV), muestras de 10-30 mg de células liofilizadas fueron sometidas a metanólisis (Brandl et al. 1988) o propanólisis (Riis & Mai 1988). Se utilizó como estandar interno 100 μl de una solución de ácido benzoico (20 mg/ml). 1 μl de las preparaciones incluyendo los ésteres de metilo o

propilo fueron analizadas mediante cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (GCFID) o espectrometría de masa (GC-MS).

La determinación del polímero por GC-MS se efectuó en un equipo GC-MS QP2010 Ultra Shimadzu, equipado con una columna HP-5MS ([5% fenil]-metilpolisiloxano), con una relación de *split* 50:1. Las corridas se realizaron en modo TIC (*Total Ion Chromatogram*) y SIM (*Selective Ion Monitoring*). La cuantificación se realizó en modo SIM monitoreando los siguientes iones m/z: 43, 71, 74, 103 según lo descrito por Tan y col (2014). Se construyó una curva de calibración utilizando el copolímero P(3HB-*co*-HV) con 12 % en peso de 3HV (403121 Sigma-Aldrich), PHB (29435-48-1 Sigma Fluka) y ácido benzoico (B-9300 Sigma) como estándar interno. Los estándares fueron sometidos a metanólisis en las mismas condiciones que las muestras.
Programa de separación y análisis: La temperatura del puerto de inyección, la interfase y la fuente de iones fueron 280ºC, 300ºC y 300ºC, respectivamente. Se utilizó He ultra puro (Linde) como gas de arrastre. El programa de separación se inició con el horno a 80ºC durante 2 min, seguida de una rampa de 8ºC/min hasta 220ºC y mantenida por 2 min. Finalmente, la corrida incluyó una segunda rampa de 20ºC/min hasta los 310ºC. La ionización se efectúo por impacto electrónico (EI) a 70eV

El análisis por GC-FID se efectuó en dos equipos:
1. Hewlett-Packard modelo 6890 equipado con una columna HP-5 ([5% fenil]-metilpolisiloxano) y detector FID. Se inyectó 1 μl de muestra con un *split*: 20:1. Se usó N_2 como gas de arrastre con un flujo de 2 ml/min y el programa de temperaturas fue el siguiente: 80°C por 2 min, seguido de una rampa de temperatura de 8°C/min hasta alcanzar 140°C donde se mantuvo por 2 min. Para verificar los tiempos de retención de los monómeros 3HB y 3HV se utilizó como estándar externo los metil ésteres obtenidos a partir de un protocolo de metanólisis ácida de células liofilizadas de Z69 crecidas en presencia de ácido nonanoico (Catalán et al., 2007).
2. Hewlett-Packard modelo 6890 A con una columna capilar apolar HP-5 Se inyectaron 2 μl de muestra con un *split* 20:1. Se usó N_2 como gas de arrastre con un flujo de 0,6ml/min. La temperatura del inyector fue de 250°C y se utilizó el siguiente programa de temperaturas: 100°C por 3 min, seguido de una rampa de temperatura de 8°C/min por un período de 30 min. La curva de calibración se construyó utilizando

como estándar externo el copolímero P(3HB-*co*-3HV) (Sigma) y ácido benzoico como estándar interno, sometidos en este caso a propanólisis.

(2) Método gravimétrico

A partir de 10 ml de cultivo se recuperaron las células por centrifugación a 10.000 rpm por 10 min. El pellet celular se resuspendió en igual volumen de una solución de hipoclorito de sodio 5% y se incubó a 37°C durante 2 horas para su hidrólisis. El hidrolizado se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min. El pellet se lavó dos veces con agua desionizada para eliminar todos los componentes y restos celulares solubles en agua. El material polimérico insoluble en agua se secó en estufa a 60°C durante 72 horas o hasta peso constante. La cantidad de polímero se determinó por peso seco y la concentración fue calculada dividiendo este valor entre el volumen de cultivo empleado para la extracción. El contenido de PHA expresado en % corresponde a la relación PHA (g/l) en la Xt, (g/l).

$$\%\, PHA\ = \frac{PHA}{Xt} * 100$$

- *Purificación de PHB y P(3HB-co-3HV)*

El material polimérico de células crecidas en presencia de glucosa o glucosa/propionato se extrajo según lo descrito por Law y Slepecky (1961).

H. seropedicae se cultivó en medio LGI en presencia de la fuente de carbono correspondiente. Cuando el cultivo alcanzó la fase estacionaria de crecimiento se colectaron las células por centrifugación, se resuspendieron en igual volumen de hipoclorito de sodio (5%, p/v) y se incubaron durante 2 horas a 37ºC. La suspensión obtenida se centrifugó y el “pellet” fue lavado dos veces con agua desionizada y una con un pequeño volumen de metanol. El “pellet” fue resuspendido en cloroformo caliente para ayudar a su disolución y se volvió a centrifugar para eliminar todo residuo insoluble en cloroformo. El sobrenadante conteniendo el material polimérico se precipitó con 4 volúmenes de metanol frío durante toda la noche a 4ºC. El precipitado se separó por centrifugación y se secó bajo un flujo de N_2.

- *Determinación de la concentración de propionato de Na en el sobrenadante*

La concentración de propionato de sodio en el sobrenadante fue determinada por HPLC-UV. Volúmenes de 20 μl de los sobrenadantes adecuadamente diluidos fueron filtrados por membranas de poro de 0,2 μm (Millipore) y luego fueron inyectados en un equipo de HPLC (HP1000 de Agilent) equipado con una columna Shodex (KC-811) y un detector UV a 210nm. La corrida se efectúo a 45°C y se utilizó ácido fosfórico 0,1% como fase móvil a un flujo de 1ml/min. Se realizó una curva de calibración, utilizando propionato de Na (P1880 Sigma) como estándar.

- *Determinación de la concentración y presencia de ácidos orgánicos en el sobrenadante*

La concentración de ácidos orgánicos en el sobrenadante del cultivo en lote alimentado fue determinada por HPLC-UV. Volúmenes de 20 μl de los sobrenadantes adecuadamente diluidos se filtraron por membrana de poro de 0,2 μm (Millipore), e inyectaron en un equipo HPLC Dionex Ultimate 3000 equipado con una columna Aminex HPX87-H (Biorad, USA), con detector UV (210nm). Se utilizó H_2SO_4 6mM como solvente de corrida y la elución se efectuó a una velocidad de 0,6ml/min. Para obtener la curva de calibración se usaron soluciones conteniendo de 0,1 a 4 g/l de cada uno de los ácidos analizados. Se determinaron los siguientes ácidos: acético, cítrico pirúvico, láctico y fórmico. El análisis de la presencia de los ácidos orgánicos en el sobrenadante de los cultivos continuos y en lote se determinó por HPLC usando una columna Shodex RSpak KC-811K, con detector UV (210nm). Se utilizaron diferentes ácidos orgánicos como estándares para verificar los tiempos de retención y así identificar los compuestos que eluían en cada corrida (α-cetoglutarico, cítrico, pirúvico, láctico, acético, succínico, fumárico).

- *Determinación de la concentración de glucosa*

La concentración de glucosa en el sobrenadante fue determinada por tres metodologías diferentes. En primer lugar se usó el sistema Accu chek Active (Roche Diagnostics, Alemania), según lo especificado por el fabricante. Se utilizó también el Kit enzimático “Enzymatic method for glucose determination in serum or plasma”(Wiener Lab. Rosario, Argentina). Este Kit requiere construir una curva de calibración, la cual fue realizada de acuerdo a lo especificado en el folleto adjunto. En

caso de ser necesario, los sobrenadantes de los cultivos fueron diluidos con agua desionizada de manera de que se ubicaran dentro del rango de concentración estipulado para cada kit. Finalmente, en algunos ensayos la concentración de glucosa se determinó por HPLC en un equipo Dionex Ultimate 3000, empleando una columna Aminex HPX87-H (Biorad, USA), equipado con un detector de índice de refracción (IR). Se utilizó H_2SO_4 6mM como solvente de corrida y la elución se efectuó a una velocidad de 0,6ml/min. Los sobrenadantes diluidos en forma adecuada con agua desionizada, se filtraron con filtros de 0,2 μm (Millipore) antes de ser inyectados. La cuantificación se efectúo empleando una curva de calibración elaborada a partir de una solución madre de glucosa en el rango de 0,1 a 2 g/l.

- *Determinación de la concentración de amonio*

La concentración de amonio en el medio de cultivo se determinó con un electrodo de amonio (Thermo Orion, Waltham, MA, USA). Para ello las muestran se llevan a pH14 con el agregado de NaOH 10N. Se construyó una curva de calibración en el rango de 0,1 a 10mM de NH_4Cl según lo descrito por el fabricante.

3.4 Resultados y discusión

3.4.1 Determinación de parámetros de crecimiento y evaluación de la síntesis de copolímero por *H. seropedicae* Z69 en presencia de propionato y propionato-glucosa (P/G) como fuente de carbono

.

3.4.1.1 Perfil de crecimiento en propionato de sodio

Se determinó el perfil de crecimiento de *H. seropedicae* Z69 cultivada en medio LGI y en presencia de diferentes concentraciones de propionato de sodio como única fuente de carbono (figura 3.4.1).

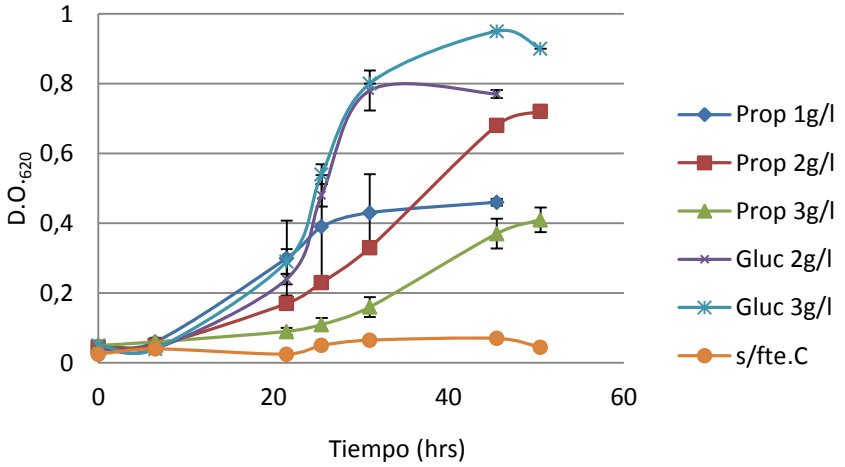


Figura 3.4.1 Perfil de crecimiento de la cepa Z69 en presencia de propionato de sodio Curvas realizadas a partir del crecimiento en tubos con 5 ml de medio LGI (ver Mat y met).

Como se observa en la figura 3.4.1, la fase *lag* se incrementa al aumentar la concentración de propionato. Como era de esperar, el cultivo en presencia de 1 g/l de

dicha fuente de carbono alcanzó una menor densidad óptica máxima, comparada con el cultivo con 2 g/l, aunque sin embargo presentó una fase *lag* más corta. Estimamos que concentraciones de 3 g/l o mayores de propionato resultarían más tóxicas para el crecimiento, de acuerdo al perfil observado. Dados estos resultados, se seleccionó un rango de concentración propionato de sodio de entre 1-2 g/l de para utilizar en los ensayos del estudio de la síntesis del copolímero

3.4.1.2 Análisis de síntesis de P(3HB-*co*-3HV) por *H. seropedicae* Z69 cultivada en una mezcla de glucosa y propionato (G/P)

Los estudios que desarrollamos previamente en el laboratorio nos permitieron establecer que *H. seropedicae* es capaz de acumular P(3HB-*co*-3HV) cuando crece en presencia de ácido nonanoico como única fuente de carbono (Catalán et al. 2007).
A los efectos de determinar si la bacteria es capaz de acumular el copolímero al consumir propiónico, analizamos las células obtenidas en un cultivo en medio LGI (NH_4Cl 20mM) con 2 g/l de propionato de sodio como única fuente de carbono. Las células recuperadas luego de 72 horas de incubación fueron sometidas a metanólisis (como se describe en Materiales y Métodos) y analizadas mediante GC-FID. Los compuestos separados en la corrida cromatográfica fueron identificados como 3HB de metilo y 3HV de metilo, de acuerdo a los tiempos de retención de los metil-ésteres correspondientes, obtenidos a partir de células de Z69 crecidas en ácido nonanoico y utilizados como estándares externos.
El ácido nonanoico y propiónico son relativamente tóxicos y sólo pueden ser utilizados como fuente de carbono a bajas concentraciones. Esto determina una baja producción de biomasa y acumulación de copolímero. En varios microorganismos se emplea el propionato de sodio como co-sustrato como estrategia para producir el monómero 3HV (Lee, Kim, et al. 1996; Ramsay et al. 1990; Silva et al. 2000). En general, en este tipo de estrategia se adiciona al medio de cultivo un sustrato carbonado (carbohidratos, etc) a altas concentraciones, que permite obtener una cantidad apreciable de biomasa y polímero (homopolímero) y propionato como co-sustrato a bajas concentraciones, para obtener finalmente el copolímero.

En este trabajo analizamos la producción de biomasa y P(3HB-*co*-3HV) en cultivos de *H. seropedicae* Z69, usando glucosa como sustrato y propionato de sodio como co-sustrato. Como se detalla en Materiales y Métodos, cultivamos la cepa Z69 en 2 matraces simultáneamente, denominados A y B, con glucosa como única fuente de carbono. A las 24 horas de incubación el matraz A no fue modificado y se utilizó como control de crecimiento y síntesis de PHB. Al matraz B se le agregó propionato de sodio a una concentración final de 1 g/l y NH_4Cl a una concentración final de 5mM. Se seleccionó la concentración de 1 g/l de propionato de sodio de acuerdo a los resultados obtenidos previamente, ya que no afectaría el crecimiento. En la tabla 3.4.1 se muestran los datos de densidad óptica, biomasa, concentración y composición de polímero. Se incluyen también las concentraciones de glucosa y amonio en el sobrenadante a tiempo inicial, 24 y 48 horas. El polímero acumulado luego del agregado del propionato se denominó en forma genérica PHA.

A las 24 horas de incubación, el contenido de PHA de las células en ambos matraces fue similar (alrededor de un 30%). Los cultivos se comportaron de forma distinta, a pesar de que las DO_{620nm} al inicio del ensayo fueron similares. A las 24 horas de incubación el matraz A alcanzó una DO_{620nm} mayor que la del matraz B, lo que se vió reflejado en una mayor biomasa. No es posible comparar el consumo de glucosa, dado que no se determinó la concentración inicial de este carbohidrato en el matraz A. Sin embargo, a las 24 horas de incubación las concentraciones de glucosa fueron similares en ambos matraces (A y B) (alrededor de 6 g/l). Al analizar la concentración de amonio remanente en los matraces a las 24 horas, las células del matraz A habrían consumido el doble que las del matraz B. Estos datos sugieren que al inicvio del ensayo el cultivo A debe haber tenido una mayor concentración de glucosa, generando un mayor crecimiento. A las 24 horas, el polímero producido en el matraz A se determinó mediante gravimetría y no se analizó la composición del mismo por GC-FID, dado que en trabajos previos con la cepa Z69 crecida en presencia de glucosa como única fuente de carbono, sólo se detectó la presencia del monómero 3HB (Catalán et al. 2007).

Tabla 3.4.1 Resultados de los cultivos realizados en matraz de *H. seropedicae* Z69

	Tiempo 0 hrs			**Tiempo 24 hrs**						**Tiempo 48 hrs**						
Cultvo	DO_{620}	Glu (g/l)	NH_4 (mM)	DO_{620}	Glu (g/l)	NH_4 (mM)	Xt (g/l)	PHB^+ (g/l)	PHB %	DO_{620}	NH_4 (mM)	Xt (g/l)	PHA^+ (g/l)	PHA %	Monómeros^{++}	
															HB	HV
A	0,126	nd	19	3,51	5,70	1,50	1,69	0,44	26	7,75	< 0,01	2,8	1,18	42	+	-
B	0,124	9,6	20	1,75	5,87	2,78*/9,30**	0,96	0,34	34	13,3	< 0,01	4	2,18	55	+	+

nd: no determinado

*Concentración de amonio determinada antes del agregado NH_4Cl; ** Concentración de amonio luego del agregado de NH_4Cl

+ La concentración de PHB y PHA (g/l) se determinó por el método gravimétrico

++ Determinación cualitativa del polímero sintetizado analizada por GC/FID: (+) Presencia del monómero, (-) ausencia del monómero

A las 48 horas de incubación se detectó 3HV de metilo en el material recuperado del matraz B, en donde se agregó 1 g/l de propionato de sodio como co-sustrato y amonio. La biomasa total alcanzada en el mismo fue de 4 g/l, con un contenido de copolímero del 50% (tabla 6.1.1.2.1). Este ensayo permitió obtener un contenido de P(3HB-*co*-HV) del 50%, similar al contenido de PHB obtenido sólo con glucosa como fuente de carbono. La estrategia de cultivar a la cepa Z69 en presencia de glucosa y propionato permitió obtener una cantidad de biopolímero (50%), con monómeros de 3HV. Dependiendo del porcentaje molar del 3HV, en éstas condiciones, se puede haber generado un material con mejores propiedades que el homopolímero de 3HB.

3.4.2 Obtención de mutantes de la cepa Z69 incapaces de metabolizar propionil CoA y cálculo del rendimiento de transformación de propionato en 3HV

El propionato es adicionado al medio de cultivo como precursor para generar los monómeros 3HV y así obtener un PHA con mejores propiedades. Parte del mismo es catabolizado por *H. seropedicae* para el crecimiento, situación que no es deseable ya que es un sustrato costoso y tóxico, por lo que se lo utiliza a bajas concentraciones. De manera de consumir el propionato para la síntesis exclusiva de HV, construimos mutantes incapaces de catabolizar el propionil-CoA.

3.4.2.1 Identificación de genes diana en el genoma de las cepas SmR1 y Z67.

Se analizaron las rutas catabólicas del propionato identificadas en diferentes microorganismos (Textor et al. 1997; Wegener et al. 1968), las vías propuestas para *H. seropedicae* SmR1 según la anotación de Genopar y las descritas en la base de datos de KEGG (figura 3.4.2). También se analizó el genoma de *H. seropedicae* SmR1 y Z67 disponibles en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/, utilizando el servidor RAST (figura 3.4.3). En la figura 3.4.2, los recuadros pintados de verde corresponden a las enzimas presumiblemente presentes en la cepa SmR1 según KEGG. Se observa que existe un primer módulo en el metabolismo del propionato que genera el intermediario propionil-CoA, el cual involucra las enzimas propionato-CoA ligasa (EC 6.2.1.17 codificada por el gen *prp*E) o una acetil-CoA sintetasa (EC 6.2.1.1), ambas reversibles. De acuerdo a

lo que se muestra en la figura 3.4.2 en *H. seropedicae,* el propionil-CoA, podría ser catabolizado por dos rutas. El ciclo del 2-metilcitrato (2MCC), indicado por la presencia de sólo dos de las enzimas involucradas: la 2-metilcitrato sintasa, (EC 2.3.3.5, gen *prp*C) y la metil-isocitrato liasa (EC 4.1.3.30, gen *prp*B). La segunda ruta sería la del malonato semialdehído, que transcurre por el acriloil-CoA a malonil-CoA, generando finalmente acetil-CoA. Las dos primeras reacciones corresponden a la β-oxidación de los ácidos grasos y las enzimas que aparentemente estarían presentes (y eventualmente se expresarían) serían una acil-CoA deshidrogenasa (EC 1.3.8.7 gen *cai*A) y una enoil-CoA hidratasa (EC 4.2.1.17 gen *paa*F con dos copias en el genoma). De acuerdo a lo indicado en la figura 3.4.2, la otra enzima que estaría presente en la cepa SmR1 sería la metilmalonato semialdehido deshidrogenasa (EC 1.2.1.18, gen *mms*A con dos copias en el genoma).

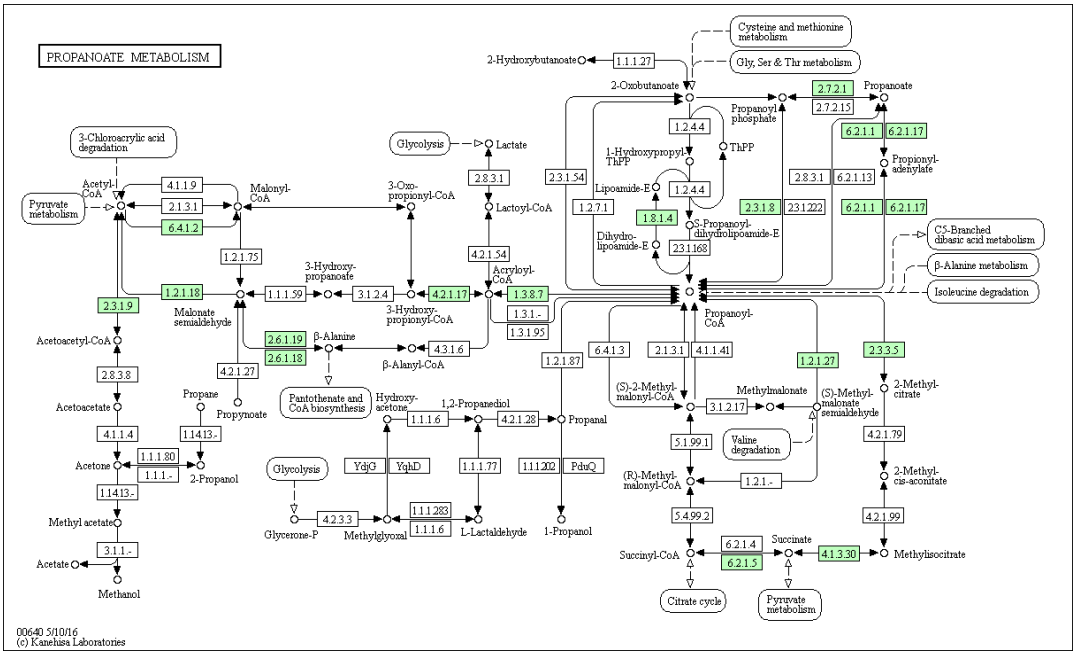


Figura 3.4.2 Esquema de las rutas metabólicas para el propionato obtenidas de la base de datos KEGG para *H. seropedicae* SmR1. En verde se señala las enzimas presentes de acuerdo a dicha base de datos.

Esta última enzima se denomina también malónico semialdehido oxidasa/descarboxilasa y participaría además en otras rutas metabólicas como el metabolismo de aminoácidos (β-alanina, alanina y aspártico) (http://www.kegg.jp/dbget-bin/www_bget?ko:K00140).

Los resultados del análisis del metabolismo del propionato a partir del genoma anotado con el servidor RAST se muestran en la figura 3.4.3, indicando con color las enzimas presentes de acuerdo a los datos del genoma de las cepas SmR1 y Z67. Al igual que lo observado en el esquema de KEGG, identifica las enzimas para el primer módulo (sintesis del propionil-coA) y luego la ruta del 2MCC, desde propionil-CoA a succinato, indicando la presencia de todas las enzimas de esta ruta: 2-metilcitrato sintasa (*prp*C), 2-metilcitrato deshidratasa (*acn*D), 2-metil isocitrato deshidratasa (MICDH) y 2-metil isocitrato liasa (*prp*B)

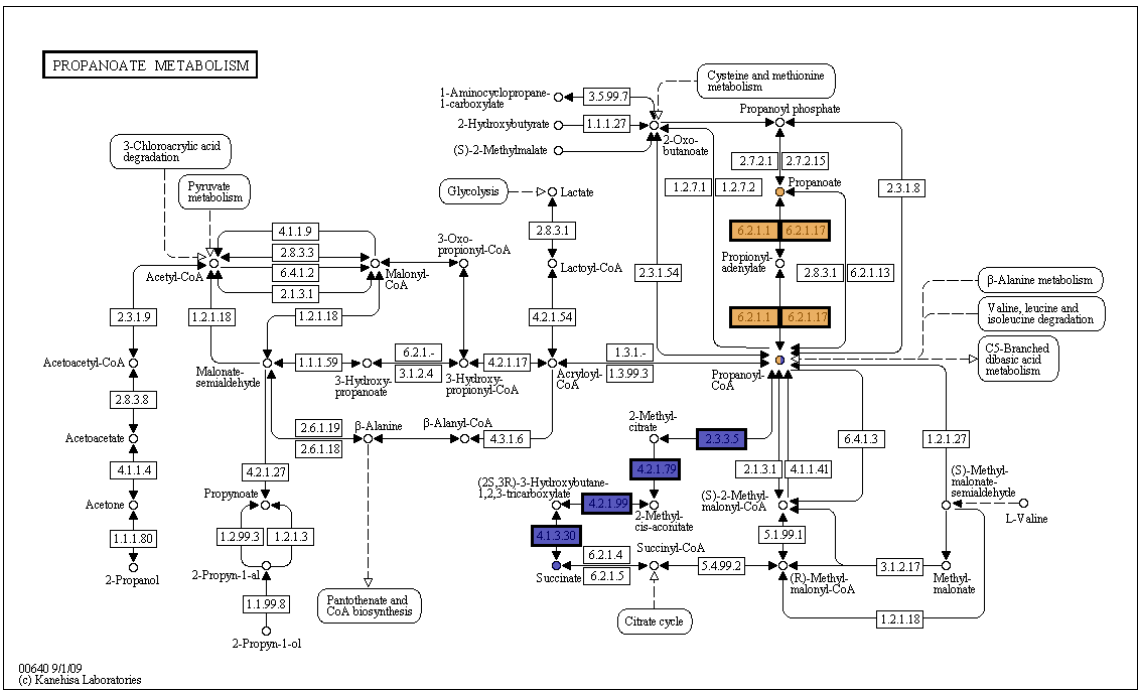


Figura 3.4.3 Mapa de las enzimas del metabolismo del propionato de acuerdo a la anotación del RAST.

Tabla 3.4.2 Lista de enzimas del metabolismo del propionato presentes en *H. seropedicae* de acuerdo a la anotación KEGG y RAST.

	Enzima	EC	gen	KEGG	RAST
Ruta del 2-metilcitrato	propionato-CoA ligasa	6.2.1.17	*prp*E		
	acetil-CoA sintetasa	6.2.1.1			
	2-metilcitrato sintasa	2.3.3.5	*prp*C		
	2-metilcitrato deshidratasa	4.2.1.79	*acn*D	-	
	2-metilisocitrato deshidratasa	4.2.1.99	MICDH	-	
	2-metilisocitrato liasa	4.1.3.30	*prp*B	-	
Ruta del acriloil-CoA por malonil-CoA	Acil-CoA deshidrogenasa	1.3.8.7	*cai*A		-
	Enoil-CoA hidrolasa	4.2.1.17	*paa*F		-
	3-hidroxi isobutiril-CoA hidrolasa	3.1.2.4		-	-
	3-hidroxiporpionato deshidrogenasa	1.1.1.59		-	-
	Malonil-CoA reductasa	1.2.1.75		-	-
	Metilmalonato semialdehido deshidrogenasa	1.2.1.18	*mms*A		-

Los cuadrados coloreados señalan la presencia de la enzima en la ruta correspondiente según los criterios usados para la anotación empleada.

En la tabla 3.4.2 se muestra en forma esquemática las enzimas involucradas en cada una de las rutas metabólicas, los genes que las codificarían y la presencia o no según cada anotación.

El análisis del genoma de las cepas SmR1 y Z67 realizado por RAST permitió conocer la organización de los genes que presumiblemente codifican para las enzimas de la ruta 2MCC. Los genes *prp*R, *prp*B y *prp*C se encuentran agrupados en el genoma (figura 3.4.4).

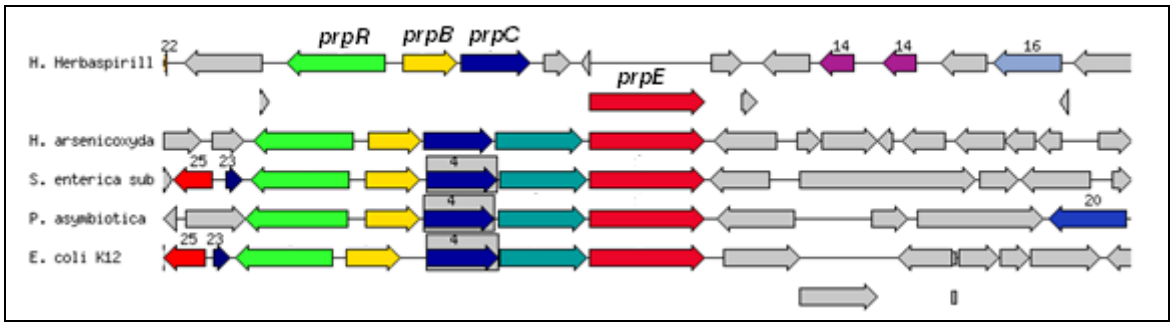


Figura 3.4.4 Organización de los genes del metabolismo del propionato en el genoma de las cepas Z67 y SmR1de *H. seropedicae.*

Por otro lado, el gen *acn*D junto con un gen regulador ("*Propionate catabolism operon transcriptional regulator of GntR family [predicted]*"), estarían agrupados en otra región del genoma en ambas cepas. Finalmente, el gen que codifica para la enzima 2-metilisocitrato deshidratasa o aconitasa hidratasa (MICDH) se encontraría separado en el genoma también en ambas cepas.

La organización de los genes *prp* involucrados en la ruta de 2MCC en *H. seropedicae* sería diferente a lo descrito en las enterobacterias. *E. coli y Salmonella typhimurium* poseen los genes *prp*R, *prp*B, *prp*C, *prp*D y *prp*E agrupados y organizados en el operón *prp*BCDE (Textor et al. 1997; Horswill & Escalante-Semerena 1997). Esta organización es similar a la descrita en otros organismos Gram negativos como *R. eutropha*, *P. putida*, *Pseudomonas aeruginosa* y *B. sacchari,* donde los genes *prp*R, *prp*B y *prp*C se encuentran agrupados (Brämer et al. 2002; Brämer & Steinbüchel 2001). En *H. seropedicae* el gen *acn*D podría corresponder al *prp*D y estaría ubicado en otra región del genoma al igual que MICDH.

La ruta del 2MCC es responsable del catabolismo del propionato en una amplia variedad de bacterias Gram negativos (Brämer & Steinbüchel 2001; Brämer et al. 2002; London et al. 1999; Textor et al. 1997) y se propone que podría actuar como una ruta de detoxificación del propionil-CoA (Horswill et al. 2001). Por otro lado, la ruta del malonato semialdehido ha sido descrita en los tejidos vegetales y es la ruta principal del catabolismo del propionato en algas (Wegener et al. 1968). Asimismo, se ha demostrado que en la eubacteria *Chloroflexus aurantiacus,* esta ruta estaría implicada en la fijación del CO_2, en la cual el acetil-CoA es convertido a succinato a través de la síntesis de propionil-CoA (Eisenreich et al. 1993).

A partir de los datos obtenidos del análisis del genoma de las cepas SmR1 y Z67, se decidió construir mutantes de la cepa Z69 en el gen *prp*C (Hsero_3119) que codifica para la enzima 2-metilcitrato sintasa de la ruta de 2MCC. En estudios previos se estableció que dicho gen es esencial para la degradación del propionil-CoA en *R. eutropha* y *B. sacchari* (Brämer et al. 2002; Brämer & Steinbüchel 2001). Asimismo, mutantes en el gen *prp*C de *B. sacchari* y una cepa de *S. typhimuriun* transformada con el operon *phb* de *Acinetobacter* sp., mostraron una mayor proporción del monómero 3HV en el copolímero, cuando fueron cultivadas en presencia de propionato de sodio como co-sustrato (Silva et al. 2000; Aldor et al. 2002). En el caso de la ruta del malonato semialdehido, se seleccionaron como genes blancos a mutar el gen *cai*A (Hsero_2798) y *mms*A (Hsero_3067) (figura 3.4.2). En este caso se optó por eliminar la primera y la última enzima de la ruta.

3.4.2.2. Construcción de mutantes en los genes *prp*C, *mms*A y *cai*A

Se ajustaron las condiciones de los ensayos de PCR (temperatura de hibridación, concentración $MgCl_2$ y programa de ciclado) 1, 2 y 3, utilizando los cebadores diseñados a partir de las secuencias adyacentes e internas del gen que se deseaba eliminar. A partir del producto de PCR3 se procedió a construir los mutantes *mms*A (Hsero_3067), *cai*A (Hsero_2798) y *prp*C (Hsero_3119)

En la figura 3.4.5, se muestran los productos de PCR (1 y 2) obtenidos para los genes *mms*A y *cai*A. Para el gen *prp*C sólo se observa producto de amplificación para el PCR 1. No se incluye el fragmento generado por PCR 2. En todos los casos, los tamaños

obtenidos fueron los esperados de acuerdo al diseño de los cebadores (ver tabla 3.3.2 en Materiales y métodos)

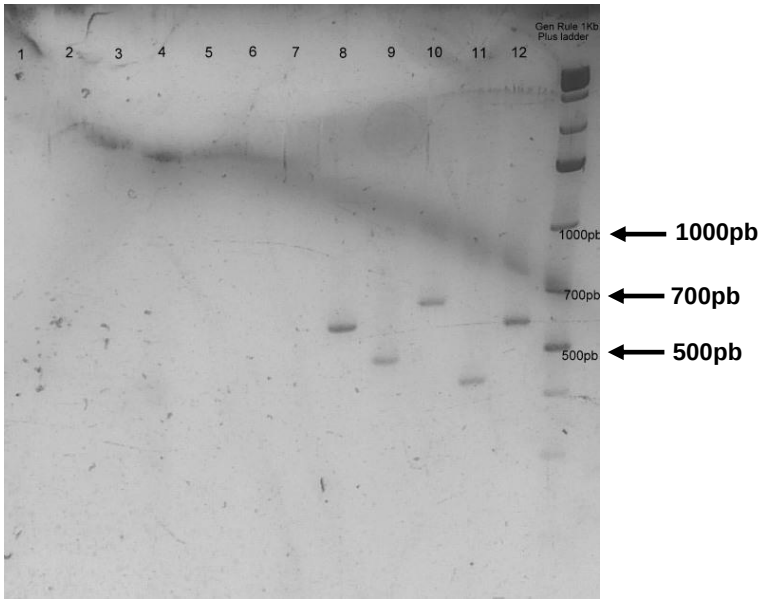
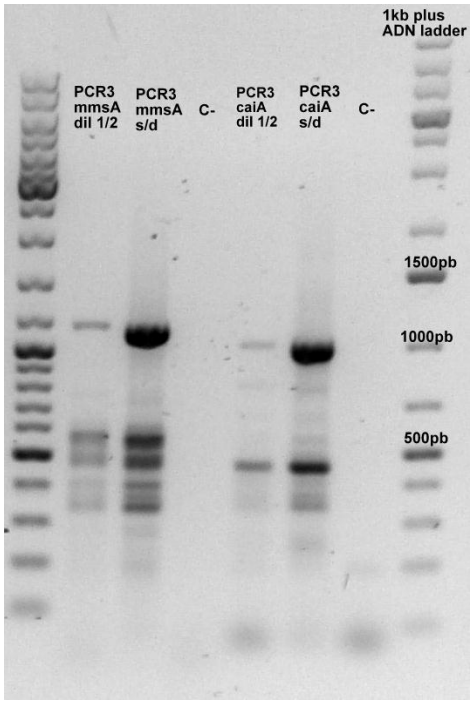


Figura 3.4.5 Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR 1 y 2.

Carriles 1-6 Controles negativos de PCR 1 y 2 de los tres genes *mms*A, *cai*A y *prp*C.
Carril 7: sin sembrar
Carril 8: PCR1 *prp*C, banda del tamaño esperado mayor a 550pb
Carril 9: PCR2 *mms*A banda del tamaño esperado entre 450-480pb
Carril 10: PCR1 *mms*A banda del tamaño esperado aproximadamente 600 pb
Carril 11: PCR1 *cai*A banda del tamaño esperado entre 400-450 pb
Carril 12: PCR2 *cai*A banda del tamaño esperado entre 550-600pb

En la figura 3.4.6 (A, B) se muestran los productos correspondientes al PCR3 para los tres genes. Los tamaños de los productos de PCR3 de *cai*A, *mms*A y *prp*C son 975pb, 1079pb y 1100pb, respectivamente (Tabla 3.4.3). El análisis de secuencia de cada uno estos fragmentos permitió confirmar que los fragmentos amplificados correspondían a las regiones esperadas de acuerdo al diseño de los cebadores.

(A)



(B)

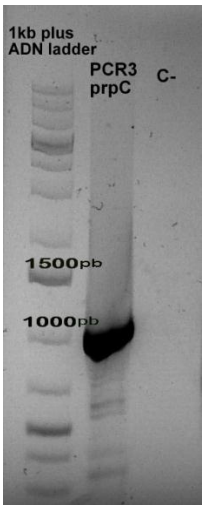


Figura 3.4.6 Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos de la reacción PCR3: (A) se muestra el producto obtenido para los genes *mms*A y *cai*A, como molde se utilizó los productos del PCR1 y 2 sin diluir y diluidos ½, (B) se muestra el producto obtenido para el gen *prp*C.

Estos productos amplificados fueron clonados en pK18mob*sacB* y transferidos a *H. seropedicae* Z69. Se confirmó la presencia de la inserción (doble recombinante)

mediante PCR de acuerdo al tamaño del producto esperado en el caso del gen salvaje o el mutado (tabla 3.4.3).

En el caso del gen *cai*A, se analizaron mediante PCR aproximadamente unas 150 colonias. En todas ellas se obtuvo un producto de PCR del tamaño esperado para el gen salvaje. En ningún caso se obtuvo el fragmento de 975pb.

En el caso del gen *prpC* se analizaron aproximadamente 30 colonias y a partir de 3 de ellas se obtuvo un producto de PCR con un tamaño correspondiente al del gen mutado (aproximadamente 1100pb). Estas tres mutantes *prpC* fueron incapaces en crecer en placas de medio definido (LGI) con 2 g/l de propionato de sodio como fuente de carbono.

Tabla 3.4.3 Tamaño del producto de PCR esperado según el genotipo salvaje (wt) o mutado.

	Tamaño fragmento salvaje (pb)	Tamaño fragmento mutado (pb)
*mms*A	2400	1079
*cai*A	1754	975
*prp*C	1721	1100

En el caso del gen *mms*A se analizaron aproximadamente 20 colonias, identificando en una de ellas un producto de PCR de aproximadamente 1000pb, tamaño esperado para el gen mutado.

Para la construcción del doble mutante Z69*mms*A*prp*C se siguió el mismo procedimiento que para los simples mutantes. En este caso, la construcción del fragmento mutado correspondiente al gen *prp*C clonado en pK18*mobsac* fue transferido a *H. seropedicae* Z69*mms*A. El análisis de las colonias mutantes se realizó mediante PCR de la misma forma que para la mutante Z69*prp*C y se obtuvo un mutante en el gen *prp*C a partir de la cepa Z69*mms*A.

3.4.3. Fenotipo de los mutantes en los genes *prp*C y *prp*C*mms*A

Se determinaron los perfiles de crecimiento en medio definido LGI con propionato o glucosa como únicas fuentes de carbono y se analizó el tipo de polímero acumulado al crecer en presencia de una mezcla de glucosa y propionato como fuente de carbono.

3.4.3.1 Perfiles de crecimiento

Los perfiles de crecimiento de los distintos mutantes construidos se muestran en la figura 3.4.7 (A, B, C, D, E). Se ensayaron diferentes concentraciones de propionato como fuente de carbono. El mutante *prp*C (Z69*prp*C) fue incapaz de crecer en presencia de propionato de sodio en todas las concentraciones ensayadas (figura 3.4.7) y por su fenotipo lo denominamos Z69Prp. Este resultado indica que en *H. seropedicae* la ruta del 2 metilcitrato estaría involucrada en el catabolismo del propionil-CoA y sería esencial.

Este mismo comportamiento se observó en el doble mutante Z69*prp*C*mms*A. El mutante *mms*A creció de forma similar o incluso mejor que la cepa salvaje en presencia de propionato de sodio en todas las concentraciones ensayadas. Esto sugiere que el fenotipo de no crecimiento observado en el doble mutante se debería a la ausencia del gen *prp*C. Como se observa en los gráficos de la figura 3.4.7, la cepa salvaje incluida como control no exhibió un buen crecimiento en presencia de glucosa así como en ninguna otra condición.

Con estos resultados no podeamos afirmar que la única ruta posible para el metabolismo de propionil-CoA en *H. seropedicae* sea la del 2MCC. Sin embargo si podemos afirmar que ésta ruta es esencial para el crecimiento de la bacteria en propionato, las condiciones de ensayo. La otra vía no parece contribuir al crecimiento en nuestras condiciones de cultivo, pudiendo quizás estar involucrada en el consumo o síntesis de propionil CoA para generar algún metabolito intermediario. El efecto de la mutación en el gen *mms*A debería analizarse en lo que refiere a otros aspectos fisiológicos de la bacteria (análisis transcripcional). De acuerdo al mapa metabólico y a la anotación del genoma de *Herbaspirillum*, existen dos genes que codificarían para la enzima metil-malonato semialdehido deshidrogenasa (Hsero_3067 y Hsero_4789). Se debería construir el mutante en el otro ORF Hsero_4798, de manera de confirmar o

descartar que la ruta del malonato semialdehido esté involucrada en el catabolismo del propiónico. Sin embargo, esta enzima no es específica de ésta ruta, y como se mencionó anteriormente, la ruta del malonato semialdehido ha sido descrita en tejidos vegetales, algas y en bacterias, pero en sentido de síntesis de propionil-CoA.

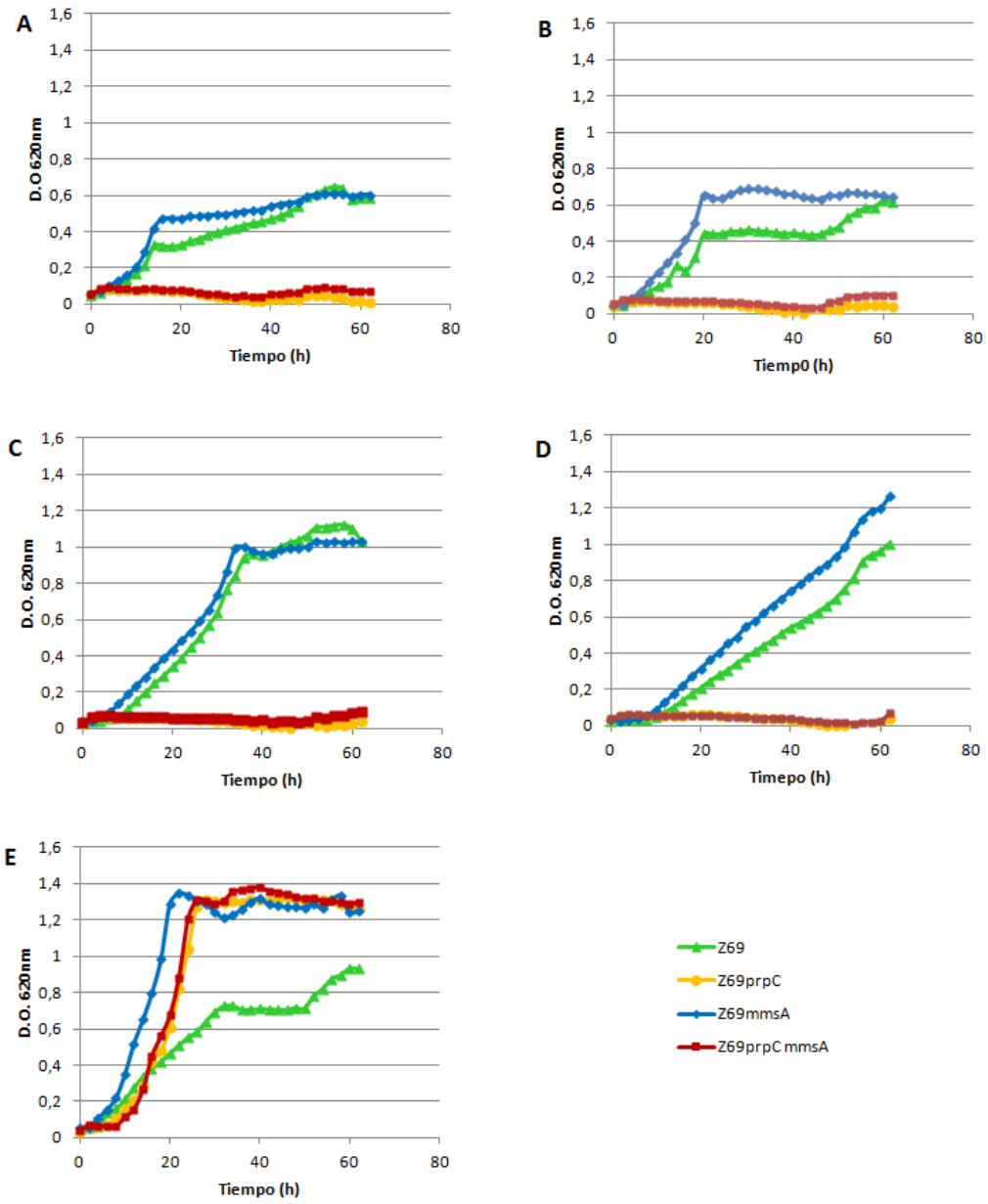


Figura 3.4.7 Perfiles de crecimiento de las cepas mutantes y salvaje en presencia de diferentes concentraciones de propionato de sodio en g/l.: A (0,5), B (1,0), C (2,0), D (3,0). Control crecimiento con 3 g/l de glucosa (E). Curvas realizadas a partir del crecimiento en placas de microtitulación (ver Mat y met).

3.4. 3.2. Complementación de función del mutante Z69Prp

Se amplificó por PCR el fragmento correspondiente al gen *prp*C salvaje (*prp*Cwt) de *H. seropedicae* Z69, se clonó en el vector pCR2.1 y se confirmó la identidad y orientación de clonado mediante análisis de secuencia. Debe destacarse que la región amplificada incluye el ORF completo y regiones adyacentes al mismo (1700 pb). El fragmento fue subclonado en el sitio *Hind*III/*Xba*I del vector pBBR1MSC-2, y de acuerdo al análisis de secuencia, el gen quedó clonado en el sentido adecuado para su expresión bajo el control del p*lac* de pBBR1MSC-2 que se encuentra previo al sitio de clonado. El vector pBBR1MSC-2::*prp*Cwt fue transferido por conjugación triparental a *H. seropedicae* Z69Prp, según lo descrito en Materiales y métodos. Como control se transfirió el vector pBBR1MSC-2 a la cepa Z69Prp.

El fenotipo se analizó mediante la determinación del perfil de crecimiento en medio LGI con 1 g/l de propionato como única fuente de carbono y Km^{50}

En el gráfico de la figura 3.4.8 se muestra el perfil de crecimiento de Z69Prp(pBBR1MSC-2::*prp*Cwt) y la cepa control Z69Prp(pBBR1MSC-2), en presencia de propionato. La cepa Z69Prp(pBBR1MSC-2::*prp*Cwt) logró recuperar su fenotipo de crecimiento en propionato a las aproximadamente 100 horas de incubación. Ambas cepas crecieron bien y de forma similar en glucosa y no se detectó crecimiento hasta el final del ensayo en el control sin fuente de carbono (figura 3.4.8).

En este ensayo hubiera sido fundamental incluir la cepa salvaje Z69 con el plásmido y comparar así su crecimiento en presencia de propiónico y Km. El gen *prp*C en el vector pBBR1MSC-2 fue clonado bajo el control del promotor fuerte p*lac,* lo que quizás haya alterado el metabolismo bacteriano. En trabajos previos realizados en el laboratorio, se transfirió a un mutante en un gen involucrado en el metabolismo de la xilosa, el gen salvaje utilizando el mismo vector bajo el control del mismo promotor. En ese ensayo se logró recuperar el fenotipo salvaje de forma parcial. Además, cuando se determinó la actividad enzimática codificada por ese gen en la cepa complementada, se determinó una actividad 10 veces mayor comparada con la de la cepa salvaje. Este importante aumento en la actividad enzimática pudo haber tenido algún efecto negativo en el microorganismo, que no le permitió recuperar completamente el fenotipo salvaje. La complementación de función sólo fue obtenida cuando el gen en cuestión se expresó bajo el control de su propio promotor. En el caso del metabolismo del

propionato, pudo haber ocurrido algo similar. Para verificar esto sería necesario en primer lugar transformar la cepa Z69 con dicha construcción y así evaluar el efecto de la misma en el metabolismo del propionato. Se debería también efectuar el ensayo de complementación de función con el gen *prpC* expresado bajo el control de su propio promotor y quizás hasta incorporado en el genoma.

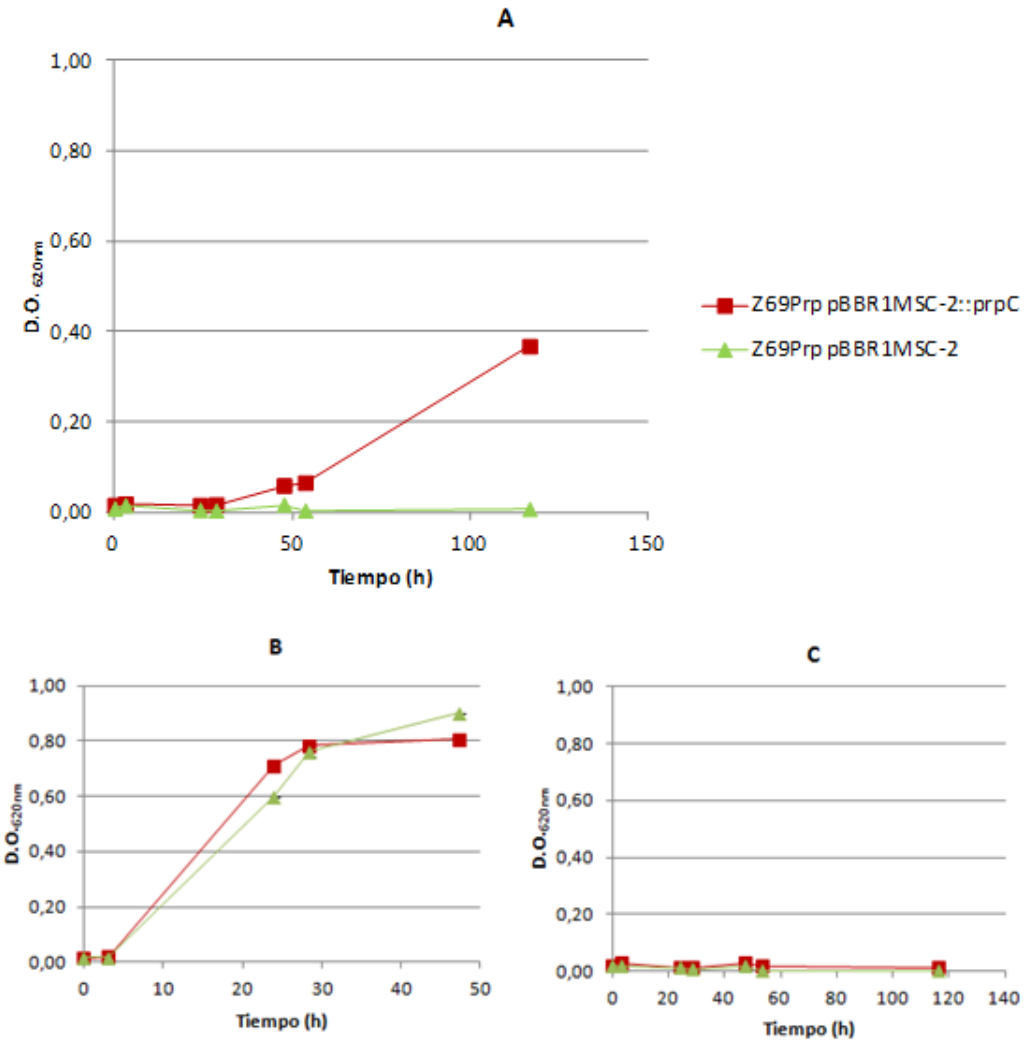


Figura 3.4.8 Perfil de crecimiento en medio LGI con 1 g/l de propionato y Km50 de la cepa Z69Prp (pBBR1MSC2::prpCwt) (A). Controles: crecimiento en glucosa (B) y sin fuente de carbono (C) Curvas de crecimiento realizadas en tubos con 5 ml de medio LGI (ver Mat y met).

3.4.3.3. Capacidad de sintetizar monómeros 3HV

La capacidad de la cepa Z69Prp de sintetizar el copolímero en presencia de propionato se evaluó en ensayos en matraces con 100 ml de medio LGI con una mezcla de glucosa (10 g/l) y propionato de Na (2 g/l) como fuente de carbono y NH_4Cl (20mM) como fuente de nitrógeno. Luego de 72 hrs de incubación, el polímero fue extraído de las células, y sometido a metanólisis (ver Materiales y Métodos). Los metil-ésteres se analizaron en GC-MS, en la figura 3.4.9 se muestran los perfiles cromatográficos correspondientes a la cepa Z69 y Z69Prp.

De acuerdo al perfil cromatográfico, el monómero 3HB en el polímero producido por Z69 está presente en una mayor proporción que el 3HV. Esto sin embargo no se observa en el caso de la cepa mutante, en donde ambos monómeros parecen exhibir una abundancia relativa comparable. Una composición relativa de polímero similar se observó al analizar los productos de metanólisis de células de Z69 y Z69Prp obtenidas a partir de cultivos en presencia de mezclas de xilosa-propionato y glucosa-ácido nonanoico (no se muestran los datos). A partir de este ensayo verificamos que la cepa mutante Z69Prp mantuvo la capacidad de sintetizar monómeros 3HV cuando es cultivada en presencia de una mezcla glucosa-propionato, xilosa-propionato y glucosa-nonanoico como fuente de carbono, y además estimamos que sería más eficiente en transformar propionato en 3HV.

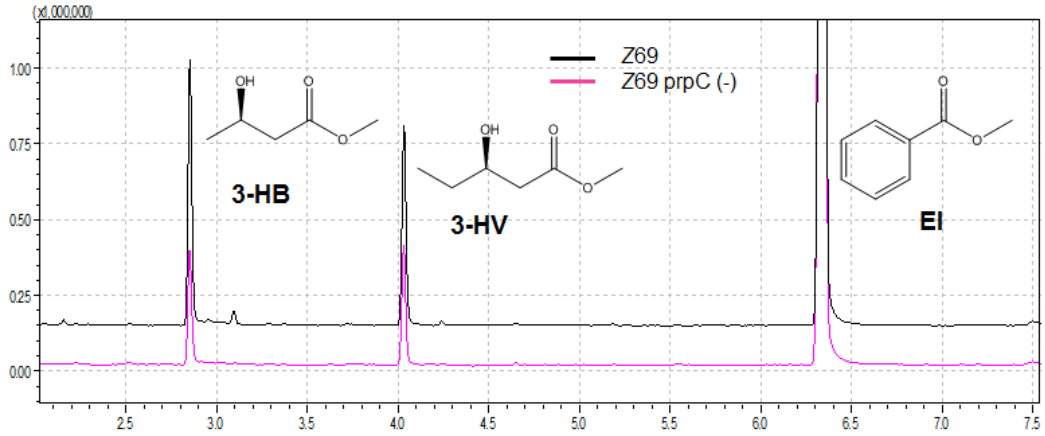


Figura 3.4.9 Cromatograma obtenido por derivatización del polímero purificado a partir de cultivos de Z69 (3,5mg) y Z69Prp (2,1mg) en LGI glucosa y propionato.

3.4.3.3.1. Análisis de la síntesis de 3HV por la cepa mutante en medio rico TY y a partir de glucosa.

Se analizó por GC-MS el polímero acumulado por las cepas Z69 y Z69Prp cultivadas en medio LGI con glucosa como única fuente de carbono, de modo de corroborar que el 3HV es sintetizado a partir del propionato en los cultivos en presencia de una mezcla de glucosa y propionato. En la tabla 3.4.4 se muestra la composición del polímero obtenido a partir de células cultivadas en presencia de glucosa como única fuente de carbono. El contenido de polímero fue similar en ambas cepas. Como era de esperar, se observó un pico correspondiente al 3HB de metilo en el cromatograma de la muestra proveniente de cultivos de Z69 en medio LGI con glucosa, el cual corresponde al 100 mol% (porcentaje molar de HB referido a los moles totales de polímero, Anexo 3.3). Por otro lado, el análisis de las células de la cepa Z69Prp crecidas en medio LGI glucosa, muestra la presencia de ambos monómeros metilados, el 3HV y 3HB en una relación de 0,04 y 99,96 mol%, respectivamente.

Tabla 3.4.4 Composición del polímero sintetizado en medio LGI con glucosa como única fuente de carbono

	PHA %	3HVmol%	3HB mol%
Z69	48,5	0	100
Z69Prp	48,5	0,04±0,01	99,96±0,01

En resumen, el análisis de la cepa Z69Prp permitió detectar una pequeña cantidad de 3HV en cultivos sin propionato, a diferencia de la cepa salvaje. En estudios previos se obtuvieron resultados similares al analizar una cepa de *R. eutropha* mutante en el anabolismo de aminoácidos ramificados y un mutante en el metabolismo del 2MCC derivado de *B. sacchari*, cultivados en presencia de glucosa como única fuente de carbono. En estos microorganismos también fue detectado el monómero 3HV en

células obtenidas a partir de cultivos en caldo nutriente. Este medio era utilizado para preparar el inóculo a incorporar al ensayo de producción en medio definido (Steinbüchel & Pieper 1992; Silva et al. 2000). Los autores proponen que la producción de 3HV sería debida a la presencia de aminoácidos ramificados en el medio rico, cuyo metabolismo promovería la síntesis de propionil-CoA u otro intermediario que generaría dicho monómero. Por lo tanto, el 3HV detectado en el medio definido con glucosa, provendría del inóculo con células que sintetizaron dicho monómero durante su crecimiento en el caldo nutriente (Steinbüchel & Pieper, 1992; L. F. Silva et al., 2000).

Para determinar si en la cepa Z69Prp ocurre lo mismo, se analizó el polímero acumulado en células de la cepa salvaje y mutante cultivadas en caldo TY. El análisis de Z69 no mostró ningún pico en el cromatograma que correspondiera a los monómeros metilados de 3HB y 3HV. La acumulación de este tipo de polímeros de reserva no ocurre, ya que las condiciones nutricionales no lo requerirían. Por otro lado, el cromatograma obtenido a partir de células de Z69Prp crecidas en medio rico TY no presentó un pico correspondiente al 3HB de metilo, aunque sin embargo si se observó la elución de 3HV de metilo. Probablemente, en *H. seropedicae* esté ocurriendo lo mismo que lo descrito en *B. sacchari* y *R. eutropha*, donde la síntesis del monómero 3HV ocurriría por la presencia de moléculas de propionil-CoA generadas a partir del metabolismo de los aminoácidos ramificados. Esto haría pensar que la cantidad de 3HV determinada en presencia de glucosa posiblemente provenga del inóculo crecido en medio TY. Para poder confirmar esto se debería cuantificar los mg de 3HV obtenidos en caldo nutriente y comparar con la cantidad obtenida en el medio LGI glucosa.

3.4.4. Análisis del rendimiento de transformación de propionato en 3HV en cultivos en lote de las cepas Z69 y Z69Prp

Se realizaron diferentes ensayos para evaluar el rendimiento de transformación de propionato en unidades de 3HV ($Y_{3HV/Prp}$) por la cepa Z69Prp.

3.4.4.1 Ensayo en dos etapas

Ensayo 3.4.4.1 Este ensayo fue similar al diseñado para evaluar la síntesis de P(3HB-*co*-3HV) por la cepa salvaje. Se utilizaron matraces de 2 L con 300 ml de medio LGI con NH_4Cl 15mM y glucosa 10 g/l como fuente de carbono inicial. En el matraz con el cultivo de Z69Prp, a las 24 horas de incubación se agregó propionato de sodio a una concentración final de 1,26 g/l y se continuó incubando por aproximadamente 24 horas más. En el cultivo de la cepa Z69, se agregó propionato de sodio (1,24 g/l) a las 18 horas, ya que por datos de ensayos preliminares, en ese momento la concentración de glucosa remanente no sería despreciable y podría ser empleada para la síntesis de copolímero. En este caso se evaluó la síntesis del P(3HB-*co*-3HV) a las 8 horas de agregado el co-sustrato.

Durante el ensayo se tomaron muestras a tiempo inicial, a las 24 o 18 y 45 o 26 horas para el cultivo de Z69Prp y Z69, respectivamente Se determinó la biomasa alcanzada, concentración de polímero (por gravimetría) y concentración de glucosa y propionato de sodio en el sobrenadante. La composición del polímero se determinó únicamente en las muestras colectadas al final del cultivo. En la tabla 3.4.5 se muestran los resultados para ambas cepas.

En la primera etapa del cultivo, justo antes del agregado del propionato (18-24 hrs) los crecimientos de las cepas Z69 y Z69Prp fueron similares, alcanzando una Xr de 1,56 g/l y 1,69 g/l (Xt de 2,55 y 2,65 g/l), respectivamente. En esos momentos, los contenidos de polímero para ambas cepas fueron de aproximadamente 35%. En el caso de la cepa salvaje, al agregar el propionato la concentración de glucosa remanente en el medio era 1,09 g/l. El cultivo fue evaluado 8 horas después de agregado el co-sustrato, no detectándose un aumento de la biomasa, aunque el contenido de polímero aumentó, llegando a un 40%. El mol% de 3HV en el polímero fue muy bajo. Estimamos que este período de incubación fue demasiado corto, no permitiendo la incorporación de de más unidades de 3HV en el polímero. Apoyando esto, al final del cultivo se determinó que la concentración remanente de propionato en el medio fue de aproximadamente 0,83 g/l. En estas condiciones, la cepa Z69 fue mucho menos eficiente en cuanto a la proporción mol% de 3HV que la descrita en otros microorganismos, donde los valores rondan desde 3 a 50 mol% (Ramsay et al. 1990).

Tabla 3.4.5 Resultados del ensayo 3.4.4.1.

	T (h)	Xt (g/l)	Xr (g/l)	Glu (g/l)	Prop (g/l)	PHA g/l*	PHA %*	PHA%**	3HB*** mol%	3HV*** mol%	$Y_{HV/pro}$
Z69Prp	0	nd	nd	7,2	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	24	2,65 ± 0,07	1,69	0	1,26±0,06	0,95	36	nd	nd	nd	nd
	45	2,20 ± 0,14	1,69	0	0,84±0,04	0,51	23	20,9	98,79±0,02	1,19±0,02	0,016
Z69	0	nd	nd	nd	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	18,5	2,55 ± 0,07	1,56	1,09	1,24±0,06	0,98	39	nd	nd	nd	nd
	26,5	2,40 ± 0,00	1,40	0	0,83±0,04	1,01	42	40,8	99,63±0,03	0,37±0,03	0,009

nd: no determinado
El $Y_{3HV/prop}$ se calculó considerando los mg de HV inicial de 0.
PHA% (definido en materiales y métodos), corresponde la cantidad de polímero en relación a la biomasa total.
* PHA determinado por peso seco y % de PHA calculado con los valores de peso seco.
** PHA% determinado por GCMS
*** Corresponde a los moles de cada monómero en relación a los moles totales de polímero

En el caso de la cepa Z69Prp, el propionato fue agregado aproximadamente a las 24 horas de incubación. En ese momento, la concentración de glucosa en el sobrenadante estaba por debajo de los límites de detección del método (menor a 0,1 g/l). Los resultados obtenidos con la cepa mutante Z69Prp muestran que las células dejaron de crecer una vez que la glucosa fue consumida. Se observa que la Xr se mantuvo y hubo una disminución del contenido de polímero de 36% a 23% aproximadamente. Al no haber más glucosa en el medio y al ser incapaz de crecer en propionato, el mantenimiento de la biomasa se generó a expensas de la degradación del PHA acumulado en las primeras 24 horas. En este cultivo se obtuvo una composición de 3HV de 1,2 mol% y un $Y_{3HV/prp,}$ de 0,016 (Tabla 3.4.5).

Estas condiciones de cultivos no fueron las mejores para evaluar la eficiencia de ambas cepas de transformar el propionato en monómeros de 3HV. En el caso del mutante hubiese sido necesario incorporar glucosa para mantener el crecimiento celular y aportar las moléculas de acetil-CoA, que junto con el propionil-CoA formarían el 3HV.

Ensayo 3.4.4.2 Se desarrolló un nuevo ensayo con la cepa Z69Prp cultivada en las mismas condiciones que el ensayo anterior. Se determinó la concentración de glucosa en el sobrenadante a diferentes tiempos de incubación y se agregó el propionato antes que la glucosa fuese consumida completamente. Los resultados se muestran en la tabla 3.4.6.

La cepa Z69Prp alcanzó una Xt máxima de 1,65 g/l, una Xr de 1,17 g/l y un contenido de polímero alrededor del 27%, al cabo de 48 hs de incubación. En este caso, en el momento del agregar el propionato la concentración remanente de glucosa era 2,45 g/l, la cual habría sido consumida hacia el final del cultivo. La concentración de propionato no disminuyó apreciablemente desde su agregado hasta el fin del cultivo. Al igual que el ensayo anterior, el contenido de polímero disminuyó aproximadamente a la mitad entre las 24 y 48 horas de incubación. En este caso hubo crecimiento, apreciable por el aumento de Xr. Este crecimiento probablemente se produjo a expensas del polímero acumulado.

Tabla 3.4.6 Resultados del Ensayo 3.4.4.2.

	T (h)	Xt (g/l)	Xr (g/l)	Glu (g/l)	Prop (g/l)	PHA g/l*	PHA %*	PHA%**	3HB*** mol%	3HV*** mol%	$Y_{HV/pro}$
	0	nd	nd	12,3	0	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
Z69Prp	24	1,60±0,14	0,60	2,45	0,82±0,04	1,00±0,05	62±7,8	nd	nd	nd	nd
	48	1,65±0,14	1,17	0	0,65±0,03	0,48±0,19	28,5±10,6	27,2±5,9	98,18±0,16	1,82±0,16	0,068

nd: no determinado
El $Y_{3HV/prop}$ se calculó considerando los mg de HV inicial de 0.
PHA% (definido en materiales y métodos), corresponde la cantidad de polímero en relación a la biomasa total.
* PHA determinado por peso seco y % de PHA calculado con los valores de peso seco.
** PHA% determinado por GCMS
*** Corresponde a los moles de cada monómero en relación a los moles de polímero total

Los resultados de rendimiento de transformación de propionato fueron mejores que los del ensayo anterior. Se obtuvo un $Y_{3HV/prop}$ de 0,067 y la composición del polímero a las 48 horas de incubación fue 98 mol% de 3HB y 2 mol% de 3HV (Tabla 3.4.6). Sin embargo, dichos valores siguen estando muy alejados de lo descrito en la bibliografía para las cepas mutantes *B. sacchari* IPT189 y *R. eutropha* BK23 (Lee, G. J. Kim, et al. 1996; Silva et al. 2000). En el caso de estos microorganismos, las condiciones de cultivo en dos etapas fueron diferentes a las nuestras. En la primera etapa, los cultivos en presencia de glucosa produjeron biomasa, la cual fue luego transferida a medio fresco sin nitrógeno (condiciones de limitación de nutriente) con una mezcla de glucosa/propionato (G/P) para inducir la acumulación del polímero. Las relaciones G/P empleadas en esos ensayos fueron 5:1 y 20:1, respectivamente. En esas condiciones, *B. sacchari* IPT189 y *R. eutropha* BK23 sintetizaron un polímero con 50 mol% de 3HV y rendimientos $Y_{3HV/prop}$ de 0,88 y 0,45 g/g, respectivamente (Lee et al. 1996; Silva et al. 2000). En el caso de *H. seropedicae* Z69, la síntesis de polímero ocurre parcialmente asociada al crecimiento, por lo cual el nutriente esencial debe mantenerse a una concentración acotada, pero que permita mantener el crecimiento. La estrategia de cultivo diseñada para las cepas de a *B. sacchari* y *R. eutropha* no sería exactamente aplicable a *Herbaspirillum*. En el cultivo de la cepa mutante Z69Prp, al agregar propionato, la cantidad de glucosa remanente en el medio era muy baja. En ese momento la relación G/P era aproximadamente 2,5:1. En estas condiciones, probablemente la disponibilidad de acetil-CoA, generado a partir del metabolismo de la glucosa no fue suficiente para sintetizar el monómero 3HV y así el consumo del propionato fue muy bajo.

Las condiciones de cultivo alcanzadas en estos ensayos no fueron las adecuadas para evaluar la síntesis y rendimiento de monómeros de 3HV en *H. seropedicae*, como ya se ha discutido.

De manera de poder determinar que sucede a lo largo del cultivo, se evaluó el crecimiento, síntesis de polímero y consumo de las fuentes de carbono, ambas agregadas desde un principio utilizando diferentes relaciones G/P.

3.4.4.2. Ensayo en una etapa utilizando una mezcla G/P como única fuente de carbono

Los ensayos se efectuaron en matraces de 6 L con 700 ml de medio LGI. Se aumentó la concentración de la fuente de nitrógeno (NH_4Cl 20mM). Como fuente de carbono se utilizó una mezcla compuesta por 10 g/l de glucosa y 1,5 o 0,5 g/l propionato de sodio. De este modo, la relación (w/w) G/P aproximada, fue de 10:1 y 20:1, respectivamente. A lo largo del cultivo se tomaron muestras para la determinación de crecimiento celular (Xt) y concentración de glucosa y propionato en el sobrenadante. A partir de las 48 horas también se tomaron muestras para la determinación de la concentración y composición del polímero.

En las tablas 3.4.7 y 3.4.8 se muestran los resultados del ensayo utilizando 10 g/l de glucosa y 1,5 g/l de propionato de sodio, relación 10:1 para la cepa salavaje y mutante, respectivamente.

Tabla 3.4.7 Ensayo empleando una relación G/P 10:1 para la cepa Z69.

Tiempo (h)	Xt (g/l)	Xr (g/l)	Gluc g/l)	Prop (g/l)	PHA %*	PHA %	3HB mol%	3HV mol%
0	1,12 ± 0,35	nd	9,58	1,58±0,05	nd	nd	nd	nd
18	0,70 ± 0,28	0,30	9,18	nd	nd	nd	nd	nd
24,5	1,25 ± 0,21	0,86	7,60	0,27±0,01	31	nd	nd	nd
41	4,45 ± 0,07	1,82	0,94	0,006	59	nd	nd	nd
46,5	4,80 ± 0,28	1,92	0	0,006	60	53,70	98,4±0,1	1,6±0,1
66,5	4,40 ± 0,14	1,64	0	0,006	63	65,32	98,7±0,2	1,3±0,2
71	4,50 ± 0,0	1,71	0	0,006	62	58,82	98,5±0,1	1,5±0,1

*PHA%, contenido determinado con los valores de g/l obtenidos por determinación de peso seco

La cepa Z69 consumió el propionato inmediatamente, no detectándose en el sobrenadante luego de 24,5 horas de incubación. Se obtuvo una Xt máxima de 4,8 g/l alrededor de las 48 horas, con un contenido de PHA del 54% compuesto por 1,6 mol%

de monómeros 3HV. Comparado con el ensayo anterior, *H. seropedicae* Z69 mejoró los valores de Xt, contenido de P(3HB-*co*-3HB), y contenido de 3HV (mol%).

Tabla 3.4.8 Ensayo empleando una relación G/P 10:1 para la cepa Z69Prp.

Tiempo (h)	Xt(g/l)	Xr (g/l)	Gluc g/l)	Prop (g/l)	PHA %*	PHA%	3HB mol%	3HV mol%
0	1,09 ± 0,09	nd	9,90	1,11±0,06	nd	nd	nd	nd
18	0,60 ± 0,28	0,21	8,50	nd	nd	nd	nd	nd
24,5	1,20 ± 0,14	1,01	7,50	0,99±0,05	16	nd	nd	nd
41	1,95 ± 0,07	1,64	3,97	1,48±0,07	16	nd	nd	nd
46,5	2,10 ± 0,14	1,66	2,90	1,46±0,07	21	12,57	79,2±1,2	20,8±1,2
66,5	2,40 ± 0,0	1,85	0,80	1,89±0,09	23	17,05	80,1±1,7	19,0±1,7
71	2,45 ± 0,07	1,66	0,34	0,87±0,04	32	20,17	81,9±0,6	18,1±0,6

*PHA%, contenido determinado con los valores de g/l obtenidos por determinación de peso seco
nd: no determinado

En la tabla 3.4.8 se muestran los resultados del cultivo con Z69Prp. Como era de esperar dicha cepa creció a expensas de la glucosa. La concentración de propionato no disminuyó en el medio, e incluso se incrementó entre las 41 y 66,5 horas de incubación. Cuando la concentración de glucosa remanente fue de 0,8 g/l, a las 66,5 horas de incubación, la concentración de propionato comenzó a disminuir. Finalmente a las 71 horas del cultivo, se obtuvo una biomasa total máxima de 2,45 g/l, con un contenido de P(3HB-*co*-3HV) de alrededor de un 32% y con 18 mol% de monómeros de 3HV. Este valor en mol% es el más alto de los determinados hasta ahora en la cepa Z69Prp, comparable con lo descrito para otras mutantes (Lee, G. J. Kim, et al. 1996; Silva et al. 2000). Los valores máximos de producción de biomasa y copolímero se obtuvieron a 46,5 horas para la cepa salvaje y a las 71 horas para la cepa mutante. Las biomasas residuales (Xr) alcanzadas por ambas cepas fueron similares. La diferencia observada en la Xt máxima alcanzada se debe a que Z69 fue más eficiente en la síntesis de P(3HB-*co*-3HV). En cuanto a la composición del P(3HB-*co*-3HV)

producido, la cepa Z69Prp exhibió una mayor proporción de monómeros 3HV, hasta 10 veces superior que la cepa salvaje.

En el cultivo de la cepa Z69Prp, la concentración de propionato en el sobrenadante aumentó a lo largo del tiempo (Tabla 3.4.8). A las 46,5 horas de incubación se obtuvo un porcentaje molar del 20 (mol %) de 3HV, sin haber detectado una disminución de la concentración del propionato en el medio de cultivo. Este resultado estaría indicando que el propionato debió haber sido incorporado por las células, aunque sin embargo esto no se detectó en la corrida cromatográfica por HPLC-UV. Una de las posibilidades es que exista alguna otra molécula que se esté produciendo y excretando durante el cultivo, que tenga un tiempo de retención igual al del ácido propiónico y absorba al UV. Con estos resultados no fue posible determinar el $Y_{3HV/Prop}$.

Este comportamiento no se observó en la cepa salvaje. Quizás la concentración inicial de propionato (1,11 g/l) fue demasiado alta para la cepa Z69Prp, que no puede catabolizar el propionil-CoA. El mismo se puede haber acumulado en el interior, promoviendo un desajuste en el metabolismo. En una cepa de *Salmonella enterica* mutante en el gen *prp*C se determinó que las células sintetizaban 2-metilcitrato en una reacción catalizada por la enzima del ciclo de CAT, citrato sintasa (GltA). Esta enzima es capaz de reconocer propionil-CoA como sustrato, generando múltiples isómeros del 2MC que no son reconocidos por la enzima 2-MC deshidratasa (AcnD o PrpD), por lo que termina acumulándose en el citoplasma. En el caso de *S. entérica* no se postula que el mismo sea excretado, sino más bien se estudió su efecto como inhibidor de la gluconeogénesis (Horswill et al. 2001; Rocco & Escalante-Semerena 2010). En el caso de *H. seropedicae* Z69Prp, bajo estas condiciones de mayor concentración de propionato, parte del propionil-CoA se podría estar usando para la síntesis de 3HV y el resto podría ser transformado a 2-metilcitrato por acción de la enzima citrato sintasa, y en éste caso podría ser excretado. Para poder confirmar esta hipótesis sería necesario identificar el compuesto excretado mediante LC-MS o analizar el 2MC por HPLC bajo las mismas condiciones de corrida.

Se realizó un ensayo en las mismas condiciones que las anteriores pero empleando una menor concentración de propionato (0,5 g/l). Los resultados se muestran en la tabla 3.4.9 para la cepa salvaje y 3.4.10 para la cepa Z69Prp.

El cultivo de la cepa se inició con una concentración de 7,0 g/l de glucosa y 0,62 g/l de propionato. El propionato fue consumido totalmente antes de las 24 horas de

crecimiento. La biomasa máxima alcanzada fue de 3 g/l a las 40 horas de incubación. El contenido máximo de P(3HB-*co*-3HV) fue del 45%, alcanzado a las 24 horas, con 1,08 mol% de 3HV. Luego de las 24 horas de incubación ya no se detectaron las fuentes de carbono en el medio de cultivo. La Xt se mantuvo y el contenido de polímero se redujo.

Tabla 3.4.9 Ensayo empleando una concentración de propionato de 0,5 g/l en la mezcla inicial para la cepa Z69.

Tiempo (h)	Xt (g/l)	Gluc (g/l)	Prop (g/l)	PHA%	3HB mol%	3HV mol%
0	nd	7,0	0,62±0,03	nd	nd	nd
18,5	2,55 ± 0,07	4,4	0,10±0,01	nd	nd	nd
24	2,70 ± 0,14	3,1	<0,06	45,21	98,91±0,02	1,08±0,02
40	3,00 ± 0,28	0	<0,06	24,71	98,22±0,27	1,77±0,27
48	2,10 ± 0,14	0	<0,06	23,34	98,06±0,19	1,93±0,19
66	2,75 ± 0,07	0	<0,06	21,74	98,07±0,33	1,92±0,33

nd: no determinado

La disminución del contenido de polímero indica que probablemente fue degradado para el mantenimiento de la biomasa. Se observa un aumento en el contenido porcentual molar 3HV, dado que probablemente la degradación se produjo a expensas del monómero 3HB cuyo % molar disminuyó. La menor composición en mol% del HV, en relación con el ensayo utilizando una mayor concentración de propionato, estaría de acuerdo con la menor cantidad de co-sustrato usado (Lee, G. J. Kim, et al. 1996; Ramsay et al. 1990).

El cultivo de Z69Prp exhibió una disminución gradual de la concentración de propionato en el sobrenadante a lo largo del tiempo. A las 48 hs de incubación se alcanzó una Xt de 2,2 g/l, con un 50% de contenido de copolímero, siendo éste el máximo obtenido. El mismo alcanzó una composición de 8,6 mol% de 3HV. Los valores máximos de biomasa y contenido de P(3HB-*co*-3HV) alcanzados fueron similares a los de la cepa salvaje. Al igual que la cepa salvaje, en este ensayo se usó una menor concentración de propionato, generándose una menor proporción de

monómero 3HV en el copolímero, sin embago la cepa Z69Prp sintetizó un copolímero con un % molar de 3HV mayor (8,6 mol%) que el obtenido por la cepa salvaje (1,08 mol%)

Tabla 3.4.10 Resultados del ensayo con una concentración de propionato en la mezcla inicial de 0,5 g/l para la cepa Z69Prp.

Tiempo (h)	Xt (g/l)	Gluc (g/l)	Prop (g/l)	PHA %	3HB mol%	3HV mol%
0	nd	7,60	0,49±0,02	nd	nd	nd
18,5	1,60 ± 0,14	7,18	0,45±0,02	nd	nd	nd
24	1,90 ± 0,14	5,02	0,29±0,01	27,30	85,50±0,47	10,49±0,47
40	2,40 ± 0,0	1,73	0,32±0,02	43,49	91,55±0,22	8,45±0,22
48	2,20 ± 0,28	0,32	0,26±0,01	50,05	91,39±0,34	8,60±0,34
66	2,35 ± 0,07	0,00	0,25±0,01	37,34	87,86±0,92	12,14±0,92

nd: no determinado

La determinación $Y_{3HV/prop}$ para la cepa Z69Prp se consideraron los valores determinados a las 40 y 66 horas de incubación (según fórmula en Anexo 3.2). El valor de $Y_{3HV/prop}$ calculado fue 0,44 g/g. Faltan datos para poder calcular el rendimiento de la cepa salvaje, no se determinó la composición del polímero durante el tiempo que se consumió todo el propionato (entre tiempo inicial y 24 horas). En estos ensayos hubiera sido fundamental realizar un seguimiento del crecimiento, consumo de sustratos carbonados y síntesis de PHA desde el comienzo del cultivo. Para realizar este tipo de determinaciones es necesario realizar cultivos a escala de bio-reactor con un volumen mayor, que permita la toma de muestras de forma más frecuente y así poder obtener un perfil temporal más completo de cada unos de los parámetros a analizar.

En resumen, la cepa Z69Prp cultivada en presencia de 0,5 g/l de propionato sintetizó más copolímero P(3HB-*co*-3HV), con una menor composición mol% de 3HV y un mejor $Y_{3HV/prop}$, que a concentraciones de 1,11 g/l o mayores. Este comportamiento ya ha sido descrito en mutantes en el metabolismo del propionato y en cepas salvajes (Ramsay et al. 1990; Lee, G. J. Kim, et al. 1996; Rocha et al. 2008). Al igual que lo

observado en todos los cultivos realizados, se observa una mayor eficiencia de síntesis de 3HV por Z69Prp comparado con la cepa Z69. Asimismo, de acuerdo a lo discutido anteriormente, es necesario emplear una mezcla de glucosa y propionato como fuente carbonada para permitir el crecimiento celular y la generación de moléculas de acetil-CoA.

3.5 Discusión general

Los resultados obtenidos en esta primer parte del trabajo permitieron elucidar parcialmente el metabolismo del propionato en *H. seropedicae*. A partir de los datos del genoma secuenciado de las cepas SmR1 y Z67, fue posible determinar la/s ruta/s presentes, responsables de la degradación del propionato. Los genes que codifican para las enzimas de la ruta del 2MCC estarían presentes en estas cepas y Z69 en forma conservada.

La expresión de la ruta del 2MCC en *H. seropedicae* para el metabolismo del propionil-CoA se confirmó mediante la construcción del mutante Z69Prp. Este mutante carece del gen *prp*C que codifica para la enzima 2-metilcitrato sintasa. La cepa Z69Prp fue incapaz de crecer en presencia de un rango variado de concentraciones de propionato de sodio. Según la base de datos KEGG, existiría otra posible ruta para el catabolismo del propionil-CoA. La construcción del mutante en el gen *mms*A que codifica para una de las enzimas de dicha ruta no generó un fenotipo particular en lo que refiere al crecimiento en propionato. Debe indicarse que no se analizaron otras propiedades fenotípicas. Además, de acuerdo a la anotación del genoma, existiría otro gen que codificaría para una enzima con una función similar. Por otro lado, no se logró obtener el mutante *cai*A. Este gen codifica para una enzima que participa en la β-oxidación, pudiendo ser esencial para la bacteria. Se podría abordar el análisis de las rutas que participan en el metabolismo del propionato mediante el estudio de transcriptos por el método de RNAseq. Esta metodología basada en secuenciación, permite identificar los transcriptos que se sintetizan bajo diversas condiciones ambientales. Es así que podría determinarse en la cepa Z69 la expresión de genes durante el crecimiento en presencia de propionato de sodio. Con dicha información sería más factible determinar la presencia de una, dos o más rutas metabólicas para el catabolismo del propionato. Otra estrategia podría ser al análisis de rutas metabólicas mediante el análisis de

modos elementales de flujo. Así, se podrían construir diferentes redes metabólicas, incluyendo la/s ruta/s descritas para el metabolismo del propionato y mediante datos experimentales de rendimiento de transformación de propionato en 3HV, poder determinar cuál de los modelos es el que mejor se ajusta.

El objetivo planteado en este trabajo se cumplió, obteniéndose un mutante derivado de *H. seropedicae* Z69 en la ruta de asimilación del propionato, incapaz de crecer en dicho sustrato pero con la capacidad de sintetizar monómeros 3HV. La cepa Z69Prp no expresa la enzima 2-metilcitrato sintasa de la ruta del 2MCC. Esta cepa fue capaz de acumular el copolímero con un contenido de aproximadamente 50% al igual que la cepa salvaje, pero con una composición de 3HV del 8,6 mol% a diferencia del 1 mol% alcanzado por la cepa parental. Asimismo, bajo las condiciones ensayadas en este trabajo, se logró obtener un rendimiento de transformación ($Y_{3HV/prop}$) de 0,44 g/g.

La primera producción industrial de P(3HB-*co*-3HV) por *R. eutropha* fue efectuada por Imperial Chemical Industries, mediante fermentación alimentada con una mezcla de glucosa y ácido propiónico. El alto costo del ácido propionico determinó que en 1998 cesara la producción de dicho copolímero. La construcción de cepas más eficientes en transformar el propionato en monómeros de 3HV como *B. sacchari* IPT189, ha mostrado ser una buena alternativa para bajar los costos en aproximadamente un 70% (Rocha et al. 2008). Asimismo, la elección de una correcta estrategia de alimentación es fundamental para lograr buenos resultados (Du et al. 2001; Rocha et al. 2008). Las condiciones de cultivo utilizadas en este trabajo no son las descritas en la bibliografía para las cuales se obtuvieron mejores concentraciones de copolímero, composición de 3HV y rendimiento del sustrato carbonado. Los estudios de producción del copolímero empleando tanto cepas salvajes o mutantes en la ruta de asimilación del propionato, se desarrollan en bio-reactores alimentados, donde existe una relación constante y controlada de glucosa o sacarosa y propionato, que se va adicionando al cultivo a una determinada velocidad (Du et al. 2001; Rocha et al. 2008). En el trabajo de Rocha y col. (2008), usando la cepa de *B. sacchari* IPT189 mutante en el gen *prp*C, se utilizaron relaciones de sacarosa/propionato de 30:1 y mayores, y ajustando la velocidad de alimentación lograron obtener valores de $Y_{3HV/prop}$ de 1,1 a 1,34 g/g, próximos al valor teórico descrito por Gómez y col. (1996) de 1,35 g/g. Asimismo, dependiendo de la relación sacarosa/propionato utilizada, pudieron determinar el contenido (mol%) de 3HV dentro del copolímero.

Para evaluar la capacidad de *H. seropedicae* Z69Prp de producir el P(3HB-*co*-3HV) con un $Y_{HV/prp}$ más próximo al valor teórico de 1,35 g/g, será necesario efectuar ensayos en condiciones de bio-reactor alimentado, utilizando una relación glucosa, propionato de sodio de mayores a 20:1 en la solución de alimentación.

CAPITULO 2

Optimización de la síntesis de PHB por *H. seropedicae* Z69

4. CAPITULO 2-Optimización de la síntesis de PHB por *H. seropedicae* Z69

4.1 Objetivo específico

Analizar el funcionamiento del metabolismo carbonado e identificar posibles blancos de modificación genética dirigidos a aumentar el rendimiento de conversión de glucosa en PHB.

4.2 Estrategia experimental

1. Diseñar una red del metabolismo carbonado central de *H. seropedicae* Z69 al consumir glucosa como fuente de carbono. Las rutas metabólicas presentes se deducen a partir de los datos de actividades enzimáticas obtenidas previamente y por análisis de secuencia del genoma anotado de otras cepas de la misma especie (SmR1 y Z67).
2. Establecer el perfil de flujos de la red metabólica al consumir glucosa, mediante Modos Elementales de Flujo (MEF).
3. Construir cepas genéticamente modificadas de acuerdo al/los blanco(s) a modificar, identificados por MEF.
4. Evaluar la producción de PHB y rendimiento de transformación de fuente de glucosa en PHB en las cepas modificadas
5. Realizar un analisis de flujos metabólicos (AFM) de las cepas modificadas mediante marcación isotópica.

4.3 Materiales y Métodos

Las cepas, plásmidos y medios de cultivos utilizados se detallan en el capitulo 1 tabla 3.3.1 item 3.3.1. La relación C/N utilizada para todos los ensayos de bio-reactor fue de 22-25 (moles de carbono/moles de nitrógeno).

El diseño de los cebadores para amplificar el gen *fbp* se describe en los ítems 3.3.2 y en la tabla 3.3.2 se lista la secuencia. Las técnicas de biología molecular empleadas para la construcción de la cepa Z69pRK767::*fbp* se describen en los ítems 3.3.3; 3.3.5; 3.3.6 y 3.3.8 en el capítulo 1.

4.3.1 Cultivos en bio-reactor

En todos los cultivo realizados en éste capitulo, tanto en condiciones de matraces como de bio-reactor, las concentraciones de glucosa y amonio utilizadas mantuvieron la relación C/N de entre 22 y 25 (moles de carbono:moles de nitrógeno) determinada en trabajos previos como óptima.

Los inóculos usados en todos los ensayos en bio-reactor (lote, lote alimentado y continuo) se prepararon de acuerdo a un protocolo único. El volumen del inóculo correspondió al 10% del volumen final del cultivo.

H. seropedicae fue cultivada inicialmente en caldo TY, a 30°C y 190 rpm por 24 h. Se transfirió un volumen correspondiente al 10% del volumen a inocular a un matraz con LGI glucosa 10 g/l y NH_4Cl 20mM. El matraz se incubó a 30°C con agitación a 190 rpm durante 18 horas. En los casos de las cepas transformadas (Z69pRK767::*fbp* y Z69pRK767), se incluyó Tc^{10} en los medios de cultivo.

Los medios utilizados en los cultivos en el bio-reactor fueron el medio LGI y el medio MMG (ver composición en Anexo 1), ambos suplementados con glucosa y amonio a una relación C/N (mol/mol) de entre 22-25.

4.3.1.1 Cultivos continuos

Se efectuaron ensayos de cultivo continuo sin reciclado de células de la cepa Z69. Se utilizó un bio-reactor de acero inoxidable de 2 L de volumen nominal, equipado con dos agitadores tipo turbina con paletas verticales, aireador, condensador, sensor de pH y de oxígeno disuelto. El cultivo se realizó en 1L de medio LGI, glucosa 5 g/l y NH_4Cl 7,5 mM, bajo condiciones controladas de temperatura (34°C), aireación (100 ml/min) y agitación (600 rpm). Este mismo medio fue utilizado en la solución de alimentación. Manteniendo la relación C/N de 22, se ensayaron cuatro velocidades de dilución D (h^{-1}): 0,025; 0,07; 0,12; 0,157.

El cultivo se inició en régimen de lote o *batch*, durante aproximadamente 6 horas. Luego de este tiempo se encendieron las bombas peristálticas para iniciar el régimen de cultivo continuo. Se estimó que una vez ajustadas las condiciones del cultivo continuo, como se evidenciaría por la determinación de una cierta estabilidad en los valores de porcentaje de oxígeno disuelto (O.D.) y $D.O._{620nm}$, debían mantenerse las

mismas condiciones a lo largo de cuatro tiempos de residencia, de modo de asegurarse que las medidas reflejaran de forma fiel las condiciones de equilibrio estacionario. Luego de alcanzado los cuatro tiempos de residencia se extrajeron muestras para el análisis de contaminación por ensayo de Gram, determinación de biomasa, concentración de PHB, glucosa, amonio y solutos en sobrenadante. En la figura 4.3.1 se muestra una foto del bio-reactor utilizado.

Figura 4.3.1 Bio-reactor utilizado para los cultivos continuos (Departamento de Bioingeniería, Facultad de Ingeniería).

4.3.1.2 Cultivo en lote y lote-alimentado

Los cultivos en lote-alimentado de la cepa Z69 fueron desarrollados en un bio-reactor Biostat B (Braun Biotech International, Alemania) de 5 L conteniendo 2 L de medio MMG (glucosa 30 g/l y amonio 40mM, agregado como $(NH_4)_2SO_4$). Las condiciones de operación fueron las siguientes: velocidad de aireación, 0.5 v.v.m., velocidad de agitación, 250 rpm y temperatura, 34°C. El O_2 disuelto se mantuvo por encima del 20% mediante el aumento de la agitación. El pH se mantuvo en un valor de 7,0 con NaOH

2M. El reactor fue alimentado en forma de un único pulso con una solución de glucosa concentrada (50%). Cuando la concentración de glucosa en el medio alcanzó un valor de 10 g/l se agregó un pulso de la solución de glucosa hasta alcanzar un valor de 30 g/L en el medio de cultivo. En la figura 4.3.2 se muestra una foto del bio-reactor utilizado para la fermentación alimentada.

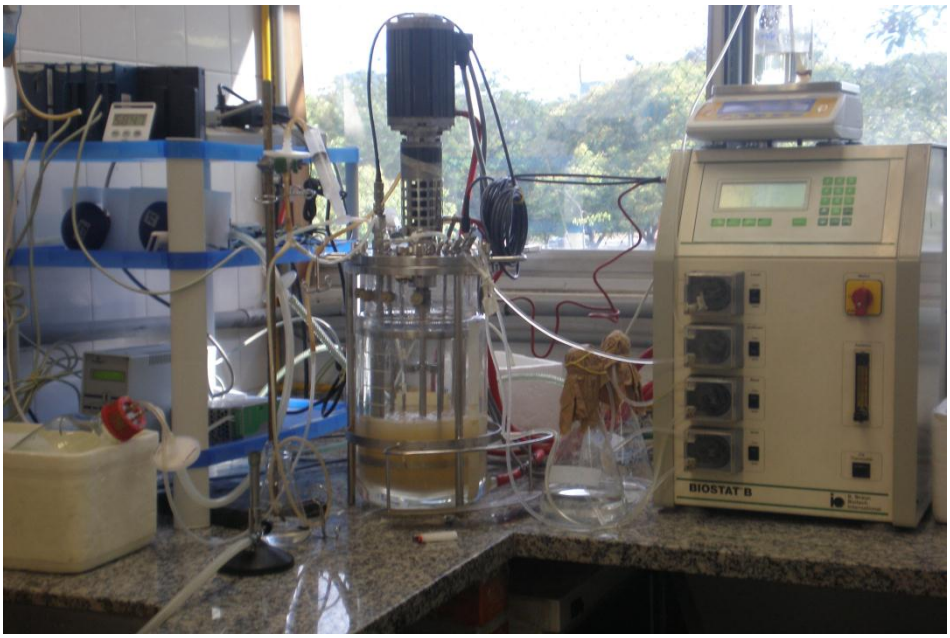


Figura 4.3.2 Bio-reactor Biostat B utilizado para el cultivo en lote-alimentado (Laboratorio de Microbiología, Universidad de San Pablo).

Los cultivos en lote de *H. seropedicae* Z69, Z69(pRK767::*fbp*) y Z69(pRK767) se realizaron en un bio-reactor L.E. Marubishi modelo MD 300 de 5 L con 1,5 L de medio de cultivo. Las condiciones de operación fueron las siguientes: velocidad de aireación 1 v.v.m., velocidad de agitación, 200 rpm y temperatura, 34°C. El pH se mantuvo en un valor de 7,0 con NaOH 2M. El oxígeno disuelto (OD) se ajustó por encima del 30% de saturación mediante el aumento de la agitación.

En el caso de la cepa Z69 se realizaron tres ensayos. En dos de estos cultivos se mantuvo el O_2 disuelto por encima del 30% y se empleó medio LGI y MMG separadamente, a los efectos de evaluar la composición de los medios minerales en el crecimiento y síntesis de PHB. La diferencia entre ambos medios reside en la

concentración de sales de fosfato. El medio LGI contiene una mayor concentración de iones fosfato que el medio MMG (ver composición de los medios en Anexo1). En la tercera fermentación se evaluó el efecto del O_2 disuelto en el crecimiento y síntesis de PHB. En este ensayo se utilizó el medio mineral LGI y se mantuvo el O_2 disuelto entre un 10- 20%.

Las cepas Z69(pRK767::*fbp*) y Z69(pRK767) fueron cultivadas en 1,5 L de medio LGI con Tc^{10}.

En todos los casos se utilizó glucosa 30 g/l y NH_4Cl 40mM como fuente de carbono y nitrógeno, respectivamente. En la figura 4.3.3 se muestra una foto del bio-reactor utilizado en los cultivos en lote.

Figura 4.3.3 Bio-reactor L.E. Marubishi utilizado en los ensayos en lote (Unidad de Microbilogía Molecular, IIBCE).

Para todos los ensayos en bio-reactor se extrajeron muestras de aproximadamente 20 ml del cultivo a intervalos de una a dos horas. Estas suspensiones se utilizaron para determinar biomasa y concentración de PHB. El sobrenadante del cultivo fue usado para cuantificar la concentración de glucosa, amonio y ácidos orgánicos en el medio de cultivo (ver determinaciones analíticas Capítulo 1 intem 3.3.11).

4.3.2 Determinación de actividad enzimática FbPasa

Para la medida de actividad de la enzima FbPasa se prepararon extractos libres de células de las cepas Z69(pRK767) y Z69(pRK767::*fbp*).

Preparación de extractos libres de células. Se cultivaron ambas cepas en 150 ml de medio LGI con glucosa 10 g/l y $NHCl_2$ 20mM, como fuente de carbono y nitrógeno, respectivamente. Cada matraz de crecimiento se inoculó con 1,5 ml de cultivo en caldo TY incubado durante 24 horas. En todos los casos se incluyó Tc^{10} en los medios de cultivos. Los matraces fueron incubados a 30°C y 190 rpm. Las células, en fase exponencial de crecimiento, se colectaron por centrifugación a 10.000 rpm por 10 min. Las mismas se lavaron dos veces con 10 ml de una solución compuesta por Tris 20mM, $MgCl_2$ 1mM, β-mercaptoetanol 100mM, EDTA 0,5mM (pH 7,7). Aproximadamente, 2 gramos del *pellet* de células húmedo se resuspendió en 3 ml de la solución tampón Tris-HCl 100mM pH7,5. La disrupción celular se efectuó mediante cinco pasajes por una prensa French press (Aminco) a 20.000 psi. El extracto celular así obtenido se centrifugó a 17.000 g durante 30 min a 4°C. El sobrenadante, denominado extracto libre de células se fraccionó en volúmenes de 100 μl y se guardó a –20ºC por períodos de hasta 1 semana. Se determinó la concentración de proteínas en el sobrenadante mediante el método de Bradford (Bradford 1976).

Determinación de la actividad de la enzima FBPasa. La actividad enzimática fue determinada a temperatura ambiente a partir de alícuotas de los extractos libres de células, según lo descrito por Chen y col. (Chen et al. 2012) con algunas modificaciones. La medida de dicha actividad requiere acoplar la reacción con otras dos reacciones, una catalizada por la enzima fosfo-glucoisomerasa, que transforma la fructosa 6-fosfato (generada como producto de la reacción de la FBP) a glucosa 6-fosfato y la otra catalizada por la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, que transforma éste último sustrato en 6-fosfogluconato. Esta última reacción requiere preferencialmente $NADP^+$ como cofactor, el cual durante la reacción es reducido a NADPH. La actividad enzimática de FBPasa se determinó en forma indirecta por medidas de absorbancia a λ_{340nm} en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. Se determinó así la formación de NADPH (coeficiente de extinción molar $6,22 mM^{-1}cm^{-1}$ a 340nm).

En la tabla 4.3.1 se indican los reactivos y concentraciones utilizadas para la medida de la actividad FbPasa para un volumen final de 1 ml.

Tabla 4.3.1 Mezcla de reacción para la medida de la actividad de FbPasa.

Reactivos	**Concentración**
Buffer Tris-HCl	100mM
$NADP^+$ (60mM)	0,50mM
$MgCl_2$	2mM
KCl	100mM
*Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) de levadura	0,4U/ml
*Fosfo glucoisomerasa de levadura	1,2 U/ml

*Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (151188, MP Biomedicals, LLC), fosfoglucosa isomerasa (100983, MP Biomedicals, LLC)

Se utilizó 50 μl de extracto sin diluir. La reacción se inició con el agregado de fructosa 1,6 bifosfato a una concentración final de 1,50mM. Para preparar el control blanco se siguió el mismo procedimiento sin agregar fructosa 1,6 bifosfato y en este caso la medida se inició una vez agregado del extracto. Al agregar el extracto se esperó un minuto, al cabo del cual se efectuaron las determinaciones de absorbancia durante unos 12 minutos en total.

Como control del estado o calidad del extracto se determinó la actividad de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). La mezcla de reacción incluyó los componentes que se muestran en la tabla 4.3.2, para un volumen final de 1 ml.

Se utilizó 10 μl de extracto sin diluir. Las determinaciones se iniciaron al agregar 33,5 μl de glucosa 6-fosfato (60mM). Como control blanco se siguió el mismo procedimiento que el descripto previamente, sin agregado del sustrato.

Tabla 4.3.2 Lista de reactivos y concentraciones utilizados en la mezcla para la determinación de la actividad G6PDH.

Reactivos	Concentración
Buffer Tris-HCl pH 7,6	100mM
$NADP^+$ /NAD+	0,50mM
$MgCl_2$	2mM

La actividad enzimática G6PDH se determinó por medidas de absorbancia a $\lambda_{340\ nm}$ en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. Se determinó así la formación de NADPH y NADH (coeficiente de extinción molar $6,22 mM^{-1}cm^{-1}$ a $\lambda_{340\ nm}$).

Para calcular la actividad enzimática se consideró la región de máxima velocidad de variación de A_{340} en función del tiempo (ΔA_{340}/min), tanto para el blanco como para la muestra (Anexo 3). Una unidad de actividad enzimática (*U*) se define como la cantidad de enzima que en la reacción enzimática cataliza la conversión de 1μmol de NADPH en las condiciones del ensayo. La actividad específica se calcula a partir de la actividad enzimática expresada en U/ml sobre la concentración de proteínas (ver fórmula en Anexo 3).

4.3.3 Perfil de crecimiento

Los perfiles de crecimiento se realizaron según lo descrito en el ítem 3.3.9 del Capítulo 1.

Las fuentes de carbono y las concentraciones utilizadas en éste caso se listan en la tabla 4.3.3

Tabla 4.3.3 Listado de fuentes de carbono y concentración utilizada.

Fuente de carbono	***Concentración final (g/l)***
Glucosa	10
Glicerol	10
Xilosa	10
Succinato de sodio	10

4.3.4 Análisis de rutas metabólicas: determinación de modos elementales de flujo (software Metatool)

4.3.4.1 Construcción del modelo metabólico

A partir de los datos bioquímicos y genómicos se propuso una red metabólica de *H. seropedicae* que incluyó las siguientes rutas: ED, PP (en dirección anabólica), el CAT, y el ciclo del glioxilato (ver Anexo 4). De los datos experimentales se incluyó la expresión xX_r + y P3HB + z $Citr_{ext}$. = X_t como restricción del sistema en el caso de la excreción de ácido cítrico. En aquellos casos en los cuales no se detectó la excreción de ácidos orgánicos la ecuación que se utilizó fue: x X_r + y P3HB = X_t. Se usó la composición de la biomasa de *E. coli*, definida previamente por Neidhardt y col. (1990), la cual se expresó de modo de obtener 10000 moles de Xr, mediante la multiplicación de cada uno de los componentes por dicho factor.

4.3.4.2 Análisis de la red metabólica

Los modos elementales de flujo fueron determinados mediante el software METATOOL versión 3.9.2 (Pfeiffer y col. 1999). Para ello se elaboró un archivo que se denomina archivo de entrada y contiene: todas las reacciones bioquímicas de la red considerada, una lista de los metabolitos externos e internos, las enzimas reversibles e irreversible, la ecuación de la composición del biomasa y la restricción experimental mencionada anteriormente (ver Anexo 4). A partir del archivo de entrada, el programa analiza la red metabólica ingresada, la descompone en todas las posibles soluciones únicas que cumplan con el estado estacionario y genera un archivo de salida. El mismo contiene los flujos a través de cada reacción para todas las rutas en un formato de matriz que se analizó usando Excel (Microsoft Corp.). Se determinaron para cada ME los rendimientos de glucosa en Xt, Xr, PHB y ácidos orgánicos (en los casos que fueron determinados) teóricos, y fueron comparados con el experimental. Se consideraron los siguientes datos para el análisis de los resultados: un mol de 3HB tiene una masa de 86 g y, según lo definido en la bibliografía, se definió que un mol de Xr corresponde a una masa de 100g (Kayser et al. 2005).

Se calculó la diferencia entre los datos teóricos y experimentales, y se identificó la distribución de flujos en el metabolismo central como el ME correspondiente a la reacción global que mejor se ajustaba (menor diferencia entre los valores teóricos y experimentales) a los datos experimentales obtenidos en estado estacionario o *pseudo*-estacionario. Asimismo, del ME con mayor rendimiento teórico de PHB, se identificó la ruta metabólica como blanco de modificación genética.

A partir de los datos de biomasa, concentración de PHB producido, consumo de fuente de carbono y excreción de ácidos orgánicos obtenidos durante los cultivos continuos y en lote, se calcularon los coeficientes de conversión de fuente de carbono en biomasa (Xr) y PHB.

4.3.5 Análisis de flujos metabólicos usando marcación isotópica (^{13}C-glucosa)

4.3.5.1 Ajuste del protocolo de análisis de aminoácidos por GC-MS

Se utilizó un estándar de aminoácidos (AAs) comercial (AAS18 SIGMA-ALDRICH). La mezcla incluye 17 AAs a una concentración de 2,5 μmoles/ml en solución acuosa de HCl (0,1N), excepto la L-cisteína, a una concentración de 1,25 μmoles/ml.

Para el análisis por GCMS, se procedió de la siguiente manera: 50 μl de la solución estándar se secó bajo flujo de gas N_2. Los aminoácidos se disolvieron en una solución constituida por 50 μl de Dimetil formamida (DMF) y 50 μl del derivatizante *N*-*tert*-Butil dimetillsilil-*N*-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA) (394882 SIGMA-ALDRICH). La mezcla se colocó en un vial y se incubó en condiciones anhidras durante 60 min a 80°C para permitir la sililación de los residuos aminoacídicos.

Se inyectó 1 μl de la mezcla en un equipo de GC-MS QP2010 Ultra Shimadzu, equipado con una columna HP-5MS. El programa de separación fue el siguiente: 80°C durante 5 min, seguido de una primer rampa de incremento de temperatura de 10°C/min hasta alcanzar 180°C y luego una segunda rampa de temperatura de 20°C/min hasta los 300°C, donde se mantuvo por 2 min.

Como gas de arrastre se utilizó Helio ultrapuro (Linde) a un flujo de 1,5ml/min. La temperatura del inyector, interfase y fuente de iones fue 300°C. La ionización se realizó por impacto electrónico (EI) a 70eV y la detección se realizó con barrido *full SCAN* en el rango m/z= 35 a 850.

4.3.5.2 Ensayos para marcación isotópica y análisis de los aminoácidos proteinogénicos

Previo a la realización de los ensayos con ^{13}C-glucosa, se realizó un ensayo a partir de un cultivo de la cepa Z69(pRK767) en presencia de glucosa fría, en las mismas condiciones que las diseñadas para los cultivos marcados. Este ensayo nos permite identificar el rango de tiempo donde el cultivo alcanza la fase exponencial de crecimiento.

En este ensayo se determinó el perfil de crecimiento mediante medidas de $D.O._{620nm}$, biomasa (peso seco celular) y consumo de fuente de carbono (mediante Kit enzimático, Wiener Lab.). Todas estas medidas se hicieron de acuerdo a lo descrito en determinaciones analíticas Capítulo 1 intem 3.3.11.

Los cultivos se efectuaron en matraces Erlenmeyer con medio LGI suplementando con glucosa 4 g/l y NH_4Cl 10mM. Como en los demás ensayos en matraces, el volumen del medio correspondió al 10% de la capacidad del matraz.

Los cultivos de las cepas Z69(pRK767) y Z69(pRK767::*fbp*) en presencia de ^{13}C-glucosa y Tc^{10} se realizaron de acuerdo al siguiente el diseño experimental:

- Matraz (1) de 2 L con 250 ml de medio LGI suplementando con 4 g/l de glucosa fría. Este matraz se utilizó para toma de muestra a lo largo del tiempo.
- Matraz (2) de 250 ml con 25 ml de medio LGI con 4 g/l de glucosa compuesta de la siguiente manera: 80% (w/w) de glucosa fría y 20% (w/w) de glucosa uniformemente marcada [U-^{13}C-glucosa].
- Matraz (3) de 250 ml con 25 ml de medio LGI con 4 g/l de glucosa compuesta en un 100% de glucosa marcada en el carbono 1 [1-^{13}C-glucosa].

La soluciones de glucosa tanto fría como marcadas fueron esterilizadas por filtración (filtros 0,2μm Milipore). La glucosa [U-^{13}C-glucosa] (11087-42-3) y [1-^{13}C-glucosa] (40762-22-9), fueron adquiridos de Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Tewksbury, MA, USA).

Preparación del inóculo:

Al igual que los cultivos en matraces, el inóculo fue preparado partiendo de las cepas incubadas con agitación a 30°C durante 24 horas en medio rico TY (Tc^{10}). Se usó un volumen de 5 ml para inocular un matraz con 50 ml de medio LGI (Tc^{10}) con glucosa 4

g/l y NH_4Cl 10mM. El mismo se incubó por aproximadamente 18 horas a 30°C y 190 rpm.

Los matraces para el ensayo, se inocularon con los cultivos crecidos en medio LGI de manera de que la DO_{620nm} inicial fuese aproximadamente 0,1-0,2. Los cultivos fueron incubados a 30°C y 190 rpm.

Del matraz (1) (referencia) se tomaron muestras de 15-20 ml de cultivo a diferentes tiempos para evaluar el crecimiento por medidas de DO_{620nm}. Las células se recuperaron por centrifugación a 10.000 g por 10 min para la determinación de Xt y concentración de PHB. Se determinó la concentración de glucosa remanente en el sobrenadante (ver punto ver determinaciones analíticas Capítulo 1 intem 3.3.11). Los ensayos de marcación isotópica requieren obtener células en la mitad de la fase exponencial de crecimiento, momento en el cual se presume que los átomos de carbono de la fuente carbonada ya han sido incorporados a los aminoácidos proteinogénicos (Zamboni et al. 2009). Asimismo, se considera que en la fase de crecimiento exponencial el cultivo se encuentra en un estado *pseudo*-estacionario, requerido para el análisis de flujos metabólicos. Cuando el cultivo alcanzó una $D.O._{620}$ de aproximadamente 2,0 y la concentración de glucosa en el sobrenadante fue de aproximadamente 1 g/l, se colectaron las células de los matraces de 250 ml (con ^{13}C-glucosa) por centrifugación a 8000 g por 15 min a 4°C. Los *pellets* celulares se guardaron a -20°C para su posterior análisis (ver más adelante).

Con estos datos de biomasa producida, PHB producido y glucosa consumida, se calcularon las correspondientes velocidades (Anexo 3).

4.3.5.3. Determinación del patrón de marcación ^{13}C por GC-MS

El *pellet* celular correspondiente a 10 ml de cultivo se resuspendió en 10 ml de una solución acuosa de NaCl 0,9%. Se tomaron 2 ml de la suspensión y se colectaron las células por centrifugación a 8000 g por 15 min.

El *pellet* celular así obtenido se resuspendió en 1,5 ml de HCl 6N y se incubó durante 24 horas a 100°C para su hidrólisis. El hidrolizado se secó en baño de aceite a 60°C, bajo flujo de aire. Para eliminar todo resto de humedad se sometió el hidrolizado seco a corriente de N_2 por 20 min. Posteriormente se resuspendió el precipitado en 50 μl de DMF y se le agregó 50 μl del derivatizante MBSTFA, como se describió previamente.

La mezcla se colocó en horno a 80°C por 60 min. Transcurrido ese tiempo, la muestra se analizó en un GC-MS, bajo las mismas condiciones que las descritas para el análisis de la mezcla estándar de aminoácidos (ver punto 4.3.5.1).

4.3.5.4 Análisis de flujos metabólicos

Par el análisis de flujos metabólicos se usó el *software* FiatFlux (Zamboni et al. 2005). Este programa consiste de dos bloques. Uno de ellos es: el módulo *"Ratio"* que calcula a partir del patrón de marcación de los aminoácidos (patrón de masas de isotopómeros), la proporción de aporte de los intermediarios por las diferentes rutas metabólicas. En este módulo se ingresaron los resultados del perfil cromatográfico obtenido por GC-MS en formato CDF, el cual es transformado a un archivo con extensión ff, donde el programa asigna las señales a los analitos correspondientes (Figura 4.3.4 Panel A)

En el panel B, se indica si el ensayo corresponde al de glucosa 1-^{13}C (100%) o U-^{13}C (20%) y glucosa no marcada (80%). El programa está diseñado para trabajar con organismos modelo como *Bacillus subtilis, E. coli* o *Saccharomyces cerevisiae*. Si no se trabaja con esos organismos se dispone de un modelo general denominado *master*. Estos modelos fueron elaborados para células crecidas en [1-^{13}C]glucosa, [U-^{13}C]glucosa o mezclas. En nuestro caso se seleccionó el modelo *master*, recomendado por los autores para microorganismos distintos a los incluidos como modelo. El resto del análisis es realizado por el programa. Los datos de marcación con ^{13}C que genera el GC-MS son interpretados analíticamente mediante ecuaciones probabilísticas que cuantifican la relaciones de flujo (Fischer & Sauer 2003). De esta manera calcula de 3 a 12 relaciones de flujos en el metabolismo central de acuerdo al organismo (modelo seleccionado) y el experimento de marcación isotópica (Panel D).

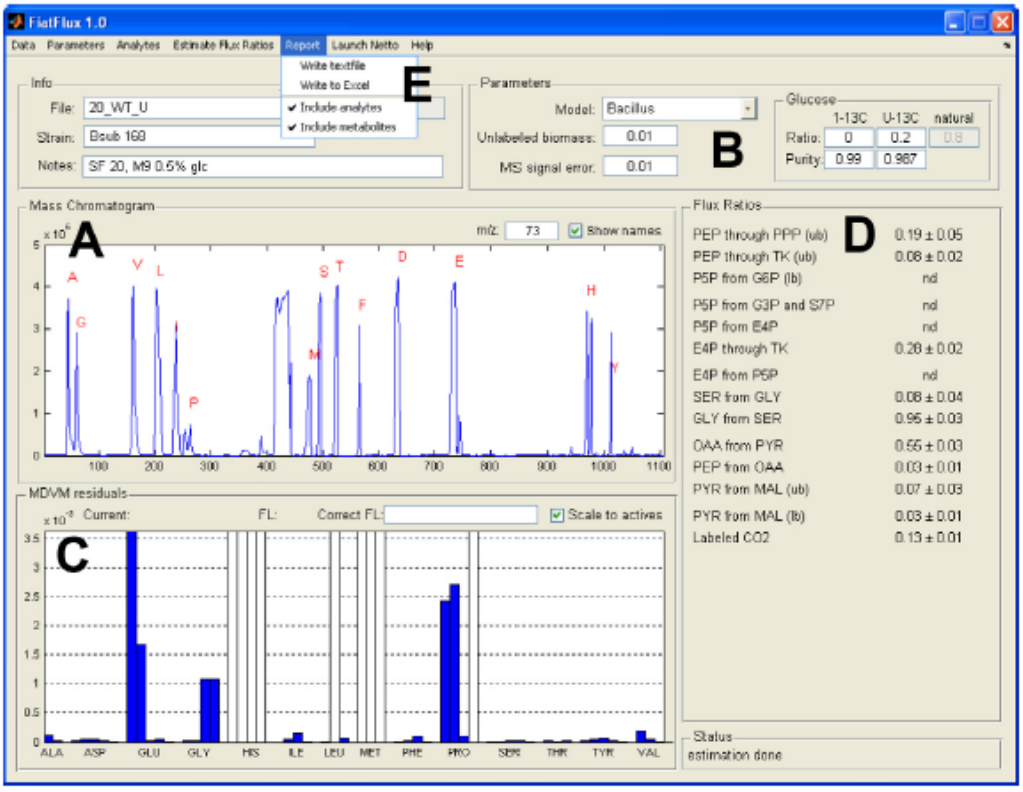


Figura 4.3.4 Ventana correspondiente al módulo Ratio.

El segundo módulo, denominado "*Netto",* calcula los flujos netos a partir de la red metabólica que incluye la composición de la biomasa y los datos fisiológicos (medidas experimentales): velocidad de crecimiento, de consumo de sustrato, de síntesis de productos o metabolitos extracelulares, todos medidos y calculados en unidades de $mmol.gXr^{-1}.h^{-1}$ y las relaciones de flujos calculadas en el módulo "*Ratio"* (Figura4.3.5). Los datos ingresados se obtuvieron a partir de los cultivos en matraces. El modelo de la red metabólica de *H. seropedicae* ingresada y utilizada en éste módulo se describe en el Anexo III. En el modelo ingresado se cargó la ecuación de requerimiento de precursores para la biomasa, así como las relaciones de flujos. Para la elaboración del modelo se partió de lo diseñado por los creadores del *software* para *E. coli,* y se lo modificó eliminando o ingresando nuevas reacciones bioquímicas de acuerdo al metabolismo de *H. seropedicae.*

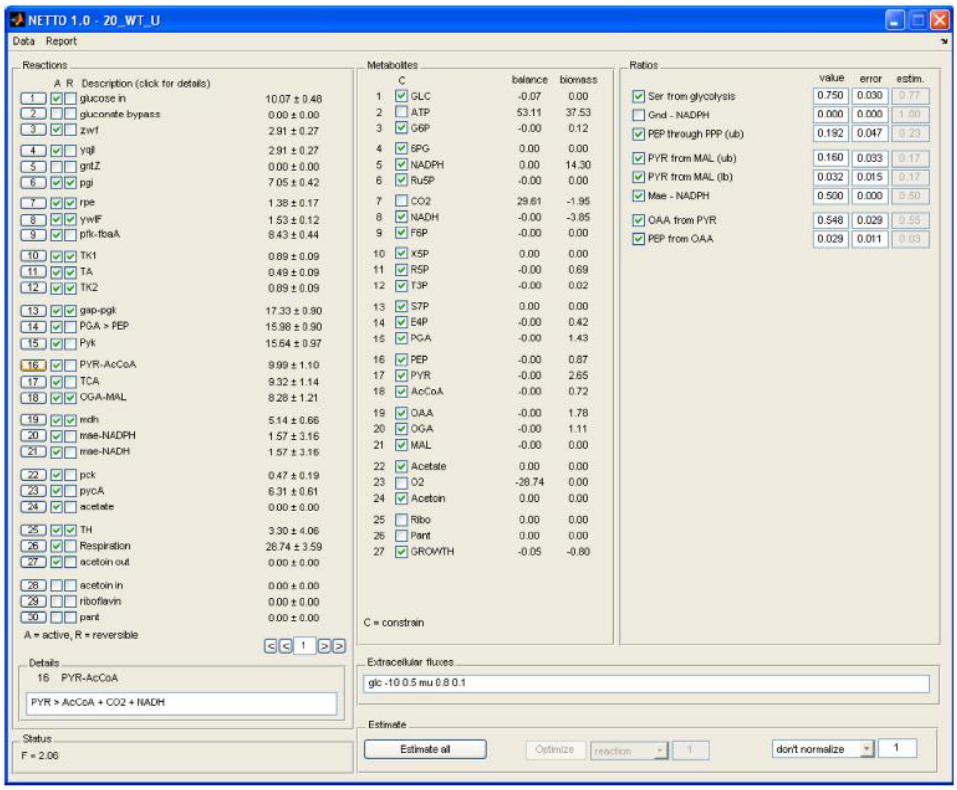


Figura 4.3.5 Ventana correspondiente al módulo Netto.

4.6 Resultados y discusión

4.6.1 Análisis de crecimiento y síntesis de PHB por *H.seropedicae* cultivada en bio-reactor en presencia de glucosa como única fuente de carbono

4.6.1.1 Cultivos continuos de *H. seropedicae* Z69

Se diseñaron varios cultivos continuos a diferentes velocidades de dilución (D) de 0,03 a 0,16 h^{-1} y manteniendo una relación molar C/N=22. El rango de D ensayado fue seleccionado de modo que esas velocidades fuesen menores que la μ_{max}, la cual por datos de cultivos en lote tiene un valor entre 0,3-0,4 h^{-1}. Para cada uno de los ensayos, el establecimiento del cultivo en estado estacionario se evaluó luego de 4 tiempos de residencia hidráulica, por medidas de DO_{620nm} del cultivo a lo largo de 24 horas. Una vez establecido el estado estacionario, se determinó Xt, concentración de PHB y concentración de glucosa en el sobrenadante, para cada una de las condiciones ensayadas. En la tabla 4.6.1 se muestran los resultados obtenidos y calculados para cada una de las velocidades de dilución.

El contenido de PHB disminuyó a medida que aumentó la velocidad de dilución. Se obtuvo cerca de un 70% de contenido en los cultivos a las diluciones más bajas, disminuyendo a valores próximos a un 50% a D mayores. El contenido de PHB de 70% es el valor más alto de los determinados hasta el momento en *H. seropedicae* Z69 creciendo en glucosa como única fuente de carbono. Asimismo, el $Y_{PHB/glu}$ obtenido para dicha condición fue el mayor alcanzado, comparado con cultivos en lote

Tabla 4.6.1 Crecimiento, síntesis de PHB, consumo de glucosa y rendimientos de transformación de glucosa en biomasa y PHB a distintas velocidades de dilución, de cultivos de la cepa Z69 en quimiostato.

D (h^{-1})	Xt (g/l)	Xr (g/l)	PHB (g/l)	Gluc. consumida (g/l)	PHB %	pXr ($g.l^{-1}.h^{-1}$)	pPHB ($g.l^{-1}.h^{-1}$)	$Y_{xr/glu}$ (g/g)	$Y_{PHB/glu}$ (g /g)
0,03	1,94 ± 0,03	0,58±0,03	1,35±0,06	5,33	69,74±2,03	0,018±0,001	0,041±0,002	0,112±0,029	0,259±0,012
0,056	1,85 ± 0,00	0,68±0,06	1,16±0,06	5,31	63,87±2,63	0,038±0,003	0,065±0,003	0,129±0,061	0,218±0,011
0,07	1,89 ± 0,02	0,58±0,07	1,31±0,05	4,10	69,50±2,36	0,041±0,005	0,092±0,003	0,143±0,067	0,321±0,004
0,12	1,35 ± 0,10	0,62±0,03	0,72±0,13	4,21	52,77±4,21	0,075±0,003	0,087±0,016	0,149±0,027	0,176±0,055
0,158	1,18 ± 0,04	0,64±0,03	0,54±0,09	2,80	47,04±2,56	0,092±0,016	0,094±0,017	0,225±0,103	0,191±0,033

Los valores corresponden al promedio de medidas obtenidas a partir de muestras independientes colectadas en dos momentos del cultivo, una vez alcanzado el estado estacionario. A su vez, cada muestra fue tomada y procesada por duplicado.

La conversión de glucosa en biomasa ($Y_{Xr/glu}$) aumentó a medida que se incrementó la velocidad de dilución. El efecto contrario se observa para $Y_{PHB/glu}$. con una disminución de la conversión de glucosa en polímero a medida que aumentaba D. A bajos valores de D se favorece la síntesis de polímero con respecto a la síntesis de biomasa. En la figura 4.6.1 se muestra en forma gráfica las concentraciones de PHB y Xr expresadas en g/l, así como la productividad de Xt y PHB (pXr y pPHB) en función de D. Se observa que pXr aumentó con la velocidad de dilución, mientras que pPHB, alcanzó un valor máximo a 0,07h^{-1} y se mantuvo constante a D mayores.

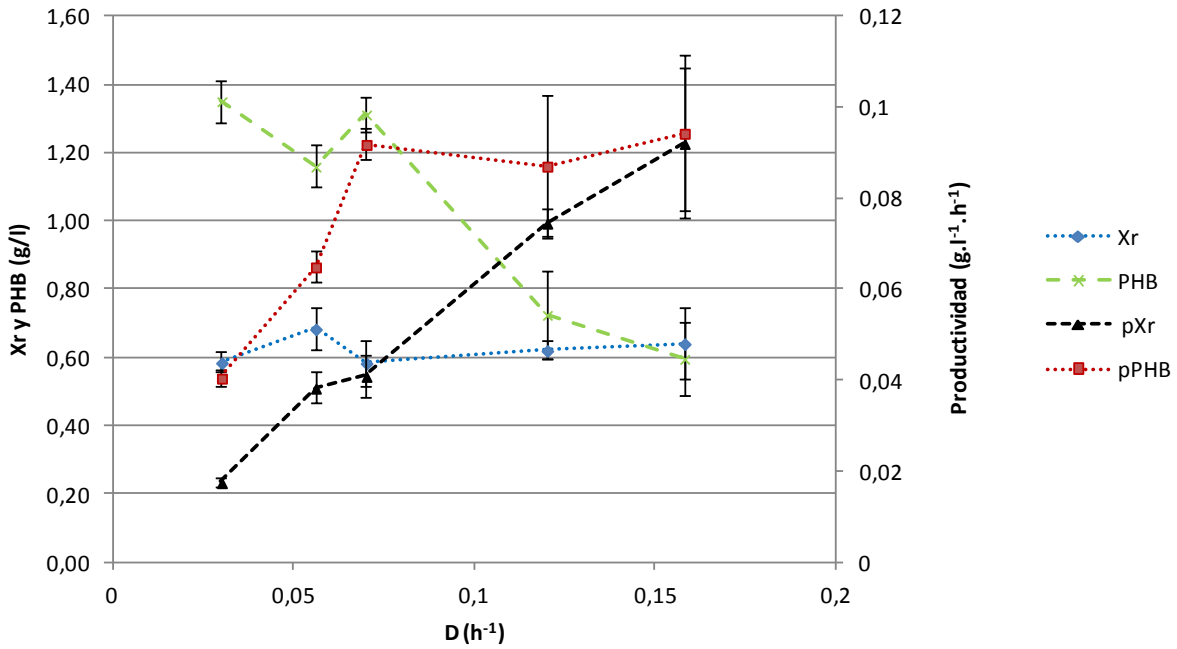


Figura 4.6.1 Gráfico que representa la productividad y producciónde Xr y PHB en función de la velocidad de dilución (D).

Para determinar la cinética de formación de producto se utilizó el modelo propuesto por Luedeking y Piret, descrito en el trabajo de Gogola-Kolling y colaboradores (Gogola-Kolling et al. 2014) para cultivos continuos:

$$\mu p = \alpha \cdot \mu + \beta$$

En esa ecuación, α es el coeficiente asociado al crecimiento y β es el coeficiente no asociado al crecimiento. En un gráfico de μp (velocidad de síntesis del producto) en función de μ (velocida de crecimiento) si $\alpha=0$ entonces la cinética del producto es no asociada al crecimiento, si β=0 la cinética es totalmente asociada al crecimiento y si ambos coeficientes son $\neq 0$ la misma está parcialmente asociada al crecimiento.

Con los resultados obtenidos del ensayo se calculó pPHB (ver fórmulas en Anexo 3) en función de D (figura 4.6.2). Los valores de α y β son distintos de 0, por lo que se puede decir que la síntesis de PHB en *H. seropedicae* está parcialmente asociada al crecimiento. Este resultado se obtiene para valores bajos de D. Al ensayar valores de D por encima de 0,07 h-1 no hay una correlación lineal entre la síntesis de PHB y la velocidad de dilución.

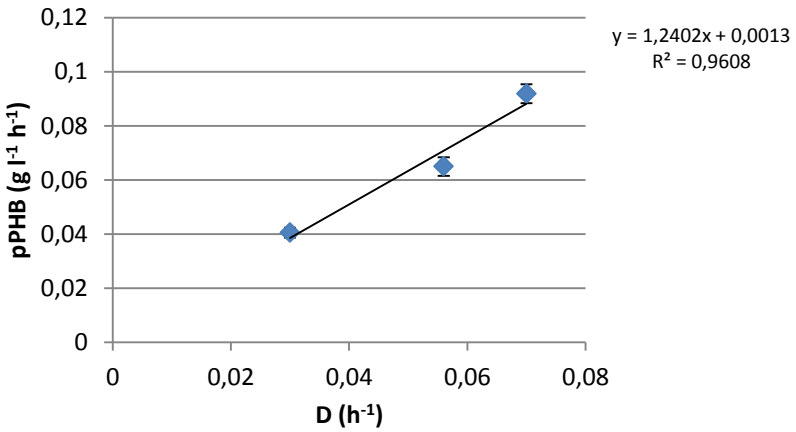


Figura 4.6.2 Relación de la velocidad de síntesis de PHB con la velocidad de dilución.

4.6.1.2 Cultivos en lote de *H. seropedicae* Z69

Estos ensayos se usaron para determinar algunos parámetros del cultivo (velocidad de crecimiento, consumo de fuente de carbono y síntesis de PHB) a escala de bior-eactor bajo condiciones controladas de temperatura, aireación, agitación y pH. Se realizaron

cuatro cultivos en lote en donde se evaluó el medio de cultivo mineral y el porcentaje de O_2 disuelto (OD). Se realizó un quinto cultivo en lote alimentado, que consistió de un único pulso de glucosa durante la fermentación. En todos los ensayos se utilizó una relación molar inicial C:N= 25.

4.6.1.2.1 Evaluación del medio de cultivo y nivel de O_2 disuelto

Bajo condiciones de bio-reactor se estudió el crecimiento y síntesis de PHB, empleando dos medios minerales definidos, el medio LGI y el medio MMG. La composición de los medios se muestra en el Anexo 1. La principal diferencia entre ambos medios es la concentración de sales de fosfato. En estos ensayos se mantuvo el nivel de O_2 disuelto (OD) en un 50% mediante el aumento manual de la agitación durante la fermentación. Los ensayos se denominaron **LGI-50** y **MMG-50**. Utilizando el medio LGI se realizó una tercera fermentación en la cual la variable fue el nivel de OD, el que en este caso se mantuvo en un 20%, este ensayo se denominó **LGI-20**. En todos los casos se utilizó una relación molar inicial C/N=25 y las fuentes carbonadas y nitrogenadas fueron glucosa y NH_4Cl, respectivamente.

Bajo las condiciones ensayadas se determinó, a lo largo de la fermentación, la velocidad de crecimiento, concentración de PHB y consumo de fuente de carbono y amonio.

Ensayo LGI-50: en la figura 4.6.3 se muestra los perfiles de crecimiento, síntesis de PHB, concentración de glucosa y amonio en el sobrenadante a lo largo del tiempo.

Como se observa en la figura 4.6.3, el crecimiento en medio LGI presentó un fase *lag* de aproximadamente 2,5 horas y luego una fase de crecimiento exponencial con una μ_{max}=0,32 h^{-1}, que se extendió hasta las 12 horas. A partir de ese momento y hasta aproximadamente las 30 horas, se observa una fase de crecimiento con una velocidad mucho menor (0,024 h^{-1}). Se identificaron así estos dos tramos con una velocidad constante de crecimiento cada uno (tramo 1 y tramo 2), lo que correspondería a estados *pseudo*-estacionarios.

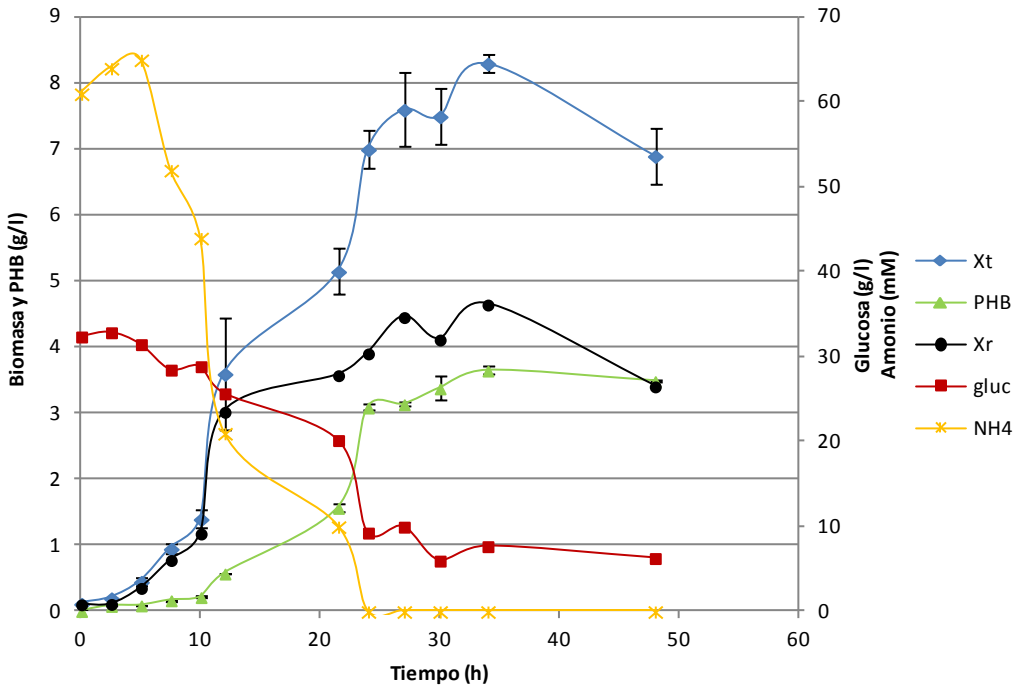


Figura 4.6.3. Perfil de crecimiento, síntesis de PHB, concentración de glucosa y amonio en el sobrenadante correspondiente al ensayo LGI-50.

Ensayo MMG-50: en la figura 4.6.4 se muestra los perfiles de crecimiento, síntesis de PHB, concentración de glucosa y amonio en el sobrenadante a lo largo del tiempo.

Al igual que en el ensayo anterior, en este caso se pueden identificar dos fases con una velocidad de crecimiento constante. El tramo 1, correspondiente a la fase exponencial de crecimiento, presenta una velocidad máxima μ_{max}=0,28 (3 a 12 horas). En el tramo 2 la velocidad de crecimiento fue 0,04 h^{-1}(desde las 12 a las 30 horas de incubación). Los perfiles de crecimiento y producción de PHB en ambos medios de cultivo fueron similares, con una fase exponencial que se extendió hasta aproximadamente 12 horas, en donde la velocidad de crecimiento fue máxima. Luego se observa una segunda etapa con una velocidad de crecimiento menor (desaceleración), previo al ingreso a la fase estacionaria de crecimiento.

En los perfiles de las figuras 4.6.3 y 4.6.4 se observa que la fase de desaceleración se inició cuando la concentración de amonio en el medio fue alrededor de 20mM y el

ingreso en la fase estacionaria para ambos cultivos coincidió con el momento en que la misma fue indetectable.

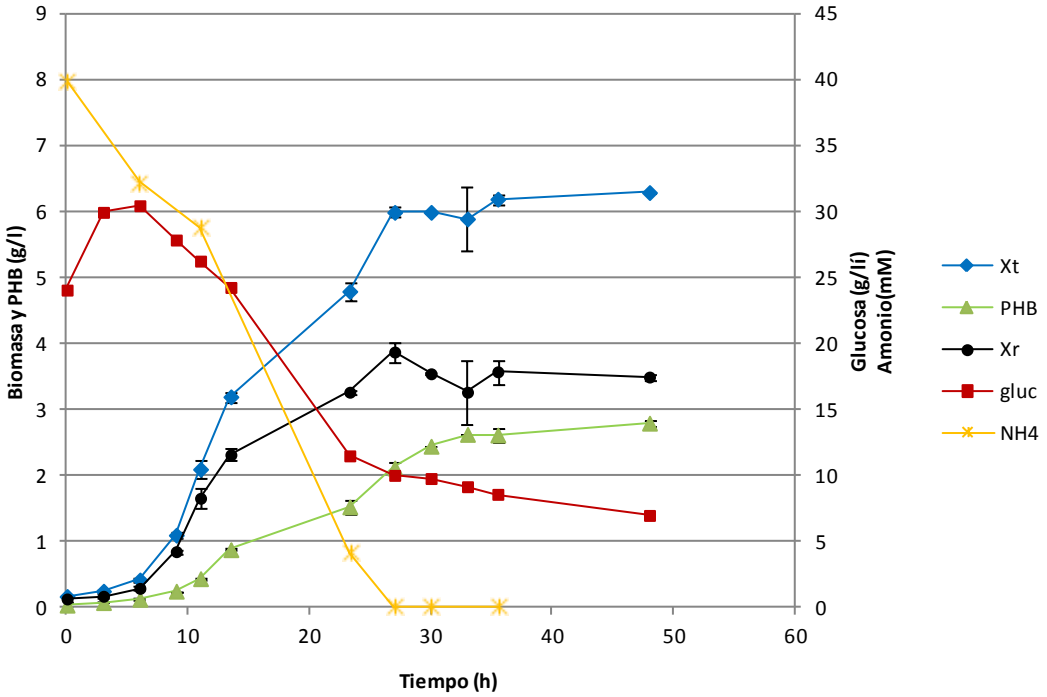


Figura 4.6.4 Perfil de crecimiento, síntesis de PHB, concentración de glucosa y amonio correspondiente al ensayo MM-G-50.

La mayor biomasa alcanzada en el medio LGI pudo deberse a que en este ensayo el cultivo partió con una concentración de amonio mayor que la del medio MMG, las cuales fueron 60mM y 40mM, respectivamente. En ambos ensayos, cuando el cultivo entró en la fase estacionaria de crecimiento no hubo síntesis de PHB.

En la tabla 4.6.2 se resumen los resultados obtenidos para el ensayo LGI-50 y MM-G-50. Se listan los dos tramos de crecimiento identificados, los rendimientos de transformación de glucosa en biomasa y en PHB, velocidad de síntesis de PHB y velocidad de consumo de glucosa.

Tabla 4.6.2 Resultados obtenidos para cada uno de los tramos con velocidad constante de crecimiento en los cultivos en lote LGI-50 y MMG-50.

	Tramos	μ (h^{-1})	Xt (g/l)	Xr (gl/l)	PHB %	$Y_{PHB/glu}$ (g/g)	$Y_{Xr/glu}$ (g/g)	*qPHB**	*qS***
LGI-50	1	0,32	3,58	3,00	16	0,048	0,268	0,67	4,65
	2	0,02	7,60	4,50	41	0,144	0,070	6,48	19,16
MMG-50	1	0,29	2,10	1,66	21	0,054	0,222	0,81	4,25
	2	0,04	6,00	3,88	35	0,079	0,086	2,83	12,08

*Las determinaciones PHB se realizaron por gravimetría y las de concentración de glucosa fueron realizadas con el sistema AccuChek
**qPHB* velocidad de síntesis de PHB (productividad especíica: mmolPHB.gXr^{-1}.h-1)
***qS:* velocidad de consumo de sustrato (mmolgluc.gXr^{-1}.h^{-1})

Estos datos indicarían que en el primer tramo (μ_{max}) se favorece la síntesis de biomasa y cuando la velocidad de crecimiento es menor se favorece la síntesis de polímero. La velocidad de consumo de fuente de carbono es mayor en la etapa de acumulación de polímero. Ambos medios se comportaron de forma aceptable para el cultivode *H. seropedicae*. La diferencia radica en la cantidad de fosfato en el medio de cultivo, exhibiendo un mejor comportamiento en el medio LGI, que tiene mayor concentración de fosfato. El medio LGI es habitualmente utilizado para cultivar a *H. seropedicae* en el laboratorio. El medio MMG fue ensayado, ya que es más económico por la menor cantidad de sales de fosfato que lo compone.

Ensayo LGI-20: En este ensayo se evaluó el efecto del oxígeno disuelto en la acumulación de PHB, el cual se mantuvo entre 10-20%. Las condiciones del cultivo fueron las mismas que en los ensayos anteriores. La agitación fue de 200rpm durante todo el ensayo y se mantuvo así, ya que fue suficiente para mantener el OD en el porcentaje requerido.

En el gráfico de la figura 4.6.5, se observa el perfil de crecimiento, concentración de PHB y concentración de glucosa en el sobrenadante. Al igual que para los demás ensayos, la fase exponencial de crecimiento se extendió hasta las 12 horas aproximadamente, con una μ_{max}=0,15 h^{-1}. En este ensayo no se tomaron suficientes muestras como para realizar un estudio más completo. Sin embargo, los resultados

preliminares indican que a las 15 horas del cultivo se alcanzó una biomasa máxima de 6,7 g/l y la concentración máxima de PHB fue 3,4 g/l. Estos valores corresponden a un contenido de 50% de PHB, con una productividad volumétrica de 0,48 g/l.h^{-1}.

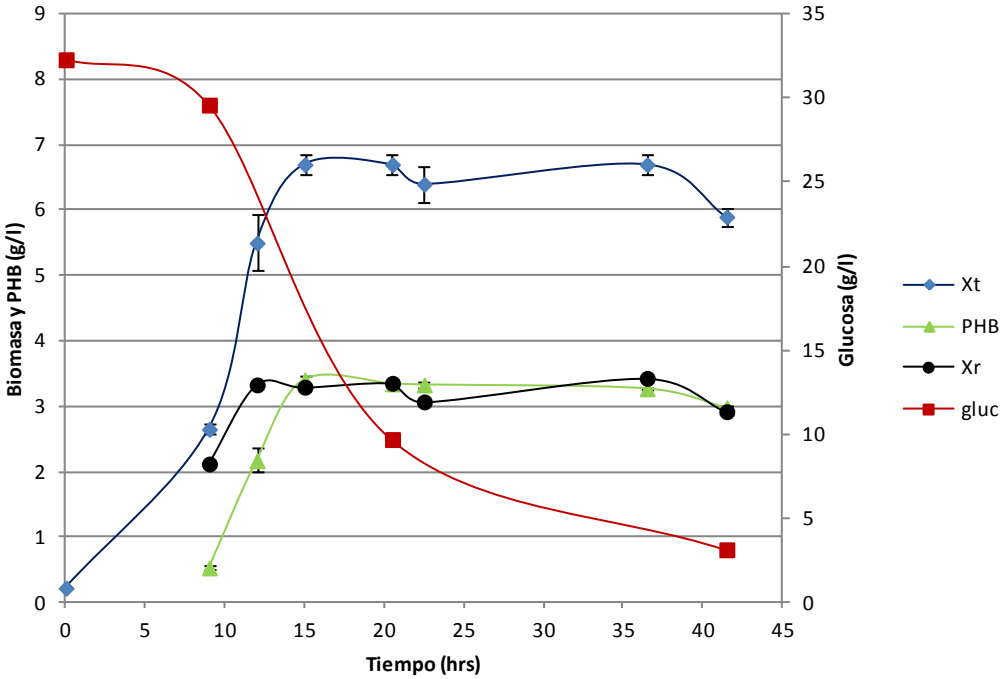


Figura 4.6.5 Perfil de crecimiento de la cepa Z69 en bio-reactor manteniendo el oxígeno disuelto entre un 10-20% de saturación.

Manteniendo el OD en un valor no mayor al 20% el crecimiento fue más lento, con un valor μ_{max} aproximadamente la mitad que para la condición del ensayo LGI-50. En esas condiciones se vio favorecida la síntesis de PHB, reflejada por una productividad de 0,48 g/l.h^{-1}, comparada con 0,18 g/l.h^{-1} obtenida en LGI-50 con mayor disponibilidad de oxígeno. El oxígeno es otro nutriente limitante para el crecimiento, que puede afectar la síntesis de PHB (Senior & Dawes 1973; Anderson & Dawes 1990). Probablemente, el ingreso de acetil-coA al ciclo de CAT se vio reducido por la baja disponibilidad de O_2 y por tanto baja regeneración del poder reductor. En condiciones limitantes de oxígeno aumenta la relación NAD(P)H/NAD(P). Las enzimas isocitrato deshidrogenasa y citrato sintasa son inhibidas por el NADH, lo que trae como

consecuencia una disminución de la velocidad de ingreso del acetil-CoA al ciclo CAT. Bajo estas condiciones, el acetil-CoA que no es incorporado al ciclo es condensado por la 3-cetotiolasa a acetoacetil-CoA, el cual es reducido a 3-hidroxibutiril-CoA y polimerizado a PHB, con la concomitante reoxidación del NAD(P)H. El efecto del nivel de NADPH y de la relación NADPH/NADP en la síntesis de PHB ha sido demostrada en *E. coli* portando el operón *phb*CBA de *R. eutropha* (Lee, M. K. Kim, et al. 1996; De Almeida et al. 2010).

4.6.1.2.2. Ensayo en lote con un pulso de alimentación

En este cultivo se utilizó medio MMG y la fuente de nitrógeno fue $(NH_4)_2SO_4$. El equipamiento empleado fue distinto al de las demás fermentaciones (ver Materiales y Métodos). Este ensayo se enmarcó en una pasantía realizada en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Biomedicina de la Universidad de San Pablo.

En la Figura 4.6.6 se muestra el perfil de Xt, Xr, concentración de PHB y concentraciones de glucosa y amonio remanentes en el medio de cultivo, en función del tiempo. La concentración inicial de glucosa y amonio fue de 33 g/l y 0,53 g/l (29mM), respectivamente. Al cabo de las primeras 12 horas de incubación la concentración de glucosa en el sobrenadante fue de 15 g/l, mientras que la concentración de amonio alcanzó un valor menor que el límite de detección del método empleado (0,002 g/l). En ese momento se alcanzó una Xt de 6,4 g/l y el contenido de PHB fue 34%.

A las 14 horas de incubación,cuando la concentración de glucosa en el sobrenadante fue 10 g/l aproximadamente, se realizó un pulso de alimentación con una solución de glucosa 500 g/l, hasta alcanzar una concentración en el medio de cultivo de 30 g/l (figura 4.6.6). Luego de la alimentación la biomasa total comenzó a disminuir, llegando a un valor de 5 g/l a las 23 horas. A partir de ese momento la biomasa y concentración de PHB se recuperaron parcialmente, alcanzando al final del cultivo 6 g/l de Xt, con un 47% de contenido de PHB.

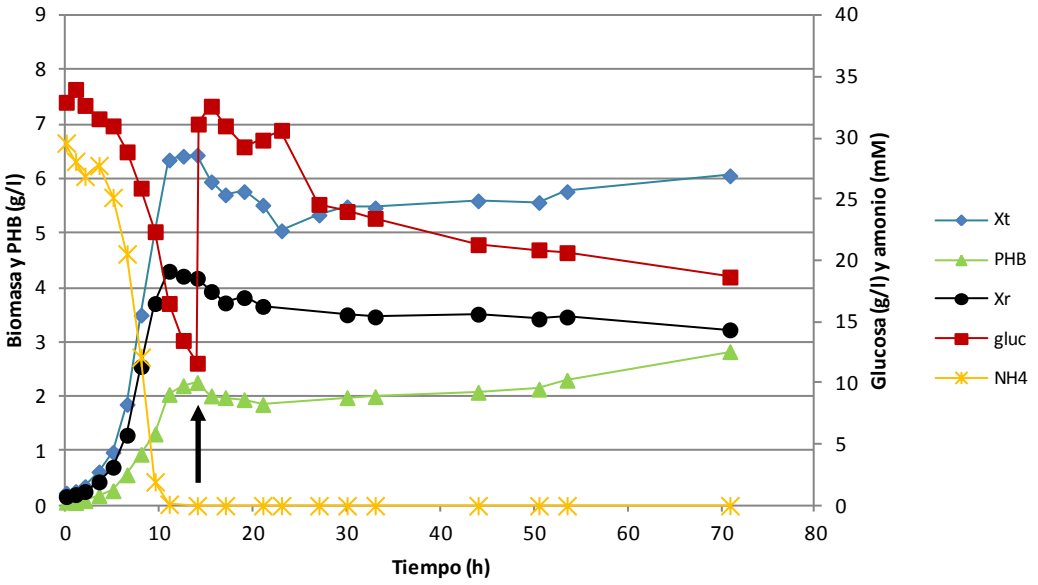


Figura 4.6.6 Perfil de crecimiento, síntesis de PHB y concentración de glucosa y amonio en el sobrenadante en función del tiempo en cultivo en lote con alimentación. La flecha indica el momento del agregado de glucosa.

El pulso de glucosa en el cultivo coincidió con una muy baja concentración de fuente de nitrógeno en el mismo. De acuerdo a lo que se observa en el perfil de crecimiento, una vez efectuado el pulso disminuyó la biomasa total. El cultivo no continuó creciendo, probablemente por la falta de la fuente nitrogenada. Sin embargo, esta limitación no promovió la acumulación del exceso de fuente de carbono como PHB. Estos resultados confirmarían que la acumulación de polímero en *H. seropedicae* parece estar parcialmente asociada al crecimiento. Cuando el organismo no puede duplicarse por la falta de algún nutriente esencial detiene su crecimiento y síntesis de polímero. En este ensayo, la alimentación con glucosa coincidió con el agotamiento del amonio en el medio. La recuperación obtenida luego de aproximadamente 20 horas probablemente se debió a que los componentes nitrogenados de las células bacterianas lisadas fueron consumidos como fuente de nitrógeno, lo que les permitió crecer y acumular PHB.

La μ_{max} alcanzada en la fase de crecimiento exponencial (entre 2 y 10 horas de cultivo) fue 0,37 h^{-1}. Se alcanzó una Xt de 6,3g/l, una Xr de 4,3g/l y con un contenido de PHB de 32 %.

La figura 4.6.7 muestra el perfil de concentración de los ácidos orgánicos analizados en el sobrenadante en función del tiempo. Se detectó la presencia de ácido cítrico, cuya concentración aumentó de forma apreciable durante todo el ensayo. En el caso del ácido acético, la concentración aumentó de forma apreciable a partir de las 8 horas de incubación.

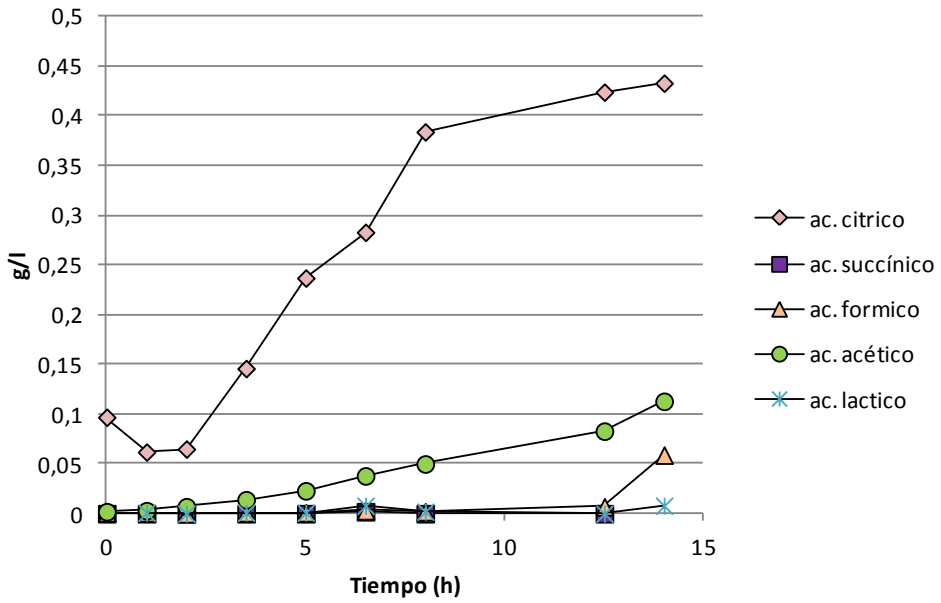


Figura 4.6.7 Concentración de ácidos orgánicos en el sobrenadante a lo largo del tiempo de la fermentación.

En este ensayo, la alimentación no mejoró la producción de biomasa y PHB. El efecto de la alimentación fue contrario al que se buscaba. En la tabla 4.6.4 se resumen los resultados de producción de biomasa, PHB, rendimiento y velocidad de síntesis de PHB. Se determinó también el sustrato carbonado consumido y se calcularon los $Y_{xr/glu}$ y $Y_{PHB/glu}$ correspondientes al tramo de crecimiento exponencial de acuerdo a las formulas detalladas en el anexo 3 (tabla 3.1.1).

Tabla 4.6.4 Resumen de los resultados del cultivo en lote. Correspondientes a la fase exponencial de crecimiento (2-10 horas).

μ (h^{-1})	Xt (g/l)	Xr (g/l)	PHB %	$Y_{PHB/glu}$ (g/g)	$Y_{Xr/glu}$ (g/g)	$Y_{cit/glu}$ g/g)	*qPHB**	*qS***
0,37	6,3	4,3	32	0,110	0,284	0,036	1,64	4,26

**qPHB* en mmolPHB.gXr^{-1}.h-1
***qS:*en mmolgluc.gXr^{-1}.h^{-1}

El tramo de 2 a 10 horas con velocidad constante de crecimiento se seleccionó como un estado *pseudo*-estacionario. Los resultados de contenido de PHB y rendimiento de transformación de glucosa en polímero y biomasa calculados en este período fueron considerados para un posterior análisis de rutas metabólicas mediante el análisis de modos elementales de flujo.

4.6.2 Análisis de rutas metabólicas mediante el análisis de modos elementales de flujo (Metatool)

El estado estacionario necesario para el análisis de flujos metabólicos se alcanza en cultivos continuos. Sin embargo, en los cultivos en lote, se requiere identificar estados *pseudo*-estacionarios determinados por la velocidad de crecimiento, velocidades de consumo de O_2, producción de CO_2, consumo de fuente de carbono y síntesis de productos, constantes. A lo largo del cultivo en lote las células adaptan su metabolismo y por lo tanto la estructura de la red metabólica a lo largo de las diferentes etapas de crecimiento va cambiando. Por lo tanto, se requerirían diferentes redes metabólicas para describir el comportamiento celular a lo largo del cultivo.

4.6.2.1 Análisis de modos elementales de flujo (AMEF) a partir de los resultados obtenidos de cultivos contínuos

Se utilizaron los resultados obtenidos de los cultivos continuos. Para cada velocidad de dilución (D= 0,03, 0,06, 0,07, 0,12 y 0,16 h^{-1}) se definió Xt=Xr+PHB en moles, de acuerdo al contenido de PHB (%) obtenido (las ecuaciones y archivo de entrada de Metatool se muestra en Anexo 4). No se incluyeron restricciones adicionales. Se consideró que la concentración de metabolitos que hubiesen sido excretados era despreciable, no detectándose la presencia de ácido pirúvico, α-cetoglutárico, cítrico y succínico en el sobrenadante (estos ácidos fueron usados como estándares por sus tiempos de retención para ayudar a la identificación de los compuestos eluidos en el HPLC-UV).

Para cada uno de los cultivos continuos se obtuvieron 9 MEF. En todos los casos se descartó el primer modo, ya que se trató de un ciclo fútil. Por lo tanto, se realizó el análisis de los restantes 8 MEF. Los moles de Xr y PHB producidos por mol de glucosa consumida asociados a cada MEF fueron usados para calcular los rendimientos correspondientes en unidades g/g (ver Anexo 4). La identificación del MEF que mejor se ajusta a los datos experimentales se realizó mediante la comparación de dichos rendimientos con los obtenidos experimentalmente (datos experimentales en la tabla 4.6.1).

En la figura 4.6.8 se muestra en forma de gráfica de barras, las enzimas (reacciones) y el correspondiente flujo de carbono para cada una, que componen cada MEF que mejor representa los datos experimentales obtenidos. En la figura 4.6.9 se ilustra en forma de red metabólica sólo una de las distribuciones de flujos, que corresponde a la condición de D=0,07 h^{-1}. En general, estas distribuciones de flujos comprenden, para cada una de las condiciones, la utilización de la ruta ED en forma lineal para el catabolismo de glucosa, generación de biomasa y PHB. Algunas diferencias se observan en el CAT, siendo el caso de la condición de 0,07 h^{-1} la única que presenta flujo por todas las enzimas de dicho ciclo. Los flujos a través de la ruta de pentosas fosfato, utilizada para la síntesis de intermediarios biosintéticos, no variaron en ninguno de los MEF que se ajustaban a los valores experimentales. El ciclo del Glioxilato estuvo presente en todas las soluciones y el flujo por dichas enzimas es mayor en los MEF en donde las enzimas CK4 y CK5 (α-cetoglutarato deshidrogenasa y succinil-CoA sintetasa) de CAT no participan.

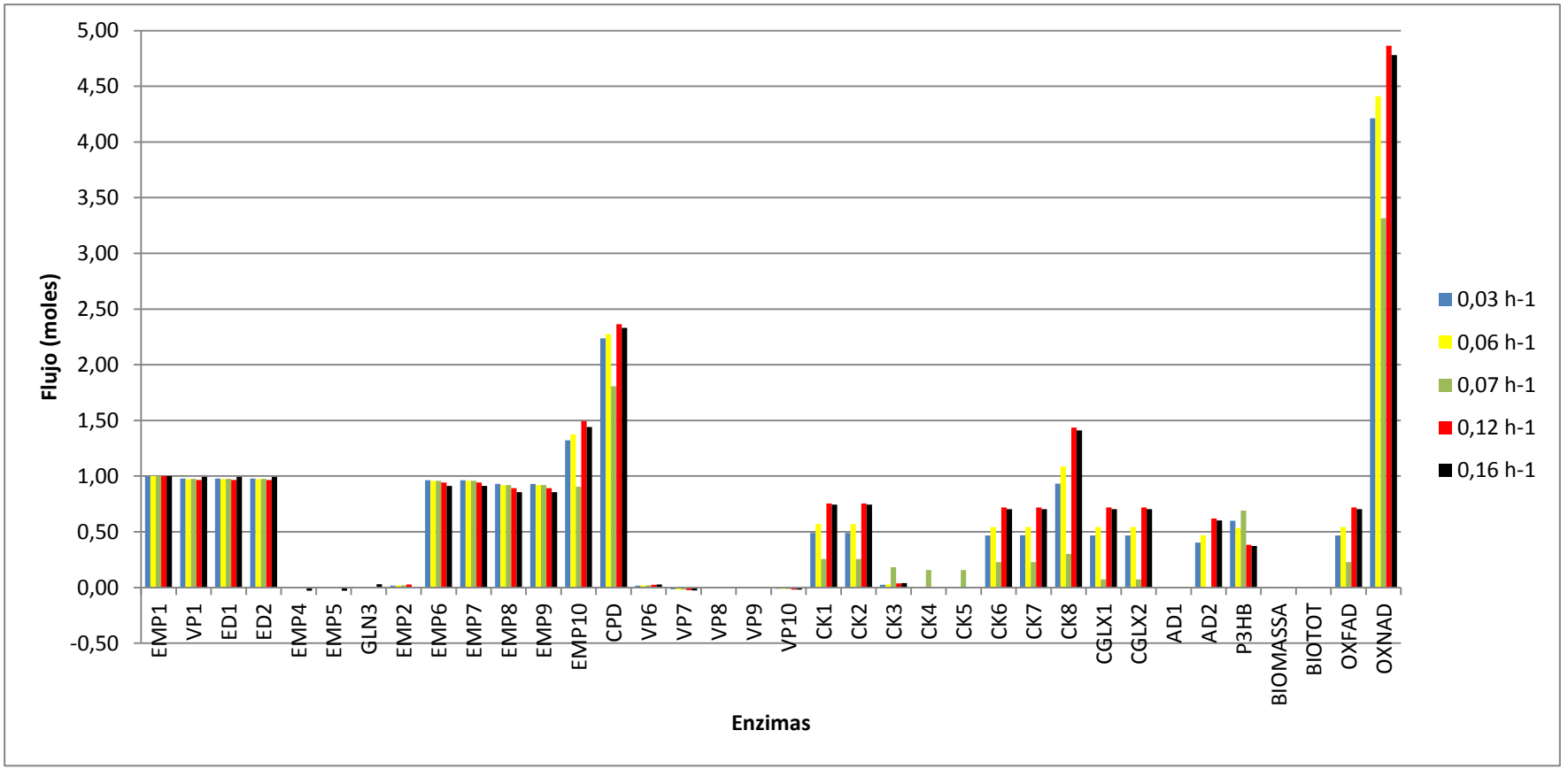


Figura 4.6.8 Representación gráfica del conjunto de enzimas (MEF) y los flujos, correspondiente a la reacción global que mejor se ajusta a los datos experimentales.

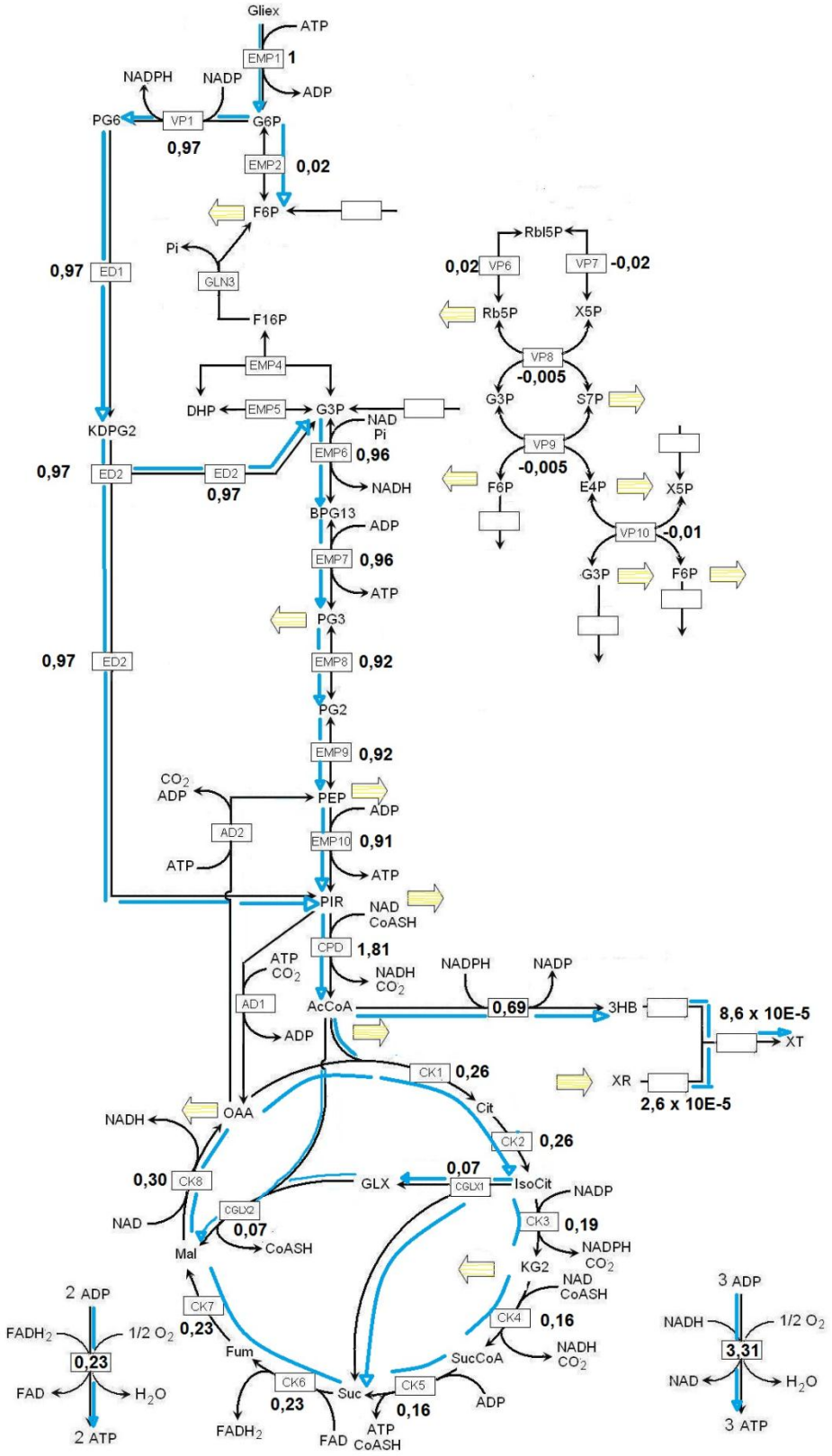


Figura 4.6.9 Distribución de flujos del metabolismo central que mejor representa los datos experimentales del cultivo de *H. seropedicae* en quimiostato a D=0.07h-1. Las flechas amarillas indican la salida de intermediarios para la ecuación de biomasa.

Por otro lado, para los cinco ensayos en quimiostato, se identificaron por lo menos dos posibles soluciones (MEF2 y MEF4) que garantizarían una mayor eficiencia de conversión de glucosa en PHB, estos corresponden al rendimiento máximo de la red. Estos dos MEF en cada una de las condiciones ensayadas comprenden la misma distribución de flujos con pequeñas diferencias en el flujo de carbono por las reacciones involucradas. En las figuras 4.6.10 y 4.6.11 se muestran en forma de gráfico de barras las enzimas y el flujo de carbono de cada una que componen el MEF2 y MEF4, respectivamente, para cada una de las D. En la figura 4.6.12 se muestra el esquema de la red metabólica y la distribución del flujo correspondiente al MEF4. En el modo MEF4, no habría flujo a través de las enzimas CK4 y CK5, mientras que en el MEF2 no hay participación de las enzimas del CAT CK4, CK5, CK6, CK7, CK8 (corresponde a α-cetoglutarato deshidrogenasa, succinil-CoA sintetasa, succinato deshidrogenasa, fumarasa y malato deshidrogenasa). A pesar de esta diferencia, en ambas distribuciones de flujos se observa la participación de las enzimas EMP2, EMP4 y EMP5 (glucosa 6-fosfato isomerasa, fructosa bi-fosfato aldolasa, triosa fosfato isomerasa) con signos negativo en el flujo (ver figuras 4.6.10 y 4.6.11). El signo negativo está indicando que la dirección del flujo es contraria a como se introdujo la reacción en el archivo de entrada. Este signo negativo significa que estas enzimas están operando en la dirección de gluconeogénesis (figura 4.6.12). También, a diferencia de lo obtenido experimentalmente, se observa un mayor flujo por la enzima GLN3 (fructosa 1,6 bi fosfatasa). Esta distribución de flujo marca un funcionamiento de la vía de ED cíclico a diferencia del funcionamiento lineal observado en las distribuciones que se ajustan a los datos experimentales.

El ciclo del Glioxilato participa en todas las soluciones identificadas, tanto las que se ajustan a los datos experimentales como las que garantizan la obtención de un mayor rendimiento de transformación de glucosa en PHB y Xr, con diferencias menores en el flujo en las enzimas involucradas en el mismo.

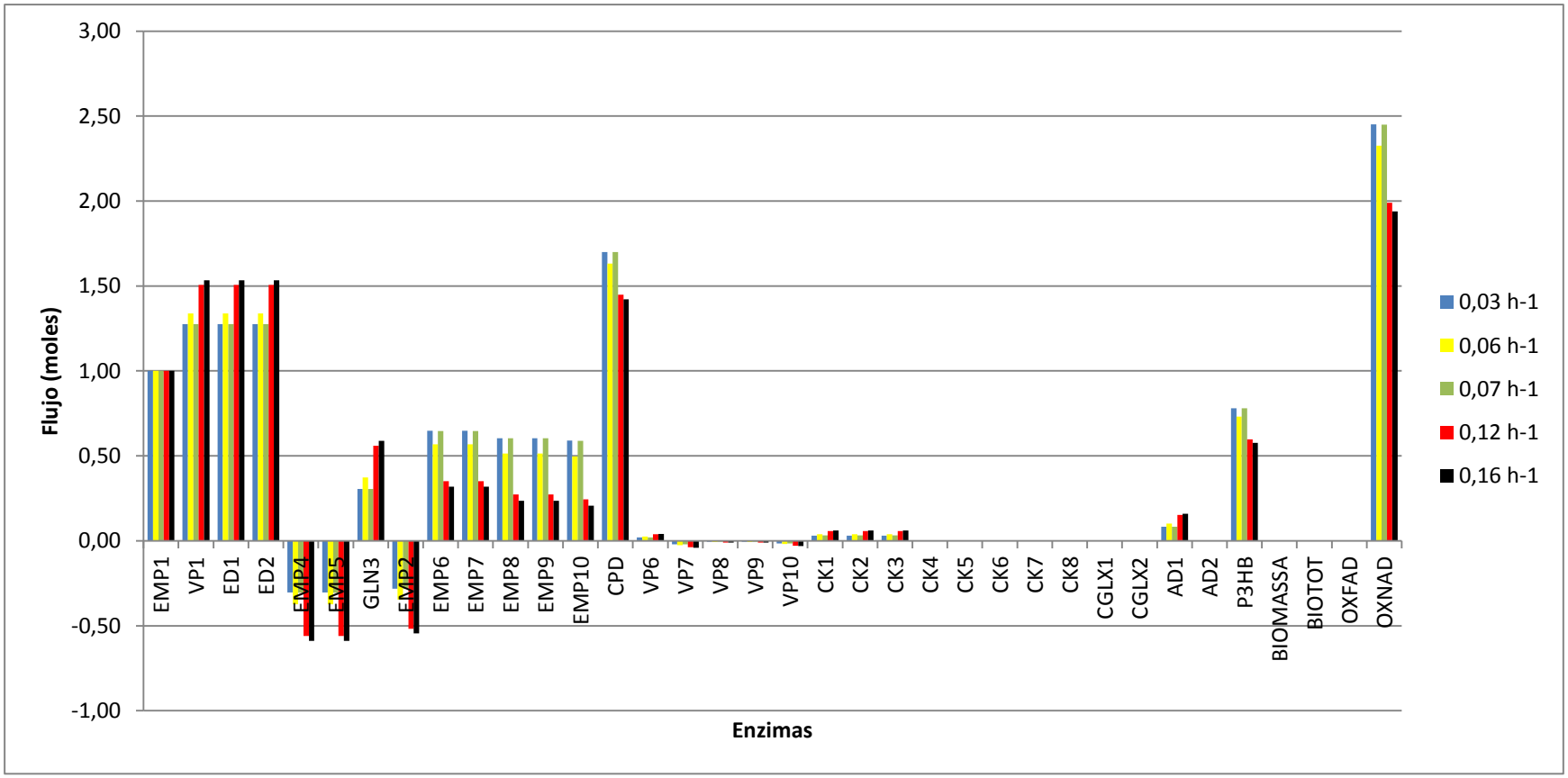


Figura 4.6.10 Representación gráfica del conjunto de enzimas y flujos correspondiente al MEF2 para cada condición ensayada. (Las barras con valor negativo, indican que el flujo es en dirección opuesta a como se ingresó la reacción en la red metabólica).

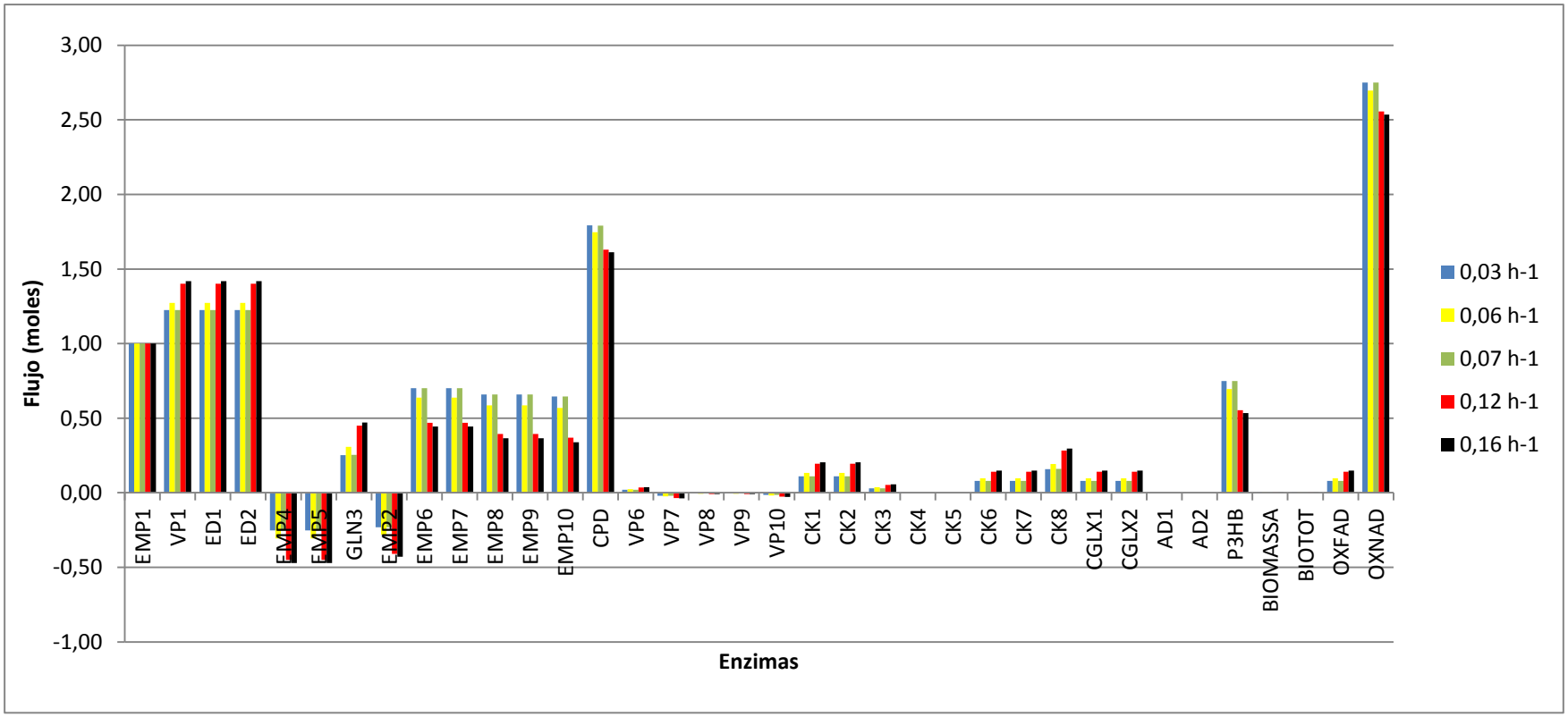


Figura 4.6.11 Representación gráfica del conjunto de enzimas y los flujo correspondientes al MEF4 para cada condición ensayada. (Las barras con valor negativo, indican que el flujo es en dirección opuesta a como se ingresó la reacción en la red metabólica).

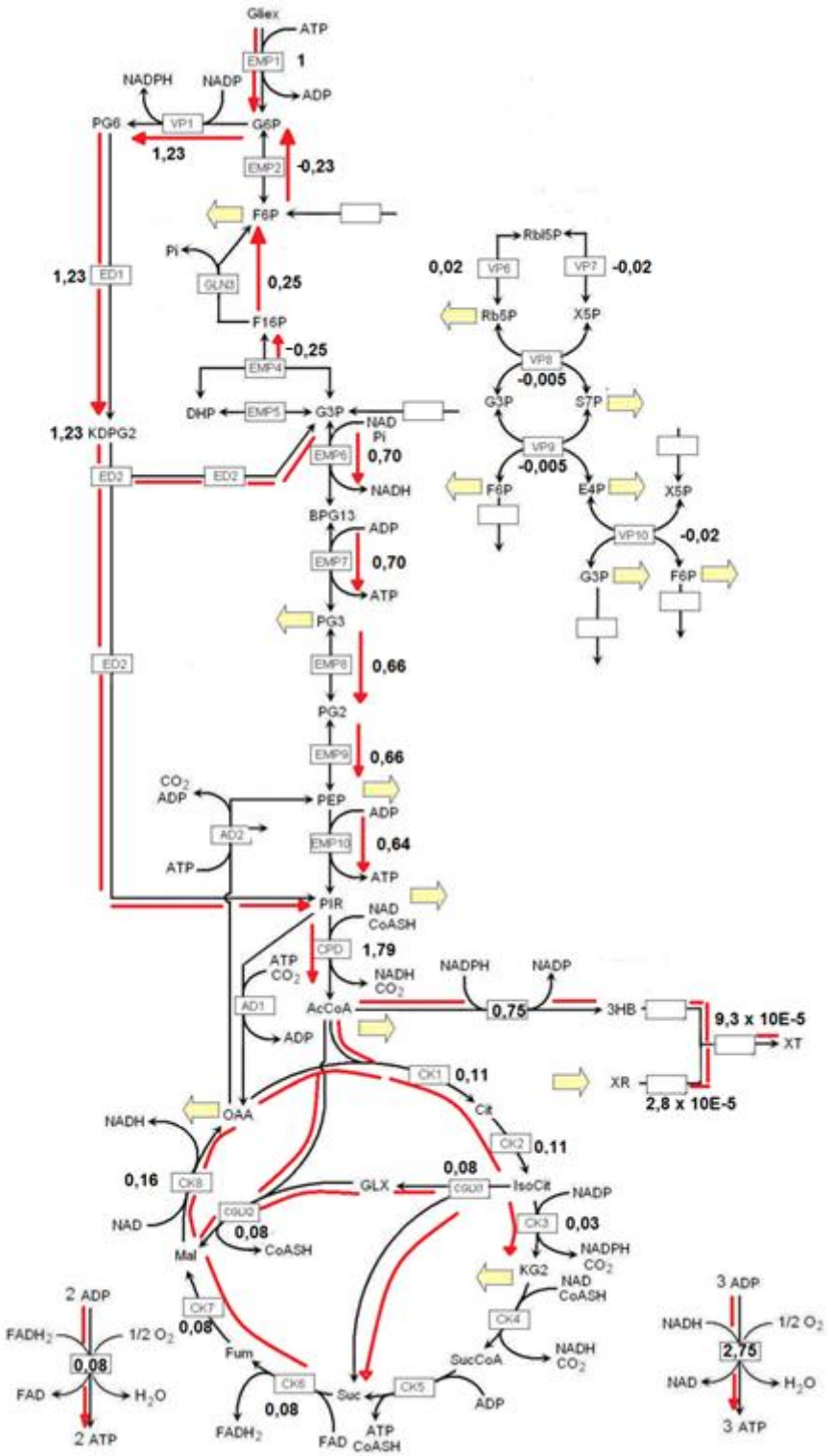


Figura 4.6.12. Distribución de flujos del metabolismo central que garantiza un mayor rendimiento de transformación de glucosa en PHB (MEF4). Las flechas amarillas indican la salida de intermediarios para la ecuación de biomasa.

En el caso de la condición D=0,07 h^{-1}, el $Y_{PHB/glucosa}$ de 0,32 g/g obtenido experimentalmente es muy próximo al máximo establecido por el MEF2 y MEF4 de 0,36 y 0,37, respectivamente. Sin embargo, las distribuciones de flujos son diferentes (ver figura 4.6.9 y 4.6.12). Como ya se ha discutido, la diferencia entre estos MEFs radica principalmente en la presencia de la vía de ED lineal y en los otros casos la misma funcionaría en forma cíclica. Lo mismo ocurre con los resultados obtenidos para las otras velocidades de dilución. Para las condiciones de D correspondientes a 0,12 y 0,16 h^{-1}(mayor velocidad de crecimiento), existe una correlación positiva entre los moles de biomasa total por moles de glucosa consumida en función del flujo de carbono por la enzima GLN3, con un r^2 de aproximadamente 0,6. El gráfico que se muestra es el de la condición la figura 4.6.13.

Esta correlación se hace menos pronunciada a velocidades de crecimiento de 0,03, 0,06 y 0,07 h^{-1} (datos no se muestran)

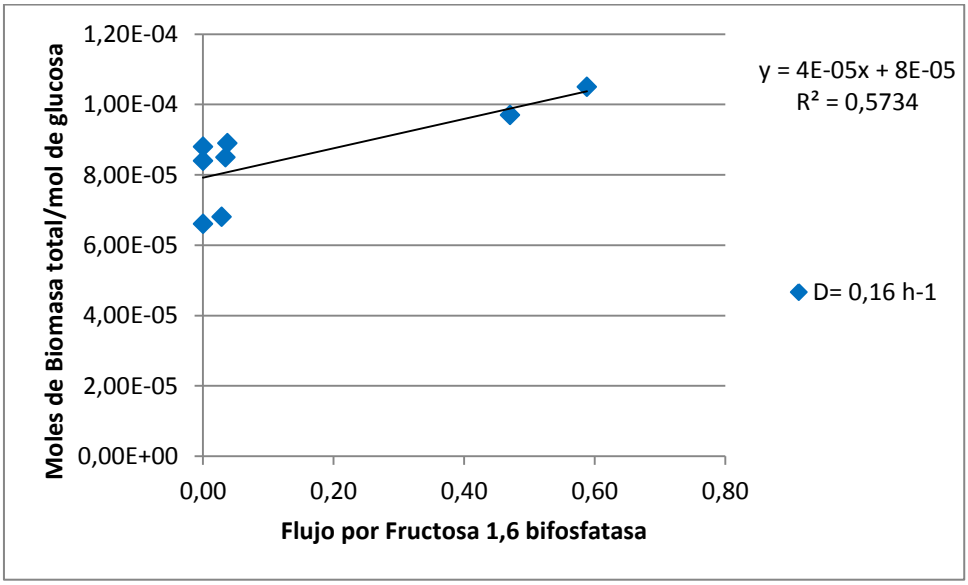


Figura 4.6.13 Relación de los moles de biomasa total obtenida por mol de glucosa consumida en función del flujo de carbono por la enzima fructosa 1,6 bi fosfatasa (FbPasa). Cada punto del gráfico corresponde a un MEF.

4.6.2.2 Análisis de modos elementales de flujo (AMEF) a partir de los resultados obtenidos de cultivos en lote

Este análisis se realizó con los datos del cultivo en lote alimentado correspondiente al estado *pseudo*-estacionario de 2 a 8 horas de fermentación, donde la velocidad de crecimiento, consumo de sustrato y velocidad de síntesis de PHB fueron constantes.

Como archivo de entrada para el Metatool se utilizó la misma red metabólica que para los cultivos continuos y se incluyó dentro de los metabolitos externos el ácido cítrico y una ecuación para su excreción. A partir de los resultados de concentración de glucosa, Xr, concentraciones de PHB y ácido cítrico durante la fase de equilibrio *pseudo*-estacionario, se calcularon los moles de cada metabolito y luego el porcentaje molar (mol%). Como los valores de porcentaje molar (mol%) son diferentes para cada tiempo dentro del período seleccionado, se calculó el porcentaje molar medio de Xr, PHB y ácido cítrico (ver Anexo 4, tabla A4.1.2.1). Se generó así una restricción en la ecuación de biomasa total (XT) para introducir en el archivo de entrada, de manera que todas las soluciones generadas en Metatool deben considerar estas proporciones. La restricción así establecida fue la siguiente: XT= xXr+yPHB+zcitrico

Como resultado, el archivo de salida de Metatool presentó 13 MEF, siendo uno de ellos un ciclo fútil que se descartó y por lo tanto se consideraron 12 MEF (Anexo 4).

Al igual que el análisis realizado para los cultivos continuos, en este caso se compararon los resultados de rendimiento de transformación de glucosa en Xr y PHB de cada uno de los MEF con los obtenidos experimentalmente para cada uno de los tiempos de la fase exponencial de crecimiento.

En la primera medida (2 h), los MEF 12 y 13 se ajustaron mejor a los datos experimentales. Para las otras medidas (3,5, 5,0, 6,5 y 8,0 horas), los MEF 7 y 9 fueron los que mejor se ajustaron a los datos experimentales.

Analizando las reacciones bioquímicas (enzimas) que comprenden los MEF que se ajustan mejor a los datos experimentales, se observa en todos un flujo prácticamente lineal por la vía de ED y en algunos casos un pequeño flujo de la vía ED cíclica. En la figura 4.6.14 se muestra una representación gráfica del conjunto de enzimas que componen cada MEF (7, 9, 12, 13). Las distribuciones de flujos obtenidos en estas condiciones son similares a las obtenidas en condiciones de quimiostato.

Asimismo, el MFE2 que garantiza un mayor rendimiento de transformación de glucosa en PHB, presenta una distribución de flujo que involucra el funcionamiento cíclico de ED. En la figura 4.6.15 se muestra en forma de grafico de barras las enzimas y el flujo de carbono involucrados en el MEF2. Al igual que para los cultivos continuos, la mayor diferencia se observa en las enzimas EMP2, EM4 y EM5 (glucosa 6-fosfato isomerasa, fructosa bi-fosfato aldolasa, triosa fosfato isomerasa), las cuales operan en dirección de gluconeogénesis y en la presencia de la enzima GLN3 (FbPasa) con un flujo de carbono mayor que el detectado en algunas de las soluciones identificadas con los datos experimentales.

En la figura 4.6.16 se muestra el esquema de la red metabólica y la distribución del flujo correspondiente al MEF12.

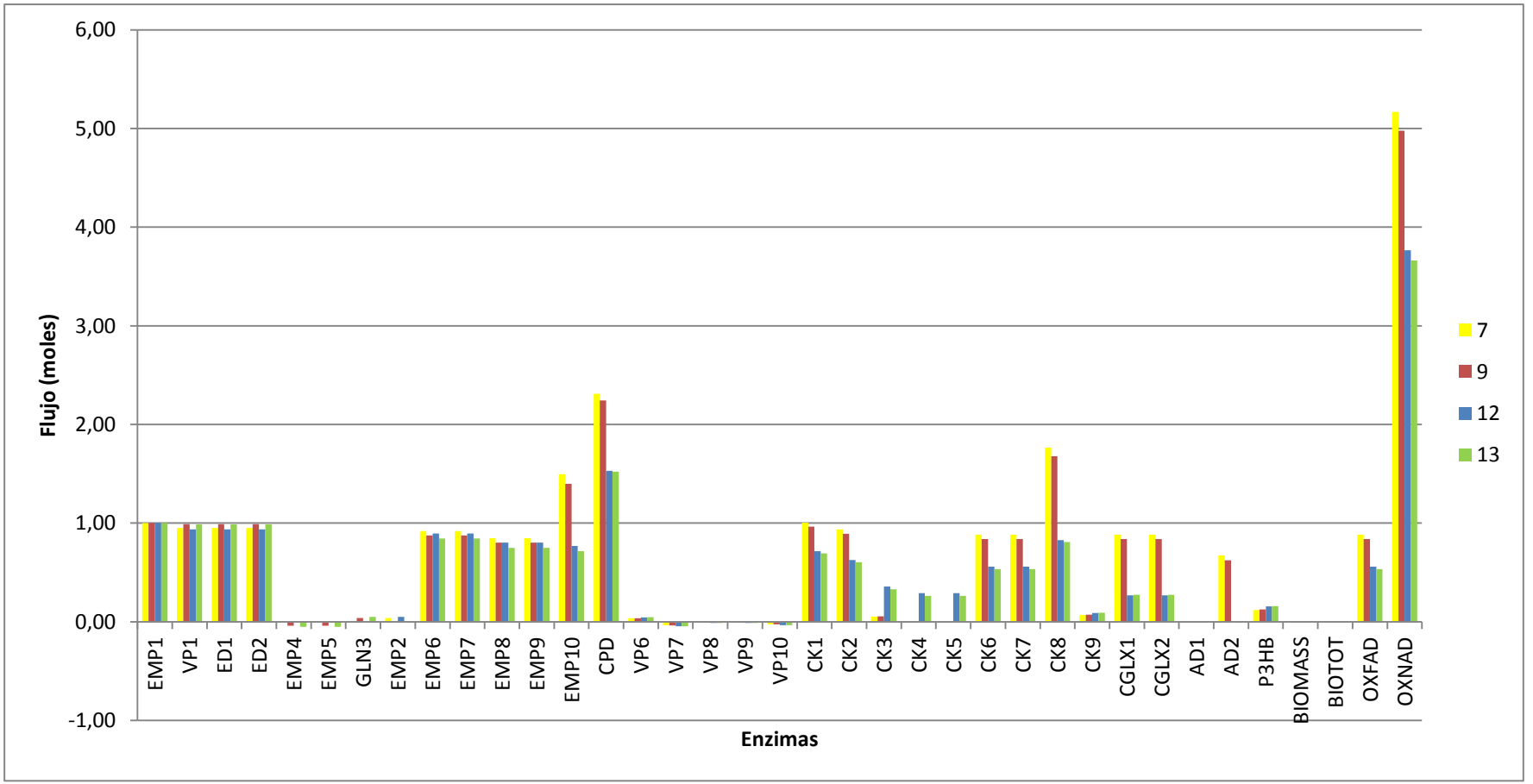


Figura 4.6.14 Representación gráfica del conjunto de enzimas y los flujos, correspondiente a los MEF (7, 9, 12, 13) que se ajustan a los datos experimentales.

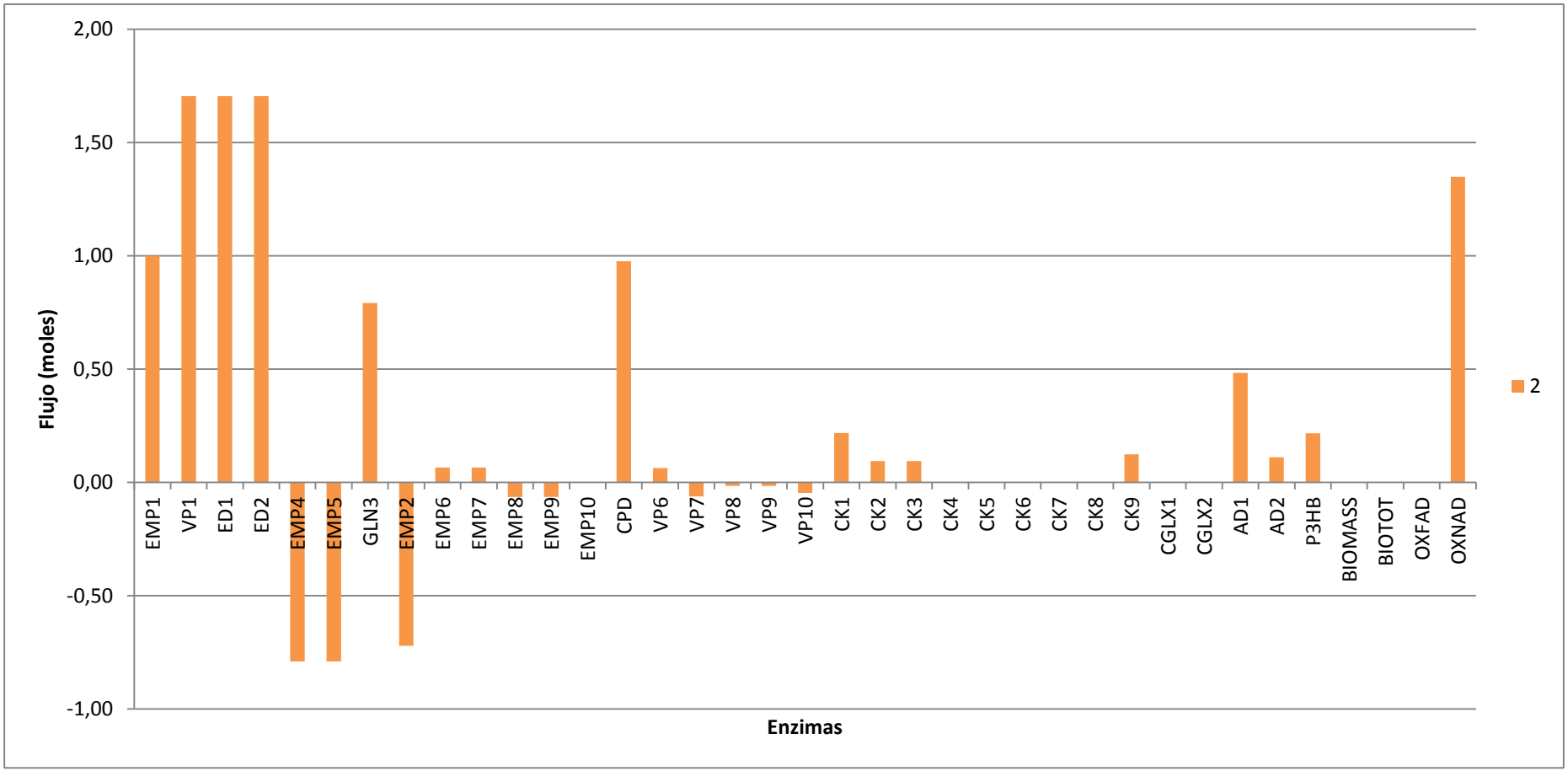


Figura 4.6.15 Representación gráfica del conjunto de enzimas y los flujos, correspondiente al MEF2 que garantiza el mejor rendimiento de transformación de glucosa en PHB.

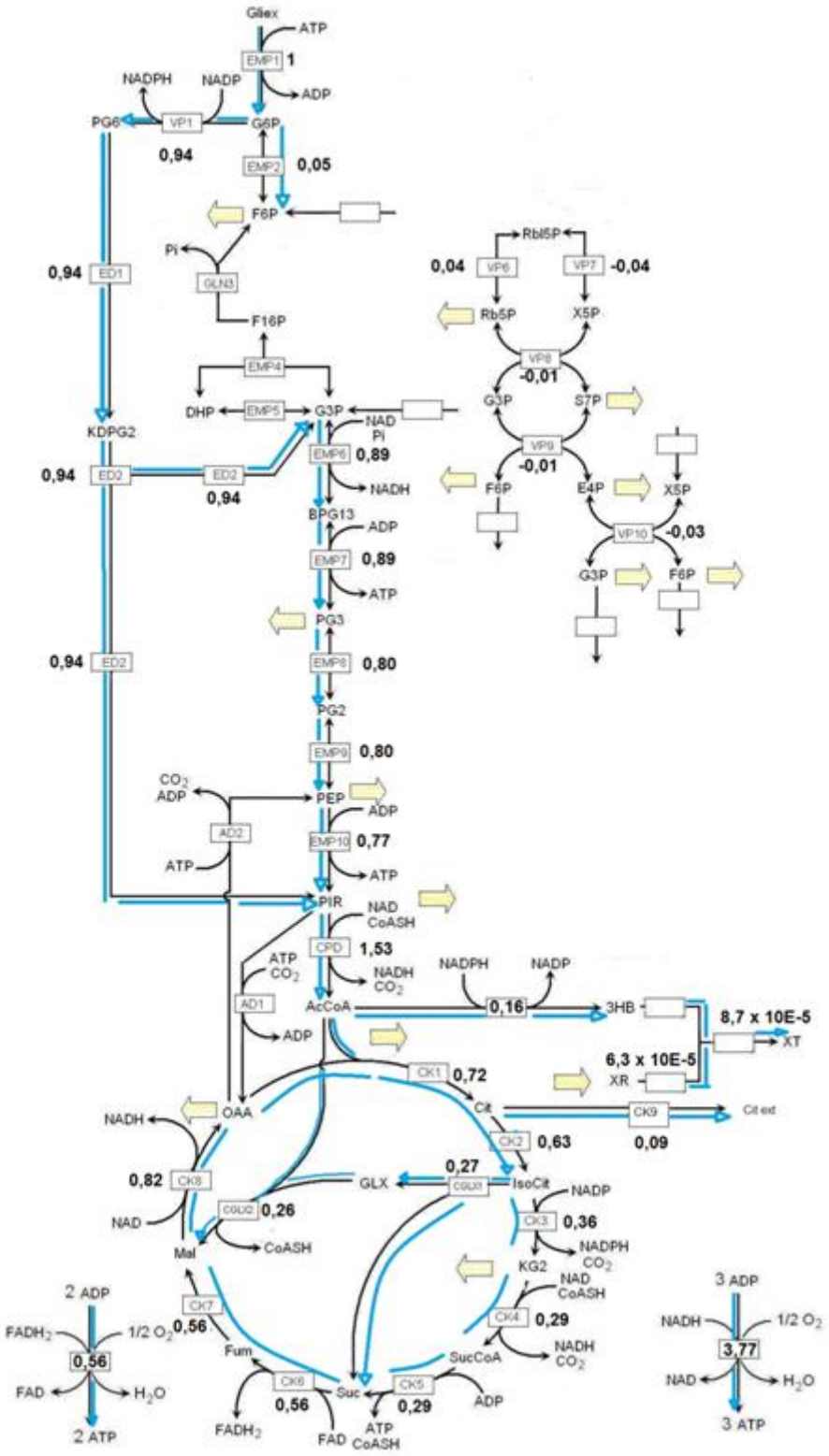


Figura 4.6.16 Distribución de flujos del metabolismo central que mejor representa los datos experimentales del cultivo en lote de *H. seropedicae* (representación esquemática del MEF 12). Las flechas amarillas indican la salida de intermediarios para la ecuación de biomasa.

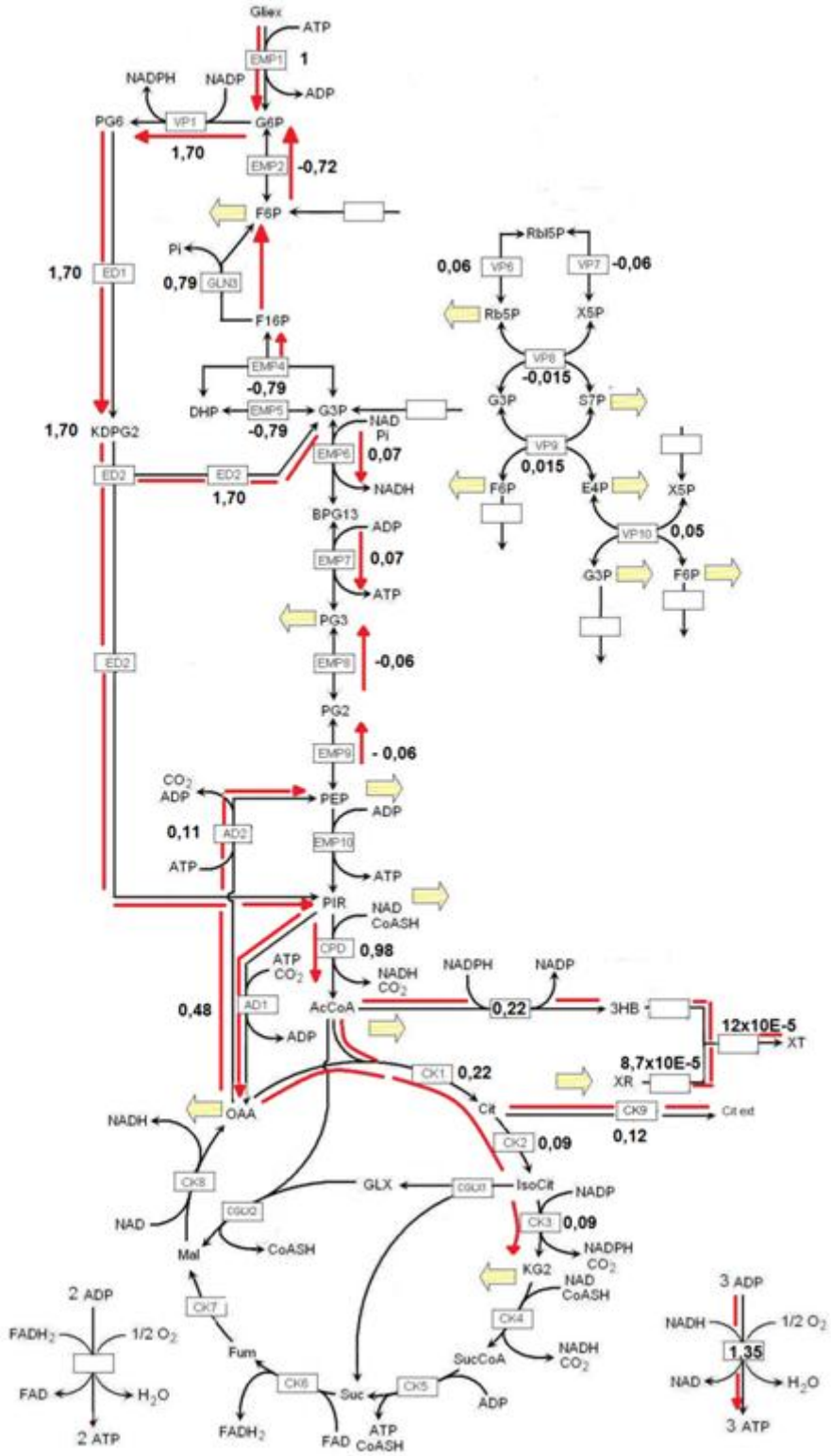


Figura 4.6.17 Distribución de flujos del metabolismo central que garantiza un mayor rendimiento de transformación de glucosa en PHB (MEF2). Las flechas amarillas indican la salida de intermediarios para la ecuación de biomasa.

Independientemente de los resultados experimentales, el MEF que garantiza la mayor eficiencia de conversión de glucosa en PHB es MEF2 (se muestra esquema en la figura 4.6.17). Este MEF maximiza el rendimiento de producción de PHB, Xr y citrato y exhibe un flujo ED cíclico. En la gráfica de la figura 4.6.18, donde se graficaron los moles obtenidos de biomasa total por mol de glucosa, para todos los MEF obtenidos, en función del flujo de carbono por la enzima FbPasa, se observa que cuanto mayor es el flujo por dicha enzima FbP, mayor es rendimientode formación de producto.

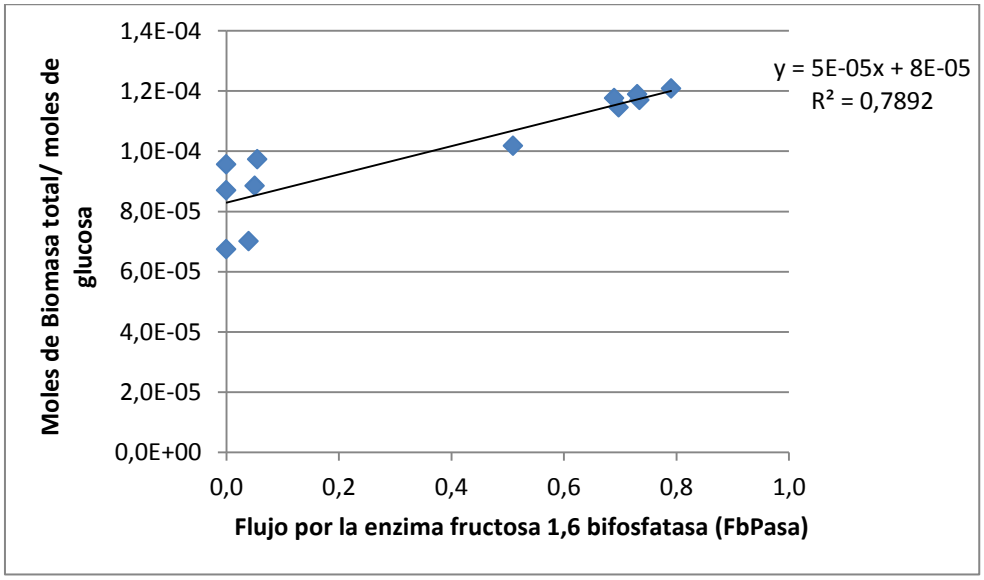


Figura 4.6.18 Correlación entre los moles de biomasa total producida por mol de glucosa y el flujo por la enzima FbPasa. Cada punto del gráfico corresponde a un MEF.

Tanto el análisis realizado en un cultivo en lote en la fase *pseudo*-estacionaria como en cultivos en estado estacionario como lo es el quimiostato, muestran que la actividad de la via de ED en forma cíclica posee una mejor eficiencia en transformar la glucosa en biomasa total, la cual incluye el PHB. Existe una correlación positiva entre los moles de Xt producida por mol de glucosa y el flujo de carbono por la reacción catalizada por la enzima FbPasa. Dicho efecto se observó tanto en el análisis de rutas metabólicas

realizadas con los datos del cultivo en estado estacionario (quimiostato) como durante el estado *pseudo*-estacionario en la fase exponencial de crecimiento del cultivo en lote. El análisis de rutas metabólicas mediante el análisis de modos elementales de flujo de *H. seropedicae* en condiciones de crecimiento y síntesis de PHB utilizando glucosa como única fuente de carbono, permitió identificar como posible blanco de manipulación genética a la enzima FbPasa.

4.6.3 Modificaciones genéticas indicadas por el análisis de flujos metabólicos

4.6.3.1 Aumento del número de copias del gen fbp que codifica para la enzima FbPasa en *H. seropedicae* Z69

Los resultados obtenidos por el análisis de MEF en cultivos continuos y en lote, indican que un aumento de la actividad de la enzima irreversible FbPasa podría incrementar el rendimiento de biomasa y producción de PHB por unidad de fuente carbonada. Es así que nos planteamos como estrategia lógica incrementar el número de copias del gen *fbp* que codifica para esta enzima, de manera de impulsar un mayor flujo de carbono por la misma. Se diseñaron cebadores específicos a partir de la secuencia del gen *fbp* de *H. seropedicae* cepa SmR1. Los mismos se diseñaron de modo de que el producto de PCR abarcara el ORF de 1002 nucleótidos (nt), 15 nt extra al fin del gen y 312 nt precediendo de manera de presumiblemente incluir la región promotora.
Mediante la reacción de PCR se logró obtener un producto del tamaño esperado (1329pb) (figura 4.6.19).

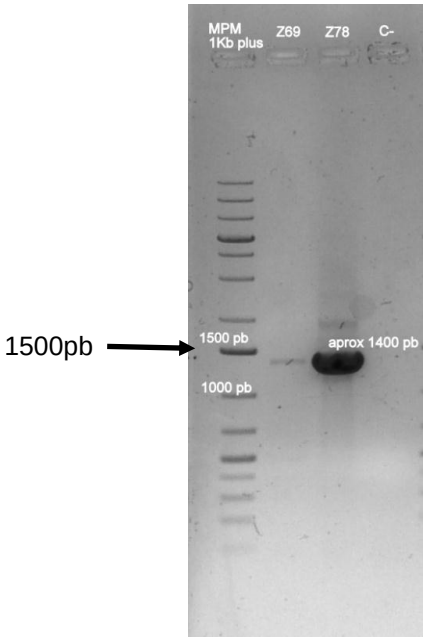


Figura 4.6.19 Perfil electroforético en gel de agarosa de los productos de PCR correspondientes al gen *fbp*. Como molde se utilizaron lisados de *H. seropedicae* Z69 y Z78, carriles 2 y 3, respectivamente.

El producto de PCR se clonó en el vector pCR 2.1 TOPO del kit TOPO TA cloning kit. Se transformaron células químicamente competentes de *E.coli* TOP10 con la mezcla de ligación y se seleccionaron los clones transformantes en medio sólido LB Km^{50}X-gal^{20}. De las colonias blancas obtenidas se seleccionaron 4 y se verificó la presencia de inserto en el plásmido mediante extracción del material plasmídico (mediante lisis alcalina), digestión con enzimas de restricción*Hind*III/*Xba*I y perfil electroforético de los productos generados (figura 4.6.20).

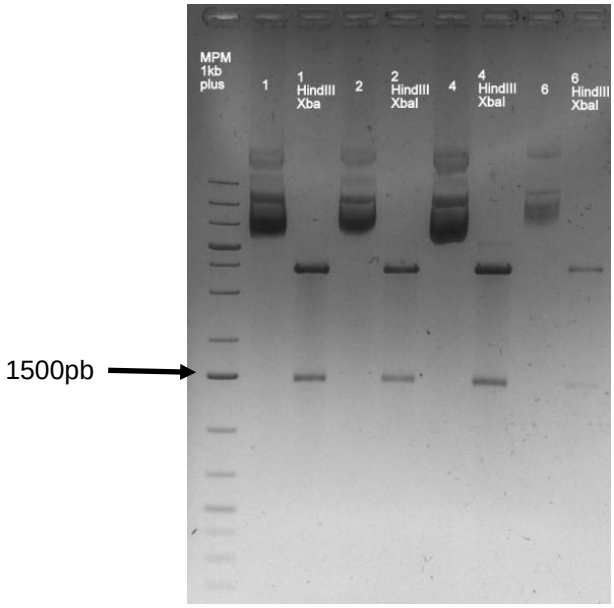


Figura 4.6.20 Electroforesis en gel de agarosa correspondiente a los productos de digestión con las enzimas de restricción *Hind*III/*Xba*I del material plasmidico obtenido de las colonias 1, 2, 4 y 6.

Todas los clones contenían el vector pCR 2.1 con un inserto del tamaño esperado (aprox. 1329 pb). Se seleccionaron los clones 1 y 2 y se confirmó la identidad del gen mediante análisis de secuencia nucleotídica.

El gen *fbp* se subclonó en los sitios*Hind*III/*Xba*I de pRK767. Luego de transformar las células de *E. coli* TOP10, se seleccionaron 6 colonias blancas crecidas en medio sólido LB Tc^{10} $Xgal^{20}$. Para confirmar la presencia del inserto se purificaron los

plásmidos, se los digirió con las mismas enzimas y se analizó el perfil electroforético de las digestiones. Los perfiles de restricción de los 6 clones analizados mostraron la presencia de un fragmento menor a 1500 pb, probablemente correspondiente al gen de interés (no se muestran los datos). El plásmido de uno de los clones fue transferido por conjugación triparental a *H. seropedicae* Z69 usando *E. coli* TOP10 (pRK2013) como *helper*. Los transconjugantes se seleccionaron en medio sólido TY $Nal^{50}Tc^{10}$. Se eligieron 6 colonias Tc^r, se extrajo el ADN plasmídico y se confirmó la presencia del plásmido pRK767::*fbp* mediante el análisis de restricción. En la figura 4.6.21 se muestra la corrida electroforética correspondiente a la digestión con las enzima de restricción *Hind*III/*Xba*I del material obtenido luego de la lisis alcalina de 2 transconjugantes de *H. seropedicae* Z69. En ambos casos se obtuvieron dos bandas, una de aproximadamente 11Kb correspondiente al vector y la otra menor a 1500 pb, correspondiente al gen *fbp* (1329pb).

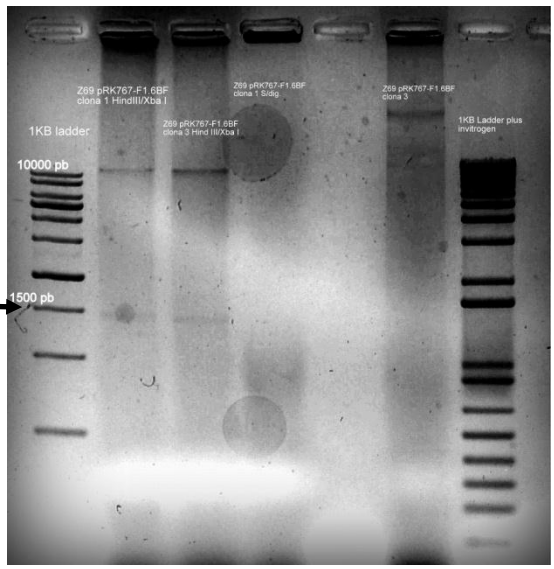


Figura 4.6.21 Perfil electroforético en gel de agarosa del ADN plasmídico extraído de los transconjugantes de *H. seropedicae* Z69.Carriles 2 y 3, producto de restricción con las enzimas *Hind*III/*Xba*I del clon 1 y clon 3, respectivamente. Carriles 4 y 6, plásmido sin digerir, correspondientes al clon 1 y 3, respectivamente.

De acuerdo al análisis de secuencia del gen clonado en el vector pCR2.1, se dedujo que el gen *fbp*, al ser clonado en el sitio *Hind*III/*Xba*I de pRK767, habría quedado orientado en una dirección opuesta al promotor fuerte p*lac*. Es por ello que estimamos que la expresión de dicho gen habría quedado bajo el control de su propio promotor, en caso de estar completo.

Para continuar trabajando se seleccionó el transconjugante 3, al cual se le llamó Z69(pRK767::*fbp*). Como control para los posteriores estudios se obtuvo un transconjugante de *H. seropedicae* Z69 sólo con el vector pRK767 sin inserto (siguiendo la misma metodología detallada anteriormente).

4.6.3.2 Análisis del crecimiento y producción de PHB de la cepa transformada Z69(pRK767::*fbp*).

4.6.3.2.1 Crecimiento en glucosa y fuentes de carbono gluconeogénicas

Se efectuaron ensayos de crecimiento de las cepas Z69(pRK767::*fbp*) y Z69(pRK767) en tubos con 5 ml de medio LGI con 40mM de amonio suplementado con 10 g/l de las siguientes fuentes de carbono: glucosa, xilosa, succinato de sodio y glicerol. Los ensayos se efectuaron por triplicado y se incluyó Tc^{10} en todos los tubos. En la figura 4.6.22 se muestran los perfiles de crecimiento de cada cepa en las distintas fuentes de carbono.

Los perfiles de crecimiento de las cepas Z69(pRK767::*fbp*) y (Z69pRK767) fueron similares al ser cultivados en medio LGI con glucosa, xilosa o succinato como únicas fuentes de carbono. La cepa Z69(pRK767::*fbp*) presentó una mayor velocidad de crecimiento que la cepa control (apreciable por la pendiente de la fase exponencial) al crecer en presencia de glicerol como fuente de carbono, alcanzando una DO_{620nm} final mayor (figura 4.6.22).

El glicerol es un sustrato que se cataboliza generando glicerol-3P y luego gliceraldehido 3-P. Este pool de triosas que se genera por acción de dos enzimas favorecería la ruta de cíclica de ED, promoviendo el crecimiento de la cepa que posee las copias extras del gen que codifica para la enzima FbPasa. Debe considerarse que el plásmido pRK767 es de amplio espectro y se replica en bajo número de copias.

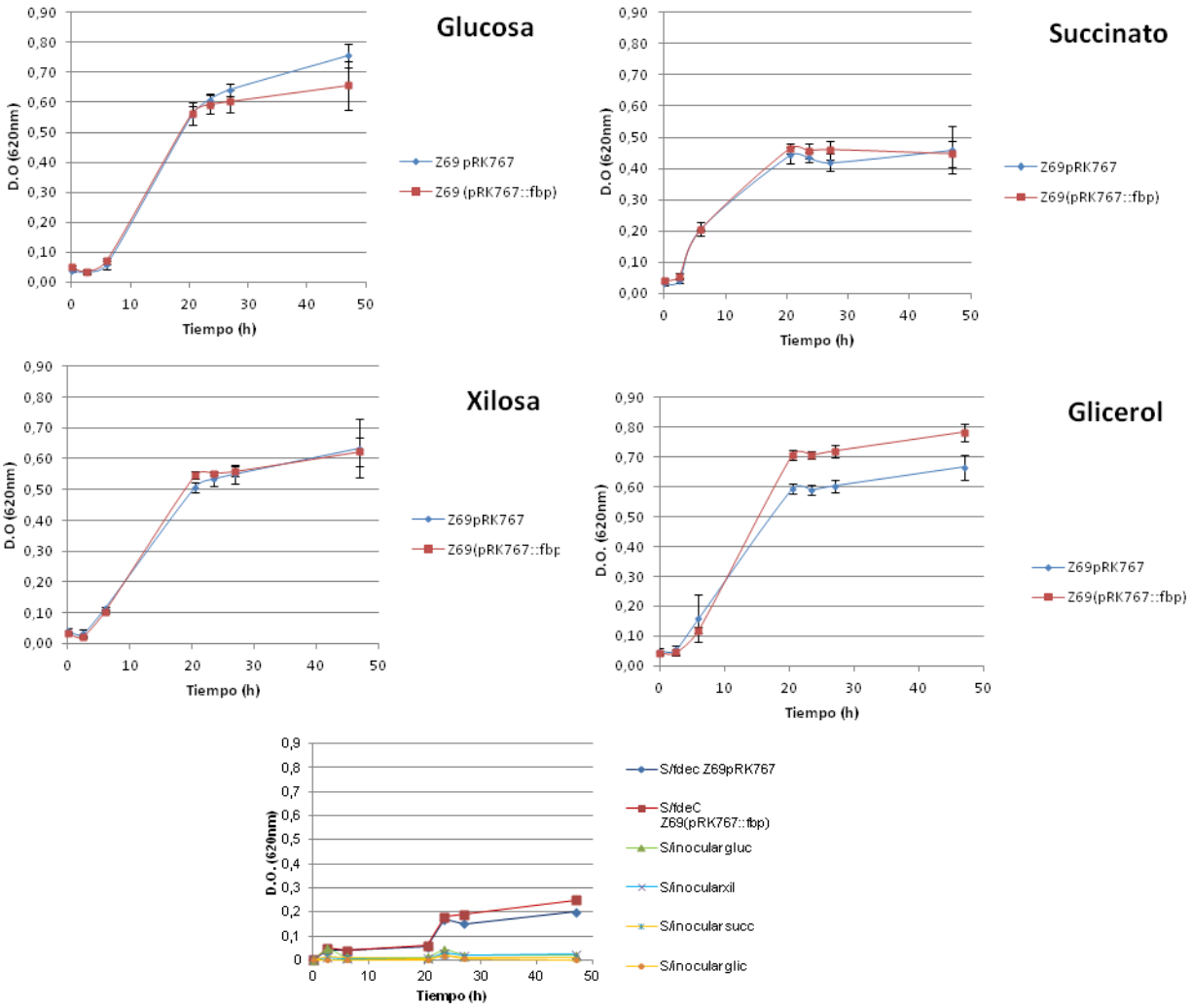


Figura 4.6.22 Perfiles de crecimiento de las cepas Z69(pRK767::*fbp*) y Z69(pRK767) en distintas fuentes de carbono. Se graficó el promedio de tres medidas y se calculó el desvío estándar correspondiente.

4.6.3.2.2 Determinación de la actividad enzimática FbPasa

Se determinó la actividad FbPasa a partir de extractos celulares de las cepas Z69(pRK767::*fbp*) y Z69(pRK767) obtenidos a partir de cultivos en fase de crecimiento exponencial (ver Materiales y Métodos).

Tabla 4.6.5 Actividad enzimática de extractos de las cepas Z69(pRK767) y Z69(pRK767::*fbp*).

	Actividad específica (μmol.mg proteínas^{-1}.min^{-1})		
	G6PDH		FbPasa
	NAD^+	$NADP^+$	
Z69(pRk767::*fbp)*	24,9	78,8	4,01±1,06
Z69(pRK767)	22,2	83,3	2,66 ± 0,97

Como control de la calidad de los extractos se midió la actividad glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) utilizando como cofactor NAD^+ y $NADP^+$.

Ambos extractos presentaron la misma actividad específica deshidrogenasa de G6PDH, confirmando la calidad de los mismos.

Como se observa en la tabla 4.6.5, la actividad específica FbPasa fue ligeramente superior en extractos de la cepa Z69(pRK767::*fbp*) que en la cepa control. Este resultado podría deberse a que el incremento en el número de copias del gen fue relativamente bajo (en virtud de lo mencionado anteriormente por el tipo de plásmido que se utilizó y el control de expresión bajo su propio promotor).

4.6.3.2.3. Cultivos en lote las cepas Z69(pRK767::*fbp*) y Z69(pRK767)

La cepa Z69(pRK767::*fbp*) y la cepa control Z69(pRK767) fueron cultivadas en lote en condiciones de bio-reactor para comparar la producción de biomasa y PHB. Estos ensayos fueron realizados en medio LGI con 30g/l de glucosa y 40mM de NH_4Cl, con una relación C/N=25. El porcentaje de OD se ajustó por encima del 30%. En la figura 4.6.23 se muestra los perfiles de crecimiento, concentración de PHB y concentraciones de glucosa y amonio en el sobrenadante, a lo largo del tiempo.

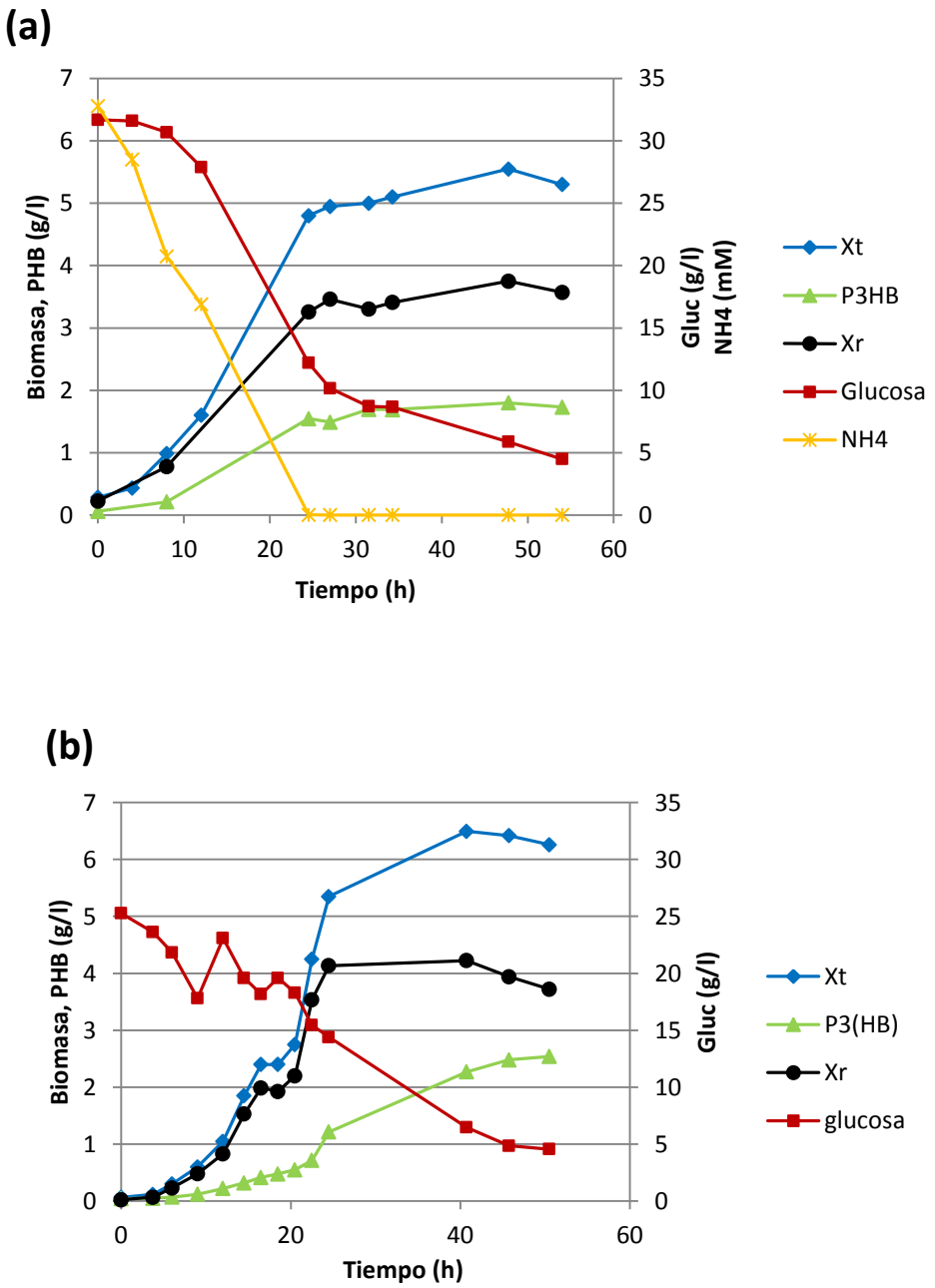


Figura 4.6.23 Perfil de crecimiento, concentración de PHB, glucosa y amonio en cultivos en bior-eactor en lote. (a) Z69(pRK767::*fbp*) y (b) Z69(pRK767).

Para ambas cepas se observa una fase *lag* que se extendió entre 4 y 6 horas, seguida de una fase exponencial que se prolongó hasta las 24 horas del cultivo. Las μ_{max} de la cepa control y recombinante fueron 0,147 y 0,106 h^{-1}, respectivamente. La cepa

Z69(pRK767::*fbp*) alcanzó a las 24 horas una Xt de 4,8 g/l con un contenido del 32 % de PHB. Como se muestra en el gráfico (a) de la figura 4.6.23., al igual que los otros ensayos de la cepa Z69, el cultivo ingresó en fase estacionaria a las 24 horas, coincidiendo con el momento en que la concentración de amonio se tornó indetectable. En ese momento se detuvo el crecimiento y síntesis de PHB. A las 24 horas de cultivo, la cepa control exhibió una Xt=5,3 g/l y un contenido de PHB de 23%. Sin embargo, la cepa continuó creciendo y acumulando polímero, alcanzando a las 40 horas una Xt=6,5 g/l y un contenido de PHB=40%. En este cultivo no se determinó la concentración de amonio en el sobrenadante, por lo cual no es posible comparar ambos ensayos. Estos resultados fueron obtenidos a partir de un único ensayo. Sería necesario repetir el cultivo y determinar si se mantiene el comportamiento y resultados finales de producción.

En la tabla 4.6.6 se muestra un resumen de los resultados obtenidos para cada una de estas cepas. El rendimiento, velocidad de síntesis de PHB y consumo de glucosa se calcularon para la fase exponencial de crecimiento.

Tabla 4.6.6 Resumen de los resultados de cultivos en lote en condiciones de bio-reactor de las cepas Z69(pRK767::*fbp*) y Z69(pRK767) cultivadas en presencia de glucosa.

	μmax (h^{-1})	Xt (g/l)	Xr (g/l)	PHB %	$Y_{xr/glu}$ (g/g)	$Y_{PHB/glu}$ (g/g)	*qPHB**	*qS***
Z69(pRK767::*fbp*)	0,106	4,8	3,3	32	0,130	0,07	0,63	6,8
Z69(pRK767)	0,147	5,3	4,1	23	0,122	0,04	0,40	4,6

Los resultados presentados en la tabla corresponden a la fase exponencial de crecimiento.
Los resultados de biomasa, y contenido de PHB corresponden a valores a las 24 horas del crecimiento
**qPHB* en nmolPHB.gXr^{-1}.h^{-1}
***qS* en nmolgluc.gXr^{-1}.h^{-1}

Los parámetros (Y_{PHB}, *qPHB* y *qS*) determinados en estos cultivos fueron similares a los obtenidos previamente con la cepa salvaje Z69 cultivada en las mismas condiciones (ver tabla 4.6.4). En la fase exponencial de crecimiento, con una velocidad

máxima, las células priorizaron la producción de biomasa residual a la acumulación de polímero. En este período, los resultados de $Y_{Xr/glu}$, $Y_{PHB/glu}$, la velocidad de síntesis de PHB y consumo de glucosa de la cepa recombinante (Z69pRK767-*fbp*) fueron levemente superiores a los de la cepa control. Esta cepa recombinante creció con una μ_{max} inferior a la cepa control y al final de la fase exponencial alcanzó una biomasa Xt de 4,8g/l y con un contenido de 32% de PHB. La cepa Z69(pRK767) creció a una mayor velocidad, alcanzando una biomasa de 5,3 g/l pero con un menor contenido de PHB (23%).

A pesar de observar una diferencia en el comportamiento de la cepa Z69(pRK767::*fbp*) comparada con la salvaje, la modificación genética no mejoró el $Y_{PHB/glu}$. Una vez más, debe indicarse que estos datos fueron obtenidos a partir de un único ensayo y esta tendencia debería verificarse con réplicas de los mismos. Es importante aclarar que en el cultivo de la cepa salvaje (ensayo LGI-50 y MMG-50) se apreciaron durante el crecimiento exponencial dos tramos con diferentes velocidades, uno correspondiente a la μ_{max}, en el cual los valores de síntesis de PHB son similares a los obtenidos en este ensayo y otro tramo con una velocidad mucho menor, en la cual la velocidad de síntesis de PHB fue aproximadamente 10 veces mayor. En este ensayo, las muestras colectadas a partir del cultivo de la cepa Z69(pRK767::*fbp*) permitieron identificar un solo tramo, correspondiente al de la fase de crecimiento exponencial. Por todo lo discutido anteriormente, consideramos que los datos obtenidos en estos ensayos son preliminares. Sería necesario realizar nuevamente las fermentaciones teniendo en cuenta un mayor número de toma de muestras, analizar en ambos cultivos tanto el consumo de glucosa como el de amonio, mantener el OD en valores del 20% y analizar en el sobrenadante la presencia de ácidos orgánicos para su cuantificación.

4.6.3.3. Análisis de flujos metabólicos de las cepas Z69(pRK767::fbp) y Z69(pRK767) mediante marcación isotópica con 13C-glucosa

El análisis de flujos metabólicos mediante el seguimiento de la marcación isotópica, también denominado experimento traza, permite identificar las rutas activas y la cuantificación del flujo de carbono a través de las mismas. Esta metodología permite comparar el funcionamiento del metabolismo central de un mismo organismo en diferentes condiciones ambientales, fisiológicas o en diferentes *background* genéticos,

como por ejemplo el generado por la eliminación o introducción de nuevas reacciones o aumento de las existentes. En el caso de modificaciones genéticas, el AFM por marcación isotópica permite estudiar cómo se reorganiza o no el metabolismo. Esta estrategia es diferente al análisis de rutas metabólicas, en el cual se estudia la topología o estructura de la red. El análisis de MEF genera todas las posibles soluciones de funcionamiento de dicha red que satisfacen el estado estacionario. Frente a todas las posibles soluciones originadas del análisis de MEF es posible identificar soluciones óptimas y subóptimas en cuanto al rendimiento de obtención de cierto metabolito o biomasa.

Como se detalla en Materiales y Métodos, se realizaron cultivos en matraces pequeños utilizando el sustrato carbonado marcado con ^{13}C y en forma paralela se realizó un cultivo en un matraz con mayor volumen de medio, utilizando glucosa fría como fuente de carbono. Este último matraz, al que denominamos matraz control, fue utilizado como matraz de muestreo para determinar el perfil de biomasa, concentración de PHB y de glucosa en el sobrenadante, a lo largo del tiempo. Todos los matraces fueron inoculados partiendo de una DO_{620nm} inicial de entre 0,12-0,15 y fueron incubados en las mismas condiciones de temperatura y agitación (ver Materiales y Métodos).

Las muestras del matraz control se tomaron a tiempo 0, 10 horas y a partir de ese momento cada una hora y hora y media. El crecimiento fue monitoreado por determinaciones de DO_{620nm} a lo largo de tiempo.

Tabla 4.6.7 Resultados de DO y glucosa obtenidos del matraz control (glucosa fría) y los matraces con ^{13}C-glucosa para ambas cepas a tiempo inicial, 12 y 15 horas de incubación.

T (h)	Z69(pRK767)		Z69(pRK767) 1-[^{13}C]-Glu		Z69(pRK767) U-[^{13}C]-Glu		Z69(pRK767::*fbp*)		Z69(pRK767::*fbp*) 1-[^{13}C]-Glu		Z69(pRK767::*fbp*) U-[^{13}C]-Glu	
	DO	Glu	DO	Glu	DO	Glu	DO	Glu	DO	Glu	DO	Glu
0	0,12	3,16	0,11	4,03	0,11	3,46	0,15	3,33	0,13	3,98	0,12	3,18
12	1,25	1,95	1,29	2,62	1,10	2,07	1,66	1,75	1,44	2,28	1,67	1,64
15	2,11	1,2	1,72	1,01	1,71	0,85	2,57	0,87	2,40	-	3,01	0,82

DO, densidad óptica a 620nm
Glu, concentración de glucosa (g/l)

En cada uno de los matraces con 1-[^{13}C]-glucosa y U-[^{13}C]-glucosa como fuente de carbono se determinó la DO_{620nm} y la concentración de glucosa al inicio, a las 12 y 15 horas de iniciado el cultivo, tratando que la perturbación del volumen de los mismos fuese mínima. En la Tabla 4.6.7 se muestran dichos resultados incluyendo los obtenidos de los matraces empleados como control (con glucosa fría) a esos mismos tiempos. A las 15 horas de crecimiento se cosecharon las células para el análisis de los aminoácidos proteinogénicos por GC-MS.

El perfil de crecimiento del matraz control de ambas cepas se muestra en la figura 4.6.24. Se determinaron pocas muestras como para poder analizar la fase de crecimiento exponencial. De acuerdo al perfil de crecimiento, se observa que a las 15 horas, momento en el cual se detuvieron los cultivos con la glucosa marcada y se colectaron las células para la derivatizaciónde los aminoácidos, el cultivo estaba ingresandoen la fase estacionaria de crecimiento. De todas formas, analizando dicho perfil, se puede observar entre las 12 y 15 horas una fase de crecimiento constante que no corresponde a la μ_{max}. La toma de muestras a lo largo del cultivo fue limitada, dado que el volumen de medio del matraz control empleado fue de 250 ml. El diseño del experimento se basó en cultivos previos de la cepa Z69(pRK767) efectuados en las mismas condiciones, donde la fase *lag* se extendió hasta aproximadamente las 10 horas de incubación. Por lo tanto, se decidió comenzar a colectar muestras a partir de este momento, con el objetivo de abarcar la fase exponencial de crecimiento. Hubiera sido necesario utilizar un mayor volumen de medio y así realizar la toma de muestras desde el inicio del ensayo. Las pocas muestras obtenidas hacen difícil e incierto el cálculo de los parámetros de crecimiento para evaluar la *qPHB* (mmol.glu.gXr^{-1}.h^{-1}) y *qS* (mmol.PHB.gXr^{-1}.h^{-1}). Es asi que con los datos entre las 12 y 15 horas se calculó μ (h^{-1}), no fue posible calcular *qS* y *qPHB*. Los resultados de consumo de glucosa y producción de biomasa y PHB no fueron constantes en dicho período de tiempo

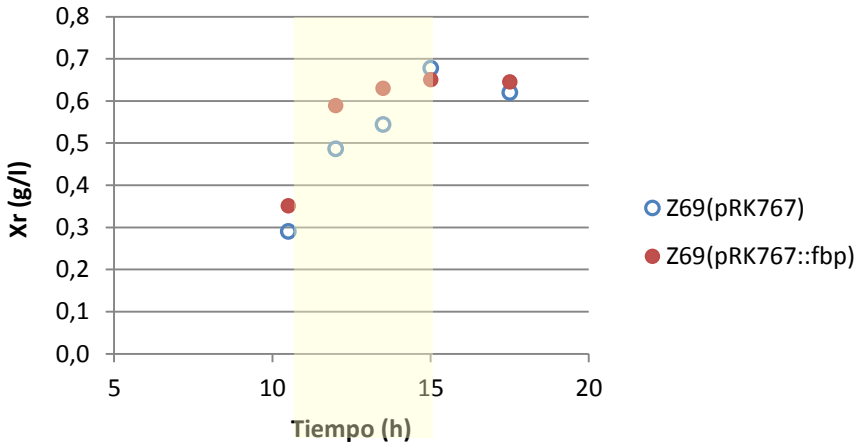


Figura 4.6.24. Perfil de crecimiento de las cepas Z69(pRK767) y Z69(pRK767::*fbp*) incluyendo Xr en función del tiempo para el matraz control. En sombreado se marca la zona de crecimiento exponencial.

Las velocidades de crecimiento en dicho tramo fueron 0,11 y 0,03 h^{-1} para la cepa Z69(pRK767) y Z69(pRK767::*fbp*), respectivamente. En el caso de Z69(pRK767::*fbp*), esta velocidad de crecimiento tan baja correspondería casi a una fase estacionaria. En la tabla 4.6.8 se presentan los datos obtenidos de producción de biomasa y contenido de PHB de los matraces control para ambas cepas. Los valores corresponden a los datos obtenidos a las 15 horas de incubación.

Tabla 4.6.8 Resumen de los resultados del cultivo de las cepas Z69(pRK767::*fbp*) y Z69(pRK767) del matraz control.

	$\mu(h^{-1})$*	Xt (g/l)	Xr (g/l)	PHB %
Z69(pRK767::*fbp)*	0,03	0,96	0,65	32
Z69(pRK767)	0,11	0,96	0,68	29

*Cálculos realizados con los datos del tramo 12-15 horas

4.6.3.4 Análisis de relación de flujos metabólicos (*Metabolic flux ratio analysis*) basado en ^{13}C

Para determinar el efecto de las copias extras del gen que codifica para la FbPasa en el metabolismo central de *H. seropedicae,* se analizaron las relaciones de flujo de los experimentos de marcación con 1-[^{13}C]-glucosa y U-[^{13}C]-glucosa. El análisis de relaciones de flujo permite estimar la actividad *in vivo* de una ruta metabólica o reacción.

Los cromatogramas de los aminoácidos proteinogénicos obtenidos por GC-MS de los cultivos de ambas cepas en presencia de 100% de 1-[^{13}C]-glucosa y 20% de U-[^{13}C]–glucosa fueron analizados con el software FiatFlux. El módulo *Ratio* de este programa determina la contribución de rutas que convergen en un mismo intermediario metabólico, calculando así las relaciones de flujo (ratios). Este módulo no necesita de los datos de datos de balance de metabolitos ni de los datos experimentales de velocidad de crecimiento, síntesis de productos y consumo de fuente carbonada.

Los datos obtenidos no pudieron analizarse dada la baja calidad de los perfiles cromatográficos (espectros de masas) obtenidos. Esto fue más evidente para los cultivos con U-[^{13}C]–glucosa en ambas cepas. La mayoría de los fragmentos de los aminoácidos necesarios para los cálculos del Ratio fueron descartados, ya que la proporción de los mismos no respetaba la relación 20:80 correspondiente a la proporción de U-[^{13}C]–glucosa:glucosa fría (^{12}C-glucosa) adicionada al medio de cultivo. Esto determinó que a la mayoría de las relaciones de flujo se les asignó el estatus de no determinado. Asimismo, el valor de la participación de la ruta de ED dio mayor al 100%.

Estos resultados no pueden ser considerados. Sería necesario volver a realizar el análisis de la biomasa hidrolizada, de manera de obtener cromatogramas de mejor calidad y así poder determinar las relaciones de flujo. Por otro lado, este primer ensayo o primera aproximación al análisis de flujos metabólicos mediante marcación con ^{13}C permitió identificar errores experimentales, los cuales serán considerados en los nuevos ensayos a realizar. Entre ellos se destaca la necesidad de tomar un mayor número de muestras para verificar que el cultivo realmente se encuentre en la mitad de la fase exponencial de crecimiento. Junto con esto sería necesaria la determinación de

algunas actividades enzimáticas clave en el momento en donde se efectúa el estudio de flujo de carbono.

4.6.3.4.1 Análisis de flujos metabólicos, basado en ^{13}*C-constrained flux balancing* (Módulo Netto)

No fue posible realizar el análisis de flujos metabólicos con el módulo *Netto*, ya que no se pudieron determinar las velocidades de consumo de glucosa y síntesis de PHB (flujos de entrada y salida), necesarias para el análisis de los flujos de este módulo. Además, como se mencionó anteriormente, los resultados del análisis por GC-MS no permiten realizar este análisis.

4.7 Discusión general

El estudio del crecimiento y síntesis de PHB por *H. seropedicae* Z69 en cultivos continuos, cultivos en lote y cultivos en lote alimentado, permitieron determinar que en este microorganismo la síntesis de PHB está parcialmente asociada al crecimiento. Este comportamiento no había sido detectado anteriormente en cultivos en lote en matraces. La síntesis de polímero parcialmente asociada al crecimiento genera una competencia entre los precursores para la síntesis de los componentes de la célula y la síntesis de PHB. En los cultivos continuos se observó que a bajas velocidad de dilución (D) aumenta la concentración de PHB y el rendimiento de transformación de glucosa en polímero. A velocidades mayores de 0,07 h^{-1}, no se detectó aumento de síntesis de PHB, priorizándose el crecimiento celular por sobre la acumulación de PHB. Esto estaría indicando que a bajas velocidades de crecimiento se ve favorecida la acumulación de polímero. Los resultados obtenidos en los cultivos en lote y lote alimentado también estarían demostrando que la síntesis de PHB en *H. seropedicae* no ocurre cuando el crecimiento celular se detiene por la falta de algún nutriente esencial en el medio. Esto provoca que la bacteria no pueda crecer y por lo tanto deja de sintetizar PHB. Este efecto se vio más claro en la fermentación con la alimentación de un pulso de glucosa, en la cual el crecimiento se detuvo probablemente por la ausencia de amonio en el medio y no hubo acumulación de polímero aún en presencia

de exceso de glucosa. Como ya ha sido descrito para las bacterias que acumulan PHB asociadas al crecimiento, para una óptima acumulación se requiere que el nutriente limitante se encuentre presente a una baja concentración, de modo que la velocidad de crecimiento sea baja, priorizando la velocidad de síntesis de PHB (Madison & Huisman 1999). Sería necesario realizar cultivos continuos (como los realizados en este trabajo) a diferentes velocidades de dilución (D) y diferentes relaciones C/N, de manera de explorar regiones de doble limitación nutricional, donde *H. seropedicae* acumule el máximo de PHB posible (Zinn et al. 2004; Durner et al. 2000). También podría ensayarse un cultivo en lote alimentado diseñado de forma tal que luego de un crecimiento exponencial, el cultivo sea alimentado de forma constante (lineal) con la fuente de carbono y el nutriente limitante para generar simultáneamente una fase lineal de crecimiento y acumulación de polímero. La relación C/N de la solución de alimentación determinaría el contenido de PHB acumulado.

Los ensayos de cultivo continuo y en lote o lote alimentado, además de permitir profundizar en el conocimiento de *H. seropedicae* como productor de PHAs a escala de bio-reactor, permitió generar datos en condiciones de crecimiento estacionario o *pseudo*-estacionario, para realizar un análisis de rutas metabólicas. Este estudio fue realizado mediante el análisis de modos elementales de flujos (MEF). Como se mencionó en la introducción, este análisis permite describir el metabolismo celular (red metabólica) teniendo en cuenta la estequiometría de las reacciones. El análisis de MEF a partir de los datos del cultivo continuo permitieron confirmar que la red metabólica considerada para *H. seropedicae* de acuerdo a datos de actividad enzimática y datos del genoma, sería la correcta. El/los MEF que garantizan un mayor rendimiento de transformación de glucosa en PHB, para todos los cultivos (continuos y el lote), presentaron una distribución de flujos similar. En todos los casos, dichas distribuciones de flujo comprenden un funcionamiento cíclico de la vía de ED, donde la participación de la enzima fructosa 1,6 bifosfatasa es clave, siendo la única enzima irreversible perteneciente a la gluconeogénesis. El funcionamiento cíclico de la ruta de ED ha sido descrito en una variedad de microorganismos y tiene que ver con el estilo de vida de los mismos (Conway 1992). Desde el punto de vista de la síntesis de PHB, un flujo cíclico implica un mayor flujo de carbono por la gluconeogénesis. Esto genera más moles de glucosa 6-fosfato, lo que lleva a aumentar los moles de NADPH

generados, cofactor clave para la síntesis de PHB, ya que participa en la reacción catalizada por la enzima acetoacetil-CoA reductasa.

Estudios de proteomica y análisis de flujos metabólicos en una cepa recombinante de *E. coli* capaz de acumular PHB al crecer en presencia de glucosa, demostraron la importancia de la ruta de ED durante la etapa de acumulación de PHB. Los estudios de proteómica determinaron en dichas condiciones la sobreexpresión de las enzimas Tip (triosa fosfato isomerasa), FbA (fructosa bifosfato aldolasa) y KDPG (2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato aldolasa) (Han et al. 2001), enzima clave de ED. El AFM *in silico* con una cepa recombinante de *E. coli* capaz de sintetizar PHB, demostró que en condiciones de acumulación de PHB disminuye el flujo de acetil-CoA hacia el ciclo CAT y aumenta el flujo por la ruta de ED (Hong et al. 2003). La predicción mediante AFM *in silico* fue corroborada *in vivo* con un mutante de la enzima 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato aldolasa, enzima clave de la vía ED. En ese mutante se detectó una disminución de la acumulación de PHB. *E. coli* utiliza la vía ED únicamente para el catabolismo del gluconato. En presencia de glucosa, *E. coli* utiliza la vía EMP como ruta central, generando más ATP y poder reductor en forma de NADH. Sin embargo la predicción *in silico* determinó que en condiciones de acumulación de PHB, *E. coli* recombinante prefiere la ruta de ED, dado que obtiene mayor producción de NADPH. En este trabajo, comprobaron que la ruta de ED estaba activa y jugaba un papel importante durante la producción de PHB a partir de glucosa (Hong et al. 2003). Por otro lado, Lee y col. (Lee et al. 2013) determinaron un incremento en la concentración de acetil-CoA intracelular en los clones donde se sobreexpresó las enzimas Tpi y FbA. Sin embargo, en estas condiciones y a diferencia de lo descrito por Hong y col. (2003) la sobreexpresión de Tpi y FbA determinó un menor flujo por ED (Lee et al. 2013). Estos trabajos mencionados anteriormente demuestran como se reorganiza el metabolismo de una cepa recombinante de *E .coli* productora de PHB cuando se le transfiere el operon *phb*CBA. En condiciones de acumulación de PHB, esta nueva ruta biosintética se expresa y compite con las rutas metabólicas propias de la bacteria por el acetil-CoA y NADPH. Los estudios de proteómica y de AFM demostraron la reorganización del metabolismo de *E. coli* para sobrellevar esta nueva situación y esto involucra principalmente al pool de triosas fosfato y a la ruta de ED.

Por otro lado, *P. putida* es una bacteria del suelo resistente el estrés oxidativo, capaz de degradar contaminantes orgánicos (tolueno) y produce PHA en pequeñas

cantidades a partir de glucosa. El metabolismo de esta bacteria es similar al de *H. seropedicae*, ya que carece de la enzima fosfofructoquinasa y el catabolismo de glucosa ocurre casi exclusivamente por la ruta de ED (Chavarria et al. 2013). El trabajo realizado por Nikel et al. (2013) incluyó un estudio completo que integró AFM, determinación de actividades enzimáticas y cuantificación de metabolitos (metabolómica). Este trabajo permitió determinar que aproximadamente un 10% de las triosas son recicladas para la formación de hexosas y que en esta bacteria opera una combinación de reacciones de ED, PP y EMP (en dirección de gluconeogénesis) y que en conjunto determinan un funcionamiento cíclico por la ruta de ED. Este ciclo favorece la síntesis de NADPH. Este cofactor no sólo es requerido para las reacciones biosinteticas, sino que también contrarresta el estrés oxidativo, lo cual tiene que ver con el estilo de vida de *P. putida* (Nikel et al. 2015). Análisis de MEF *in silico* efectuados en esta misma bacteria pero dirigidos a identificar blancos de modificación genética que lleven a optimizar la producción de PHA a partir de glucosa fueron efectuados por Poblete y col. (2013). Mediante correlaciones de flujo entre las reacciones que producen PHA y todas las otras reacciones de la red, fue posible agruparlas en reacciones con correlaciones positivas, neutras y negativas. Dentro de las positivas, lo cual implicaría que un aumento de la misma genera un aumento de PHA, se encuentran la enzima FbPasa y las enzimas de ED (6-fosfogluconolactonasa) y KDPG. Luego las reacciones del ciclo de CAT tendrían una influencia negativa, y para el caso de *P. putida* que posee una glucosa deshidrogenasa periplasmática que oxida la glucosa a gluconato, tendría también un efecto negativo en la síntesis de PHAs. Estos resultados son similares a los obtenidos para *H. seropedicae*, donde los MEF que optimizan la producción de PHB presentaron una flujo bajo o nulo por las enzimas del cíclo de CAT (figuras 4.6.9, 4.6.12, 4.6.16, 4.6.17). En el caso de *P. putida,* la construcción del mutante en la enzima glucosa deshidrogenasa determinó una mayor acumulación de PHA con mayor rendimiento que la salvaje, mientras que el mutante en la enzima 6-fosfogluconolactona, indicada con una correlación positiva, presentó una disminución en la síntesis de PHAs, corroborando la predicción (Poblete-Castro et al. 2013).

Estos resultados demuestran la importancia de la ruta de ED en organismos como *P. putida*. En *E. coli,* la ruta de ED es inducible por gluconato pero pasa a ser la ruta principal cuando existe una mayor demanda de acetil-CoA y NADPH, necesaria para la

síntesis de PHB. De todos estos trabajos, realizados mediante diferentes abordajes, es posible concluir la importancia de la ruta de ED y los resultados obtenidos con *H. seropedicae* en este trabajo siguen esta misma línea.

El aumento en el número de copias del gen *fbp* que codifica para la enzima FbPasa en *H. seropedicae*, fue una de las posibles modificaciones genéticas identificada por el análisis de MEF. Se determinó que cuanto mayor es el flujo por esta enzima, mayor el rendimiento de producción de Xt. El aumento en la actividad de esta enzima impulsaría un mayor flujo hacia un funcionamiento cíclico de ED. Los resultados de acumulación de PHB por Z69(pRK767::*fbp*), en este trabajo resultaron en un mayor contenido de PHB que la cepa control, con valores de 32 y 29%, respectivamente. Sin embargo, no hubo diferencias en el consumo de glucosa, ni en la velocidad de síntesis de PHB. La cepa transformada creció más lentamente en glucosa y produjo un poco más de PHB. El plásmido que se utilizó para la construcción de la copia extra del gen *fbp* es de bajo número de copias y el gen se clonó bajo el control de su propio promotor y no del promotor fuerte p*lac* del vector. La medida de la actividad enzimática mostró un leve aumento de la actividad FbPasa en la cepa recombinante con la construcción pRK767::*fbp*. Es posible que la expresión de la misma en esta construcción no fuese suficiente como para observar una diferencia en el crecimiento y producción de PHB, como la determinada por el análisis de rutas metabólicas. Se debería realizar una nueva construcción en la cual el gen *fbp* quede bajo la expresión del promotor fuerte p*lac*. El rendimiento obtenido por Z69(pRK767::*fbp*) en cultivos en lote durante la fase exponencial de crecimiento fue bajo, con valores similares a los obtenidos a partir de la cepa salvaje. En el trabajo de Lee y col. (2013) la sobreexpresión de las enzimas de las triosas fosfatos (Tpi) en *E. coli* recombinante productora de PHB, generó una mayor producción de PHB en presencia de glucosa. Una alternativa a ensayar en la cepa Z69(pK767::*fbp*) es sobreexpresar la enzima Tpi y evaluar así el contenido y rendimiento de producción de PHB. Esta enzima tiene que ver con el *pool* de triosas fosfato, que junto con una sobreexpresión de FbPasa podrían dirigir un mayor flujo de carbono hacia las hexosas.

Dentro de posibles modificaciones ya sean genéticas como las mencionadas recién, otra alternativa sería cultivar dicha cepa en otras condiciones de fermentación como ser con una baja disponibilidad de O_2 disuelto, así como tratar de utilizar otros sustratos como el glicerol. El glicerol es un sustrato carbonado que se encuentra en

grandes cantidades en el residuo de la producción de biodiesel. Sería necesario evaluar el crecimiento, producción y rendimiento de PHB por la cepa Z69(pRK767::*fbp*) cultivada en presencia de glicerol como única fuente de carbono y así eventualmente poder utilizar el residuo como sustrato carbonado para la producción a bajo costo de PHB.

Los análisis de flujo metabólico por marcación isotópica fue una primera aproximación para el uso de esta herramienta. Lo realizado durante el desarrollo de esta tesis nos brindó conocimiento para abordar nuevamente los experimentos con marcación isotópica, teniendo en cuenta la fase de crecimiento en la cual se detiene el cultivo, el procesado de la biomasa marcada y derivatización de los aminoácidos y separación cromatográfica, de manera de obtener una buena calidad de los mismos para un análisis más preciso.

5. CONCLUSIONES

El estudio de la síntesis del copolímero P(3HB-*co*-3HV) nos permitió establecer:

1) En *H. seropedicae* se expresa el ciclo del 2MCC para el catabolismo del propionil-CoA. La cepa Z69Prp, mutante en el gen *prp*C que codifica para la enzima 2-metilcitrato sintasa perteneciente a esta ruta, no crece en propionato de sodio.
2) Al cultivar Z69Prp en presencia de 10 g/l de glucosa y 0,5 g/l de propionato de sodio (relación 20:1) sintetiza 50% de copolímero con una composición de 8,6mol% de 3HV.
3) El rendimiento de transformación de propionato de sodio en monómeros 3HV por la cepa mutante fue de 0,44 g/g.
4) Consideramos que se logró obtener una cepa incapaz de metabolizar el propionato por la ruta de 2MCC y que resultó ser más eficiente en transformar el propionato en monómeros de 3HV que la cepa parental.

El estudio de la producción de PHB en cultivos en bio-reactor en presencia de glucosa como fuente de carbono, permitieron establecer:

1) Los resultados de cultivos continuos (quimiostato) demostraron que la síntesis de PHB en *H. seropedicae* Z69 está parcialmente asociada al crecimiento. Esto también fue observado en cultivos en lote en condiciones de bio-reactor.
2) A bajas velocidades de dilución (D) la productividad y rendimiento de transformación de glucosa en PHB es mayor, lo contrario sucede con la productividad y rendimiento en biomasa residual.
3) El análisis de rutas metabólicas (AMEF) efectuado en fase estacionaria (quimiostato) y en la fase *pseudo*-estacionaria (cultivo en lote alimentado) permitió determinar la participación de la ruta de ED, PP (biosintética), CAT, ciclo del Glioxilato y respiración.
4) Para cada condición ensayada, se obtuvo un MEF cuya ecuación general se ajustó a los datos experimentales. Dicha distribución de flujo, con pequeñas

diferencias, demostró un funcionamiento lineal de ED, participación de CAT, PP y el ciclo del Glioxilato.

5) Para cada condición ensayada se obtuvieron 2 MEF cuya ecuación general garantiza un mayor rendimiento de transformación de glucosa en biomasa total (que incluye el PHB). La distribución de flujos de estas dos soluciones tiene en común el funcionamiento cíclico de ED. Presentan un mayor flujo de carbono por la enzima GLN3 (fructosa 1,6 bifosfatasa), EMP5 (triosa fosfato isomerasa) y EMP4 (fructosa 1,6 bifosfato aldolasa).
6) Se observó una correlación positiva entre el flujo de carbono por la enzima fructosa 1,6 bifosfatasa y los moles de biomasa total por mol de glucosa consumida al graficar estos datos para los 8 o 12 MEF obtenidos
7) Para optimizar la de Xt que incluye PHB se identificó a la enzima fructosa 1,6 bifosfatasa como blanco para amplificar la copia del gen que la codifica.
8) Resultados preliminares de ensayos en bio-reactor de la cepa Z69(pRK767::*fbp*) con copias extra del gen *fbp* que codifica para la enzima fructosa 1,6 bifosfatasa no mostraron mejoras en el rendimiento de transformación de glucosa en biomasa total incluyendo el PHB.
9) La actividad enzimática fructosa 1,6 bifosfatasa determinada en la cepa Z69(pRK767::*fbp*) fue levemente superior que en la cepa salvaje.
10) La cepa Z69(pRK767::*fbp*) crecida en LGI con glicerol como fuente de carbono, crece a mayor velocidad y alcanza una DO mayor que la cepa control

6. PERSPECTIVAS

- Los resultados obtenidos en esta tesis permieron determinar que la síntesis de los PHAs por *H. seropedicae* esta parcialmente asociada al crecimiento, por lo tanto como trabajo a futuro proponemos realizar cultivos en bio-reactor alimentado, diseñado en dos tramos o etapas:
  1) Comienzo de la fermentación a velocidad máxima de crecimiento, priorizando la formación de biomasa.
  2) En una segunda etapa, realizar una alimentación lineal de manera de priorizar la síntesis del polímero al crecimiento celular.
- En cuanto al metabolismo del propionato de sodio, evaluar la presencia de la ruta del acriloil-CoA
- La cepa transformada Z69pRK767::*fbp*, no mostró una diferencia significativa en la actividad de la enzima FbPasa y en el $Y_{PHB/gluc}$ en condiciones de bio-reactor. Por lo tanto, proponemos clonar el gen *fbp* bajo el control del promotor fuerte p*lac* y evaluar el fenotipo del transformante. Asimismo, por lo discutido anteriormente, en el funcionamiento ciclico de ED participan las enzimas Tip (triosa fosfato isomerasa) y FbA (fructosa bifosfato aldolasa). Proponemos aumentar el número de copias de dichas enzimas
- Evaluar al glicerol como sustrato carbonado para la producción de PHB en la cepa Z69pRK767::*fbp* y futuras recombinantes mencionadas en el punto anterior.
- Rrealizar un AFM con ^{13}C-glucosa de las cepas recombinantes obtenidas

7. REFERENCIAS

Aldor, I.S. et al., 2002. Metabolic Engineering of a Novel Propionate-Independent Pathway for the Production of Poly (3-Hydroxybutyrate- co -3-Hydroxyvalerate) in Recombinant *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*. *Applied and environmental microbiology*, 68(8), pp.3848–3854. Available at: http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/68/8/3848.

Aldor, I.S. & Keasling, J.D., 2003. Process design for microbial plastic factories: Metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(5), pp.475–483.

De Almeida, A. et al., 2010. Effects of aeration on the synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) from glycerol and glucose in recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(6), pp.2036–2040.

Anderson, A.J. & Dawes, E.A., 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological reviews*, 54(4), pp.450–472.

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.

Bailey, J., 1991. Toward a science of metabolic engineering. *Science*, 252(5013), pp.1668–1675. Available at: http://science.sciencemag.org/content/252/5013/1668.abstract [Accessed October 21, 2016].

Baldani, J.I. et al., 2016. Characterization a Root- Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. , pp.86–93.

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.

Batista, M.B. et al., 2015. Enhanced oxygen consumption in *Herbaspirillum seropedicae* fnr mutants leads to increased NifA mediated transcriptional activation. *BMC microbiology*, 15(1), p.95. Available at: http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-015-0432-6.

Beringer, J., 1974. R factor transfer in *Rhizobium legumonisarum. Journal of General Microbiology*, 84, pp.188–198.

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.

Brämer, C.. . et al., 2002. Identification of the 2-Methylcitrate Pathway Involved in the Catabolism of Propionate in the Polyhydroxyalkanoate- Producing Strain. *Microbiology*, 68(1), pp.271–279.

Brämer, C.O. & Steinbüchel, A., 2001. The methylcitric acid pathway in *Ralstonia*

eutropha: new genes identified involved in propionate metabolism. *Microbiology*, 147(Pt 8), pp.2203–2214. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11495997.

Brandl, H. et al., 1988. *Pseudomonas oleovorans* as a Source for novel Poly(beta-Hydroxyalkanoates). *Applied and Environmental Microbiology*, 54(8), pp.1977–1982. Available at: <Go to ISI>://WOS:A1988P936201963.

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.

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 *lacZlac*Y genes. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), 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.

Chavarria, M. et al., 2013. The Entner-Doudoroff pathway empowers *Pseudomonas putida* KT2440 with a high tolerance to oxidative stress. *Environmental Microbiology*, 15(6), pp.1772–1785.

Chee, J.-Y. et al., 2010. Bacterially Produced Polyhydroxyalkanoate (PHA): Converting Renewable Resources into Bioplastics. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, (April 2016), pp.1395–1404.

Chen, G.-Q., 2010. Industrial Production of PHA. *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*, 14, pp.121–132.

Chen, G.-Q., Zhang, J. & Wang, Y., 2015. *White Biotechnology for Biopolymers*, Elsevier B.V. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63453-5.00018-5.

Chen, Q. et al., 2011. Production in *Escherichia coli* of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with differing monomer compositions from unrelated carbon sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(14), pp.4886–4893.

Chen, W.M. et al., 2012. Effect of phosphoglycerate mutase and fructose 1,6-bisphosphatase deficiency on symbiotic *Burkholderia phymatum*. *Microbiology*, 158(4), pp.1127–1136.

Conway, T., 1992. The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. *FEMS Microbiology Reviews*, 9(1), pp.1–27. Available at: http://femsre.oxfordjournals.org/content/9/1/1.abstract.

Demain, A.L. & Vaishnav, P., 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27(3), pp.297–306. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008.

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.

Divan Baldani, V.L., Baldani, J.I. & Dobereiner, J., 2000. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and Burkholderia spp. *Biology and Fertility of Soils*, 30(5–6), pp.485–491.

Du, G.C. et al., 2001. Feeding strategy of propionic acid for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with *Ralstonia eutropha. Biochemical Engineering Journal*, 8(2), pp.103–110.

Durner, R., Witholt, B. & Egli, T., 2000. Accumulation of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas oleovorans* during growth with octanoate in continuous culture at different dilution rates. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), pp.3408–3414.

Eisenreich, W. et al., 1993. Retrobiosynthetic Analysis of Carbon Fixation in the Phototrophic Eubacterium Chloroflexus-Aurantiacus. *European Journal of Biochemistry*, 215(3), pp.619–632. Available at: http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=8354268&retmode=ref&cmd=prlinks\npapers2://publication/uuid/4CBA36F0-7F68-4F67-911E-2ED6703432E5.

Emmerling, M. et al., 2002. Metabolic Flux Responses to Pyruvate Kinase Knockout in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 184(1), pp.152–164.

Fischer, E. & Sauer, U., 2003. Metabolic flux profiling of *Escherichia coli* mutants in central carbon metabolism using GC-MS. *European Journal of Biochemistry*, 270(5), pp.880–891.

Fischer, E., Zamboni, N. & Sauer, U., 2004. High-throughput metabolic flux analysis based on gas chromatography-mass spectrometry derived 13C constraints. *Analytical Biochemistry*, 325(2), pp.308–316.

Fuhrer, T., Fischer, E. & Sauer, U., 2005. Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. *Society*, 187(5), pp.1581–1590.

Fukui, T. & Doi, Y., 1997. Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae. J Bacteriol*, 179(15), pp.4821–4830. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9244271\nhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC179330/pdf/1794821.pdf.

Fukui, T., Naofumi Shiomi & Doi, Y., 1998. Expression and Characterization of (R)-Specific Enoyl Coenzyme A Hidratase Involved in Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis by Aeromonas caviae. *Journal of bacteriology*, 180(3), pp.667–673.

Gao, X. et al., 2011. Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(6), pp.768–774. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2011.06.005.

Gayen, K. & Venkatesh, K. V, 2006. Analysis of optimal phenotypic space using elementary modes as applied to *Corynebacterium glutamicum*. *BMC*

bioinformatics, 7, p.445.

Gill, P.R. & Warren, G.J., 1988. An iron-antagonized fungistatic agent that is not required for iron assimilation from a fluorescent rhizosphere pseudomonad. *Journal of Bacteriology*, 170(1), pp.163–170.

Gogola-Kolling, V.M.R. et al., 2014. Improved capsular polysaccharide production by *Streptococcus pneumoniae* serotype 14 using continuous cultivation. *Biochemical Engineering Journal*, 91, pp.16–22.

Gruchattka, E. & Kayser, O., 2015. In vivo validation of in silico predicted metabolic engineering strategies in yeast: Disruption of α-ketoglutarate dehydrogenase and expression of ATP-citrate lyase for terpenoid production. *PLoS ONE*, 10(12), pp.1–26.

Han, M., Yoon, S.S. & Lee, S.Y., 2001. Proteome Analysis of Metabolically Engineered *Escherichia coli* Producing Poly (3-Hydroxybutyrate). *Journal of bacteriology*, 183(1), pp.301–308.

Hong, S.H. et al., 2003. In silico prediction and validation of the importance of the Entner-Doudoroff pathway in poly(3-hydroxybutyrate) production by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(7), pp.854–863.

Horswill, A.R., Dudding, A.R. & Escalante-Semerena, J.C., 2001. Studies of Propionate Toxicity in *Salmonella enterica* Identify 2-Methylcitrate as a Potent Inhibitor of Cell Growth. *Journal of Biological Chemistry*, 276(22), pp.19094–19101.

Horswill, A.R. & Escalante-Semerena, J.C., 1997. Propionate catabolism in *Salmonella typhimurium* LT2: Two divergently transcribed units comprise the prp locus at 8.5 centisomes, prpR encodes a member of the sigma-54 family of activators, and the prpBCDE genes constitute an operon. *Journal of Bacteriology*, 179(3), pp.928–940.

James, E.K. et al., 1997. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue 3Sorghum bicolor L. Moench. *J. Exp. Bot.*, 48(3), pp.785–798. Available at: http://jxb.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/48/3/785.

James, E.K. et al., 2002. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium Herbaspirillum seropedicae Z67. *Molecular plant-microbe interactions MPMI*, 15(9), pp.894–906.

Kauffman, K.J., Prakash, P. & Edwards, J.S., 2003. Advances in flux balance analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(5), pp.491–496.

Kayser, A. et al., 2005. Metabolic flux analysis of Escherichia coli in glucose-limited continuous culture. I. Growth-rate-dependent metabolic efficiency at steady state. *Microbiology*, 151(3), pp.693–706.

Khanna, S. & Srivastava, A.K., 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40(2), pp.607–619.

Klamt, S. & Stelling, J., 2003. Two approaches for metabolic pathway analysis? *Trends*

in biotechnology, 21(2), pp.64–69. Available at: http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=12573854&retmode=ref&cmd=prlinks.

Koller, M. et al., 2007. Potential of various archae- and eubacterial strains as industrial polyhydroxyalkanoate producers from whey. *Macromolecular bioscience*, 7(2), pp.218–26. Available at: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mabi.200600211/full [Accessed May 3, 2016].

Lee, I.Y., Kim, G.J., et al., 1996. Improvement of hydroxyvalerate fraction in poly(β-hydroxybutyrate-co-β-hydroxyvalerate) by a mutant strain of *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 81(3), pp.255–258.

Lee, I.Y., Kim, M.K., et al., 1996. Regulatory effects of cellular nicotinamide nucleotides and enzyme activities on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 52(6), pp.707–712.

Lee, S.H. et al., 2013. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for enhanced biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) based on proteome analysis. *Biotechnology Letters*, 35(10), pp.1631–1637.

Lee, Y.-H. et al., 2000. Construction of transformant *Alcaligenes latus* enforcing its own cloned phbC gene and characterization of poly-β-hydroxybutyrate biosynthesis. *Biotechnology Letters*, 22(11), pp.961–967. Available at: http://dx.doi.org/10.1023/A:1005628908532.

Llaneras, F. & Picó, J., 2008. Stoichiometric modelling of cell metabolism. *Journal of bioscience and bioengineering*, 105(1), pp.1–11.

London, R.E. et al., 1999. Carbon-13 nuclear magnetic resonance study of metabolism of propionate by *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 181(11), pp.3562–3570. Available at: http://jb.asm.org/cgi/content/full/181/11/3562.

Lu, X., 2010. A perspective: Photosynthetic production of fatty acid-based biofuels in genetically engineered cyanobacteria. *Biotechnology Advances*, 28(6), pp.742–746. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.05.021.

Luengo, J.M. et al., 2003. Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), pp.251–260.

Madison, L.L. & Huisman, G.W., 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, 63(1), pp.21–53.

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.

Neidhardt FC, Ingraham JL, Schaechter M (1990) Physiology of the

Bacterial Cell: a Molecular Approach. Sinauer Associates:

Sunderland, Mass

Nielsen, J., 2001. Metabolic engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(3), pp.263–283.

Nikel, P.I. et al., 2015. *Pseudomonas putida* KT2440 strain metabolizes glucose through a cycle formed by enzymes of the Entner-Doudoroff, embden-meyerhof-parnas, and pentose phosphate pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 290(43), pp.25920–25932.

Papin, J.A. et al., 2003. Metabolic pathways in the post-genome era. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(5), pp.250–258.

Papin, J. a et al., 2004. Comparison of network-based pathway analysis methods. *Trends in biotechnology*, 22(8), pp.400–5.

Park, J. et al., 1995. Production of Poly-Beta-Hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus* transformants harboring cloned phbcab genes. *Biotechnology Letter* (7), pp.735–740.

Park, J.H. & Lee, S.Y., 2008. Towards systems metabolic engineering of microorganisms for amino acid production. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(5), pp.454–460.

Park, S.J. et al., 2012. Advanced bacterial polyhydroxyalkanoates: Towards a versatile and sustainable platform for unnatural tailor-made polyesters. *Biotechnology Advances*, 30(6), pp.1196–1206. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.007.

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.

Pfeiffer, T. et al., 1999. METATOOL: For studying metabolic networks. *Bioinformatics*, 15(3), pp.251–257.

Pieja, A.J., Sundstrom, E.R. & Criddle, C.S., 2011. Poly-3-hydroxybutyrate metabolism in the type II *Methanotroph Methylocystis parvus* OBBP. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17), pp.6012–6019.

Poblete-Castro, I. et al., 2013. In-silico-driven metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for enhanced production of poly-hydroxyalkanoates. *Metabolic Engineering*, 15(1), pp.113–123. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2012.10.004.

Portais, J. et al., 2002. Carbohydrate cycling in micro-organisms: what can 13 C-NMR tell us? *FEMS Microbiology Reviews*, 26.

Price, N.D., Reed, J.L. & Palsson, B.Ø., 2004. Genome-scale models of microbial cells: evaluating the consequences of constraints. *Nature reviews. Microbiology*, 2(11), pp.886–97. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15494745.

Radhakrishnan, D., Rajvanshi, M. & Venkatesh, K. V., 2010. Phenotypic characterization of *Corynebacterium glutamicum* using elementary modes towards

synthesis of amino acids. *Systems and Synthetic Biology*, 4(4), pp.281–291.

Ramsay, B.A. et al., 1990. Production of poly-(beta-hydroxybutyric-co-beta-hydroxyvaleric) acids. *Applied and environmental microbiology*, 56(7), pp.2093–8. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=184565&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Rehm, B.H. a, 2003. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *The Biochemical journal*, 376, pp.15–33.

Riis, V. & Mai, W., 1988. Gas cromatographic determination of poly-B-hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrocloryc acid propanolysis. *Journal of Chromatography*, 455, pp.285–289.

Rocco, C.J. & Escalante-Semerena, J.C., 2010. In *Salmonella enterica*, 2-methylcitrate blocks gluconeogenesis *Journal of Bacteriology*, 192(3), pp.771–778.

Rocha, R.C.S. et al., 2008. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) P(3HB-co-3HV) with a broad range of 3HV content at high yields by *Burkholderia sacchari* IPT 189. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(3), pp.427–431. Available at: http://dx.doi.org/10.1007/s11274-007-9480-x.

Roessner-Tunali, U. et al., 2004. Kinetics of labelling of organic and amino acids in potato tubers by gas chromatography-mass spectrometry following incubation in 13C labelled isotopes. *Plant Journal*, 39(4), pp.668–679.

Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning A Laboratory Manual* Second Edi., United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sauer, U. et al., 1997. Metabolic fluxes in riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Nature biotechnology*, 15(5), pp.448–452.

Sauer, U., 2006. Metabolic networks in motion: 13C-based flux analysis. *Molecular systems biology*, 2, p.62. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17102807.

Savenkova, L. et al., 2000. Effect of 3-hydroxy valerate content on some physical and mechanical properties of polyhydroxyalkanoates produced by *Azotobacter chroococcum. Process Biochemistry*, 36(5), pp.445–450.

Senior, P.J. & Dawes, E. a, 1973. The regulation of poly-beta-hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *The Biochemical journal*, 134(1), pp.225–238.

Shang, L., Jiang, M. & Chang, H.N., 2003. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* with phosphate limitation under different glucose concentrations. *Biotechnology Letters*, 25(17), pp.1415–1419.

Shlomi, T., Cabili, M.N., Herrga, M.J., Palsson, B. & Ruppin, E., 2008.Network-based prediction of human tissue-specific metabolism. *Nature Biotechnology,* 26 (9), pp. 1003-1010.

Silva, L.F. et al., 2000. Propionic acid metabolism and poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (P3HB-co-3HV) production by *Burkholderia* sp. *Journal of Biotechnology*, 76(2–3), pp.165–174.

Silva, L.G. Da, Miguens, F.C. & Olivares, F.L., 2003. *Herbaspirillum seropedicae* and sugarcane endophytic interaction investigated by using high pressure freezing electron microscopy. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34, pp.69–71.

Simon, R., Priefer, U. & Puhler, A., 1983. A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nat Biotech*, 1(9), pp.784–791. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/nbt1183-784.

Slater, S. et al., 1998. Multiple β-Ketothiolases Mediate Poly (β -Hydroxyalkanoate) Copolymer Synthesis in *Ralstonia eutropha*. *Journal of bacteriology*, 180(8), p.1979.

Sonntag, K. et al., 1995. 13C NMR studies of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* during growth and overproduction of amino acids in batch cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44(3–4), pp.489–495.

Steinbüchel, A., 2001. *Biotechnology Set* H.-J. Rehm & G. Reed, eds., Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH. Available at: http://onlinelibrary.wiley.com/resolve/doi?DOI=10.1002%2F9783527620999.ch13f#.V6SRVUgyeqE.mendeley [Accessed August 5, 2016].

Steinbüchel, A. & Lütke-Eversloh, T., 2003. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, 16(2), pp.81–96.

Steinbüchel, A. & Pieper, U., 1992. Production of a copolyester of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from single unrelated carbon sources by a mutant of *Alcaligenes eutrophus. Applied Microbiology and Biotechnology*, 37, pp.1–6.

Steinbüchel, A. & Valentin, H.E., 1995. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters*, 128(3), pp.219–228. Available at: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07528.x/abstract [Accessed August 2, 2016].

Stephanopoulos, G., 1999. Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metabolic engineering*, 1(1), pp.1–11. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S109671769890101X.

Sukdeo, N. & Trevor, C., 2003. Application of crossover-PCR-mediated deletion-insertion mutagenesis to analysis of the bdhA-xdhA2-xdhB2 mixed-function operon of *Sinorhizobium meliloti*. *Arch Microbiol,* 179, pp. 301–304

Szyperski, T. et al., 1999. Bioreaction network topology and metabolic flux ratio analysis by biosynthetic fractional 13C labeling and two-dimensional NMR spectroscopy. *Metabolic engineering*, 1(3), pp.189–197.

Szyperski, T., 1995. Biosynthetically directed fractional 13C-labeling of proteinogenic amino acids. An efficient analytical tool to investigate intermediary metabolism. *European Journal of Biochemistry*, 232(2), pp.433–448.

Tan, G-Y.A., Chen, Ch-L., Ge, L., Li, L., Wang, L., Zhao, L., Mo, Y., Tan,S.N. & Jing-Yuan Wang, J-Y., 2014. Enhanced gas chromatography-mass spectrometry method for bacterial polyhydroxyalkanoates analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering,* 117 (3), pp. 379-382

Textor, S. et al., 1997. Propionate oxidation in *Escherichia coli*: Evidence for operation of a methylcitrate cycle in bacteria. *Archives of Microbiology*, 168(5), pp.428–436.

Trinh, C.T. et al., 2006. Design , construction and performance of the most efficient biomass producing *E . coli* bacterium. *Metabolic Engineering*, 8, pp.628–638.

Trinh, C.T. et al., 2011. Redesigning *Escherichia coli* Metabolism for Anaerobic Production of Isobutanol. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(14), pp.4894–4904.

Trinh, C.T., Unrean, P. & Srienc, F., 2008. Minimal Escherichia coli Cell for the Most Efficient Production of Ethanol from Hexoses and Pentoses. *Applied and Environmental Microbiology* 74(12), pp.3634–3643.

Trinh, C.T., Wlaschin, A. & Srienc, F., 2009. Elementary mode analysis: A useful metabolic pathway analysis tool for characterizing cellular metabolism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(5), pp.813–826.

Unrean, P. & Nguyen, N.H.A., 2012. Metabolic pathway analysis of *Scheffersomyces* (Pichia) *stipitis*: Effect of oxygen availability on ethanol synthesis and flux distributions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(5), pp.1387–1398.

Unrean, P., Trinh, C.T. & Srienc, F., 2010. Rational design and construction of an efficient *E . coli* for production of diapolycopendioic acid. *Metabolic Engineering*, 12(2), pp.112–122. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2009.11.002.

Ureta, A. et al., 1995. Indentification of *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* using biochemical and genetic criteria. *Plant and Soil*, 172(2), pp.271–277. Available at: http://dx.doi.org/10.1007/BF00011329.

Varma, A. & Palsson, B.O., 1994. Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(10), pp.3724–3731.

Wang, Y., Yin, J. & Chen, G.Q., 2014. Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. *Current Opinion in Biotechnology*, 30, pp.59–65. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2014.06.001.

Wegener, W.S. et al., 1968. Alternate pathways of metabolism of short-chain fatty acids. *Bacteriological reviews*, 32(1), pp.1–26.

Wiechert, W., 2001. 13C metabolic flux analysis. *Metabolic engineering*, 3(3), pp.195–206. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11461141.

Wittmann, C., 2007. Fluxome analysis using GC-MS. *Microbial cell factories*, 6(1), p.6. Available at: http://www.microbialcellfactories.com/content/6/1/6.

Wittmann, C. & Heinzle, E., 2001. Modeling and experimental design for metabolic flux analysis of lysine-producing Corynebacteria by mass spectrometry. *Metabolic engineering*, 3(2), pp.173–191.

Yang, J.E. et al., 2014. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from glucose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(1), pp.95–104.

Zamboni, N. et al., 2009. 13C-Based Metabolic Flux Analysis. *Nature Protocols*, 4(6), pp.878–892. Available at: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2009.58.

Zamboni, N., Fischer, E. & Sauer, U., 2005. FiatFlux--a software for metabolic flux analysis from 13C-glucose experiments. *BMC bioinformatics*, 6, p.209.

Zinn, M., Witholt, B. & Egli, T., 2004. Dual nutrient limited growth: Models, experimental observations, and applications. *Journal of Biotechnology*, 113(1–3), pp.263–279.

8. ANEXOS
Anexo 1

1.1. Composición de los medios de cultivo

Medio rico TY

Composición (g/L): extracto de levadura, 3; triptona, 5; y $CaCl_2$, 0.42 mM. Disolver en H_2O desionizada.

Medio rico LB

Composición (g/l): extracto de levadura, 3; triptona, 5; y NaCl 5.

Disolver en H_2O desionizada.

Medio mineral-glucosa (MMG)

Composición (g/l): KH_2PO_4, 3.0; $CaCl_2.2H_2O$, 0.030; $MgSO_4.7H_2O$, 0.5; $(NH_4)_2SO_4$, 2.64; $FeCl_3.6H_2O$, 0.05 y 2.0 ml/L de una solución de elementos traza (pH 6,8)

La composición de la solución de elementos traza (g/L): H_3BO_3, 0.30; $CoCl_2.6H_2O$, 0.20; $ZnSO_4.7H_2O$, 0.1; $MnCl_2.4H_2O$, 0.03; $NaMoO_4.2H_2O$, 0.03; $NiCl_2.6H2O$, 0.02 y $CuSO_4.5H_2O$, 0.01.

Disolver en H_2O desionizada

Medio mineral LGI

Composición (g/L): K_2HPO_4, 2.13; KH_2PO_4, 11.9; $CaCl_2$, 0.015; $MgSO_4$, 0.1; $Na_2MoO_4.2H_2O$, 0.002, $FeCl_3.6H_2O$, 0.010 (pH 6,8).

Disolver en H_2O desionizada

1.2. Soluciones y buffers

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

Solución de glicerol (Ausubel et al. 1992)

Glicerol ……65%(v/v)

$MgSO_4$ ……0,1M

Tris.HCl, pH=8,0……0,025M

Anexo 2

2.1. Lisado de células: molde para las reacciones de PCR

- Tomar una anzada de un cultivo crecido no más de 24 horas en placa de medio rico y resuspenderla en un tubo de 1,5 ml con 100 μl de agua estéril.
- Colocar el tubo en baño a 100°C durante 10 minutos y luego pasar a -20°C durante 10 minutos o hasta el momento de usar.
- Centrifugar el lisado 10 min a 10.000 rpm
- Utilizar el 2 μl del sobrenadante como molde para las reacciones de PCR.

2.2. Condiciones de PCR para la construcción de mutantes

2.2.1 Condiciones PCR1 y PCR2 para los genes: *prp*C, *mms*A y *cai*A

Tabla A 2.2.1.1 Mezcla de reacción para un volumen final de 20 μl

	Concentración final
Buffer c/$MgCl_2$ (20mM)	1x
dNTPs	0,25mM
Cebador (Fw)	0,5μM
Cebador (Rev)	0,5μM
Taq	0,05U/μl
ADN	2 μl

Programa de amplificación

5 min a 94°C, 25 ciclos de [1min a 94°C, 30 segundos a 58°C y 45 segundos a 72°C], 10 minutos a 72°C.

2.2.2 Condiciones de PCR3 para los genes: *prp*C, *mms*A, *cai*A y *prp*Cwt

Tabla A 2.2.2.1 Mezcla de reacción para un volumen final de 40 μl

	Concentración final
Buffer c/$MgCl_2$ (20mM)	1x
dNTPs	0,25mM
Primer (Fw)	0,37μM
Primer (Rev)	0,37μM
Taq	0,05U/μl
Molde*: PCR1y 2	1μl de cada uno

*Para el caso del gen *prp*Cwt se utilizó como molde 2μl de lisado celular.

Programa de amplificación

5 min a 94°C, 30 ciclos de [1min a 94°C, 1 min a 60°C y 1 min a 72°C], 10 minutos a 72°C.

2.2.3 Condiciones de PCR para amplificar el gen *fbp*

Tabla A 2.2.3.1 Mezcla de reacción para un volumen final de 20 μl

	Concentración final
Buffer c/$MgCl_2$ (20mM)	1x
dNTPs	0,25mM
Primer (Fw)	0,4μM
Primer (Rev)	0,4μM
Taq	0,05U/μl
Molde: Lisado	2μl

Programa de amplificación

5 min a 94°C, 30 ciclos de [1min a 93°C, 30 segundos a 55°C y 1,45 min a 72°C], 10 minutos a 72°C.

2.3. Digestión con enzimas de restricción

Mezcla de digestión con enzima *Eco*R1 (New England Biolabs, Inglaterra)

Buffer 3 10X……..2 μl

Miniprep (Topo +inserto; pK18*mobsac*)…….....10 μl

*Eco*R1……..…...1 μl

H_2O…….... csp 20 μl

Los tubos se incubaron a 37°C por 24 horas.

Mezcla de digestión con enzimas *Hind*III y *Xba*I (Promega, USA)

Buffer E 10X……2 μl

Miniprep (Topo +inserto; pBBR1MSC-2; pRK767)…….....10 μl

*Hind*III……..1 μl

XbaI…..…….. 1 μl

H_2O…….. csp 20 μl

Los tubos se incubaron a 37°C por 24 horas.

2.4. Clonado

Las reacciones de ligación de los fragmentos de interés en los vectores correspondiente se realizaron de la siguiente manera:

Se utilizó la enzima T4 ligasa (Fermentas, USA)

Buffer Ligasa 10X……1,5 μl

Fragmento ADN *Eco*RI o *Hind*III/*Xba*I…….6 μl

T4 ligasa (5U/μl)……..1μl

H_2O……..csp 15 μl

La mezcla de ligación se incuba por 24 horas a 16°C

2.5. Electroforesis en geles de agarosa

Las corridas electroforéticas se realizaron en gel de agarosa al 1 o 2 % (p/v) en buffer TAE 1X. Se sembraron 5 µl en caso de reacciones de PCR, 4 µl en caso de ADN plasmídico o 8 µl en caso de restricciones. Para la purificación de fragmentos de ADN del gel se sembró el total de volumen de reacción preparado (20 μl o 40 μl en caso de productos de digestión o PCR, respectivamente). Se incorporó 0,5 μl por cada 10 ml de agarosa el colorante Good View (SBS, China) de manera de visualizar el ADN bajo luz UV.

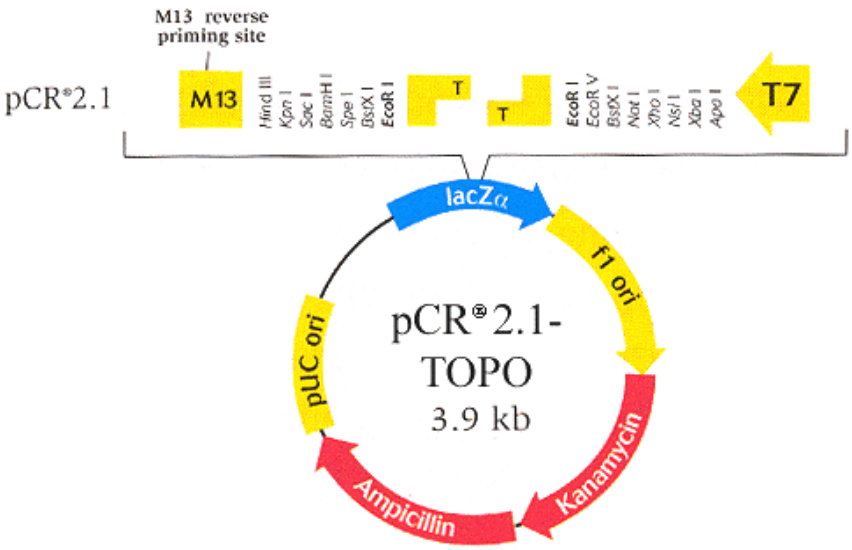
2.6. Conjugación triparental

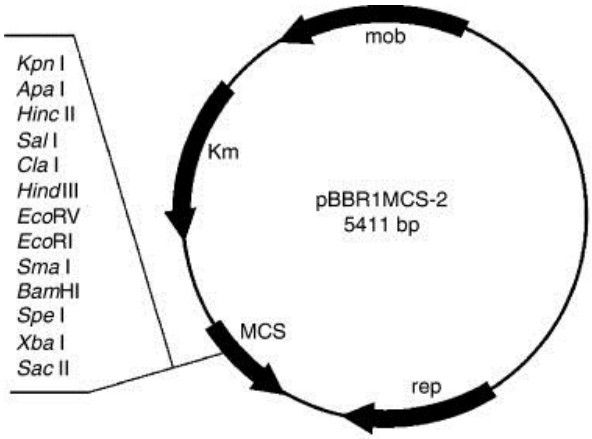
Se utilizaron tres cepas: *E. coli* Top10 pRK2013 (cepa "helper"), *E. coli* Top10 pK18*mobsacB* (cepa donadora) con la construcción de interés y *H. seropedicae* Z69 (cepa receptora). Cada una de las cepas se cultivó con agitación durante toda la noche en 5ml de medio líquido LB-Km^{50} a 37ºC o en TY a 30ºC, según corresponda. Al otro día, se inocularon 5ml de medio líquido TY con 100µl del cultivo anterior de *H. seropedicae* Z69 y se incubó a 30ºC y 200rpm. Al mismo tiempo se inocularon, por

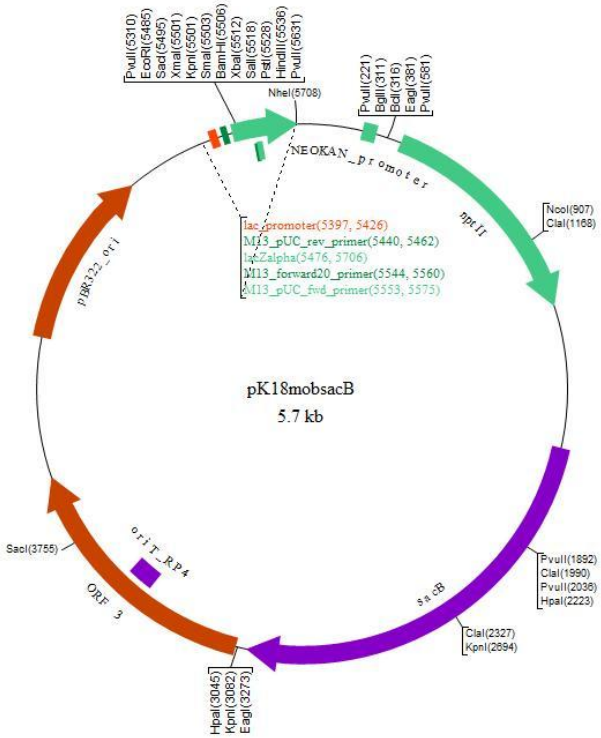
separado, tubos conteniendo 5ml de medio LB sin antibiótico con 5µl o con 20µl de los cultivos de *E. coli* y se incubaron a 37ºC y 200rpm. Luego de 4 horas se eligió un tubo de cultivo de cada cepa que exhibiera visualmente un crecimiento aparentemente similar y se mezcló 30 µl de cada uno formando 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 24 horas a 30ºC, al cabo de lo cual, las células fueron transferidas con ansa estéril a un tubo de microfuga de 1,5 ml estéril y se resuspendieron en 1ml de TY líquido. Se sembró 100µl de esta suspensión celular con rastrillo en placas con TY-Km^{50}-Nal^{50} y se incubó a 30ºC por 72 horas.

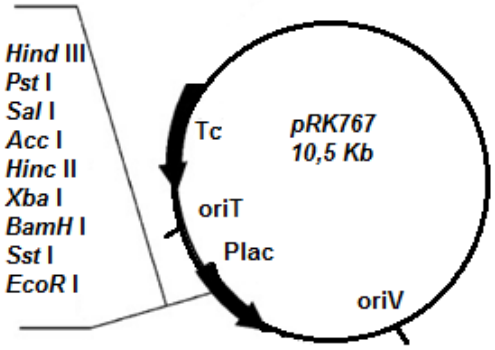
Al término de la incubación, las colonias que se desarrollaron en las placas con TY-Km^{50}-Nal^{50} fueron repicadas a nuevas placas con el mismo medio. Simultáneamente y de la misma forma, se realizaron los controles negativos conteniendo solamente *H. seropedicae* Z69 o ambas cepas de *E. coli*.

4.6. Mapa de los plásmidos utilizados




Kpn I
Apa I
Hinc II
Sal I
Cla I
HindIII
EcoRV
EcoRI
Sma I
BamHI
Spe I
Xba I
Sac II
mob
Km
pBBR1MCS-2
5411 bp
MCS
rep


pK18mobsacB
5.7 kb
NEOK4N_promoter
nptII
sacB
oriT_RP4
ORF 3
pBR322_ori


Hind III
Pst I
Sal I
Acc I
Hinc II
Xba I
BamH I
Sst I
EcoR I
Tc
pRK767
10,5 Kb
oriT
Plac
oriV

Anexo 3

Listado de fórmulas utilizadas para los distintos cálculos realizados

3.1. Velocidades específicas

3.1.1. Cultivos en lote

Crecimiento (h^{-1})	$\boldsymbol{\mu = \frac{d(LnXr)}{dt}}$
Síntesis de PHB (productividad específica) ($mmolPHB.gXr^{-1}.h^{-1}$)	$\boldsymbol{qPHB = \frac{dPHB}{dXr} \times \mu}$
Consumo de glucosa ($mmolGluc.gXr^{-1}.h^{-1}$)	$\boldsymbol{qgluc = \frac{dXr}{dgluc} \times \frac{1}{\mu}}$

3.1.2. Cultivos continuos

Crecimiento (h^{-1})	**D** (velocidad de dilución)
Productividad específica(síntesis de PHB) ($gPHB.gXr^{-1}.h^{-1}$)	$\boldsymbol{qPHB = \frac{PHB}{Xr} \times D}$
Productividad volumétrica de PHB ($g.l^{-1}.h^{-1}$)	$\boldsymbol{P = PHB \times D}$
Productividad volumétrica de biomasa (Xr) ($g.l^{-1}.h^{-1}$)	$\boldsymbol{P = Xr \times D}$

3.2. Calculo del rendimiento de transformación del sustrato en 3HB, 3HV y Xr expresado en g/g

$$YHB/gluc = \Delta HB \div \Delta Gluc$$

$$YHV/prop = \Delta HV \div \Delta Prop$$

$$YXr/gluc = \Delta Xr \div \Delta Gluc$$

3.3. Determinación del contenido de PHB

$$\%PHA = \frac{PHB\ (g/l)}{Xt\ (g/l)} \times 100$$

3.3 Determinación de la composición monomérica del copolímero

El porcentaje de cada monómero dentro del polímero se expresa en mol% y corresponde a la fracción molar de cada monómero en los moles totales del copolímero, expresado en porcentaje.

Mol%3HV= (mol 3HV/ mol 3HV+ mol 3HB) x100

Mol%3HB= (mol 3HB/ mol 3HV+ mol 3HB) x100

3.4. Actividad enzimática

$$Unidades/(mg\ proteinas) = \frac{[\Delta A340nm/\min muestra\ - \Delta A340nm/\min blanco\ ] * 1 * FD}{6{,}22 * \text{vol. ext} * \text{proteinas mg/ml}}$$

Donde:
1 = Volumen total de la reacción (ml)
FD = Factor de dilución (en el caso de haber usado)
6.22 = Coeficiente de extinción molar de NADPH a 340 nm (en mM^{-1} cm^{-1})
Vol. ext: volumen de extracto celular en ml

Anexo 4

4.1. Red metabólica usada como archivo de entrada para el software Metatool

4.1.1 Ensayo en cultivo continuo

La red utilizada incluyó las vías ED, VP (pentosas fosfato), CK (ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarboxilicos), Glioxilato, anapleróticas y respiración aeróbica de coenzimas.

El archivo de entrada para el software Metatool fue el siguiente:

ENZIMAS REVERSIBLES

EMP2 EMP4 EMP5 EMP6 EMP7 EMP8 EMP9 VP6 VP7 VP8 VP9 VP10

ENZIMAS IRREVERSIBLES

EMP1 ED1 ED2 EMP10 CPD VP1 CK1 CK2 CK3 CK4 CK5 CK6 CK7 CK8 CK9 CGLX1 CGLX2 GLN3 AD1 AD2 P3HB BIOMASSA BIOTOT OXFAD OXNAD

METABOLISTOS INTERNOS

G6P KDPG2 NADP NADPH PG6 PIR G3P BPG13 PG3 PG2 PEP AcCoA Rbl5P Rb5P X5P S7P E4P F6P DHP F16P OAA Cit KG2 IsoCit SucCoA Suc Fum Mal GLX FAD FADH2 NAD NADH CoASH XR HB

METABOLITOS EXTERNOS

Gliext ADP ATP CO2 XT O

CAT

EMP1 : Gliext + ATP = G6P + ADP .
EMP2 : G6P = F6P .
ED1 : PG6 = KDPG2 .
ED2 : KDPG2 = PIR + G3P .
EMP4 : F16P = G3P + DHP .
EMP5 : DHP = G3P .
EMP6 : G3P + NAD = BPG13 + NADH .
EMP7 : BPG13 + ADP = PG3 + ATP .
EMP8 : PG3 = PG2 .
EMP9 : PG2 = PEP .
EMP10 : PEP + ADP = PIR + ATP .
CPD : PIR + NAD + CoASH = AcCoA + NADH + CO2 .

VP1 : G6P + NADP = PG6 + NADPH .
VP6 : Rbl5P = Rb5P .
VP7 : Rbl5P = X5P .
VP8 : Rb5P + X5P = S7P + G3P .
VP9 : G3P + S7P = E4P + F6P .
VP10 : X5P + E4P = F6P + G3P .
CK1 : OAA + AcCoA = Cit + CoASH .
CK2 : Cit = IsoCit .
CK3 : IsoCit + NADP = KG2 + NADPH + CO2 .
CK4 : KG2 + NAD + CoASH = SucCoA + NADH + CO2 .
CK5 : SucCoA + ADP = Suc + ATP + CoASH .
CK6 : Suc + FAD = Fum + FADH2 .
CK7 : Fum = Mal .
CK8 : Mal + NAD = OAA + NADH .
CGLX1 : IsoCit = GLX + Suc .
CGLX2 : GLX + AcCoA = Mal + CoASH .
GLN3 : F16P = F6P .
AD1 : PIR + CO2 + ATP = OAA + ADP .
AD2 : OAA + ATP = PEP + ADP + CO2 .
P3HB : 2 AcCoA + 1 NADPH = HB + 2 CoASH + 1 NADP
BIOMASA : 205 G6P + 71 F6P + 897 Rb5P + 361 E4P + 129 G3P + 1496 PG3 + 519 PEP + 2833 PIR + 3748 AcCoA + 1079 KG2 + 1787 OAA + 3547 NAD + 18225 NADPH + 18485 ATP = 10000 XR + 18485 ADP + 3547 NADH + 18225 NADP + 3748 CoASH .
BIOTOT : x XR + y HB = XT .
OXFAD : FADH2 + 2 ADP + O = FAD + 2 ATP .
OXNAD : NADH + 3 ADP + O = NAD + 3 ATP

El contenido de polímero (%PHB) experimental obtenido para cada D ensayada, se ingresó en el archivo de entrada en la ecuación:

BIOTOT : x XR + y HB= XT, se muestra en la tabla 4.1.1.1.

Tabla A 4.1.1.1. Ecuación de Xt ingresada en Metatool.

D (h^{-1})	Ecuación Xt		PHB%
	moles Xr	moles PHB	
0,03	3026	8109	69,7
0,056	3613	7427	64
0,07	3050	8081	69,5
0,12	5492	6136	53
0,158	5296	5470	47

Archivo de salida de Metatool, y cálculos realizados.

Cálculos para identificar MEF que se ajusta a los datos experimentales y los que garantizan un mejor rendimiento.

En todos los casos, la/s fila/s sombreada/s de verde corresponde a la ecuación estequeométrica de cada MEF que genera mayor $Y_{gluc/PHB}$ (g/g) Por otro lado en amarrilo se señala aquella ecuación estequeomética de cada MEF cuyo rendimiento de transformación $Y_{gluc/PHB}$ (g/g) presenta la menor diferencia con los datos experimentales

D: 0,03 h^{-1}

	Glu ext	ADP	O	ATP	CO2	Xt	Xr	PHB	$Y_{Xr/glu}$	$Y_{PHB/glu}$	$Y_{Xr/glu}$exp	$Y_{PHB/glu}$exp	Dif $Y_{PHB/glu}$	Dif $Y_{Xr/glu}$
2	10388,7	72429,5	25457,7	72429,5	17130	1	3026	8109	0,16182112	0,37293405	0,112469	0,259412	0,11352206	0,04935212
3	13551,1	190296	62405,9	190296	26104,1	1	3026	8109	0,12405717	0,28590299	0,112469	0,259412	0,02649099	0,01158817
4	10818,6	89195,6	30616,5	89195,6	19709,4	1	3026	8109	0,15539082	0,35811473	0,112469	0,259412	0,09870273	0,04292182
5	13314,3	181535	60564,3	181535	34683,3	1	3026	8109	0,12626357	0,29098789	0,112469	0,259412	0,03157589	0,01379457
6	11442,9	117757	38107,1	117757	23454,7	1	3026	8109	0,14691303	0,33857676	0,112469	0,259412	0,07916476	0,03444403
7	11363,9	114362	37159,9	114362	22981,1	1	3026	8109	0,14793435	0,34093049	0,112469	0,259412	0,08151849	0,03546534
8	11729,5	128361	41546,3	28361	25174,3	1	3026	8109	0,14332334	0,33030394	0,112469	0,259412	0,07089194	0,03085434
9	11650,5	124967	40599,1	124967	24700,7	1	3026	8109	0,14429519	0,33254367	0,112469	0,259412	0,07313167	0,03182619

D: 0,056 h^{-1}

	Gliext	ADP	O	ATP	CO2	XT	Xr	PHB	$Y_{Xr/glu}$	$Y_{PHB/glu}$	$Y_{Xr/glu}$ exp	$Y_{PHB/glu}$ exp	Dif $Y_{PHB/glu}$	Dif $Y_{Xr/glu}$
2	10162,7	63877,5	23637,8	63877,5	15948,4	1	3613	7427	0,19750875	0,34915262	0,12884633	0,21831832	0,1308343	0,06866243
3	13957,5	205318	69175,7	205318	38717,3	1	3613	7427	0,14380958	0,25422413	0,12884633	0,21831832	0,03590581	0,01496325
4	10678,6	83996,8	29828,4	83996,8	19043,7	1	3613	7427	0,1879668	0,33228451	0,12884633	0,21831832	0,11396618	0,05912047
5	13673,4	194804	65765,8	194804	37012,4	1	3613	7427	0,14679759	0,25950629	0,12884633	0,21831832	0,04118797	0,01795127
6	11427,6	118270	38817,1	118270	23538	1	3613	7427	0,17564687	0,31050556	0,12884633	0,21831832	0,09218724	0,04680055
7	11332,9	114197	37680,5	114197	22969,7	1	3613	7427	0,17711462	0,31310021	0,12884633	0,21831832	0,09478188	0,04826829
8	11771,6	130995	42944,2	130995	25601,6	1	3613	7427	0,17051397	0,30143169	0,12884633	0,21831832	0,08311337	0,04166764
9	11676,8	126922	41807,5	126922	25033,2	1	3613	7427	0,17189831	0,30387892	0,12884633	0,21831832	0,08556059	0,04305198

D: 0,07 h^{-1}

	Gliext	ADP	O	ATP	CO2	XT	XR	PHB	$Y_{Xr/glu}$	$Y_{PHB/glu}$	$Y_{PHB/glu}$ exp	$Y_{Xr/glu}$ exp	Dif $Y_{PHB/glu}$	Dif $Y_{Xr/glu}$
2	10360,8	72149,6	25373,7	72149,6	17074	1	3050	8081	0,16354378	0,37264711	0,14307231	0,32050907	0,052138049	0,020471477
3	13523,1	190016	63321,9	190016	36048,1	1	3050	8081	0,125300	0,28550571	0,14307231	0,32050907	-0,035003359	-0,017772307
4	10790,7	88915,7	30532,5	88915,7	19653,4	1	3050	8081	0,15702822	0,35780091	0,14307231	0,32050907	0,037291839	0,013955915
5	13286,3	181255	60480,3	181255	34627,3	1	3050	8081	0,12753321	0,29059424	0,14307231	0,32050907	-0,029914827	-0,015539101
6	11414,9	117477	38023,1	117477	23398,7	1	3050	8081	0,14844146	0,33823531	0,14307231	0,32050907	0,017726243	0,005369154
7	11335,9	114082	37075,9	114082	22925,1	1	3050	8081	0,14947595	0,34059247	0,14307231	0,32050907	0,020083408	0,006403644
8	11701,5	128081	41462,3	128081	25118,3	1	3050	8081	0,14947595	0,32995105	0,14307231	0,32050907	0,009441986	0,001733439
9	11622,5	124687	40515,1	124687	24644,7	1	3050	8081	0,14947595	0,33219378	0,14307231	0,32050907	0,011684716	0,002717707

D: 0,12 h^{-1}

	Gliext	ADP	O	ATP	CO2	Xt	Xr	PHB	$Y_{Xr/glu}$	$Y_{PHB/glu}$	$Y_{Xr/glu}$ exp	$Y_{PHB/glu}$ exp	Dif $Y_{PHB/glu}$	Dif $Y_{Xr/glu}$
2	10288,9	45583,5	20467,8	45583,5	13933,4	1	5492	6136	0,29654396	0,28493274	0,1486513	0,17637278	0,10855996	0,14789266
3	16049,7	260297	89596,7	260297	48497,8	1	5492	6136	0,19010393	0,18266039	0,1486513	0,17637278	0,00628761	0,04145264
4	11072,1	76125,8	29865,4	76125,8	18632,2	1	5492	6136	0,27556752	0,26477763	0,1486513	0,17637278	0,08840485	0,12691622
5	15618,3	244337	84420,3	244337	45909,6	1	5492	6136	0,19535488	0,18770573	0,1486513	0,17637278	0,01133295	0,04670358
6	12209,2	128154	43510,7	128154	25454,9	1	5492	6136	0,24990262	0,24011765	0,1486513	0,17637278	0,06374487	0,10125133
7	12065,4	121971	41785,3	121971	24592,1	1	5492	6136	0,25288106	0,24297947	0,1486513	0,17637278	0,06660669	0,10422976
8	12731,3	147472	49775,8	147472	28587,4	1	5492	6136	0,23965433	0,23027063	0,1486513	0,17637278	0,05389785	0,09100303
9	12587,5	141289	48050,3	141289	27724,7	1	5492	6136	0,24239214	0,23290125	0,1486513	0,17637278	0,05652847	0,09374085

D: 0,158 h^{-1}

	Gliext	ADP	O	ATP	CO2	XT	Xr	PHB	$Y_{Xr/glu}$	$Y_{PHB/glu}$	$Y_{PHB/glu}$ exp	$Y_{Xr/glu}$ exp	Dif $Y_{PHB/glu}$	Dif $Y_{Xr/glu}$
2	9497,56	39399,9	18407,6	39399,9	12551,2	1	5296	5470	0,30978717	0,27515839	0,19139933	0,22469988	0,08375906	0,08508729
3	15084,4	247631	85449,4	247631	46072,1	1	5296	5470	0,19505066	0,17324742	0,19139933	0,22469988	-0,01815191	-0,02964922
4	10257	69020	27521,4	69020	17108,1	1	5296	5470	0,28685017	0,25478535	0,19139933	0,22469988	0,06338602	0,06215029
5	14666	232152	80429,2	232152	43562	1	5296	5470	0,20061518	0,17818992	0,19139933	0,22469988	-0,01320941	-0,0240847
6	11359,8	119478	40754,8	119478	23724,8	1	5296	5470	0,25900299	0,230051	0,19139933	0,22469988	0,0386567	0,03430311
7	11220,4	113481	39081,5	113481	22888,1	1	5296	5470	0,2622208	0,23290911	0,19139933	0,22469988	0,04150978	0,03752091
8	11866,2	138212	46830,8	138212	26762,8	1	5296	5470	0,24794983	0,22023338	0,19139933	0,22469988	0,02883405	0,02324994
9	11726,7	132215	45157,4	132215	25926,1	1	5296	5470	0,25089942	0,22285326	0,19139933	0,22469988	0,03145393	0,02619954

4.1.2. Ensayo de lote-alimentado

Al igual que la red utilizada para el cultivo continuo, en este caso se agregó una reacción extra por la excreción de ácido cítrico.

ENZIMAS REVERSIBLES

EMP2 EMP4 EMP5 EMP6 EMP7 EMP8 EMP9 VP6 VP7 VP8 VP9 VP10

ENZIMAS IRREVERSIBLES

EMP1 ED1 ED2 EMP10 CPD VP1 CK1 CK2 CK3 CK4 CK5 CK6 CK7 CK8 CK9 CGLX1 CGLX2 GLN3 AD1 AD2 P3HB BIOMASSA BIOTOT OXFAD OXNAD

METABOLISTOS INTERNOS

G6P KDPG2 NADP NADPH PG6 PIR G3P BPG13 PG3 PG2 PEP AcCoA Rbl5P Rb5P X5P S7P E4P F6P DHP F16P OAA Cit KG2 IsoCit SucCoA Suc Fum Mal GLX FAD FADH2 NAD NADH CoASH XR HB Citext

METABOLITOS EXTERNOS

Gliext ADP ATP CO2 XT O

CAT

EMP1 : Gliext + ATP = G6P + ADP .
EMP2 : G6P = F6P .
ED1 : PG6 = KDPG2 .
ED2 : KDPG2 = PIR + G3P .
EMP4 : F16P = G3P + DHP .
EMP5 : DHP = G3P .
EMP6 : G3P + NAD = BPG13 + NADH .
EMP7 : BPG13 + ADP = PG3 + ATP .
EMP8 : PG3 = PG2 .
EMP9 : PG2 = PEP .
EMP10 : PEP + ADP = PIR + ATP .
CPD : PIR + NAD + CoASH = AcCoA + NADH + CO2 .
VP1 : G6P + NADP = PG6 + NADPH .
VP6 : Rbl5P = Rb5P .
VP7 : Rbl5P = X5P .
VP8 : Rb5P + X5P = S7P + G3P .
VP9 : G3P + S7P = E4P + F6P .
VP10 : X5P + E4P = F6P + G3P .
CK1 : OAA + AcCoA = Cit + CoASH .
CK2 : Cit = IsoCit .
CK3 : IsoCit + NADP = KG2 + NADPH + CO2 .

CK4 : KG2 + NAD + CoASH = SucCoA + NADH + CO2 .
CK5 : SucCoA + ADP = Suc + ATP + CoASH .
CK6 : Suc + FAD = Fum + FADH2 .
CK7 : Fum = Mal .
CK8 : Mal + NAD = OAA + NADH .
CK9 : Cit = Citext .
CGLX1 : IsoCit = GLX + Suc .
CGLX2 : GLX + AcCoA = Mal + CoASH .
GLN3 : F16P = F6P .
AD1 : PIR + CO2 + ATP = OAA + ADP .
AD2 : OAA + ATP = PEP + ADP + CO2 .
P3HB : 2 AcCoA + 1 NADPH = HB + 2 CoASH + 1 NADP
BIOMASA : 205 G6P + 71 F6P + 897 Rb5P + 361 E4P + 129 G3P + 1496 PG3 + 519 PEP + 2833 PIR + 3748 AcCoA + 1079 KG2 + 1787 OAA + 3547 NAD + 18225 NADPH + 18485 ATP = 10000 XR + 18485 ADP + 3547 NADH + 18225 NADP + 3748 CoASH .
BIOTOT : 7181 XR + 1793 HB + 1026 Citext = XT .
OXFAD : FADH2 + 2 ADP + O = FAD + 2 ATP .
OXNAD : NADH + 3 ADP + O = NAD + 3 ATP

Tabla A 4.1.2.1 % molar medio de Xr, PHB y Acido cítrico

Tiempo (h)	Xr producido (mol%)	PHB producido (mol%)	Citrico producido (mol%)
2	0,823657	0,053207802	0,12313542
3.5	0,726161	0,148657253	0,1251818
5	0,698208	0,179950514	0,12184149
6.5	0,661429	0,255532893	0,08303775
8	0,680912	0,259120968	0,05996671
Media	0,7181	0,1793	0,1026
Desv	0,0636	0,0852	0,0296

Tabla A 4.1.2.2 Relaciones estequeométricas para cada uno de los MEF

N° ME	Glu_{ext}	ADP	O ´=	ATP	CO_2	XT	XR	P3HB	$Citr_{ext}$
2:	8275,96	7577	11163,5	7576,95	5769,02	1	7181	1793	1026
3:	8730,37	26208	16616,5	26207,8	8495,49	1	7181	1793	1026
4:	8544,03	18568	14380,3	18567,6	7377,41	1	7181	1793	1026
5:	8503,17	18256	13890	18255,6	7132,26	1	7181	1793	1026
6:	8409,99	13877	12771,9	13876,5	6573,22	1	7181	1793	1026
7:	14819,6	253683	89686,9	253683	45030,7	1	7181	1793	1026
8:	9818	68625	29668	68625,2	15021,2	1	7181	1793	1026
9:	14252,8	232711	82885	232711	41629,8	1	7181	1793	1026
10:	10457,2	102278	37338	102278	18856,2	1	7181	1793	1026
11:	10268,2	94153	35070,7	94153,1	17722,6	1	7181	1793	1026
12:	11485,2	140314	49674,3	140314	25024,4	1	7181	1793	1026
13:	11296,3	132190	47407	132190	23890,8	1	7181	1793	1026

Se tranforma 1 mol de Xt de acuerdo a Xt= 7181 XR + 1793 HB + 1026 Citext. Relación obtenida a partir de los datos experimentales, correspondiente al estado *pseudo* estacionario, promedidos (tabla A 4.1.2.1).

4.2. Red metabólica (modelo) de *H. seropedicae* empelado para el análisis por FiatFlux (módulo Netto)

Reacciones

glucose in: GLC + ATP > G6P
zwf: G6P > 6PG + NADPH
zwf2: G6P > 6PG + NADH
gnd: 6PG > P5P + CO2 + NADPH
pgi: G6P = F6P
edd: 6PG > T3P + PYR
fba: F1.6P > F6P + Pi
ald: F1.6P = 2*T3P
tktA: 2*P5P = S7P + T3P
tktB: P5P + E4P = F6P + T3P
tal: S7P + T3P = E4P + F6P
gap-pgk: T3P = PGA + ATP + NADH
PGA > PEP: PGA = PEP
Pyk: PEP > PYR + ATP
PYR-AcCoA: PYR > AcCoA + CO2 + NADH
TCA1: OAA + AcCoA > ICT
TCA2: ICT > OGA + CO2 + NADPH
TCA3: OGA > FUM + CO2 + 1.5*ATP + 2*NADH
TCA4: FUM = MAL
mdh: MAL = OAA + NADH
mae: MAL > PYR + CO2 + NADH
ad2: OAA + ATP > PEP
ad1: PYR + ATP + CO2 > OAA
pck: OAA + ATP > PEP + CO2
pcc: PEP + CO2 > OAA
acetate: AcCoA > Acetate + ATP
gox: ICT + AcCoA > MAL + FUM + NADH
TH: NADH = NADPH
Respiration: O2 + 2*NADH > 2*PO*ATP
PHB1: 2*AcCOA + NADPH > PHB

Relaciones de flujos "*RATIOS*"

Pyr through ED pathway = [edd]/([Pyk]+[edd]+[mae])

PEP through PPP (ub) > ([tktA]+2*[tktB]+3*[tal])/([tal]+[tktA]+[edd])

PYR from MAL (ub) > [mae]/([Pyk]+[mae]+[edd])

PYR from MAL (lb) < [mae]/([Pyk]+[mae]+[edd])

OAA from PEP = [pcc]/([pcc]+[TCA3])

PEP from OAA = [pck]/([pck]+[PGA > PEP])

OAA from GOX = [gox]/([gox]+[TCA3]-[mae]+[pcc])

Biomasa

((-0.26384*mu+0.72754)/0.55)*(144*[P5P]-54*[T3P]+361*[E4P]+(1074-364/3)*[PGA]+722*[PEP]+2550*[PYR]+428*[AcCoA]+1220*[OGA]+1218*[OAA]+9864*[NADPH]-1071*[NADH]+7087*[ATP]-1940*[CO2])

((0.2671*mu+0.04716)/0.20)*(615*[P5P]+(598.3333)*[PGA]+256*[OAA]+1135*[NADPH]-1333*[NADH]+6380*[ATP]+359*[CO2])
(1)*(100*[P5P]+50*[PGA]+50*[OAA]+300*[NADPH]-200*[NADH]+1026*[ATP]+50*[CO2])

(1)*(159*[T3P]+95*[PGA]+332*[PYR]+1557*[AcCoA]+102*[OAA]+3497*[NADPH]-198*[NADH]+1692*[ATP]-562*[CO2])

(1)*(54*[G6P]+25*[P5P]+17*[F6P]+17*[T3P]+25*[PGA]+25*[PEP]+249*[AcCoA]+499*[NADPH]-25*[NADH]+490*[ATP])
(1)*(55*[F6P]+27*[PEP]+82*[PYR]+82*[AcCoA]+27*[OGA]+191*[NADPH]+246*[ATP])(1)*(0.062*[G6P]+0.062*[ATP])(1)*(41*[OGA]+124*[NADPH]+83*[ATP])