



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Evaluación de cepas recombinantes de *Escherichia coli* para la producción de Polihidroxi butirato a partir de glucosa y xilosa.

Informe Técnico de Residencia Profesional

Ingeniería Bioquímica

P R E S E N T A

Eliseo Ronay Molina Vázquez

Asesor Interno

M.C. Ma. Cristina Ventura Canseco

Asesor Externo

Dr. Alfredo Martínez Jiménez

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; Julio 2016

I. RESUMEN	2
II. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DONDE SE DESARROLLÓ LA RESIDENCIA PROFESIONAL	3
III. PROBLEMAS A RESOLVER	4
IV. INTRODUCCIÓN	5
V. ANTECEDENTES	6
5.1 LOS POLIHIDROXIALCANOATOS: UNA EXTENSA FAMILIA DE POLIÉSTERES NATURALES	6
5.2 ESTRATEGIAS DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN POLIHIDROXALCANOATOS	8
5.3 ACERCA DEL R-3-POLIHIDROXIBUTIRATO	10
5.4 MERCADO ACTUAL DEL POLIHIDROXIBUTIRATO	11
5.5 MATERIAL LIGNOCELULÓSICO Y SU POTENCIAL COMO MATERIA PRIMA EN BIOPROCESOS.....	13
5.6 CEPAS RECOMBINANTES DE <i>E. COLI</i> PRODUCTORAS DE POLIHIDROXIBUTIRATO	14
5.7 INGENIERÍA METABÓLICA PARA LA PRODUCCIÓN DE R-3-POLIHIDROXIBUTIRATO EN <i>E. COLI</i>	16
VI. JUSTIFICACIÓN	20
VII. OBJETIVOS	21
VIII. HIPÓTESIS	21
IX. METODOLOGÍA.....	22
9.1 EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LA CEPA MG1655 /pACYCGAPN /pPHBAV SIMULANDO DIFERENTES ETAPAS DE UN PROCESO DE ESCALAMIENTO	22
9.2 TRANSFORMACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>E. COLI</i>	24
9.3 EVALUACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>E. COLI</i> PRODUCTORAS DE PHB Y CINÉTICAS DE CULTIVO	25
9.4 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.....	26
9.5 DETERMINACIÓN DE PESO SECO	27
9.6 EXTRACCIÓN DE PHB.....	27
X. RESULTADOS Y DISCUSIONES	28
10.1 EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LA CEPA MG1655 /pACYCGAPN /pPHBAV SIMULANDO DIFERENTES ETAPAS DE UN PROCESO DE ESCALAMIENTO	28
10.2 EVALUACIÓN CINÉTICA DE CEPAS DE <i>E. COLI</i> MG1655 /pPHBAV, MG1655 Δ ACKA-PTA/pPHBAV, MG1655 Δ ACKA-PTA /pACYCGAPN/pPHBAV, MS01 /pPHBAV Y AV14N1 /pPHBAV.....	33
10.3 ESTRATEGIAS DE CULTIVO	41
10.4 PRODUCCIÓN DE R-3-POLIHIDROXIBUTIRATO A PARTIR DE XILOSA	45
10.5 PRODUCCIÓN DE R-3-POLIHIDROXIBUTIRATO A PARTIR DE MEZCLA GLUCOSA-XILOSA	46
XI. CONCLUSIONES GLOBALES	48
XII. PERSPECTIVAS	49
XIII. REFERENCIAS	50
XIV. APÉNDICES.....	53

I. Resumen

En los últimos años el uso de plásticos ha incrementado significativamente, siendo el petróleo la principal materia para su producción. La limitada futura disponibilidad de este recurso aunado a la preocupación por la conservación del medio ambiente han llevado a la búsqueda de diversas alternativas.

Los bioplásticos surgen como una solución a esta problemática. El R-3-polihidroxitirato que algunos organismos acumulan como fuente de carbono y energía, ha recibido especial atención por sus propiedades comparables con las de plásticos comerciales, siendo sus mayores cualidades su biodegradabilidad y biocompatibilidad.

La principal limitante para una amplia comercialización de PHB es su alto costo de producción, el cual es aproximadamente 10 veces más alto que los polímeros convencionales, una estrategia para reducir su costo es la implementación de residuos lignocelulósicos como materia prima, estos residuos después de tratamientos termo-químicos y enzimáticos se descomponen principalmente a glucosa, xilosa y trazas de algunas sustancias tóxicas para la mayoría de organismos silvestres. Sin embargo, mediante ingeniería genética se han desarrollado cepas recombinantes capaces de utilizar estos desechos y que poseen altos rendimientos y niveles de productividad.

En el presente estudio se evaluaron cinco cepas recombinantes de *E. coli* productoras de polihidroxitirato con la finalidad de identificar estrategias de ingeniería metabólica que favorezcan la producción del polímero con rendimientos cercanos al máximo teórico.

Los resultados obtenidos en este proyecto demuestran que la cepa MS01 transformada con el plásmido de producción que contiene el operón PHB_{BAC} presentó los mejores parámetros cinéticos y los mayores niveles de producción. Además, se optimizaron las condiciones de cultivo y a partir de glucosa se lograron producir hasta 4 g/L de PHB, lo que representa un 80% del peso seco celular, no obstante, la eficiente producción del polímero no se logró utilizando xilosa como fuente de carbono, lo anterior se debe a que las vías metabólicas que intervienen en la asimilación de este azúcar no son capaces de satisfacer la demanda de NADPH requerida para la síntesis del polihidroxitirato.

Por otra parte, se observó que la estrategia de incrementar los niveles de NADPH, expresando simultáneamente el plásmido de producción de PHB en conjunto con el gen gapN que codifica para la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺, no mejora la producción de PHB utilizando glucosa como fuente de carbono, sin embargo, es una prometedora estrategia que debe ser probada empleando xilosa como sustrato.

II. Caracterización del área donde se desarrolló la residencia profesional

El Instituto de Biotecnología (IBt) es una entidad universitaria perteneciente al Subsistema de la Investigación Científica (SIC) fue fundado en 1982 y realiza investigación de excelencia académica para el desarrollo de la biotecnología moderna, generando conocimiento en diversas áreas y disciplinas. Asimismo, participa activamente en la formación de recursos humanos especializados, principalmente a través de su programa de maestría y doctorado en Ciencias Bioquímicas.

El instituto se divide en 5 departamentos, Biología molecular de plantas, Microbiología Molecular, Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Medicina molecular y Bioprocesos e Ingeniería Celular y Biocatálisis.

El presente proyecto de residencia profesional fue desarrollado en el laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas dentro del departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis.

El grupo de investigación trabaja en la caracterización y modificación de las vías metabólicas centrales de la bacteria *E. coli* para analizar y comprender mejor el metabolismo central de carbono en esta bacteria, y poder redirigir el metabolismo celular, hacia la biosíntesis de moléculas específica.

III. Problemas a resolver

- 1.** Familiarizarse con las líneas de investigación del laboratorio, técnicas y protocolos internos.
- 2.** Aprender acerca de temas relacionados a biología molecular y regulación genética.
- 3.** Comprender el metabolismo bacteriano y su relación con las condiciones de su cultivo.
- 4.** Manejo adecuado de materiales y equipos y un correcto desarrollo de técnicas de laboratorio.
- 5.** Formular estrategias adecuadas para enfrentar situaciones inesperadas y tomar decisiones rápidamente.
- 6.** Interpretar adecuadamente la información obtenida durante los experimentos, relacionarla con los antecedentes disponibles y formular conclusiones productivas.

IV. Introducción

En el último siglo el uso de plásticos ha incrementado gradualmente, debido a sus diversas aplicaciones en el ámbito industrial y en las actividades cotidianas de la vida moderna, lo cual ha implicado que su demanda sea cada vez mayor.

El uso indiscriminado de estos polímeros, aunado a su alta persistencia, ha traído consigo diversos problemas medioambientales, debido a que los millones de toneladas de residuos plásticos que se generan anualmente no son gestionados adecuadamente y terminan ocasionando graves daños en una amplia variedad de ecosistemas.

Por otra parte, existe una gran preocupación social, ya que los plásticos son principalmente manufacturados a partir de petróleo, el cual es una materia prima no renovable y la principal fuente de energía del planeta.

La escasez y encarecimiento del petróleo, junto con un aumento de las regulaciones medioambientales, actúan de forma sinérgica para promover el desarrollo de nuevos materiales y productos compatibles con el medioambiente y tratando de generar una independencia de los recursos fósiles. (Remar, 2011)

En este contexto, los bioplásticos surgen como una alternativa que permite sustituir aquellos materiales procedentes de fuentes fósiles por otros que tienen su origen en fuentes renovables, biodegradables y que además son amigables con el medio ambiente: se pueden reusar, reducir y reciclar.

Los bioplásticos constituyen una amplia gama de polímeros biodegradables y se caracterizan por tener diferentes propiedades y aplicaciones que dependerán en gran medida de las materias primas o procesos utilizados durante su síntesis.

Los bioplásticos se pueden clasificar en dos grandes grupos:

Procedentes de recursos renovables: Sus monómeros proceden de la biomasa o mediante la fermentación de recursos renovables, aunque el proceso de polimerización posterior sea por vía química y polímeros obtenidos integralmente mediante biotecnología.

Sintéticos biodegradables: Proviene de la polimerización de monómeros obtenidos de fuentes fósiles pero que son biodegradables o compostables.

V. Antecedentes

5.1 Los polihidroxicanoatos: Una extensa familia de poliésteres naturales

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son poliésteres ópticamente activos, que se acumulan en el citoplasma de numerosos microorganismos, usualmente cuando algún nutriente esencial como Nitrógeno o Fosforo se encuentran en cantidades limitantes y existe un exceso de fuente de carbono. (Byrom, 1991)

Los polihidroxicanoatos son poliésteres de β -, γ -, δ -, y ϵ -ácidos hidroxicanoicos (también conocidos como 3-,4-,5-, y 6- hidroxiácidos o -ácidos hidroxicarboxílicos) que contienen un grupo hidroxilo como grupo funcional, adicionado a un grupo carbonilo (Niaounakis, 2015).

El peso molecular de los PHAs está en el rango de 2×10^5 a 3×10^6 Daltons (Da) ya que son el producto de la polimerización de unidades monoméricas que difieren en el número de átomos de carbono de la cadena principal y en la naturaleza de los radicales sustituidos en la misma. Estas cadenas pueden ser saturadas o insaturadas, con grupos aromáticos y/o alifáticos y pueden presentar ramificaciones (Yoshiharu Doi, 1992)

Como unidad repetitiva, los PHAs están compuestos por ácidos hidroxicanoicos que contienen de 3 (3-hidroxiacetato) a 14 átomos de carbono (3-hidroxitetradecanoato) De acuerdo a dicha longitud son clasificados en PHAs de cadena corta (PHA_{SCL}) a los que contienen entre 3-5 carbonos y de cadena mediana (PHA_{MCL}) a los que contienen de 6-14 carbonos. (Niaounakis, 2015). La fórmula general de estos bioplásticos es representada en la figura 1.

Se han identificado más de 150 ácidos hidroxicanoicos como constituyentes de PHAs bacterianos; estos constituyentes son producidos por microorganismos que crecen en presencia de substratos que poseen una estructura química similar a la del monómero.

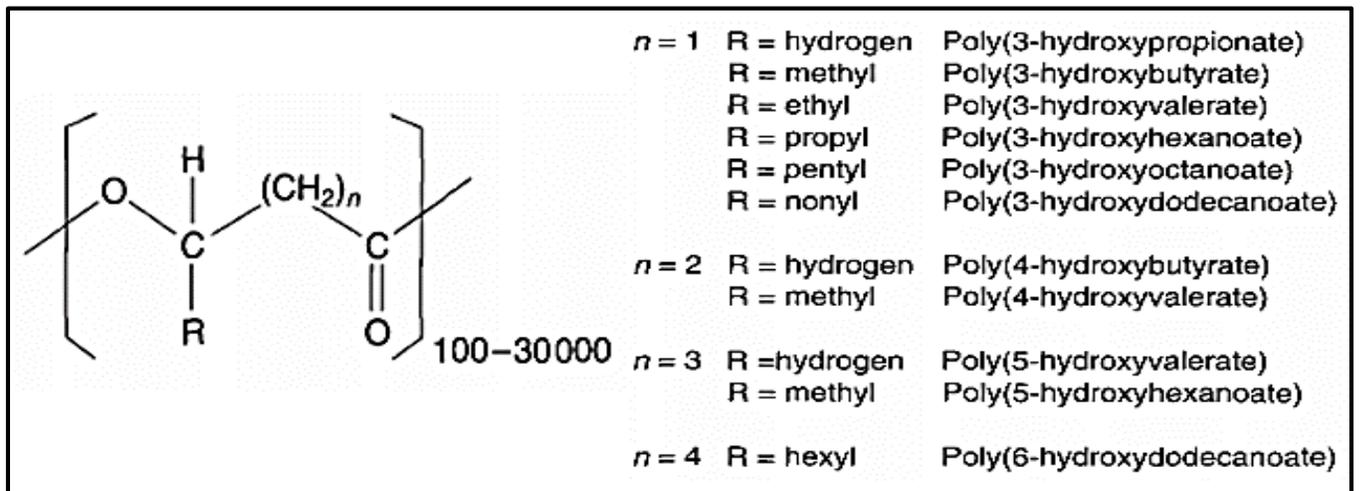


Figura 1. Estructura general de los Polihidroxicanoatos y algunos miembros representativos (Lee, 1996)

En general, las propiedades de estos polímeros varían gradualmente dependiendo de su composición, los que están compuestos por cadenas de una pequeña longitud, como el 3-polihidroxitirato, son quebradizos y mientras mayor es la longitud de la cadena, el polímero se vuelve más flexible, ejemplo de este fenómeno es el 3-hidroxiocanoato que es un elastómero.

Es importante resaltar que los ácidos 3-hidroxicanoicos siempre se encuentran en configuración D (-), esto se debe a la estereo especificidad de la enzima polimerizante; Solo en un caso se ha descrito una pequeña proporción del monómero en configuración L (+). (Haywood, 1991)

La composición y el peso de estos polímeros están determinados por el microorganismo, la fuente de carbono y el medio de cultivo empleado durante su biosíntesis. (K Sudesh, 2010).

Aunque una gran variedad de polihidroxitiratos han sido descritos en la literatura, en realidad solo algunos han sido producidos en cantidades suficientes para caracterizarlos y se han desarrollado muy pocos procesos para su producción a gran escala. Esto se debe principalmente a que los substratos (frecuentemente análogos de los monómeros) son costosos o tóxicos para las células, otros factores son la dificultad para cultivar la(s) bacteria(s) que los sintetizan e incluso por los bajos niveles de producción por dichos microorganismos. (Dawes, 1990)

Dentro de la gran variedad de polihidroxicanoatos los únicos prometedoros para ser producidos a escala industrial son los polímeros: R-3-polihidroxitirato (P3HB), 4-polihidroxitirato, 3-polihidroxivalerato y el copolímero 3-hidroxitirato-co-3-hidroxivalerato.

Algunas de las principales aplicaciones de estos polímeros son detalladas en la tabla 1.

Tabla 1. Aplicaciones potenciales de los Polihidroxicanoatos

Aplicaciones	ejemplos
Empaque en la industria	Materiales que se utilizan para empacar o son utilizados por cortos periodos de tiempo; p. ej. utensilios de comida, films, y consumibles diarios.
Impresión fotográfica	Son poliésteres en los que se puede imprimir fácilmente.
Coopolimerización	Pueden ser polimerizados con otros polímeros para mejorar sus propiedades
Industria Textil	Pueden ser procesados para obtener fibras
Industria de químicos finos	Pueden ser procesados para obtener sus monómeros con centro quiral R y ser utilizados como precursores de algunos antibióticos.
Biomateriales para implantes	Ya que poseen biodegradabilidad y biocompatibilidad, pueden ser utilizados para construir implantes o como matrices para administración de medicamentos.
Médicas	El R3HB posee efectos terapéuticos contra la enfermedad de Alzheimer y osteoporosis.
Aditivos para alimentos	Pueden ser suplementados en alimentos para obtener cuerpos cetónicos.
Aditivos biocombustibles	Pueden ser hidrolizados para formar hidroxialcanoatos-metil-esteres que es un biocombustible.
Purificación de proteínas	Gránulos de PHAs ligados a proteínas recombinantes pueden emplearse para purificarlas.
Suministración específica de medicamentos	Pueden ayudar para alcanzar tejidos específicos.

5.2 Estrategias de cultivo para la producción Polihidroxicanoatos

La síntesis de PHAs ha sido y continúa siendo investigada básicamente en cultivo discontinuo (por lotes) debido a su fácil manipulación y a que es muy conveniente para experimentos de crecimiento y selección de microorganismos productores (Bello et al., 2009)

Las bacterias empleadas para producir PHB, se pueden dividir en dos grandes grupos de acuerdo con las condiciones de cultivo requeridas para la síntesis del polímero.

El primer grupo de bacterias requiere de limitación en el medio de cultivo de uno de los nutrientes esenciales como: N, P, Mg, K, O y S y de un exceso de la fuente de carbono para sintetizar eficientemente PHAs. (Lee, S. Y., 1996)

Las células de este grupo son cultivadas hasta una concentración deseada, sin limitación de ningún nutriente esencial y posteriormente, un nutriente esencial se limita en el medio para inducir la acumulación de PHAs en la célula. Durante este estadio de limitación de un nutriente esencial, la concentración residual celular (definida como la concentración celular menos la concentración de PHAs) debe permanecer casi constante y la concentración celular incrementa sólo por el aumento de la concentración intracelular de PHAs.

Para obtener altas productividades con las bacterias del primer grupo, es necesario que los medios de cultivo sean suplementados con una relación óptima entre las fuentes de carbono y los nutrientes esenciales. Una limitación prematura de algún nutriente esencial puede dar como resultado una baja concentración celular y por tanto un bajo rendimiento del polímero y una baja productividad en el proceso. Si la limitación de nutriente se demora en tiempo, las células no tendrán la capacidad de acumular mucho polímero y tiene como resultado un bajo contenido de PHAs en las células y una baja productividad del proceso.

El segundo grupo de bacterias no requiere de limitación de nutrientes para la síntesis de PHAs y puede acumular el polímero durante su crecimiento.

En este grupo la producción de PHAs no es dependiente de la limitación de nutrientes esenciales en el medio de cultivo. El crecimiento celular y la acumulación de PHAs necesitan estar balanceados para evitar una acumulación incompleta del polímero en las células o una prematura terminación de la fermentación a bajas concentraciones celulares. Como los PHAs se acumulan en el citoplasma, la concentración celular residual determina la cantidad de PHAs que potencialmente pueden producirse.

Un alto contenido de PHAs con una baja concentración celular residual resultará en una baja acumulación de PHAs y en una baja productividad del proceso. También una concentración celular residual alta con un bajo contenido de PHA puede reducir la concentración final de PHA, el rendimiento y la productividad.

Una concentración celular residual alta con un elevado acumulado intracelular de PHAs brindará los mejores resultados en términos de rendimiento y productividad (Lee, S. Y., 1996)

5.3 Acerca del R-3-Polihidroxiбутирато

El R-3-Polihidroxiбутирато (R3PHB ó PHB) fue descrito por primera vez en 1923, está compuesto por cadenas de ácido 3-hidroxiбутанóico, su peso molecular varía entre 60,000 y 250,000 Da, y su longitud depende de diversos factores como la especie productora, nutrientes empleados para su producción y el método de extracción.

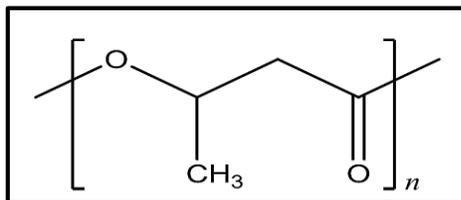


Figura 2. Estructura química del R-3-polihidroxiбутирато

Respecto a su función biológica en microorganismos que lo producen de forma natural, constituye un material de reserva de carbono y energía y generalmente su producción no está asociada al crecimiento. Interviene como regulador de los equivalentes de reducción intracelulares, está involucrado en procesos de diferenciación celular, puede servir como fuente de carbono y energía para la formación de esporas y actúa como protección respiratoria en ausencia de una fuente de carbono exógena. (Espín, 2004). Bajo condiciones limitadas de nitrógeno y oxígeno, el PHB puede constituir hasta el 88 % de la biomasa de algunas especies. (Lee and Wang, 1997). Las especies más estudiadas son: *Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes latus*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas oleovorans*, *Azotobacter vinelandii*; *Ralstonia eutropha*.

El polihidroxiбутирато ha recibido gran atención debido a que sus propiedades mecánicas son comparables a las de plásticos altamente comercializables como lo son el polipropileno (PP) y el polietileno (PE). (Yu, 2001)

Dentro de estas características se encuentran su estructura, puesto que es ópticamente activo, con el centro quiral del monómero siempre en la configuración R, posee una configuración helicoidal compuesta de hélices compactas con doble giro hacia la derecha con repetición cada 0.596nm (Dawes, 1990). Dicha configuración en el espacio le confiere un grado de cristalinidad y una temperatura de fusión similar a las de otros termoplásticos fósiles como el PP y PE. En contraste, sus propiedades químicas son completamente diferentes. El PHB es más rígido y quebradizo, posee menor resistencia a los solventes, pero mayor resistencia a los rayos UV y como principal característica se destaca su capacidad por degradarse completamente a dióxido de carbono y agua por la acción de bacterias aerobias presentes en el medio ambiente.

Es importante destacar que las propiedades del polihidroxiбутирато y en general de los bioplásticos puede ser mejorada al mezclarlos con otros polímeros

sintéticos o naturales, un ejemplo claro de estas mejoras es el copolímero de PHB-co-HV en el cual unidades monoméricas de 3-hidroxivalerato son incorporadas en la cadena principal de 3-polihidroxibutirato mejorando significativamente su flexibilidad y dureza, además de permitir que su procesamiento se realice a menores temperaturas. En la tabla 2 se hace una comparación entre las propiedades físico-mecánicas de estos polímeros.

Tabla 2. Propiedades físico-mecánicas de algunos polímeros

Parámetro	P3HB ¹	P(3HB-co-3HV) ¹	PP ²	LDPE ²
Tm (°C)	175	130	170	110
Tg (°C)	-5	0	-15	-120
Cristalinidad (%)	80	52	75	75
Extensión de ruptura	7	50	425	600

P3HB (poli-3-Hidroxibutirato), p(3HB-co-3HV) (R-3-polihidroxibutirato-co- R-3-Hidroxivalerato) conteniendo 20% de 3HV; PP (polipropileno) y LDPE (Polietileno de baja densidad). 1 (Vegt, 2002); 2 (Niaounakis, 2015). Tm (temperatura de fusión), Tg (Temperatura de transición vítrea)

En conjunto, el PHB posee características y propiedades que lo vuelven un polímero interesante con gran potencial para diversas aplicaciones, particularmente en el área biomédica donde la biodegradabilidad y biocompatibilidad juegan papeles importantes. (Holmes, 1985)

Algunos ejemplos de las aplicaciones del PHB son: material de envase y embalaje, bolsas para compras, bolsas para basura, contenedores de productos cosméticos o alimenticios, pañales y artículos desechables en general; mientras que en el área biomédica y farmacéutica puede ser utilizado como material de sutura bioabsorbible, placas biodegradables para la fijación de cartílagos o huesos, microesferas y microcápsulas para la administración de medicamentos y una infinidad de dispositivos biocompatibles. (Bonartsev, 2007)

5.4 Mercado actual del Polihidroxibutirato

En 2014 la producción mundial de plásticos alcanzo los 260 millones de toneladas de las cuales el polipropileno conforma el 19% lo cual representa cerca de 50 millones de toneladas. (PlasticsEurope, 2015). En la actualidad los bioplásticos disponibles a nivel comercial cubren aproximadamente un 5% del mercado actual de los materiales plásticos, sin embargo, el número de empresas que producen, procesan o utilizan este tipo de materiales está en constante crecimiento. (Remar, 2011). Algunos datos de la producción industrial de polihidroxibutirato y otros polihidroxicanoatos se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Producción industrial de polihidroxicanoatos (Chen, 2009)

Compañía, País	Tipo de PHAs	Producción (ton/año)	Aplicaciones
ICI, UK	PHBV	300	Embalaje
Chemie Linz, Austria	PHB	20–100	Empaque y suministración de medicamentos
btF, Austria	PHB	20–100	Empaque y suministración de medicamentos
Biomers, Alemania	PHB	ND	Empaque y suministración de medicamentos
BASF, Alemania	PHB, PHBV	Escala piloto	ND
Metabolix, USA	Diversos PHAs	ND	Embalaje
Tepha, USA	Diversos PHAs	ND	Implantes biomédicos
ADM, USA (con Metabolix)	Diversos PHAs	50 000	Materias primas
P&G, USA	Diversos PHAs	ND	Embalaje
Monsanto, USA	PHB, PHBV	ND	Materias primas
Meredian, USA	Diversos PHAs	10 000	Materias primas
Kaneka, Japón (con P&G)	Diversos PHAs	ND	Embalaje
Mitsubishi, Japón	PHB	10	Embalaje
Biocycles, Brasil	PHB	100	Materias primas
Bio-On, Italia	PHAs	10 000	Materias primas
Zhejiang Tian An, China	PHBV	2000	Materias primas
Jiangmen Biotech Ctr, China	PHBHHx	ND	Materias primas
Yikeman, Shandong, China	PHAs	3000	Materias primas
Tianjin Northern Food, China	PHB	Escala piloto	Materias primas
Shantou Lianyi Biotech, China	Diversos PHAs	Escala piloto	Embalaje
Jiang Su Nan Tian, China	PHB	Escala piloto	Materias primas
Shenzhen O'Bioer, China	Diversos PHAs	ND	Empaque y suministración de medicamentos
Tianjin Green Bio-Science	P3HB4HB	10 000	Materias primas y Embalaje
Shandong Lukang, China	Diversos PHAs	Escala piloto	Materias primas

ND - Datos no disponibles

A pesar de las diversas aplicaciones que poseen los polihidroxicanoatos y de las ventajas que presentan frente a los polímeros de origen fósil, su producción a grandes escalas y su distribución comercial se ha visto obstaculizada debido a sus altos costos de producción.

El costo de producción del polihidroxicanoato es afectado por diversos factores como lo son la capacidad de producción y acumulación de las cepas utilizadas, la productividad y el rendimiento del cultivo, el costo de la fuente de carbono

utilizada como materia prima y los costos generados durante el proceso de recuperación del polímero.

Con el objetivo de expandir el mercado del PHB, se han realizado grandes esfuerzos para reducir su costo, para ello se han construido mejores cepas productoras, desarrollado mejores estrategias de cultivo y diseñando procesos de recuperación más económicos, sin embargo, el precio actual del PHB varía en el intervalo de 5-10 USD /Kg. (Bello et al., 2009) (Choi and Lee, 1997)

Lo anterior sugiere que los costos de producción de polihidroxibutirato, y en general de los polihidroxialcanoatos, pueden ser reducidos significativamente desarrollando bioprocesos en los cuales se utilicen materias primas de menor costo, como trigo, almidón y desechos agroindustriales. (Kim B. S., 2000)

5.5 Material lignocelulósico y su potencial como materia prima en bioprocesos

Una amplia variedad de desechos agroindustriales, forestales, municipales están conformados por biomasa lignocelulósica, anualmente se generan 80,000 millones de toneladas, lo que lo vuelve un abundante material con gran potencial para la producción de una amplia gama de productos químicos, biocombustibles y biomateriales. (Obruca S. et al., 2015)

La lignocelulosa está compuesta por celulosa (40-80%), hemicelulosa (10-40%) y lignina (5-25%) y ese contenido depende del origen de la biomasa utilizada. La celulosa es la estructura dominante de la pared celular de las plantas y está conformada por un polímero lineal de β -4-D-glucopiranosas. Debido a que posee cierto grado de cristalinidad funciona como un componente de soporte de carga rígido de la pared celular. Por otra parte, en la hemicelulosa generalmente la cadena principal está compuesta por xilanos; y se encuentra asociada a otros componentes como celulosa, proteínas de la pared celular, lignina y otros compuestos fenólicos.

La celulosa y hemicelulosa pueden ser hidrolizadas a azúcares para posteriormente ser utilizados en bioprocesos. La celulosa puede ser hidrolizada a glucosa mediante la acción de celulasas, este proceso generalmente se realiza a 50°C y se pueden obtener rendimientos cercanos al 100%. Por otra parte, la hemicelulosa es hidrolizada mediante tratamientos termo-químicos, utilizando ácidos concentrados a temperaturas moderadas o ácidos diluidos a temperaturas elevadas. Los rendimientos alcanzados con estos tratamientos son bastante altos e inclusive equiparables con los obtenidos en celulosa mediante hidrólisis enzimática, sin embargo, como producto secundario se producen pequeñas cantidades de compuestos altamente tóxicos como el furfuraldehído (FH), 5-hidroximetil-2-furfuraldehído (HMF). (Wyman C. et al., 2004)

El jarabe hemicelulósico que resulta del proceso de hidrolizado se compone por una mezcla de azúcares principalmente por glucosa y xilosa y trazas de arabinosa, galactosa y manosa, además contienen otras sustancias como, FH, HMF, ácidos glucorónico, ferúlico, fórmico, acético, entre otros.

Debido a la compleja composición de estos hidrolizados lignocelulósicos, la mayoría de organismos silvestres difícilmente pueden crecer adecuadamente o asimilar ese rango de fuentes de carbono, lo que ha dificultado el empleo de estos hidrolizados para la producción industrial de compuestos de interés.

5.6 Cepas recombinantes de *E. coli* productoras de polihidroxitirato

Entre los organismos productores de PHAs se pueden encontrar alrededor de 300 especies, no obstante, pocas de estas bacterias tienen un potencial de producción que pueda ser llevado a escala industrial. Por tanto, existen diferentes investigaciones para modificar genéticamente algunas bacterias con el fin de maximizar la productividad y rendimientos, así como parámetros cinéticos y la capacidad de utilizar fuentes de carbono baratas.

Lo anterior se ha logrado mediante la clonación de genes provenientes de cepas productoras en cepas no productoras de PHB o mediante la interrupción o eliminación de genes no deseados en cepas productoras nativas. (Andler y Diaz-Barrera, 2013).

Se ha demostrado que cepas recombinantes de *E. coli* que expresan los genes para la biosíntesis de PHB poseen varias ventajas sobre las bacterias productoras naturales de PHB. (Rui L., 2007). Dentro de estas ventajas se incluyen el amplio conocimiento de su genética y vías metabólicas, la disponibilidad de diversos plásmidos y cepas mutantes que facilitan su manipulación genética y la modulación del nivel de expresión de genes heterólogos, la tecnología de su cultivo, su capacidad por crecer en medios minerales simples y de utilizar un amplio rango de fuentes de carbono, su corto tiempo de duplicación, la facilidad de lisis para la recuperación del polímero y la ausencia de un sistema de depolimerasas que degraden el polímero sintetizado. En conjunto, estas características favorecen una acumulación de grandes cantidades de PHB con altos niveles de productividad.

En la tabla 4 se presenta una revisión bibliográfica de las cepas recombinantes de *E. coli* productoras de R-3-polihidroxitirato.

Tabla 4. Cepas recombinantes de *E. coli* productoras de R-3-polihidroxibutirato a partir de Glucosa y Xilosa

Microorganismo fuente de los genes expresados	Tipo de cultivo	Fuente de carbono	Medio de cultivo	PHB % (p/p)	Producción (g/L)	Productividad (g/Lh)	Y _{PHB/Glc} (g/g)	Referencia
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Lote alimentado	Glucosa	Mineral + Vitamina B1	73	149	3.4	0.28	Wang and Lee (1997)
<i>Ralstonia eutropha</i>	Lote	Melaza de remolacha	Complejo	80	31.6	1	ND	Fang Liu et al. (1998)
<i>Alcaligenes latus</i>	Lote alimentado	Suero de leche	Mineral	80	96.2	2.57	ND	Woo Suk et al. (2000)
<i>Ralstonia eutropha</i>	Lote	Glicerol	Complejo	59	3	ND	ND	Horng et al. (2010)
<i>Alcaligenes latus</i>	Lote alimentado	Glucosa	Mineral + Vitamina B1	73	141.6	4.63	ND	Choi et al. (1998)
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Lote	Glucosa	Mineral + Vitamina B1	84	ND	ND	0.36	Centeno L. (2013)
<i>A. eutrophus</i>	Lote	Xilosa	Mineral + hidrolizado de peptona de soya	74	4.4	ND	0.226	Sang Yup Lee (1998)
<i>Pseudomonas sp.</i>	Lote	Xilosa	Complejo	59	4.1	0.085	0.21	Nduko J. et al, (2013)
<i>Pseudomonas sp, Streptomyces y Bacillus subtilis</i>	Lote	Xilosa	Complejo	46	3.3	ND	ND	Salamanca-Cardona L. et al, (2014)

ND. Datos no disponibles

5.7 Ingeniería metabólica para la producción de R-3-Polihidroxitirato en *E. coli*

La vía de síntesis del P3HB en la mayoría de los organismos incluye 3 reacciones, catalizadas por 3 distintas enzimas, cuyos genes codificantes se encuentran en un mismo operón permitiendo su expresión de forma coordinada (figura 3).

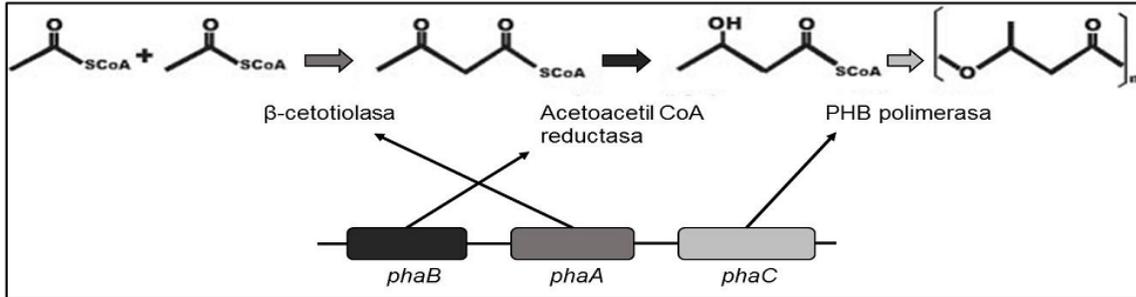


Figura 3. Esquema del Operón PHB_{BAC} de *Azotobacter sp.* (Benítez, 2016)

La primera reacción de síntesis consiste en la condensación de 2 moléculas de acetil-CoA para la formación del acetoacetyl-CoA, catalizada por una β-cetoacil-CoA tiasa (codificada por el gen *phaA*). La segunda reacción es la reducción del acetoacetyl-CoA a R-3-hidroxitirato-CoA, catalizada por la acetoacetyl-CoA deshidrogenasa dependiente de NADPH (codificada por el gen *phaB*). Finalmente se polimerizan moléculas de R-3-hidroxitirato-CoA mediante la enzima polihidroxitirato sintasa (codificada por el gen *phaC*). La vía metabólica para la producción de polihidroxitirato en *E. coli* se detalla en la figura 5.

En el año 2013 en el laboratorio de vías metabólicas del Instituto de Biotecnología-UNAM, se generó una cepa derivada de *E. coli* MG1655 con una capacidad mejorada para la producción de PHB. Para ello, con el fin de incrementar los niveles de NADPH, se realizó la expresión en plásmidos (Figura 4) del gen que codifica para la enzima Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ de *Streptococcus mutans* (*gapN*) y del operón codificante de la vía de síntesis de P3HB (*phaBAC*) de *Azotobacter vinelandii* (PHBA_v) (Tabla 5). Además, para incrementar la disponibilidad de acetil-CoA para la síntesis de PHB, se interrumpió la principal vía de producción de ácido acético (*ackA-pta*) (Centeno S. G., 2013).

Tabla 5. Vectores y plásmidos utilizados en este estudio

Plásmido	Descripción	Referencia
pTrc99A	Vector de alto número de copias, inducible por IPTG, diseñado para la expresión de proteínas bajo el promotor híbrido <i>trp/lac</i> . Amp ^r	(Nie, L. et al., 1998)
pAcyc184	Vector diseñado con un origen de replicación P15A para coexistir en células con plásmidos conteniendo el origen de replicación ColE1, p. ej. pBR322, pUC19 y pTrc99A). Tc ^r y Cm ^r	(Chang A. and Cohen S., 1978)
pACYC <i>gapN</i>	Derivado del vector pAcyc184 con un promotor constitutivo <i>trc</i> y expresando el gen <i>gapN</i> de <i>S. mutans</i> (Figura 5A)	(Centeno S. G., 2013)
pPHB _{Av}	Plásmido derivado de pTrc99A, diseñado para expresar el operón PHB _{BAC} de <i>A. vinelandii</i> (Figura 5B)	(Centeno S. G., 2013)

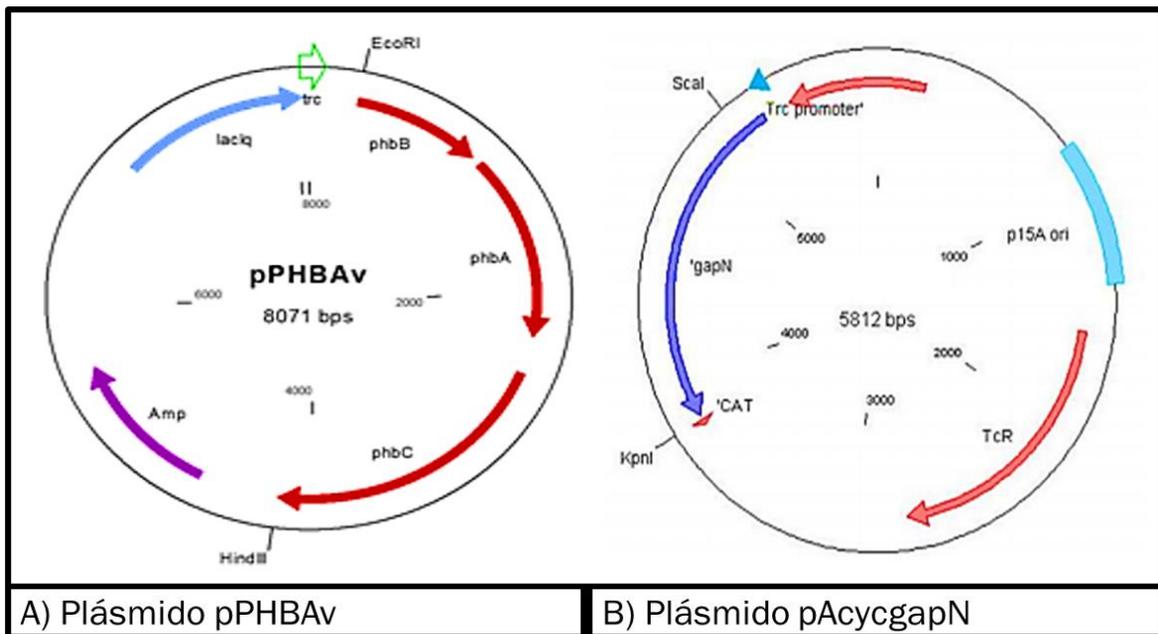


Figura 4. Estructura de los plásmidos utilizados en este estudio

Con la finalidad de llevar el proceso a una mayor escala y de producir polihidroxiacetato a partir de glucosa y xilosa, en el presente proyecto se realizaron pruebas de la estabilidad de la cepa MG1655 pACYCgapN / pPHB_{AV}. Se evaluaron cinéticamente diferentes cepas de *E. coli* (Tabla 6), y además se determinaron las modificaciones genéticas y condiciones de cultivo que favorecerían la acumulación del polímero a nivel de fermentador de 3.5 L.

Tabla 6. Genotipo de las cepas relacionadas con este proyecto

Cepa	Genotipo	Referencia
MG1655	<i>E. coli</i> K12 F-, <i>lambda</i> -, <i>ilvG</i> , <i>rfb-50</i> , <i>rph-1</i>	(Jensen, 1993)
**MG1655 /pPHB _{AV}	MG1655 /pPHB _{AV}	(Centeno S. G., 2013)
**MG1655 Δ <i>ackA-pta</i> /pPHB _{AV}	MG1655 Δ <i>ackA-pta</i> /pPHB _{AV}	
**MG1655 Δ <i>ackA-pta</i> /pPHB _{AV} /pACYCgapN	MG1655 Δ <i>ackA-pta</i> /pPHB _{AV} /pACYCgapN	
JU15	MG1655 Δ <i>pflB</i> , Δ <i>adhE</i> , Δ <i>frdA</i> , Δ <i>xyIFGH</i> , Δ reg 27.3kb, <i>gatC</i> S184L, Δ <i>midarpA</i>	(Utrilla et al., 2012)
MS01	JU15 Δ <i>ldhA</i>	(Fernández-Sandoval et al, 2012)
**MS01/pPHB _{AV}	MS01/pPHB _{AV}	Este estudio
AV11	MS01 Δ <i>poxB</i>	(Benítez, 2016)
AV14	AV11 Δ <i>pta</i>	
AV14N1	AV14 <i>gapA-gapN</i> _{op}	
**AV14N1/pPHB _{AV}	AV14N1/pPHB _{AV}	Este estudio

** Cepas utilizadas en los experimentos realizados en este estudio. *pflB* (piruvato formato liasa), *adhE* (alcohol-aldehído deshidrogenasa), *frdA* (fumarato reductasa), *xyIFGH* (transportador de xilosa dependiente de ATP), *gatC* (galactitol permease componente del sistema PTS para transporte de galactitol), *ldhA* (lactato deshidrogenasa), *poxB* (piruvato oxidasa), *pta* (fosfato acetil transferasa)

VI. Justificación

En los últimos años el uso de plásticos ha incrementado significativamente y sus aplicaciones son indispensables para la vida del ser humano, sin embargo, estos no son biodegradables y constituyen un problema de contaminación, además la principal materia prima para su producción industrial es el petróleo, un recurso no renovable, que también es utilizado como la principal fuente de energía en el mundo. La limitada futura disponibilidad de petróleo aunado a la preocupación por la conservación del medio ambiente han llevado a la búsqueda de alternativas. Los bioplásticos surgen como una solución a esta problemática. El R-3-polihidroxibutirato ha recibido especial atención, por sus propiedades comparables con las de plásticos comerciales tales como el polipropileno y el polietileno, siendo sus mayores cualidades su biodegradabilidad, biocompatibilidad y capacidad de ser producido a partir de recursos renovables.

La principal limitante para una amplia comercialización de PHB es su alto costo de producción, el cual es aproximadamente 10 veces más alto que los polímeros convencionales.

Una estrategia para reducir los costos de producción es la implementación de materias primas más baratas. Los residuos lignocelulósicos, provenientes de las agroindustrias, son una atractiva alternativa.

Mediante tratamientos termo-químicos, y enzimáticos la lignocelulosa puede ser hidrolizada a sus azúcares componentes, de los cuales glucosa y xilosa, forman más del 90%. Los hidrolizados obtenidos constituyen una materia prima económica para el desarrollo de procesos biotecnológicos, pero, debido a lo difícil que resulta la asimilación de estos compuestos, su utilización a nivel industrial se ha visto obstaculizada.

Por otra parte, mediante ingeniería genética se han desarrollado cepas recombinantes capaces de utilizar estos desechos y que poseen niveles de productividad y rendimientos superiores al de las cepas silvestres.

En el presente estudio se evaluarán cepas recombinantes de *E. coli* productoras de polihidroxibutirato con la finalidad de identificar estrategias de ingeniería metabólica que favorezcan la producción del polímero con rendimientos cercanos al máximo teórico, además se evaluará el efecto de la fuente de carbono empleada en el proceso, debido a que el interés a mediano plazo es obtener cepas que potencialmente puedan desarrollar el bioproceso a partir de hidrolizados lignocelulósicos.

VII. Objetivos

General

Evaluar cinco cepas de *Escherichia coli* modificadas mediante ingeniería de vías metabólicas para la producción de polihidroxitirato a partir de glucosa, xilosa y mezcla de glucosa-xilosa.

Específicos

Evaluar la estabilidad de la cepa MG1655 /pACYCgapN /pPHB_{AV} simulando diferentes etapas del escalamiento del cultivo.

Transformar las cepas de *E. coli* AV14N1 y MG1655 Δ ackA-pta /pACYCgapN con el plásmido que contiene el operón PHB_{BAC} proveniente de *A. vinelandii*.

Determinar en fermentadores de 3.5 L parámetros cinéticos y estequiométricos con las cepas MG1655 /pPHB_{AV}, MG1655 Δ ackA-pta/pPHB_{AV}, MG1655 Δ ackA-pta /pACYCgapN/pPHB_{AV}, MS01 /pPHB_{AV} y AV14N1 /pPHB_{AV} en medio mineral utilizando Glucosa como fuente de carbono.

Seleccionar la cepa con mayor porcentaje de acumulación de PHB y determinar los parámetros cinéticos y estequiométricos en medio mineral utilizando Xilosa y mezcla de Glucosa-Xilosa como fuente de carbono en fermentadores de 3.5 L.

Aplicar estrategias de cultivo para alcanzar porcentajes de acumulación intracelular de polihidroxitirato cercanos al 80%.

VIII. Hipótesis

La caracterización de cepas de *E. coli* productores de PHB permitirá seleccionar una cepa y condiciones para obtener acumulación intracelular del polímero cercano al 80%.

IX. Metodología

9.1 Evaluación de la estabilidad de la cepa MG1655 /pACYCgapN /pPHBAv simulando diferentes etapas de un proceso de escalamiento

El desarrollo experimental se resume en la figura 6 y se describe a continuación.

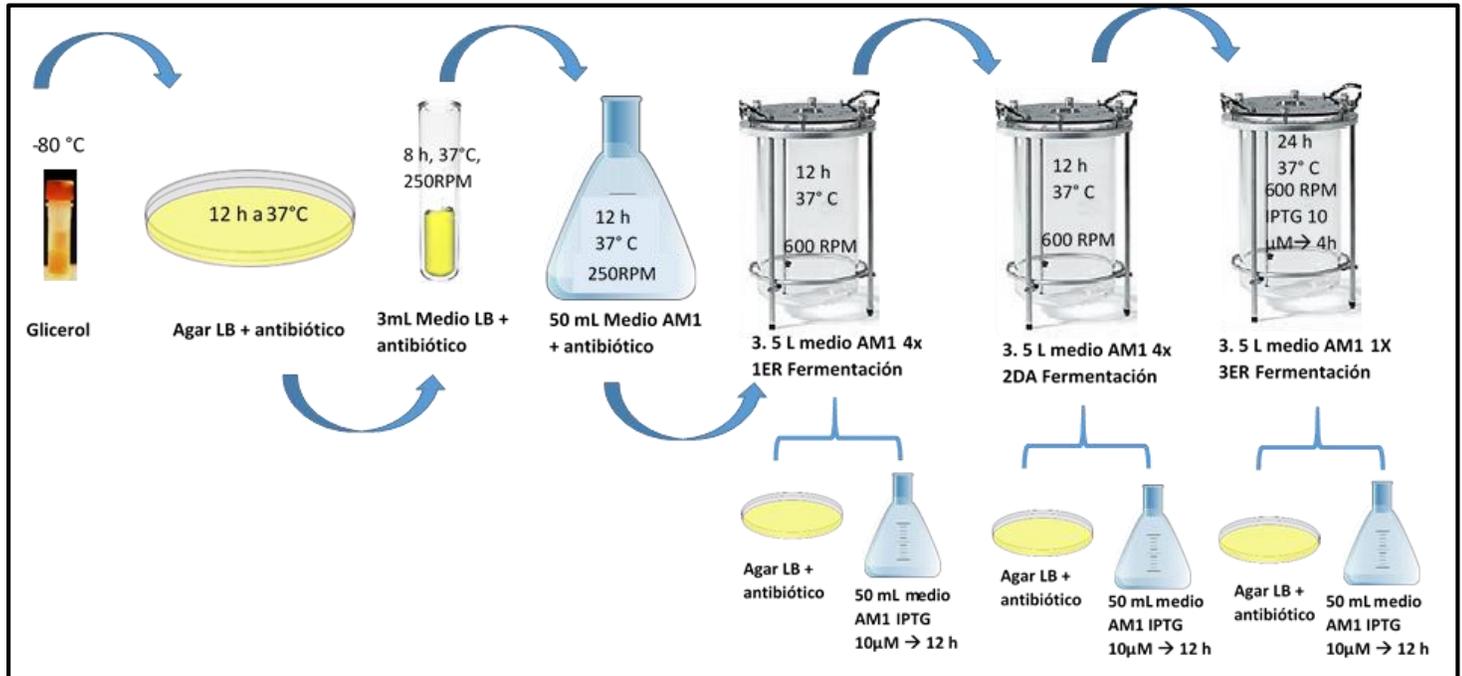


Figura 6. Metodología utilizada para probar la estabilidad de la cepa MG1655 /pAcycgapN /pPHBAv

9.1.1 Reactivación de la cepa MG1655 pACYCgapN/ pPHBAv

- Se inoculó una caja con agar LB (medio Luria Bertani) + Tc (Tetraciclina) $30\mu\text{g}/\text{mL}$ + Cb (Carbenicilina) $100\mu\text{g}/\text{mL}$ a partir del glicerol.
- Se incubó por 24 horas a 37°C .

9.1.2 Preinóculo en tubos de 15 mL

- En 3 mL de medio LB + Tc $30\mu\text{g}/\text{mL}$ + Cb $100\mu\text{g}/\text{mL}$ se resuspendieron 10 colonias aisladas.
- Se incubaron por 10 horas a 37°C y 250 rpm.

9.1.3 Inóculo en matraz de 500 mL

- Se utilizaron 100 mL de medio AM1 1X con 10 g/L de glucosa + Tc $30\mu\text{g}/\text{mL}$ + Cb $100\mu\text{g}/\text{mL}$
- Se adicionó el volumen de preinóculo en LB necesario para alcanzar una $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0.1$.
- Se incubó por 12 horas a 37°C y 250rpm.

9.1.4 Cultivo en biorreactor de 5 L "Simulación de la primera etapa de escalamiento (3.5 L)"

- A) En esta parte del experimento se buscaba generar biomasa por lo que se utilizaron 3.4 L de medio AM1 4X con 20 g/L de glucosa.
- B) El biorreactor se inoculó con 100 mL del inóculo alcanzando una DO \approx 0.1.
- C) Las condiciones de operación utilizadas fueron: 37°C, 0.8 VVM (\approx 50 Laire/h), 600 rpm y el pH se mantuvo en 7 utilizando NaOH 6M.
- D) Cada dos horas se midió o registró: DO, [glucosa], oxígeno disuelto y consumo de NaOH.
- E) A las 12 horas de cultivo se tomó una alícuota del cultivo para inocular un matraz de 250 mL con 50 mL de medio AM1 a una DO \approx 0.1
- F) Los cultivos en matraces se indujeron con IPTG 10 μ M a las 12 horas.
- G) Los matraces se monitorearon por 36 h.
- H) Se hicieron diluciones para alcanzar densidades ópticas de 0.01 y 0.001.
- I) Con 20 μ L de cada dilución se inocularon las siguientes placas de agar:
 - LB
 - LB + Tc 30 μ g/mL
 - LB + Cb 100 μ g/mL
 - LB + Tc 30 μ g/mL + Cb 100 μ g/mL
- J) Las placas se incubaron por 12 horas a 37 °C y posteriormente se realizó un conteo de las colonias.

9.1.5 Cultivo en biorreactor de 5 L "Simulación de la segunda etapa de escalamiento (35 L)"

- A) Se utilizaron 3.15 L de medio AM1 4X con 20 g/L de glucosa.
- B) El biorreactor se inoculó con 350 mL del cultivo anterior.
- C) Las condiciones de operación utilizadas fueron: 37°C, 50 L aire/hora, 600 rpm y el pH se mantuvo en 7 utilizando NaOH 6M.
- D) Cada dos horas se midió o registró: DO, [glucosa], oxígeno disuelto y consumo de NaOH).
- E) A las 12 horas de cultivo se tomó una alícuota del cultivo para inocular un matraz de 250 mL con 50 mL de medio AM1 a una DO \approx 0.1
- F) Los cultivos en matraces se indujeron con IPTG 10 μ M a las 12 horas.
- G) Los matraces se monitorearon por 36 h.
- H) Se hicieron diluciones para alcanzar densidades ópticas de 0.01 y 0.001.
- I) Con 20 μ L de cada dilución se inocularon las siguientes placas de agar:
 - LB
 - LB + Tc 30 μ g/mL
 - LB + Cb 100 μ g/mL
 - LB + Tc 30 μ g/mL + Cb 100 μ g/mL

- J) Las placas se incubaron por 12 horas a 37 °C y posteriormente se realizó un conteo de las colonias.

9.1.6 Cultivo en biorreactor de 5L "Simulación de la tercera etapa de escalamiento (350 L)"

- A) En esta parte del experimento se simuló un lote de producción, por lo que se utilizaron 3.15 L de medio AM1 1X con Nitrógeno limitado y 45 g/L de glucosa.
- B) El biorreactor se inoculó con 350 mL del cultivo anterior.
- C) Las condiciones de operación utilizadas fueron: 37°C, 50 L aire/hora, 600 rpm y el pH se mantuvo en 7 utilizando NaOH 6M.
- D) Cada dos horas se midió o registró: DO, [glucosa], oxígeno disuelto y consumo de NaOH.
- E) A las 4 horas de cultivo se indujo la producción de PHB con IPTG 10 µM.
- F) A las 12 horas de la fermentación se tomó una alícuota del cultivo para inocular un matraz de 250 mL con 50 mL de medio AM1 a una $DO \approx 0.1$
- G) Los matraces se monitorearon por 36 h.
- H) Se hicieron diluciones para alcanzar densidades ópticas de 0.01 y 0.001.
- I) Con 20 µL de cada dilución se inocularon las siguientes placas de agar:
- LB
- LB + Tc 30 µg/mL
- LB + Cb 100 µg/mL
- LB + Tc 30 µg/mL + Cb 100 µg/mL
- J) Las placas se incubaron por 12 horas a 37 °C y posteriormente se realizó un conteo de las colonias.

9.2 Transformación de las cepas de *E. coli*

9.2.1 Extracción del plásmido pPHB_{AV}

- A) Se extrajo el plásmido PHB_{AV} de la cepa de *E. coli* DH5α donde se encontraba almacenado.
- B) La extracción del plásmido se realizó de acuerdo a lo establecido en el protocolo "Miniprep por lisis alcalina-Extracción de ADN plasmídico de cepas de *E. coli*" que se encuentra en el Anexo 2.

9.2.2 Generación de células electrocompetentes y electrotransformación

- A) Las células electrocompetentes y la electrotransformación se realizaron de acuerdo a lo establecido en el protocolo "Células electrocompetentes de *E. coli* en medio libre de sales y electrotransformación" que se encuentra en el Anexo 1.

B) Se generaron células electrocompetentes de las cepas de *E. coli* AV14N1 y MG1655 $\Delta ackA-ptg / pACYCgapN$.

C) Las células electrocompetentes fueron electrotransformadas con el plásmido ptrc que contenía los genes codificantes del operón PHB_{BAC} de *A. vinelandii*.

9.3 Evaluación de las cepas de *E. coli* productoras de PHB y cinéticas de cultivo

El desarrollo experimental se resume en la figura 7 y se describe a continuación.

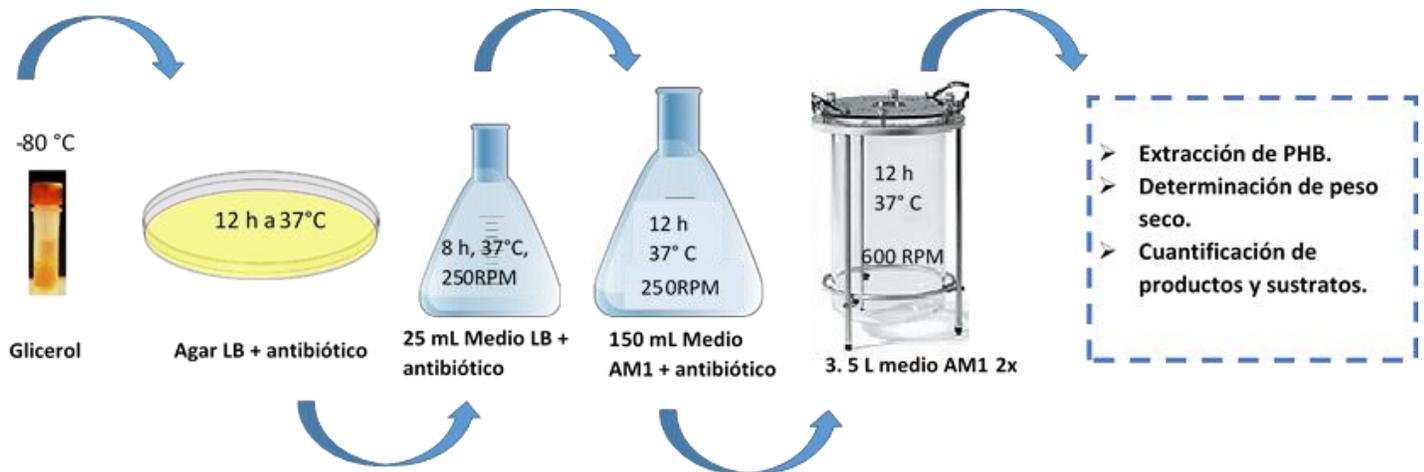


Figura 7. Diagrama de flujo para las cinéticas microbianas

9.3.1 Reactivación de las cepas

- Se inoculó una caja con agar LB + los antibióticos correspondientes a cada cepa a partir de su respectivo glicerol.
- Se incubó por 24 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

9.3.2 Preinóculo en tubos de 15 mL

- En 3 mL de medio LB + antibiótico(s) se resuspendieron 10 colonias aisladas.
- Se incubaron por 10 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 250 rpm.

9.3.3 Inóculo en matraces de 500 mL

- Se utilizaron 6 matraces de 500 mL con 150 mL de medio AM1 1X con 10 g/L de glucosa + antibiótico(s).
- Se adicionó el volumen de preinóculo en LB necesario para alcanzar una $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0.1$.
- Se incubó por 12 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 250 rpm.

9.3.4 Cultivo en biorreactor de 5L

- A) Se utilizaron 3.2 L de medio AM1 2X con 30 g/L de fuente de carbono (glucosa, xilosa o mezcla) manteniendo una relación C/N \approx 20, con lo que se limitaba el crecimiento a 5 g/L de biomasa.
- B) El biorreactor se inoculó con aproximadamente 300 mL del inóculo alcanzando una DO \approx 0.2.
- C) Las condiciones de operación utilizadas fueron: 37°C, 0.8 vvm (\approx 50 L aire/h), 600 rpm y el pH se mantuvo en 7 utilizando NaOH 6M.
- D) Cada dos horas se monitorearon (DO_{600nm}, [glucosa], oxígeno disuelto y consumo de NaOH) y se almacenaban 1.5 mL de sobrenadante para futuros análisis.
- E) La espuma fue controlada con antiespumante a base de silicón (Droguería Cosmopolita®) al 20%.
- F) Cuando los cultivos alcanzaron 6 DO_{600nm} (8-12 horas) fueron inducidos mediante la suplementación de IPTG hasta alcanzar una concentración de 10 μ M. De ser necesario algunos cultivos fueron inducidos a diferentes tiempos y/o concentraciones.
- G) Los cultivos se detuvieron alrededor de las 32 horas cuando la fuente de carbono se agotaba.
 - H) Se cuantificó la concentración de glucosa en las muestras utilizando un analizador bioquímico (YSI Modelo 2700, YSI Inc., Yellow Springs Instruments, OH, USA).
- I) La concentración de ácidos orgánicos y de ser necesario de xilosa fueron cuantificados mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (ver sección 9.4)
- J) Se determinó la cantidad de Biomasa + PHB obtenida durante la fermentación. (ver sección 9.5.)
- K) Se determinó la cantidad de PHB acumulado durante la fermentación. (ver sección 9.6.)
- L) A partir de la información obtenida durante los cultivos se calcularon los parámetros cinéticos

9.4 Cromatografía líquida de alta resolución

Los sobrenadantes de las muestras analizadas, fueron filtradas manualmente con membranas de 0.45 μ m e inyectadas (20 μ L) de forma automática con ayuda del autoinyector (Waters 717). La determinación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), de azúcares y ácidos orgánicos en muestras de fermentación fue realizada por cromatografía

isocrática con fase móvil de H₂SO₄ 5.0 mM a 0.5 mL/min y usando una columna aminada (Aminex HPX-87H, Biorad) y 50 °C. La detección de los ácidos orgánicos se realizó con un detector de arreglo de diodos a 210 nm (modelo Waters 996, Millipore Co., Milford, MA) y la de azúcares con un detector de índice de refracción (modelo Waters 2410, Millipore Co., Milford, MA). El análisis y procesamiento de datos fueron obtenidos con el sistema Millennium (Versión 3.01 Waters). Para la confirmación de los compuestos analizados por HPLC fueron inyectados estándares compuestos por concentraciones conocidas de ácidos orgánicos y los azúcares correspondientes.

9.5 Determinación de peso seco

- A) Se pusieron a peso constante membranas de 0.45 µm secándolas por 48 horas a 45°C.
- B) Se tomaron muestras del caldo de fermentación con biomasa y se filtraron a través de las membranas.
- C) Se desechó el efluente y las membranas con biomasa se secaron a 45 °C por 48 h.
- D) Las membranas con biomasa fueron pesadas.
- E) Se determinó el peso de biomasa más PHB de acuerdo a la siguiente ecuación.
- F) $[Biomasa + PHB] \text{ g/L} = (P_{final}(g) - P_{inicial}(g)) \times \left(\frac{1}{V_{muestra(L)}}\right)$

9.6 Extracción de PHB

- A) Se cosecho determinado volumen de células, centrifugando a 4000 X g, 30 min.
- B) Las células fueron lavadas dos veces con agua destilada.
- C) Se adicionaron 100 mL de una solución de hipoclorito de sodio al 4 % por cada g de biomasa.
- D) Se agitó y dejó reposar por 15 minutos.
- E) Se recuperaron los gránulos de PHB por centrifugación (3000 x g por 25 minutos).
- F) Se lavaron dos veces los gránulos de PHB con agua destilada.
- G) Los gránulos de PHB se transfirieron a contenedores que previamente habían sido llevados a peso constante.
- H) Los gránulos de PHB fueron secados a 45°C por 72 h.
- I) Se determinó la cantidad de PHB obtenida mediante la siguiente ecuación.
- J) $[PHB \text{ g/L}] = (P_{final}(g) - P_{inicial}(g)) \times \left(\frac{1}{V_{muestra(L)}}\right)$

X. Resultados y discusiones

10.1 Evaluación de la estabilidad de la cepa MG1655 /pACYCgapN /pPHBAV simulando diferentes etapas de un proceso de escalamiento

10.1.1 Cultivo celular y parámetros cinéticos

Todos los experimentos se hicieron por duplicado, los resultados que se presentan a continuación corresponden al valor promedio.

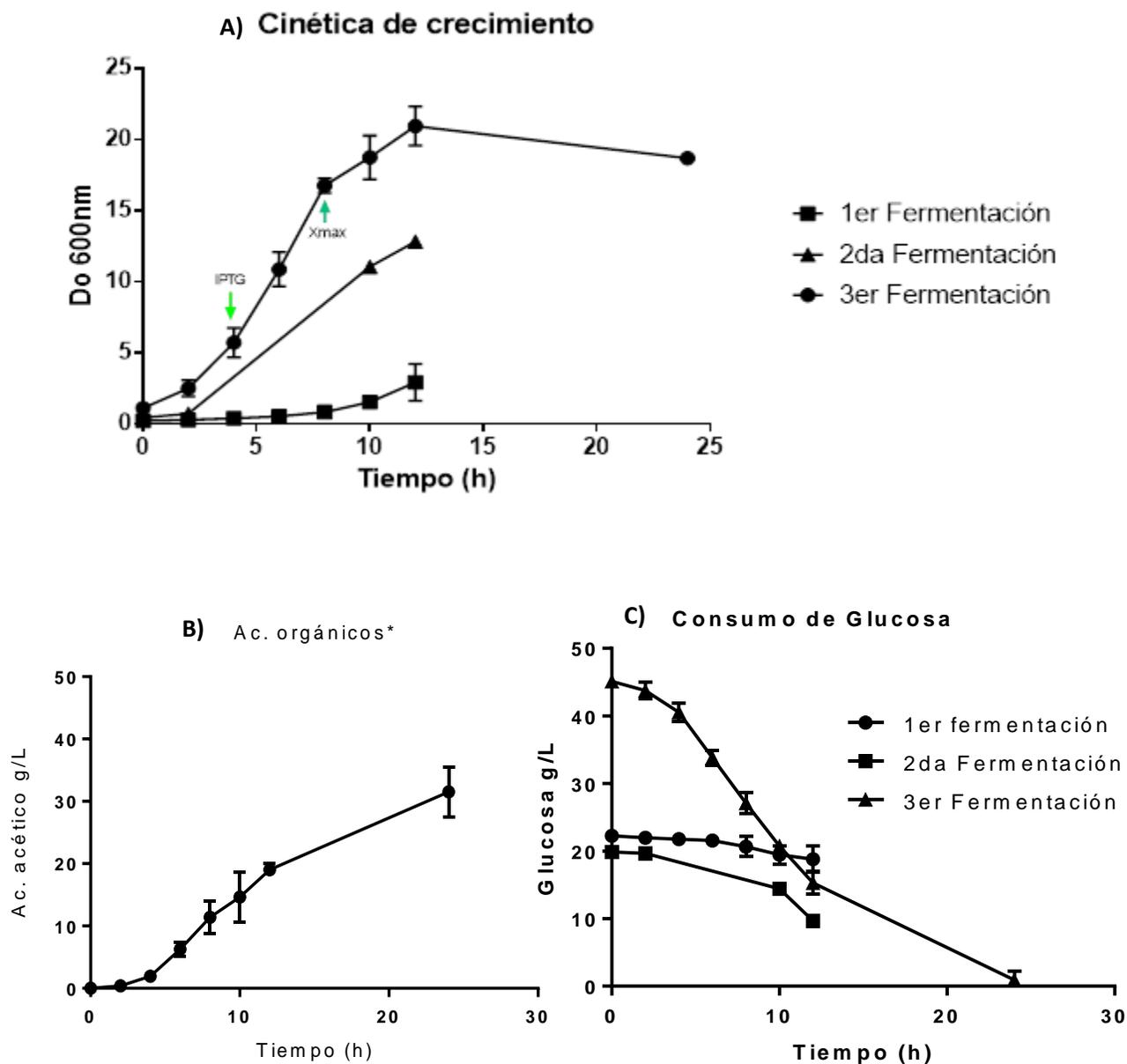


Figura 8. A) Cinética de crecimiento durante las fermentaciones. B) Ácidos orgánicos producidos durante la 3er fermentación. Estimados como g de ácido acético /L. C) Consumo de glucosa.

Los primeros dos cultivos, que contenían el medio AM1 4X y 20 g/L de glucosa, fueron utilizados únicamente para generar biomasa por lo que no se indujeron para la producción de polihidroxibutirato. Es importante mencionar que estas fermentaciones no se adicionaron antibióticos que generarán presión de selección.

En el tercer cultivo el medio estaba limitado para alcanzar una biomasa máxima de 5 g/L, durante esta etapa se indujo la producción de PHB mediante la adición de IPTG a una concentración de 10 μM , la inducción se realizó a las 4 horas de cultivo, cuando la densidad óptica era aproximadamente 6 DO, sin embargo, al final del cultivo la cantidad de PHB obtenida fue muy baja.

Durante las fermentaciones con alta densidad celular se observó una alta producción de ácidos orgánicos, estos fueron estimados como ácido acético a partir del volumen de NaOH requerido para mantener el pH en 7.

A partir de los datos obtenidos en los experimentos se determinaron los parámetros cinéticos que se presentan en la tabla 7. Los parámetros relacionados al producto no fueron determinados debido a que las cantidades de PHB obtenidas fueron muy bajas para poder ser cuantificadas de forma precisa.

Tabla 7. Velocidad específica de crecimiento y rendimiento biomasa/glucosa

Parámetro cinético	Fermentación 1	Fermentación 2	Fermentación 3
Velocidad específica de crecimiento ($\mu \text{ h}^{-1}$)	0.30 (± 0.004)	ND	0.34 (± 0.003)
Rendimiento biomasa-sustrato ($Y \text{ x/s}$)	0.42 (± 0.06)	0.52 (± 0.03)	0.29 (± 0.04)

ND. No se cuenta con los datos necesarios para calcular el parámetro cinético.

De cada fermentación a las 12 horas se inocularon matraces de 250 mL con 50 mL de medio AM1 1X y se indujeron con IPTG 10 μM cuando la $\text{DO} \approx 1$. Los datos de crecimiento obtenidos se observan en la tabla 8.

Tabla 8. Datos obtenidos de los experimentos en matraces

Tiempo	DO Matraz Fermentación 1	DO Matraz Fermentación 2	DO Matraz Fermentación 3
0	0.106	0.107	0.085
12**	0.98	0.802	0.756
24	2.83	2.65	2.5
36	3.78	3.40	2.9

*Los datos presentados son el promedio de ambos experimentos

** Inducción con IPTG 10 μM

El crecimiento observado en los matraces es menor que el esperado, ya que se esperaban densidades ópticas superiores a 5, sin embargo, esto se debe a disminuciones de pH a valores cercanos a 5 que se deben a la producción de ácidos orgánicos.

10.1.2 Crecimiento en placas

A las 12 horas de cada cultivo se hicieron diluciones para tener DO= 0.01 y 0.001; 20 μ L de estas diluciones fueron sembradas en cajas de LB, LB+Tc, LB+Cb, LB+TC+Cb y fueron incubadas por 12 horas a 37 $^{\circ}$ C.

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 9 y 10.

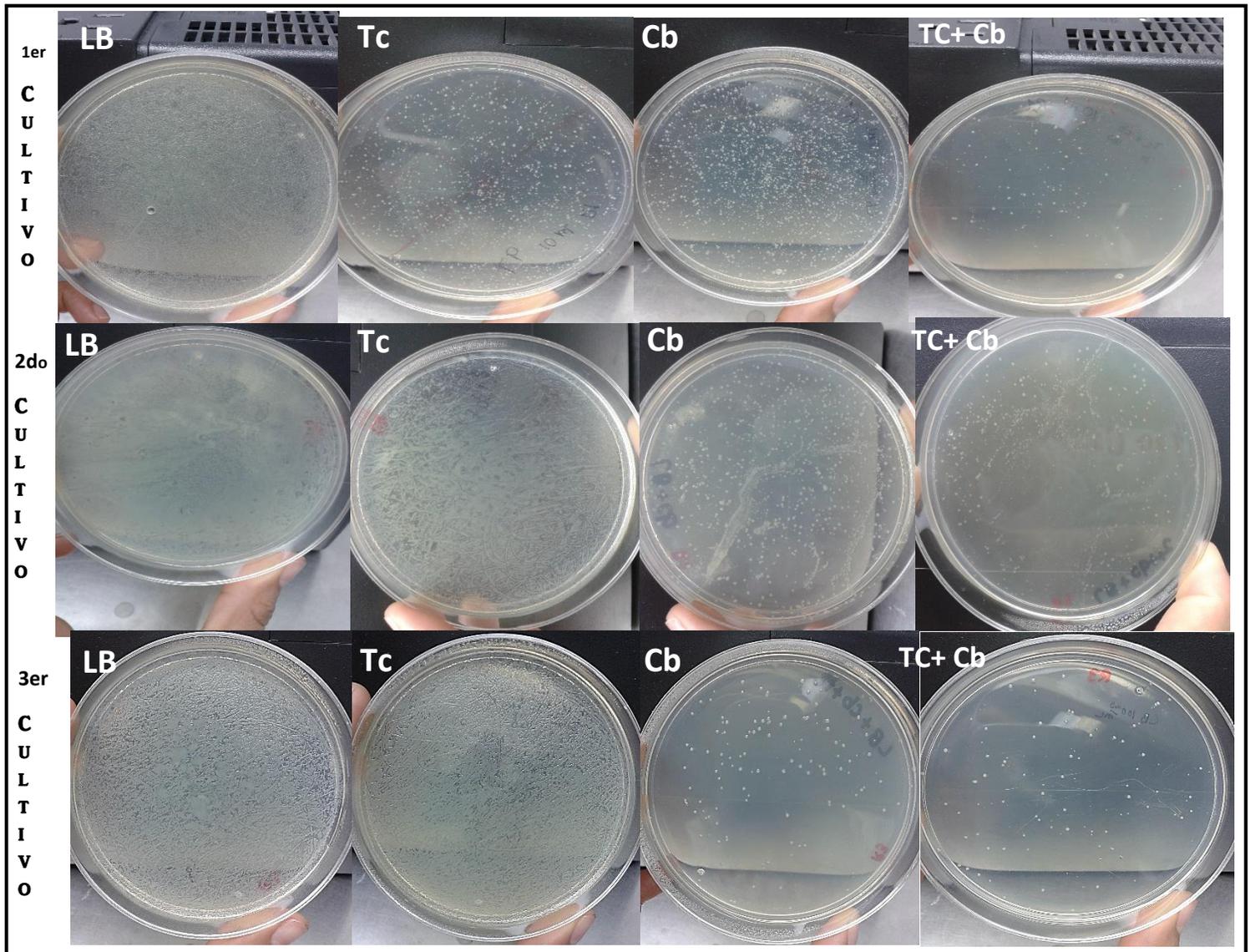


Figura 9. Crecimiento de la cepa MG1655 pACYC*gapN* /pPHBAV, durante el primer experimento, en placas de agar LB + antibióticos, a las 12 horas de cultivo con una dilución de 0.01 DO. TC (tetraciclina 30 μ g/mL), Cb (Carbenicilina(100 μ g/mL).

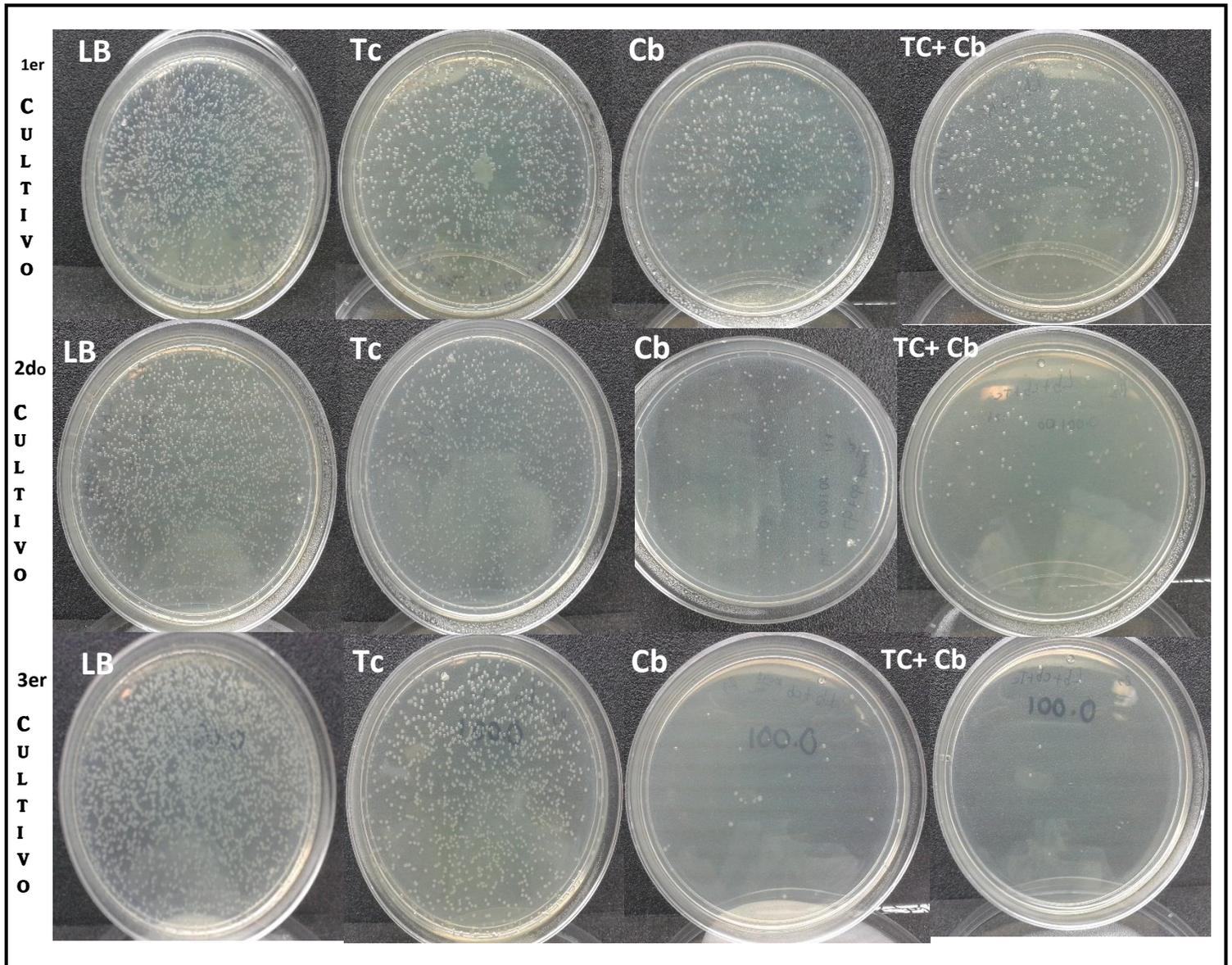


Figura 10. Crecimiento de la cepa MG1655 pACYCgapN /pPHBAV, durante el segundo experimento, en placas de agar LB + antibióticos, a las 12 horas de cultivo con una dilución de 0.001 DO. TC (tetraciclina 30 µg/mL), Cb (Carbenicilina 100 µg/mL).

En relación al conteo de colonias en cada placa, se consideró como el 100% a aquellas que crecieron en medio LB en ausencia de antibióticos, a partir de esto, se obtuvieron los porcentajes de crecimiento de colonias que se presentan en la tabla 9.

Tabla 9. Porcentaje de sobrevivencia frente a diferentes presiones de selección

ID	LB	LB + Tc	LB + Cb	LB+ Tc + Cb
1er Cultivo	100 %	96%	37%	25%
2do Cultivo	100%	92%	15%	6%
3er Cultivo	100%	42%	2%	0.5%

Tal como se observa en la tabla 9 y figuras 9 y 10 la resistencia a los antibióticos se va perdiendo conforme transcurren las diferentes etapas de cultivo.

Especialmente se observa una pérdida de la resistencia a Carbenicilina, lo cual indica que la cepa MG1655 pierde el plásmido *ptrc* que contiene el operón *PHB_{BAC}*. Lo anterior ocasiona que la cepa pierda la capacidad para producir polihidroxiacetato. En consecuencia, se concluye que en ausencia de la presión de selección al llegar a la tercera etapa del escalamiento del total de células sólo el 42 % contiene el plásmido *pACYCgapN*, el 2 % el plásmido *pPHBAv* y únicamente el 0.5 % contienen ambos plásmidos, de tal forma que al final del tercer cultivo las cantidades de polihidroxiacetato obtenidas fueron insignificantes.

10.1.3 Conclusiones de la sección

La presencia de los plásmidos en la cepa MG1655 *pACYCgapN* / *pPHBAv* no es suficientemente estable para desarrollar un escalamiento, ya que se observa una pérdida gradual de estos, perdiéndose la capacidad de producción de polihidroxiacetato conforme se avanza en las etapas del proceso, lo que conlleva a obtener muy bajas concentraciones de PHB y por tanto productividades y rendimientos despreciables.

Cabe mencionar, que no sería conveniente mantener la presión de selección en los cultivos destinados a producción de biomasa usando ambos antibióticos en todas las etapas de escalamiento, puesto que su implementación incrementaría desmesuradamente los costos de producción.

10.2 Evaluación cinética de cepas de *E. coli* MG1655 /pPHBAv, MG1655 Δ ackA-pta/pPHBAv, MG1655 Δ ackA-pta /pACYCgapN/pPHBAv, MS01 /pPHBAv y AV14N1 /pPHBAv

De no indicarse lo contrario, todos los experimentos se realizaron por duplicado los datos presentados son el promedio de las repeticiones, utilizando medio mínimo mineral AM1 2X con una relación Carbono/Nitrógeno=20 (Anexo 3) y las condiciones de cultivo fueron, 37 °C, pH 7, 600 rpm y aireación a 0.8 vvm.

En la primera etapa se realizaron todas las evaluaciones utilizando Glucosa a 30 g/L manteniendo una relación C/N=20. En esta etapa se caracterizaron los parámetros cinéticos de las cepas y se evaluó la producción y el porcentaje de acumulación del polímero.

10.2.1 *E. coli* MG1655 /pPHBAv

Se evaluó la cepa MG1655 únicamente transformada con el plásmido que contiene el operón PHB_{BAC} de *A. vinelandii*, su comportamiento fue utilizado como referencia para evaluar el efecto de las modificaciones que poseen el resto de las cepas.

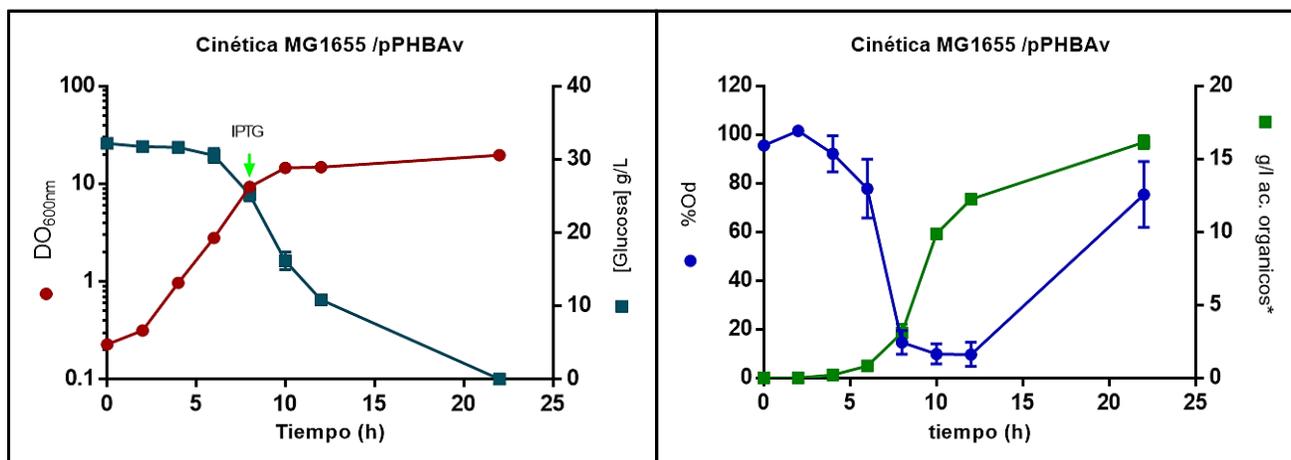


Figura 11. Comportamiento cinético de la cepa MG1655/ pPHBAv

En la figura 11 se puede observar (de izquierda a derecha) la cinética de crecimiento, el perfil de consumo de glucosa y la producción de ácidos orgánicos y el comportamiento del oxígeno disuelto mientras que en la tabla 10 se resumen los parámetros cinéticos de la cepa.

La cepa no presentó fase de adaptación, alcanzó una velocidad específica de crecimiento de 0.56 h^{-1} valor cercano al de la cepa silvestre (0.60 h^{-1}), la inducción del se realizó a las 8 horas de cultivo y a las 10 horas alcanzó la etapa estacionaria; A partir de ese momento la densidad óptica dejó de incrementar lo que indicaba que el polímero no estaba siendo sintetizado, esto fue

comprobado tras su posterior extracción y cuantificación apenas alcanzando un título de 0.10 g/L.

Por otro lado, se puede observar que durante la etapa de crecimiento exponencial la tasa de consumo de oxígeno incrementó drásticamente, lo que generó que la concentración de oxígeno disuelto (O_2d) decayera a valores cercanos al 10%, simultáneamente se observó un incremento en la producción de ácidos orgánicos obteniendo un título final de 16 g/L.

Tabla 10. Parámetros cinéticos de MG1655 /pPHBAv

Parámetro	Valor	Desv. Std
μ prom (h^{-1})	0.56	0.002
$Y_{x/s}$	0.15	0.005
$Y_{p/x}$	0.02	0.002
$Y_{p/s}$	0.003	0.000
PHB (g/L)	0.10	0.01
DCW + PHB (g/L)	5.08	0.24
DCW (g/L)	4.97	0.22
Ác. Orgánicos (g/L)	16.14857	0.309

La cepa presentó bajos rendimientos con respecto a sustrato, 0.15 para biomasa y apenas 0.003 para el producto. La acumulación de PHB fue apenas del 2% del peso seco celular, parámetros que pudieron verse afectados debido a que el flujo de carbono se dirigió a la generación de ácidos orgánicos.

10.2.2 *E. coli* MG1655 Δ ackA-pta /pPHBAv

En estos experimentos se evaluó el efecto de la eliminación de los genes *ackA-pta* que codifican para las enzimas acetato quinasa y fosfato acetiltransferasa

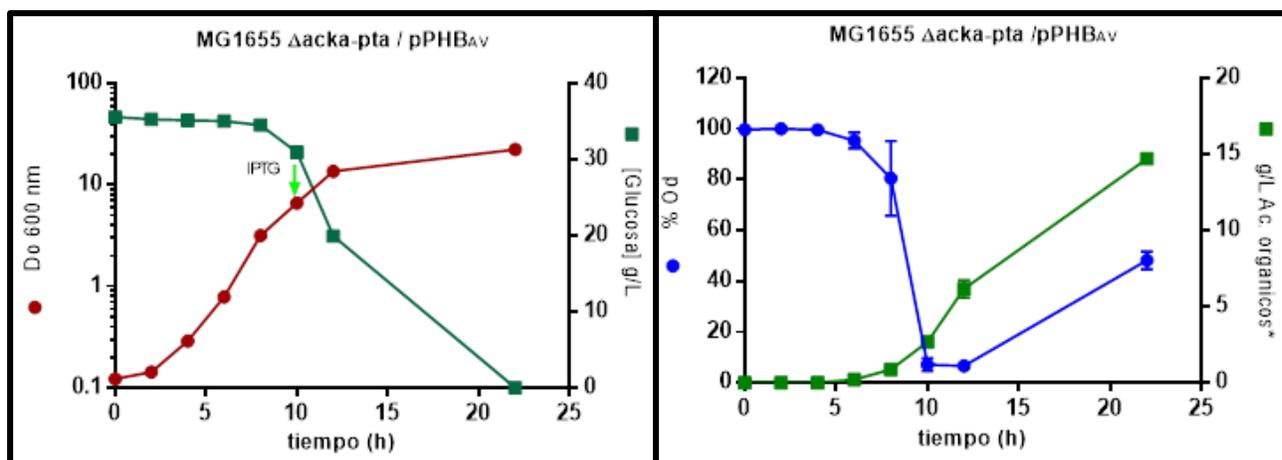


Figura 12. Comportamiento cinético de la cepa MG1655 Δ ackA-pta / pPHBAv

respectivamente, esto con la finalidad de evitar la producción de ácido acético a partir de acetil-CoA mismo que es el precursor del polihidroxibutirato.

En la figura 12 se puede observar que la eliminación de estos genes afectaron ligeramente el crecimiento de la cepa ya que su velocidad específica de crecimiento decreció a 0.52 h^{-1} . No se observó fase de adaptación y la producción de PHB fue inducida a las 10 horas, la fase estacionaria ocurrió a las 12 horas y la fase de producción duro hasta las 22 horas, durante este periodo se observó un incremento considerable en la turbidez del cultivo, alcanzando hasta 20 densidades ópticas, lo cual se debe a que las células incrementan su tamaño por la acumulación del polímero.

Tabla 11. Parámetros cinéticos de MG1655 Δ ackA-pta /pPHBAv

Parámetro	Valor	Desv. Std
μ prom (h^{-1})	0.52	0.004
$Y_{x/s}$	0.14	0.001
$Y_{p/x}$	0.23	0.011
$Y_{p/s}$	0.033	0.001
PHB (g/L)	1.17	0.04
DCW + PHB (g/L)	6.14	0.00
DCW (g/L)	4.97	0.05
Ác. Orgánicos (g/L)	14.70857	0.103

Durante la fase exponencial, la demanda de oxígeno incrementa de tal forma que el porcentaje de oxígeno disuelto cae a concentraciones inferiores a 10%. Contrario a lo esperado, esta cepa generó una gran cantidad de ácidos orgánicos cerca de 15 g/L, tan solo 1 g/L menos que la cepa parental. Según lo reportado por Yang et, al. (1999), este fenómeno podría estar relacionado a un incremento del flujo de carbono hacia la producción de lactato y/o piruvato.

Tal como se observa en la tabla 11 el rendimiento de biomasa/sustrato no se vio afectado, la producción volumétrica de PHB fue de 1 g/L, el rendimiento de producto/sustrato y el porcentaje de acumulación del polímero fueron 0.033 y 23% respectivamente, diez veces más que lo alcanzado por la cepa parental.

10.2.3 *E. coli* MG1655 Δ ackA-pta /pPHBAv /pACYCgapN

De acuerdo a los resultados obtenidos en el experimento anterior, se creía que la producción de PHB estaba siendo limitada por la disponibilidad de NADPH, y esto propiciaba la generación de otros metabolitos secundarios.

Además, según lo previamente reportado Centeno (2013), esta estrategia favorecía la acumulación de PHB hasta del 80% del peso seco celular. Por lo anterior la cepa MG1655 $\Delta ackA-pta$ /pPHBAv fue transformada con el plásmido pACYCgapN, que contiene el gen *gapN* de *S. mutans*, el cual codifica para la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP.

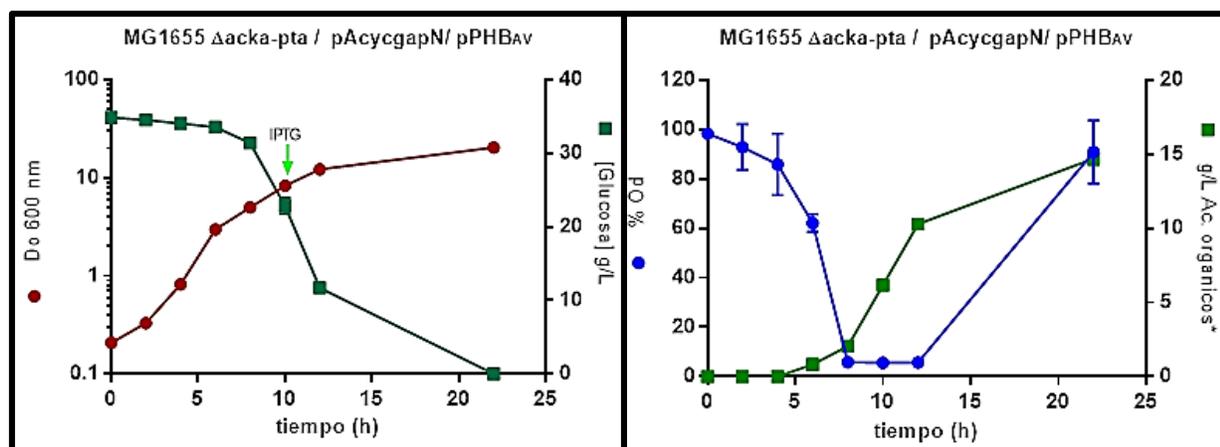


Figura 13. Comportamiento cinético de la cepa MG1655 $\Delta ackA-pta$ / pPHBAv / pACYCgapN

Tal como se observa en las figuras 12 y 13 ambas cepas (MG1655 $\Delta ackA-pta$ / pPHBAv / con y sin pACYCgapN) presentan un comportamiento con la misma tendencia. Sin embargo, la velocidad de crecimiento fue de 0.45 h^{-1} , por otro lado, la demanda de oxígeno incrementó, se puede observar como el %O₂ decae más rápido que en los cultivos de las cepas anteriores, además de un notable incremento en el consumo de glucosa. En conjunto estos datos sugieren un aumento en la demanda energética de la cepa, lo cual pudo haber sido ocasionado por la carga metabólica que genera la expresión simultánea de los dos plásmidos.

Tabla 12. Parámetros cinéticos de la cepa MG1655 $\Delta ackA-pta$ / pPHBAv / pACYCgapN

Parámetro	Valor	Desv. Std
μ prom (h^{-1})	0.45	0.002
$Y_{x/s}$	0.13	0.003
$Y_{p/x}$	0.24	0.006
$Y_{p/s}$	0.031	0.001
PHB (g/L)	1.10	0.05
DCW + PHB (g/L)	5.71	0.14
DCW (g/L)	4.61	0.09
Ác. Orgánicos (g/L)	14.70857	0.309

En la tabla 12 se puede observar que el porcentaje de acumulación y la producción de PHB y así como la generación de ácidos orgánicos fue idéntica a la de su cepa antecesora, lo que indica que la expresión del gen *gapN* no favoreció en estas condiciones la producción de PHB a partir de glucosa.

10.2.4 *E. coli* MS01 /pPHBA_v

En este experimento se evaluó la cepa MS01 es una cepa que tiene delatada la mayoría de sus vías fermentativas (tabla 6), por lo que todo el flujo de carbono a partir de glucosa es dirigido hacia la producción de acetil-COA.

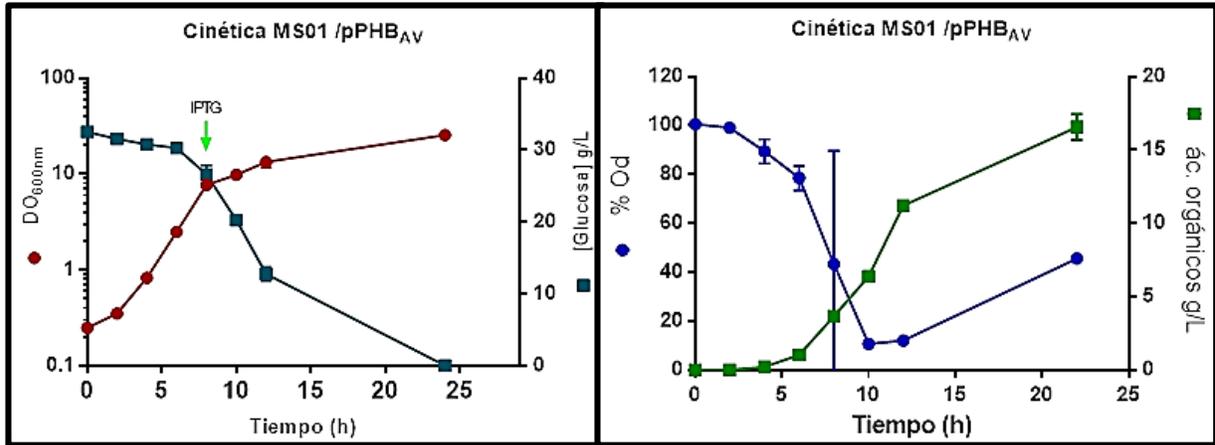


Figura 14. Comportamiento cinético de la cepa MS01 /pPHB

Es importante destacar que esta cepa cuenta con los genes $\Delta ackA-pta$ y *poxB*, por lo que puede utilizar acetil-COA y piruvato para la producción de ácido acético. Por otra parte, en estudios anteriores se había observado que esta cepa tiende a acumular y excretar altas cantidades de piruvato.

Debido a las características de la cepa, se esperaba que fuera capaz de canalizar casi en su totalidad el flujo de carbono hacia la síntesis de R-3-polihidroxibutirato, sin embargo, esta cepa presentó rendimientos y niveles de producción similares a los alcanzados con la cepa MG1655 $\Delta ackA-pta$.

El comportamiento cinético de esta cepa se presenta en la figura 14, se observa que la cepa no presentó fase de adaptación, alcanzó una velocidad específica de crecimiento de 0.52 h^{-1} valor cercano al de la cepa silvestre y la inducción del se realizó a las 8 horas de cultivo y a las 10 horas alcanzó la etapa estacionaria

Tabla 13. Parámetros cinéticos de MS01 /pPHB

Parámetro	Valor	Desv. Std
μ prom (h^{-1})	0.52	0.009
$Y_{x/s}$	0.15	0.002
$Y_{p/x}$	0.21	0.001
$Y_{p/s}$	0.03	0.000
PHB (g/L)	0.99	0.00
DCW + PHB (g/L)	5.77	0.04
DCW (g/L)	4.77	0.04
Ác. Orgánicos (g/L)	16.56	0.617

Los parámetros cinéticos se presentan en la tabla 13, estos fueron similares a los de MG1655 Δ *ackA-pta*. Con una velocidad de crecimiento de 0.52 h^{-1} , una producción de PHB igual a 1 g/L con un rendimiento del 0.03 y un 20% de acumulación del polímero.

Sorprendentemente la cepa MS01 produjo cerca de 17 g/L de ácidos orgánicos, 2 g/L más que el resto de las cepas.

A pesar de lo anterior esta cepa demostró un comportamiento bastante interesante, puesto que en ese momento tenía unos niveles productivos similares a la cepa silvestre con la eliminación *ackA-pta*. Sí la cepa silvestre con esa modificación había incrementado 10 veces más el nivel de PHB, sugería la posibilidad de que al hacer esa misma eliminación sobre la cepa MS01, se obtendría una cepa con gran potencial para producir polihidroxibutirato.

10.2.5 *E. coli* AV14N1

AV14N1 fue generada por Benitez (2016), a partir de la cepa MS01 al eliminar los genes *poxB* y *ackA-pta*, respectivamente codifican para las enzimas piruvato oxidasa, acetato quinasa y fosfoacetiltransferasa, responsables de la generación de acetato a partir de piruvato y acetyl-CoA. Además, esta cepa tiene *gapN* de *S. mutans* integrado río abajo de *gapA* nativa del huésped, dicho gen fue sintetizado con codones optimizados para su expresión en *E. coli* (Benítez, 2016).

AV14N1 fue transformada con el plásmido PHB_{AV} y después se realizó su caracterización y se evaluó su potencial para producir polihidroxibutirato.

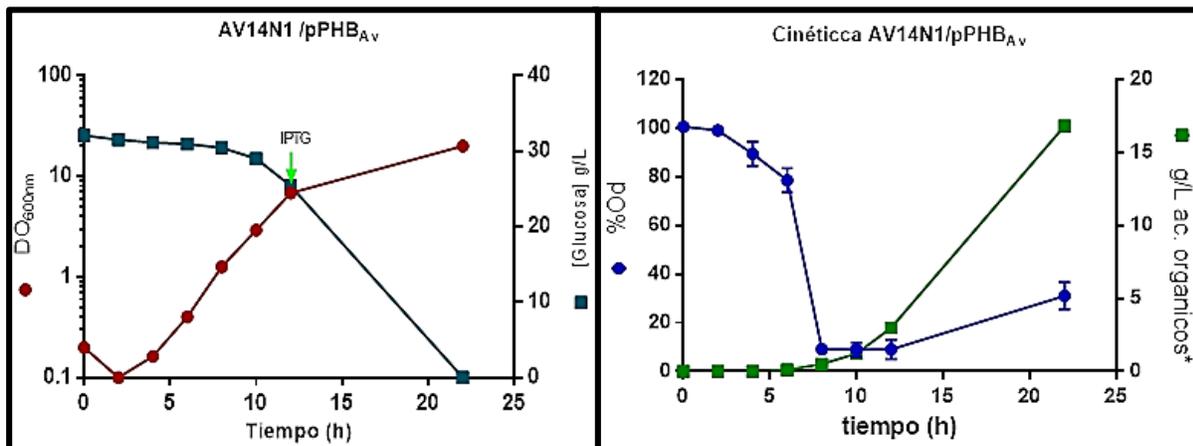


Figura 15. Comportamiento cinético de la cepa AV14N1/ pPHB_{AV}

Como se observa en la figura 15 y en la tabla 14 la cepa presentó problemas para crecer, inclusive lisándose al inicio del cultivo, lo cual puede ser considerado como una fase de adaptación. Su velocidad de crecimiento disminuyó un 20% respecto a MS01, su capacidad de producción y acumulación del polímero fue 5 veces menor acumulando apenas el 22% de su peso seco y su rendimiento con

respecto al sustrato fue el menor comparado con todas las cepas previamente evaluadas con valores de 0.16 para biomasa y 0.01 para PHB.

Durante su cultivo se observó una alta demanda de oxígeno y a partir de las 12 horas un acelerado consumo de glucosa y una elevada producción de ácidos orgánicos.

Tabla 14. Parámetros cinéticos de AV14N1 /pPHB_{Av}

Parametro	Valor	Desv. Std
μ prom (h ⁻¹)	0.42	0.002
Y _{x/s}	0.16	0.000
Y _{p/x}	0.04	0.000
Y _{p/s}	0.01	0.000
PHB (g/L)	0.22	0.00
DCW + PHB (g/L)	5.39	0.00
DCW (g/L)	5.17	0.00
Ác. Orgánicos (g/L)	16.81714	0.257

El inesperado comportamiento de la cepa AV14N1 pudo deberse a un desbalance metabólico ocasionado por las múltiples modificaciones genéticas que presenta esta cepa en conjunto con un efecto regulatorio causado por la eliminación de los genes *ackA-pta* puesto que existen reportes que indican el papel que estos genes tienen sobre la regulación del crecimiento celular en *E. coli* (Bakhtiari et al., 2014)

10.2.6 Conclusiones de la sección

La cepa silvestre de *E. coli* MG1655 únicamente transformada con el plásmido PHB_{Av} demuestra no ser una buena productora de PHB alcanzando títulos y rendimientos casi despreciables, sin embargo, al eliminar los genes ***ackA-pta*** sus niveles de producción mejoran aproximadamente unas 10 veces. Sin embargo, los niveles de producción de ácidos orgánicos no disminuyeron significativamente lo cual se atribuye a una redirección del flujo carbono hacia la producción de ácido láctico y pirúvico.

Se demostró que la expresión de los plásmidos pPHBAv y pACYC*gapN* no mejoran los parámetros productivos de la cepa, en contraste, parece tener efectos negativos en la velocidad específica de crecimiento al generar una carga metabólica.

La cepa MS01 demostró parámetros cinéticos y productivos muy similares a los de la cepa MG1655 Δ ***ackA-pta***, además fue la cepa con mayor producción de ácidos orgánicos.

La cepa AV14N1 (MS01 Δ *poxB*, Δ *ackA-pta*, *gapA-gapN_{op}*), que aparentemente sería una cepa con altos niveles de producción, resultó generar los menores niveles de producción y crecimiento.

Lo anterior se atribuye a un efecto sinérgico entre el fondo genético de la cepa MS01 y la eliminación de *ackA-pta* puesto que se ha reportado que la eliminación de estos genes afecta negativamente la velocidad de crecimiento de *E. coli*.

Después de la caracterización y evaluación de todas las cepas, se seleccionó a la cepa MS01 como modelo de estudio para futuros experimentos, debido a que posee uno de los mejores niveles de producción y su fondo genético permite un mejor control sobre el flujo de carbono.

10.3 Estrategias de cultivo

10.3.1 Concentración de oxígeno disuelto

Como principal estrategia de cultivo, se decidió que, durante los cultivos, la concentración de oxígeno disuelto debía mantenerse arriba del 20%. Esto se consiguió incrementando gradualmente la velocidad de agitación, conforme la demanda de oxígeno aumentaba. El control de esta variable se realizó de forma manual.

10.3.2 Concentración óptima de inducción

El plásmido PHB_{Av} que contiene el operón para la biosíntesis de PHB, es inducible por IPTG. Los primeros experimentos se indujeron a una concentración 10 μM de IPTG. Sin embargo, en busca de mejorar los niveles de producción de la cepa MS01, en esta serie de experimentos se realizó un barrido de concentraciones de inducción.

Tabla 15. Parámetros cinéticos obtenidos a diferentes concentraciones de inductor.

[IPTG]	0 μM	10 μM	20 μM	50 μM
Parámetro				
μ prom (h^{-1})	0.51	0.52	0.49	0.49
$Y_{x/s}$	0.15	0.15	0.15	0.15
$Y_{p/x}$	0.09	0.21	0.54	0.68
$Y_{p/s}$	0.01	0.03	0.08	0.10
PHB (g/L)	0.42	0.99	2.60	3.05
DCW + PHB (g/L)	5.35	5.77	7.42	7.82
DCW (g/L)	4.93	4.77	4.81	4.77
Ác. Orgánicos (g/L)	11.31	16.56	5.45	5.04

La inducción se realizó cuando el cultivo de MS01 /pPHB_{Av} alcanzó 6 DO. Se probaron concentraciones de IPTG de 0, 10, 20 y 50 μM . Los valores de 20 y 50 μM se hicieron por duplicado y los valores presentados son el promedio de ambos, mientras que el de 0 y 10 μM son datos de un único experimento.

De acuerdo a los datos obtenidos (figura 16 y tabla 15), se determinó que la concentración de inductor que más favorecía la acumulación de PHB fue la de 50 μM . Con dicha concentración el PHB se acumuló hasta un 68 % del peso seco celular, lo que en producción volumétrica representa 3.05 g/L, además el rendimiento producto/biomasa también se vio afectado positivamente alcanzándose el 20 % del máximo teórico.

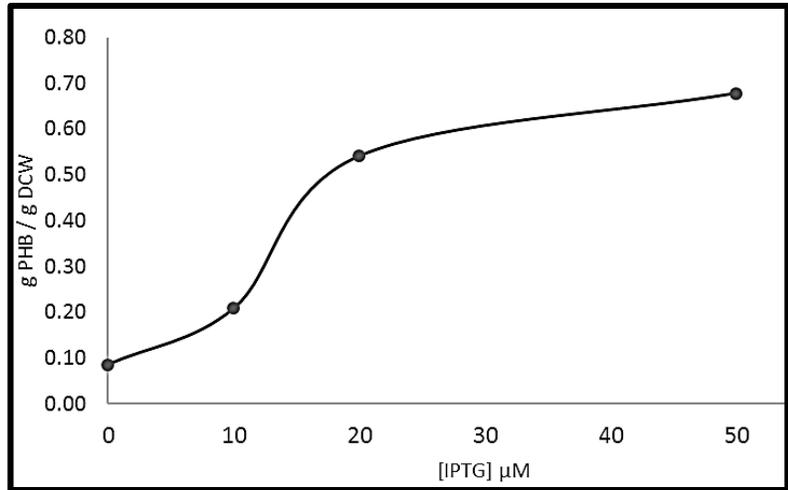


Figura 16. Relación entre concentración de inductor y acumulación de PHB.

Por otro lado, con esta cantidad de inductor se consiguió reducir la producción de ácidos orgánicos de 17 g/L hasta 5 g/L, lo cual indica que el carbono está siendo aprovechado para la síntesis del polímero.

Es importante señalar que no se hicieron pruebas con mayores concentraciones de inductor por la tendencia del gráfico representado en la figura 16, puesto que aparentemente el agregar mayor cantidad de inductor no generaría una diferencia significativa.

10.3.3 Tiempo óptimo de inducción

Se realizó una prueba por duplicado induciendo el cultivo cuando la densidad óptica fue de 3 DO. Los resultados obtenidos se presentan en figura 17 y tabla 16. La inducción se realizó a 50 μM de IPTG.

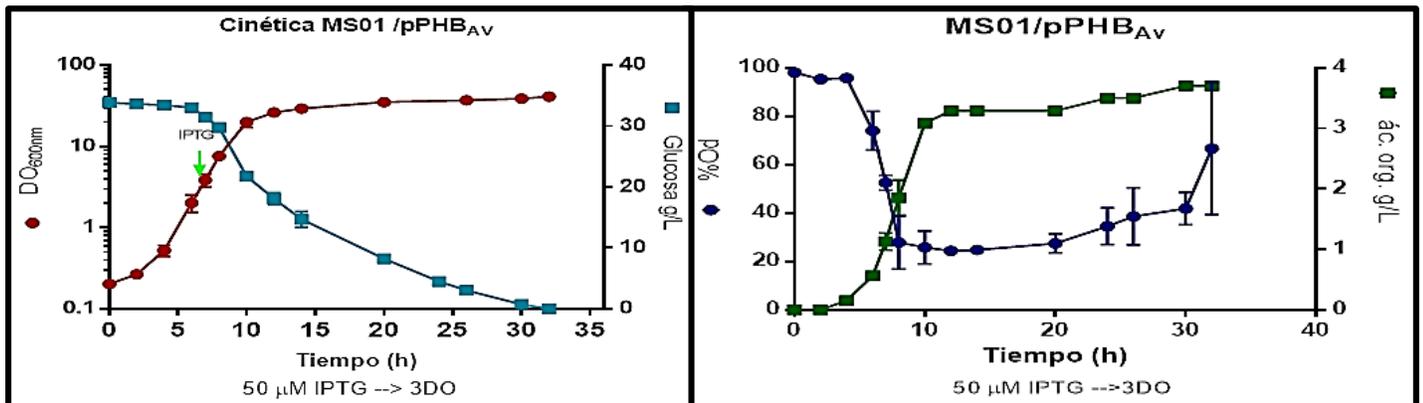


Figura 17. Cinética de MS01 /pPHBAv inducida a 3DO con 50 μM de IPTG

Tal como se observa en la tabla 16 este tiempo de inducción permitió que las células almacenaran PHB hasta un 80 % de su peso y mejoro los rendimientos de producto y biomasa con respecto al sustrato. Por otra parte la velocidad específica de crecimiento de la cepa se ve aparentemente mejorada, sin embargo, esto no es así, el valor numérico incrementa porque fue calculado en base a las densidades ópticas del cultivo, pero este incremento repentino no se debe a la mayor velocidad de generación de biomasa, sino al acumulación de gránulos de PHB, que provocan que la célula incremente su tamaño.

En la figura 17 se observan cambios en el comportamiento de la cepa MS01, puesto que la biomasa aumenta significativamente durante las primeras 12 horas y las siguientes 20 horas incrementa de forma gradual por la acumulación del polímero, lo cual se ve reflejado en un consumo del sustrato.

La generación de ácidos orgánicos se detiene completamente a las 10 horas de cultivo, aproximadamente cuando la cepa deja de duplicarse por efecto de la limitación de nutrientes.

Tabla 16. Parámetros cinéticos de la cepa MS01/ pPHBA_v inducida con IPTG 5μM a 3DO

Parámetro	Valor	std desv
μ prom (h ⁻¹)	0.57	0.01
Y _{x/s}	0.14	0.01
Y _{p/x}	0.80	0.01
Y _{p/s}	0.11	0.01
PHB (g/L)	3.81	0.24
DCW + PHB (g/L)	8.58	0.45
DCW (g/L)	4.78	0.21
Ác. Orgánicos (g/L)	3.70	0.00

Los resultados obtenidos en estas pruebas indican que la inducción en una etapa temprana del cultivo favorece la producción del polihidroxibutirato, ya que se logra canalizar una gran parte la energía y del carbono hacia la biosíntesis de este producto, minimizando casi por completo la generación de otros productos secundarios.

10.3.4 Conclusiones de la sección

La cantidad de inductor y la etapa en la cual se realiza la inducción juegan un rol de gran importancia. Para la cepa MS01 /pPHB_{AV} resultaron ser favorables una inducción en una etapa temprana del cultivo (≈3 DO) y una inducción a una concentración de IPTG de 50 μM.

Por otra parte, la biosíntesis del polihidroxibutirato requiere de la disponibilidad de equivalentes de reducción, por lo que resulta adecuado un buen control de la concentración de oxígeno disuelto arriba del 20%, evitando así la producción de ácidos orgánicos y propiciando la síntesis del polímero.

En conjunto tanto la estrategia del oxígeno disuelto como la sinergia entre el tiempo y concentración de inducción lograron que la cepa MS01 / pPHB_{AV} acumulara 4 veces más PHB, logrando almacenar hasta un 80% de su peso seco. La producción incrementó de 1 g/L hasta 3.81 g/L y el rendimiento mejoró de 0.03 a 0.11 alcanzando rendimientos cercanos al 20% del máximo teórico.

10.4 Producción de R-3-Polihidroxibutirato a partir de xilosa

Uno de los objetivos de este estudio es evaluar cepas que potencialmente podrían alcanzar altos niveles de producción de PHB y que además tuvieran la capacidad de utilizar xilosa como fuente de carbono, lo anterior debido a que este azúcar es el segundo componente más importante en los hidrolizados lignocelulósicos.

Una vez que se establecieron las estrategias que permitían que la cepa MS01 tuviera altos niveles de producción se procedió a evaluarla en un medio cuya única fuente de carbono fuera glucosa. En teoría, en base a un balance de carbono, los rendimientos máximos teóricos de acuerdo a cada una de las vías de asimilación de los dos azúcares (glucosa o xilosa), son el mismo $0.58 \text{ g}_{\text{PHB}}/\text{g}_{\text{AZÚCAR}}$.

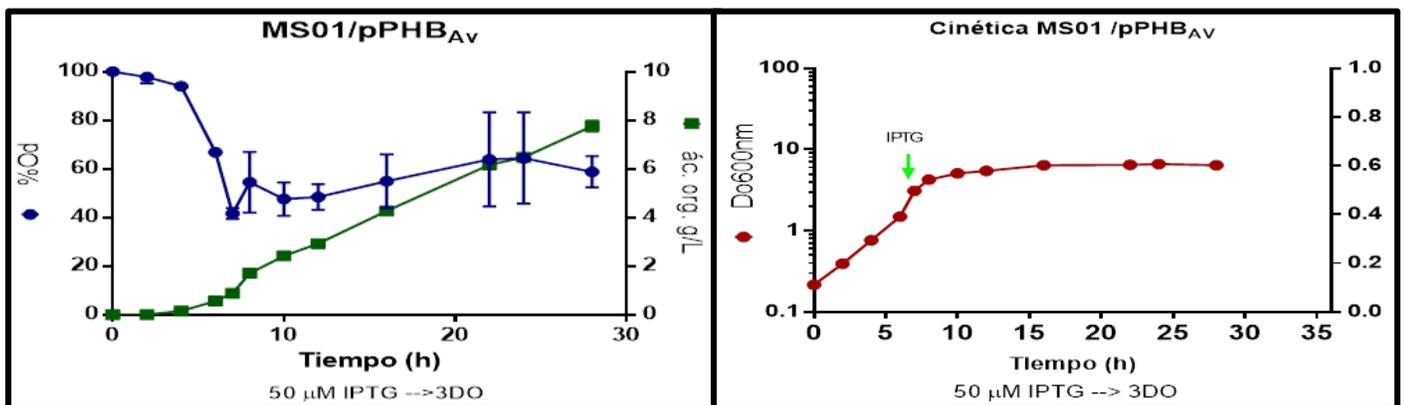


Figura 18. Cinética de MS01/pPHB en medio AM1 con Xilosa como única fuente de carbono

Tal como se observa en la figura 18, el comportamiento de la cepa MS01 utilizando xilosa como fuente de carbono difiere en gran medida del previamente obtenido para la glucosa. La demanda de oxígeno disminuye considerablemente durante todo su cultivo. En las primeras horas de fermentación el comportamiento no fue tan diferente y no se observó fase de adaptación, sin embargo, cuando se realiza el proceso de inducción, el crecimiento se detiene completamente y a partir de la décima hora de cultivo no se observó un incremento considerable de la densidad óptica, lo cual indicaba que no existía acumulación interna del polímero.

Tras la extracción del PHB y su análisis se determinó que no se habían podido alcanzar los rendimientos ni parámetros de producción reportados a partir de glucosa.

Tabla 17. Parámetros cinéticos de la cepa MS01 / pPHB_{Av} cultivada en xilosa como única fuente de carbono.

Parametro	Valor	std desv
μ prom (h ⁻¹)	0.40	0.05
Y _{x/s}	ND	ND
Y _{p/x}	0.19	0.01
Y _{p/s}	ND	ND
PHB (g/L)	0.37	0.05
DCW + PHB (g/L)	2.36	0.24
DCW (g/L)	1.99	0.19
Ác. Orgánicos (g/L)	7.77	0.15

En la tabla 17 se observa que el acumulamiento de PHB fue del 20%, con un título de 0.37 g/L. Es importante destacar que se obtuvo un incremento en la producción de ácidos orgánicos alcanzado hasta 7.77 g/L.

Se sugiere que los resultados obtenidos se deben a un desbalance de poder reductor en la célula: mediante el metabolismo de glucosa, existen algunas reacciones clave, mediante la canalización de glucosa-6-P a la vía de las pentosas, que estaban satisfaciendo la demanda de NADPH que requiere la producción de PHB (ver figura 4). Por el contrario, en el metabolismo de xilosa estas reacciones no se dan en gran medida y como consecuencia tanto el crecimiento, como los niveles de producción decaen drásticamente.

10.5 Producción de R-3-Polihidroxibutirato a partir de mezcla glucosa-xilosa

Para comprobar que el efecto observado en el experimento con xilosa como única fuente de carbono, se debía al desbalance energético que sufrían las células, se realizaron los siguientes experimentos. Dos cultivos que se iniciaron a 20 g/L de xilosa y unos minutos antes del momento de inducción fueron suplementados uno de ellos con glucosa y el otro con xilosa de tal manera que al final adquirieron una concentración final de azúcar igual a 30 g/L.

Se observaron comportamientos similares en las primeras horas de cultivo. Por el contrario, después de la suplementación con xilosa o glucosa y la inducción, el comportamiento cambia drásticamente.

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 19 y tabla 18.

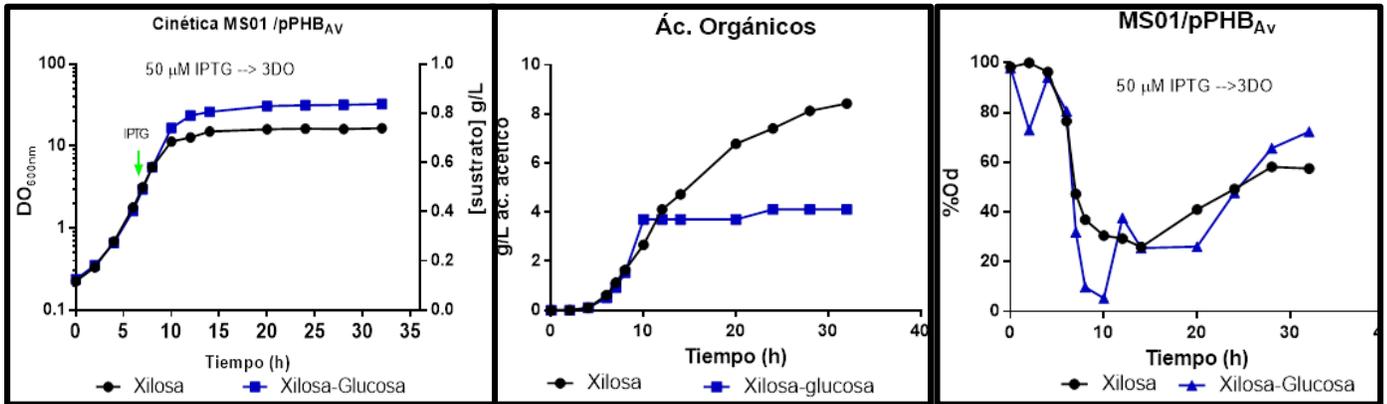


Figura 19. Cinética de MS01/pPHB_{AV} en cultivos con Xilosa y mezcla Glucosa-Xilosa

El crecimiento del cultivo con xilosa como única fuente de carbono se detuvo poco después de la inducción con IPTG, (alcanzando 15 DO) mientras que el cultivo que fue suplementado con glucosa continuó creciendo hasta alcanzar más de 30 UDO.

Este fenómeno de crecimiento se encuentra relacionado con la demanda de oxígeno, ya que el cultivo suplementado con glucosa requirió que la velocidad de agitación se aumentara hasta 900 rpm para mantener la concentración de oxígeno disuelto por encima del 20 %. Por su parte el cultivo suplementado con xilosa no requirió ningún incremento en la velocidad de agitación.

Tabla 18. Parámetros cinéticos de MS01/ pPHB_{AV} en cultivos con xilosa y mezcla de glucosa-xilosa

Parámetro	Xilosa	Xilosa-Glucosa
μ prom (h ⁻¹)	0.47	0.50
Y _{x/s}	ND	ND
Y _{p/x}	0.21	0.52
Y _{p/s}	ND	ND
PHB (g/L)	0.92	2.50
DCW + PHB (g/L)	5.32	7.29
DCW (g/L)	4.40	4.79
Ác. Orgánicos (g/L)	8.43	4.11

Por otra parte, es posible observar como los niveles de producción de ácidos orgánicos se ven afectados por la fuente de carbono utilizada, el cultivo suplementado con xilosa produjo doble concentración de ácidos orgánicos que el cultivo suplementado con glucosa.

Tal como se observa en la tabla 18, al final de la fermentación se obtuvo que el cultivo suplementado con glucosa había acumulado PHB hasta el 52% de su peso seco y el suplementado con xilosa únicamente el 21%, con títulos de 2.5 y 0.92 g/L.

A partir de estos resultados se llegó a la conclusión que, debido a un desbalance interno de poder reductor, la cepa MS01/ pPHBA_v no es capaz de producir eficientemente polihidroxi butirato a partir de xilosa.

Este problema podría resolverse incrementando la disponibilidad de NADPH, para ello podría intentarse la estrategia previamente propuesta por Centeno (2013), ya que es posible que la expresión del gen **gapN** alivie la demanda de poder reductor y se favorezca la producción de polihidroxi butirato.

XI. Conclusiones globales

La cepa MG1655 pACYC*gapN* / pPHBA_v no es suficientemente estable para desarrollar un escalamiento, ya que la carga metabólica generada por la expresión de dos plásmidos causa que la cepa tienda a segregar los plásmidos conforme se avanza en las etapas del proceso, tampoco sería conveniente mantener la presión de selección (la adición de antibióticos) debido a que esto incrementaría los costos de producción.

La estrategia de expresar simultáneamente los plásmidos pPHBA_v y pACYC*gapN* no presenta ningún efecto positivo en la producción de polihidroxi butirato utilizando glucosa como fuente de carbono, sin embargo, existe la posibilidad de que esta estrategia sea de gran utilidad cuando se requiera utilizar xilosa como sustrato.

De las 5 cepas de *E. coli* evaluadas en este estudio, la cepa MS01 /pPHBA_v posee los mejores niveles de producción, su fondo genético permitió un mejor control sobre el flujo de carbono. Después de optimizar el tiempo de inducción y la cantidad de inductor, así como mantener un mejor control del oxígeno disuelto, los cultivos de esta cepa generaron hasta 4 g/L de PHB, lo cual representa un acumulamiento de hasta el 80% utilizando glucosa como fuente de carbono.

Por el momento no es posible la síntesis de polihidroxi butirato con altos rendimientos a partir de xilosa utilizando la cepa MS01 /pPHBA_v, debido a que durante la síntesis del polímero se requiere de NADPH y la ruta metabólica involucrada para la asimilación de xilosa no satisface la demanda de este compuesto, lo cual genera un desbalance en el poder reductor y en consecuencia problemas de crecimiento y síntesis del producto.

XII. Perspectivas

1. Evaluar la cepa MS01 /pPHBAv en cultivos de 30 L para determinar si se mantienen los niveles de acumulación de PHB y los rendimientos alcanzados en cultivos de 3.5L.
2. Caracterizar el perfil de gases durante los cultivos de la cepa MS01 /pPHBAv para poder desarrollar un balance de materia detallado del proceso.
3. Caracterizar el perfil de ácidos orgánicos de la cepa MS01 / pPHBAv mediante cromatografía líquida de alto desempeño, para mejorar el entendimiento del flujo de carbono durante su cultivo bajo diferentes condiciones.
4. Evaluar la cepa AV14N1 / /pPHBAv en cultivos utilizando xilosa como fuente de carbono, para determinar si la baja acumulación intracelular de polihidroxibutirato presentado por la cepa MS01 /pPHBAv en este sustrato se debió a un desbalance en el poder reductor (NADPH).

XIII. Referencias

- Bakhtiari et al. (2014). Down Regulation of ackA-pta Pathway in Escherichia coli BL21 (DE3): A Step Toward Optimized Recombinant Protein Expression System. *Jundishapur J Microbiol*, 1-9.
- Andler y Diaz-Barrera. (2013). Ingeniería para producir plásticos desde bacterias. *INGENERARE*, 29-36.
- Bello et al. (2009). Estado del arte en la producción microbiológica de Polihidroxialcanoatos. *Sobre los Derivados de la Caña de azúcar*, 3-13.
- Bello, D. e. (2009). Estado del arte en la producción microbiologica de Polihidroxialcanoatos. *Sobre los Derivados de la Caña de*, 03-13.
- Benítez, M. G. (2016). *Ingeniería de vías metabólica de Escherichia coli para la producción de (R)-3-Hidroxi-butirato aumentando la disponibilidad de NADPH*. Cuernavaca, México: IBT-UNAM.
- Bonartsev, A. e. (2007). Biosynthesis, biodegradation, and application of poly(3- hydroxybutyrate) and its copolymers - natural polyesters produced by diazotrophic bacteria. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 295-307.
- Byrom, D. (1991). *Biomaterials: novel materials from biological sources*. Springer.
- Carbajal and Garcia. (2014). Separación, purificación y caracterización de poli-hidroxi-butirato. *ICIDCA*, 7-15.
- Cazeneuve et al. (2016). Effective Recovery of Poly- b-Hydroxybutyrate (PHB) Biopolymer from Using a Novel and Environmentally Friendly Solvent System. *Biotechnological Progress* , 678-685.
- Centeno, S. (2013). *Generación de NADPH mediante la via Embden-Meyerhof-Parnas y su efecto sobre la síntesis de Poli-3-Hidroxi-butirato en Escherichia Coli*. México: Instituto de Biotecnología- UNAM; Tesis de Doctorado.
- Centeno, S. G. (2013). *Generación de nadph mediante la vía de embdenmeyerhof-parnas y su efecto sobre la síntesis de poli-3-hidroxi-butirato en Escherichia coli*. Cuernavaca, México: IBT-UNAM.
- Chang A. and Cohen S. (1978). Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *Bacteriol*, 1141-1156.
- Chen, G.-Q. (2009). A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews*, 2434–2446.
- Choi and Lee. (1997). Process analysis and economic evaluation for Poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. *Bioprocess Engineering*, 335-342.
- Dawes, A. J. (1990). Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of bacterial Polyhydroxyalkanoates. *MICROBIOLOGICAL REVIEWS*, 450-472.

- Díaz-Barrera A, A. R. (2013). *Technological and market aspects of microbial bioplastics production*. Chile: Escuela de ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
- Espín, G. (2004). *Biología de Azotobacter vinelandii*. Obtenido de Biblioteca en línea Instituto de Biotecnología- Universidad Autónoma Nacional de México: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap6/>
- Fang, L. e. (1998). Production of poly-β-hydroxybutyrate on molasses by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 345-348.
- Ferreira and Schlottbom. (2016). Production of Polyhydroxybutyrate from Lignocellulosic Hydrolysates—Optimization of *Bacillus sacchari* Fermentation and Scale Up from 2 L to 200 L. *Application Note*, 1-6.
- Haywood, G. A. (1991). Accumulation of a Poly(hydroxyalkanoate) copolymer containing primarily 3-hydroxyvalerate from simple carbohydrate substrates by *Rhodococcus* sp. NCIMB 40126. *International Journal of Biological Macromolecules*, 83-88.
- Holmes, P. A. (1985). Applications of PHB - a microbially produced biodegradable thermoplastic. *Physics in Technology*, 32-36.
- Hornig et al. (2009). Enhanced polyhydroxybutyrate (PHB) production via the coexpressed phaCAB and vgb genes controlled by arabinose PBAD promoter in *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 158-167.
- K Sudesh, H. A. (2010). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, 1503–1555.
- Kim, B. (2000). Production of poly (3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. *Enzyme Microb. Technol.*, 774-777.
- Kim, B. S. (2000). Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. *Enzyme and Microbial Technology*, 774-777.
- Lee and Wang. (1997). Poly(3-Hydroxybutyrate) Production with High Productivity and High Polymer Content by a Fed-Batch Culture of *Alcaligenes latus* under Nitrogen Limitation. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 3703–3706.
- Lee, S. Y. (1996). Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *TIBTECH*, 431-437.
- Lee, S. Y. (1996). Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria . *TIBTECH*, 431-438.
- Mahishi, L. e. (2003). Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthesis by recombinant *Escherichia coli* harbouring *Streptomyces aureofaciens* PHB biosynthesis genes: Effect of various carbon and nitrogen sources. *Microbiological Research*, 19-27.
- Nduko et al. (2013). Lactate-enriched P(lactate-co-3-hydroxybutyrate) using a lactate-overproducing strain of *Escherichia coli* and an evolved enzyme. *Metabolic Engineering*, 159-166.

- Niaounakis, M. (2015). *Biopolymers: Processing*. Oxford: Elsevier.
- Nie, L. et al. (1998). Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene*, 301-315.
- Obruca S. et al. (2015). Use of Lignocellulosic Materials for PHA Production. *Chem. Biochem. Eng. Q*, 135-144.
- PlasticsEurope. (2015). *Plastics – the Facts 2015*. Burselas, Belgica.: epro.
- Ray S. Randall. (2008). *Strategies for the optimization of polyhydroxyalkanoate*. Syracuse, NY: College of Environmental Science and Forestry.
- Remar. (2011). *Bioplásticos*. España: Red de Energía y Medio Ambiente.
- Rui L. (2007). A novel-designed *Escherichia coli* for the production of various polyhydroxyalkanoates from inexpensive substrate mixture. *Applied genetics and molecular biotechnology*, 1103–1109.
- Sunitha Panigrahi, U. B. (2013). Screening, Isolation and Quantification of PHB-Producing Soil Bacteria. *International Journal of Engineering Science Invention*, 01-06.
- Valappil SP, B. A. (2007). Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 1-17.
- Vegt, A. v. (2002). *From polymers to plastics*. Delft, The Netherlands: VSSD.
- Wang, B. e. (2013). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* using sugarbeet juice. *Industrial Crops and Products*, 802-811.
- Wyman C. et al. (2004). Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose. En S. Dumitriu, *Polysaccharides Structural Diversity and Functional Versatility*. CRC Press.
- Wyman et al. (2005). *Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose*. USA.
- Yang et. al. (1999). Effect of Inactivation of *nuo* and *ackA-pta* on Redistribution of Metabolic Fluxes in *E. coli*. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING*, 292-297.
- Yoshiharu Doi, Y. K. (1992). Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiology Letters*, 103-108.
- Yu, J. (2001). Production of PHA from starchy wastewater via organic acids. *Journal of Biotechnology*, 105-112.

XIV. Apéndices

Anexo 1

Células electrocompetentes de *E. coli* en medio libre de sales y electrotransformación

La electroporación bacteriana es un método de transformación de alta eficiencia utilizado ampliamente en biología molecular, por el cual, ADN plasmídico o un fragmento de ADN codificante lineal es introducido a la célula a través de poros que se forman en la membrana plasmática celular al aplicar un voltaje que aumenta la conductividad eléctrica y la permeabilidad de la misma. Los poros formados por el pulso eléctrico se sellan tras un corto período. Para obtener la máxima eficiencia de electroporación, es necesario que el medio tenga una resistencia tan alta como sea posible, para lograrlo, se propone este protocolo que asegura la eliminación de todas las sales presentes en el medio de cultivo, se trata de un método simple que utiliza el medio rico YENB a base de extracto de levadura y nutrient broth no suplementado con NaCl. Este medio soporta el crecimiento vigoroso de la mayoría de cepas de *E. coli* usadas comúnmente para electroporación y es muy útil para crecer cepas mutantes que no crecen en LB debido a la presencia de NaCl. Por este método se obtienen eficiencias de hasta 1×10^9 colonias/ml/ μg de ADN.

Nota importante: este método **NO** puede ser aplicado como tal en cepas que crecen pobremente o no crecen en YENB, como las mutantes pheA-, aroB- y trpE- probadas en nuestro laboratorio. En este caso, sustituir el medio YENB por LB, con el cual la eficiencia de transformación disminuye, pero es igualmente útil.

A. Preparación de células electrocompetentes

1. A partir de una cepa crio-preserveda en glicerol a -70°C , inocular una asada en 4 mL de células en medio YENB en un tubo de 16 x 150 mm, e incubar a 37°C y 300 rpm toda la noche.

Se recomienda inocular con asa una cantidad pequeña de células porque YENB es un medio rico y los cultivos se saturan rápidamente, una cepa tipo silvestre podría alcanzar 7 U DO a 600 nm en una noche. Agregar el antibiótico correspondiente si la cepa tiene marcador de resistencia.

2. A partir del cultivo saturado utilizar 0.25 mL para inocular en 50 mL del medio YENB en un matraz de 500 mL, crecer a 37°C y 300 rpm.

Lo que se pretende es que el cultivo se diluya aproximadamente a 0.05 UDO₆₀₀. Si se desea calcular exactamente el inóculo, entonces leer las UDO del cultivo saturado y hacer los cálculos para diluirlo a 0.05 UOD₆₀₀. Hemos observado que conservando la proporción de los volúmenes medio/matraz se obtienen las eficiencias esperadas. Con estos volúmenes se obtienen más o menos 7 preparaciones de células electrocompetentes. Inocular dos matraces para obtener el doble de preparaciones. Agregar el antibiótico correspondiente si la cepa tiene marcador de resistencia.

NOTA: Enfriar la centrífuga de mesa Sorvall ST 16R (para tubos de 50 mL) y la microcentrífuga Eppendorf (para microtubos) a 4°C . Colocar en hielo camisas de

centrífuga y material estéril: agua para lavar, glicerol al 10%, tubos cónicos de 50 mL y microtubos de 1.5 ml requeridos.

3. Monitorear el cultivo durante la fase logarítmica leyendo las UDO₆₀₀. Cuando el cultivo ha alcanzado entre 0.5-0.9 unidades (aproximadamente 2 horas para las cepas silvestres) es el momento de cosechar las células, entonces, colocar el cultivo en hielo por 15 minutos.

La cosecha se realiza en la fase logarítmica cuando las células están creciendo exponencialmente y por tanto su pared está en proceso de formación lo cual las hace más susceptibles a tratamientos como la corriente eléctrica y la permeabilización con CaCl₂. La cosecha a UDO mayores, disminuye notablemente la eficiencia de transformación. A partir de este momento las células deben permanecer a 4°C.

4. Pasar el cultivo a tubos cónicos de 50 mL pre-enfriados y centrifugar a 8 Krpm, 5 minutos a 4°C, decantar para eliminar el medio.

En este paso, en las cepas silvestres, se observa que la pastilla se concentra firmemente en el fondo del tubo y la decantación no tiene dificultad. En las cepas mutantes observar la pastilla y tener cuidado de no perturbarla al decantar. La centrifugación puede hacerse a 4Krpm por 10 minutos para evitar el menor daño a las células y obtener el máximo de viabilidad.

5. Lavar la pastilla con 5 mL de agua fría, no dar vortex, centrifugar como en el paso 4, decantar el sobrenadante.

Re-suspender las células **re-pipeteando suavemente** con micropunta. Decantar cuidadosamente para evitar perturbar la pastilla.

6. Repetir el lavado de la misma manera.

En este paso, a veces, la pastilla se vuelve tan laxa que durante la decantación se re-suspenden las células, entonces se recomienda pasar la suspensión a 4 microtubos de 1.5 mL pre-enfriados, centrifugar a 13 Krpm, 1 minuto, 4°C. Decantar y eliminar el resto del sobrenadante con micropunta.

7. Re-suspender la pastilla en un volumen total de 2 mL de glicerol 10% frío, centrifugar y eliminar el sobrenadante con una micropunta.

A medida que se continúa con el proceso, la pastilla se observa como un halo lo cual indica que las células se están volviendo competentes para la entrada del ADN, esta observación es menos evidente si se centrifuga en microtubos. Si se está lavando en 4 microtubos, re-suspender en 0.5 mL de glicerol 10% cada uno, volver a centrifugar y eliminar el sobrenadante con punta.

8. Re-suspender las células en un solo microtubo con un volumen final de 0.25 mL de glicerol 10% frío.

El número de células en suspensión debe ser aproximadamente de 2-4 10⁹ cel/mL.

9. Alicuotar en microtubos de 1.5 ml con 50 µL de células competentes y colocar en hielo seco para congelar. Almacenar a -70°C. Transformar con 1 ng de un plásmido súper-enrollado y calcular la eficiencia de transformación.

Las células competentes se pueden utilizar frescas o congeladas y pueden servir por un

periodo de hasta 2 años con la consecuente pérdida de eficiencia de transformación. No deben descongelarse y volverse a congelar.

B. Electrotransformación

Este protocolo se utiliza para células electrocompetentes obtenidas por el procedimiento anterior.

1. Las células se descongelan en hielo y se agitan cuidadosamente con un chasquido. La agitación debe ser muy cuidadosa golpeando con un dedo el fondo del tubo.

2. A una alícuota de 50 μ L de células competentes agregarle 1-4 μ L de ADN.

El ADN debe estar disuelto en agua o en un amortiguador de baja fuerza iónica como TE pH 8.0. Contaminantes como sales y proteínas disminuyen la eficiencia de transformación. Si se transforma un plásmido súper enrollado de 2 Kpb como pBlueScript, se recomienda usar **1 ng**. La eficiencia de transformación disminuye a medida que el plásmido aumenta de tamaño, si se transforma con pKD46 de 6.3 Kpb se recomienda usar **50 ng** y para pCP20 de 9.4 Kpb usar **100 ng**. Si la muestra es una reacción de ligación, la eficiencia de transformación baja 10 veces debido a la ligasa, las sales y al ADN relajado, en este caso se recomienda inactivar la ligasa a 65°C por 20 minutos y diluir 10 veces. Para un resultado óptimo se recomienda purificar la reacción de ligación por columna.

3. Transferir la suspensión de células y ADN a una cubeta de electroporación de 0.1 o 0.2 mm preenfriada.

Evitar formar burbujas. Si se observan eliminarlas dando ligeros golpes a la cubeta sobre una superficie dura.

4. Electroporar siguiendo las instrucciones del equipo de electroporación. Se recomienda 1800 V/celdas de 0.1 mm y 2500 V/celdas de 0.2 mm.

En nuestro laboratorio, el electroporador Eppendorf 2510 produce un pulso de 2500 V y tiempo constante entre 4-5 ms (milisegundos), hasta escuchar la señal. La producción de un estallido indeseable puede deberse a la presencia de sales en la muestra o la formación de burbujas de aire, este evento disminuye la eficiencia de transformación, se puede continuar el proceso y esperar una pobre o nula transformación o repetirlo siguiendo con detalle todas las indicaciones.

5. Remover la cubeta de la cámara e inmediatamente añadir 950 μ L de SOC sin antibióticos y mezclar re-pipeteando firmemente hasta re-suspender las células del fondo.

El protocolo original recomienda también usar YENB en este paso. Un retraso de 1 minuto al agregar el medio, disminuye tres veces la eficiencia de transformación.

6. Transferir el contenido a un tubo de cultivo de 13x100 mm e incubar con agitación a 300 rpm a *37°C durante **1h.

El tiempo de incubación se prolonga hasta **3 horas cuando se transforma con pCP20 y la incubación se hace a*30°C cuando los plásmidos a transformar, tienen replicones termosensibles, como pKD46 y pCP20.

7. Platear 1/10 (100 µL) de las células en LB con el antibiótico de selección con perlas de vidrio, retirarlas e incubar toda la noche a 37°C*. Mantener el resto de las células transformadas a 4°C.

Preparar las cajas en campana de flujo laminar y mantenerlas abiertas 15 minutos o hasta que se seque el exceso de agua condensada. Se ha observado que precalentar las cajas a 37°C mejora en un 20% la eficiencia de transformación. Si la transformación fue muy eficiente y hay abundantes colonias volver a platear un volumen menor para obtener colonias aisladas. Si la eficiencia de transformación fue baja o no se obtienen colonias, centrifugar el resto del cultivo, decantar el medio y platear todo el volumen de la gota residual. La incubación se hace a *30°C cuando los plásmidos a transformar, tienen replicones termosensibles, como pKD46 y pCP20.

Soluciones

Medio YENB

Bacto yeast extract 0.75%

Bacto Nutrient Broth 0.8%

Medio LB

Triptona 1%

Extracto de levadura 0.5%

NaCl 0.5%

Medio SOC

Triptona 2.0%

Extracto de levadura 0.5%

Cloruro de sodio 0.058%

Sulfato de magnesio anhidro 0.12%

Cloruro de magnesio.6H 2O 0.2%

Cloruro de potasio 1.25mM

Glucosa 20mM.

TE

TrisHCl 10mM

EDTA 1mM

pH 8.0

Glicerol

Glicerol 10%

Anexo 2

Miniprep por lisis alcalina-Extracción de ADN plasmídico de cepas de *E. coli*.

El principio del método es la desnaturalización alcalina selectiva del ADN de alto peso molecular a pH12-12.5, mientras que los plásmidos de ADN circular covalentemente cerrados permanecen en doble cadena.

Plásmidos grandes y pequeños se pueden extraer por este método. Este es un método simple para obtener ADN plasmídico lo suficientemente limpio para digestiones con enzimas de restricción o para transformar otras células. Este método tiene un rendimiento de 3-5µg de plásmido por cada 1.5mL de cultivo.

Procedimiento

1. Picar con la punta de un palillo estéril una colonia de bacterias que contenga un plásmido que confiere resistencia a un antibiótico, inocular en 3mL de medio LB más el antibiótico correspondiente e incubar a 37°C toda la noche.

El cultivo se crece en medio rico toda la noche con el fin de obtener un cultivo saturado. Es indispensable el antibiótico para mantener la presión de selección y evitar la segregación del plásmido. Las soluciones concentradas de antibióticos se preparan 1000X (es decir, 1000 veces más concentradas que la concentración final) y se almacenan a -20°C.

2. Transferir a microtubo, 1.5mL del cultivo y centrifugar 1 minuto a máxima velocidad a temperatura ambiente y eliminar el sobrenadante.

Este paso elimina el medio y se concentran las células en una pastilla, el sobrenadante se elimina por decantación y se deja escurrir el medio residual sobre una toalla absorbente.

3. Lavar la pastilla en 1mL de solución SET fría y dar vortex.

Esta solución lava a las células del medio de cultivo cuyos residuos inhiben posibles reacciones posteriores como digestiones enzimáticas. También deshidrata a las células por su alto contenido de azúcar, de tal manera que se separan las membranas de la pared celular.

4. Centrifugar y eliminar el sobrenadante como en el paso 2.

Se puede observar que la pastilla está menos compacta que en la primera centrifugación. Esto indica que las células se están deshidratando.

5. Re-suspender el pellet en 150µL de SET + 5µL de ARNasa, agitando vigorosamente en vortex.

La ARNasa degrada al ARN total, dejando al ADN más limpio. Se sugiere hacer un coctel de SET+ ARNasa al momento de usar y sobre todo si se trabaja con varias muestras. En cultivos muy concentrados (>3 U.D.O.) es necesario agregar más ARNasa (10-15µL). En este paso las células se siguen deshidratando y por tanto queda más espacio entre la pared celular y la membrana de tal modo que la solución de lisis se puede intercalar.

6. Agregar 350µL de la solución II y mezclar por inversión 5-6 veces.

Esta solución lisa por completo a las células e inmediatamente se observa la mezcla transparente. Si esto no sucede, indica que la muestra no se lisó y no tiene caso continuar.

7. Incubar 10 minutos en hielo.

Durante esta incubación ocurre la desnaturalización del ADN cromosomal de alto peso molecular. Si la solución II excede de pH13.0, entonces también se desnaturaliza el ADN plasmídico, el cual es más difícil de re-naturalizar.

8. Agregar 250µL de la solución III fría, mezclar por inversión.

En este paso se neutraliza la solución de lisis, la masa de ADN cromosomal se re-naturaliza y se agrega con los detritus celulares formando una red insoluble, simultáneamente, la alta concentración de acetato de sodio causa la precipitación del complejo de proteínas-SDS.

9. Incubar 15 minutos en hielo.

Esta incubación permite que la mayoría de las proteínas, principalmente las de alto peso molecular, el ARN degradado y el ADN cromosómico se precipiten.

10. Centrifugar 5 minutos a máxima velocidad a temperatura ambiente.

Se obtiene un sobrenadante claro donde está contenido el ADN plasmídico. La pastilla es amorfa y gelatinosa.

11. Recuperar el sobrenadante por decantación en un tubo nuevo y desechar la pastilla.

En el caso de que se re-suspendan partículas insolubles, el sobrenadante puede recuperarse con micropunta, hacerlo cuidadosamente para evitar el riesgo de arrastrar ADN cromosomal. Repetir la centrifugación si es necesario.

12. Agregar 650µL (o un volumen igual al sobrenadante) de isopropanol, agitar por inversión 6 veces.

El isopropanol precipita el ADN plasmídico, no se recomienda el vortex fuerte porque el ADN en alcohol se vuelve quebradizo.

13. Centrifugar 5 minutos a máxima velocidad, y eliminar el sobrenadante por decantación.

La centrifugación concentra el ADN. El isopropanol es un alcohol que precipita rápidamente el ADN pero con el tiempo precipita otros componentes y deja la muestra más sucia, por tanto debe centrifugarse de inmediato para evitar que se precipiten las sales. Conviene eliminar la última gota sobre una toalla absorbente, después de decantar. La pastilla puede parecer invisible, sin embargo, esto es una señal buena, pues generalmente cuando se observa una pastilla abundante, se trata de componentes indeseables.

14. Agregar a la pastilla 1mL de etanol al 70%, dar vortex vigoroso.

Este paso lava la pastilla ya que en el 30% de agua se disuelven las sales indeseables.

15. Centrifugar 5 minutos a máxima velocidad y eliminar el sobrenadante por decantación.

Se recomienda escurrir sobre una toalla absorbente por 2 minutos, o bien con una punta amarilla colocada en el fondo del tubo en el lado opuesto de la pastilla retirar todo el etanol.

16. Secar la pastilla en un concentrador al vacío a temperatura ambiente por 5 minutos.

La pastilla también puede secarse dejando el tubo destapado cubierto con un trozo de aluminio o una toalla absorbentes sobre una gradilla para evitar que se contamine con partículas del aire. Otra manera, es colocar el tubo en la campana, hacia el flujo de aire. No se recomienda secar en exceso porque el ADN puede fracturarse.

17. Re-suspender el pellet en 50µL de TE pH8.0.

Es recomendable usar TE pH8.0 porque contiene EDTA que inactiva a las ADNasas y un pH en el cual el ADN es muy soluble. Se recomienda re-suspender en agua cuando el

protocolo subsiguiente lo requiere, por ejemplo para enviar a secuenciar.

18. Cuantificar 2 μ L en gel de agarosa al 1% o cuantificar espectrofotométricamente con 1.5 μ L en el nanodrop. Almacenar a 4°C ó 20 °C.

NOTA IMPORTANTE: Se sugiere eliminar los pasos 3, 4, 7 y 9, en el caso de que se esté haciendo un tamizado (screening) de numerosas colonias, pues de esta manera el tiempo total de la extracción se disminuye notablemente y el rendimiento y pureza de ADN son aún suficientes para hacer digestiones y reacciones de PCR, a esta variante se le conoce como miniprep rápida. Centrifugar más de 1.5 mL de cultivo provoca contaminación de la miniprep con ADN cromosomal.

Soluciones

Solución SET.

Sacarosa 20% 60g/300mL

Tris-HCl 0.05M 15mL de un stock 1M pH 8.0/300mL

EDTA 0.05M 60mL de un stock 0.25M pH 8.0/300mL

pH 8.0 Filtrar en 0.45 μ m y autoclavear

RNAasa Buffer para disolver la RNAasa

Acetato de sodio 100mM Acetato de sodio anhidro 0.82g/100mL

EDTA 0.3mM EDTA Na 2 0.0012g/100mL

Ajustar pH 5.0 con ácido acético. Filtrar 0.45 μ m.

Pesar 0.1g de RNAasa (Ribonucleasa A de pancreas bovino tipo A). Disolver en 10mL de buffer en tubo pyrex estéril hervir 20 minutos en baño María. Enfriar. Alicuotar en tubos de 0.6mL. Congelar.

Solución II

La solución II se prepara mezclando partes iguales de SDS 2% y NaOH 0.4N al momento de usar,

mezclar con vortex.

SDS 2% 7g/350mL

NaOH 0.4N 5.6g/350mL

Solución III

Acetato de sodio anhídrido o trihidratado 3M. Ajustar a pH4.8, con ácido acético glacial.

Aforar y

filtrar en 0.45 μ m.

Preparar 250mL

Solución TE

Trisma base 10mM 1mL de un stock Tris 1M/100mL

EDTA 1mM pH8.0 0.4mL de un stock EDTA 0.25M pH 8.0/100mL

Esterilizar en autoclave.

Las soluciones SET y III se almacenan a 4°C.

Anexo 3

Medio mínimo mineral AM1

Tabla 19. Componentes del medio AM1

Reactivo	Masa (g)
Stock 1 para 1L	
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	26.3
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	8.7
Stock 2 para 100mL	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1M	24.64
Stock 3 para 100mL	
KCl 2M	14.91
Stock 4 para 100mL	
Betaina 2M	11.715
** Si es necesario ajustar a pH 7 con NaOH	
Stock 5 para 1L Elementos traza	
FeCl_3	1.6
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.2
CuCl_2	0.1
$\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.2
NaMoO_4	0.2
H_3BO_3	0.05
$\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.33
HCl	10 mL
* En 10 mL de agua DI agregar las sales y después adicionar el HCl para disolverlos, finalmente aforar a 1L con agua DI	

Medio AM1 2X C/N=20	
Stock 1	100 mL
Stock 2	3 mL
Stock 3	2 mL
Stock 4	2 mL
Stock 5	3 mL
Glucosa	30 g
Aforar a 1 L con agua destilada.	