

Universidad ORT Uruguay
Facultad de Ingeniería

Optimización de la producción de poli-3-hidroxi-butirato en
Herbaspirillum seropedicae Z69 mediante la sobreexpresión de
los genes: *fba*, *tpiA* o *pgi*.

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Manuela Oribe – 192507

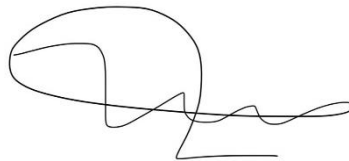
Tutores: Ana Karen Malán y Ana Inés Catalán

2023

Autoría

Yo, Manuela Oribe, declaro que el trabajo que se presenta en esa obra es de mi propia mano. Podemos asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba el trabajo final de la carrera Ingeniería en Biotecnología;
- Cuando he consultado el trabajo publicado por otros, lo he atribuido con claridad;
- Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente mía;
- En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, he explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por mi;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Manuela Oribe

13 de marzo de 2023

Agradecimientos

Primero que nada, agradecerles a mis tutoras, Ana Karen Malán y Ana Inés Catalán, por su disponibilidad, su ayuda y su constante apoyo. Gracias por guiarme, por enseñarme y por confiar en mí para llevar a cabo este proyecto.

A Silvia Batista, por aclararme las dudas siempre, por su constante ánimo cuando las cosas no salían como esperábamos y por alegrarse de mis logros como si fueran propios.

A todo el equipo de BIOGEM del IIBCE, por abrirme las puertas.

A mi familia y amigos, por su apoyo constante durante todos estos meses, por bancar mis frustraciones, enojos y por festejar mis alegrías y logros. Principalmente a mis padres, por preguntarme como venían las cosas y escuchar atentamente, aún sin entender nada de los que les comentaba. Por sus palabras de aliento cuando los resultados no eran los mejores y por sus grandes festejos cuando las cosas salían bien, por más insignificantes que fueran.

Sin ustedes, esto no hubiera sido posible.

¡Gracias!

Resumen

La acumulación masiva de residuos plásticos a nivel mundial ha generado grandes preocupaciones. El uso de plásticos biodegradables se presenta como una solución prometedora. Los polihidroxicanoatos (PHAs), son biopolímeros sintetizados naturalmente por una gran variedad de bacterias. Son biodegradables, biocompatibles y provienen de fuentes renovables.

La producción de los PHAs no se ha podido establecer a escala industrial de forma masiva debido al alto costo de producción. En la actualidad la investigación sobre este tema está orientada principalmente a la utilización de sustratos baratos, a la optimización del proceso fermentativo, la búsqueda de nuevas cepas bacterianas y/o introducción de modificaciones genéticas en cepas productoras para mejorar su eficiencia mediante cambios del metabolismo celular. El poli-3-hidroxi-butirato (PHB), es un polímero de cadena corta formado por unidades de cuatro átomos de carbono y es el PHA más abundante y estudiado.

Herbaspirillum seropedicae es una β -proteobacteria Gram-, que presenta la peculiaridad de acumular niveles significativos de PHB cuando se la cultiva en presencia de glucosa como fuente carbonada.

Estudios de flujos metabólicos mediante el análisis de modos elementales de flujo, permitió identificar dentro de la red metabólica presente en esta bacteria, reacciones químicas posibles de ser modificadas para generar un aumento en el rendimiento de transformación de glucosa en PHB ($Y_{PHB/gluc}$). En este trabajo se propuso sobre expresar los genes *fba* (codifica para la proteína fructosa-bifosfato aldolasa), *tpiA* (triosa fosfato isomerasa) y *pgi* (glucosa-6-fosfato isomerasa), con el fin de observar un mayor rendimiento de transformación. No se observaron diferencias entre las cepas recombinantes (Z69 (pBBR1MCS-2::*tpiA*), Z69 (pBBR1MCS-2::*fba*) y Z69 (pBBR1MCS-2::*pgi*)) y la cepa control, en cuanto al crecimiento y producción de PHB. Estos resultados estarían indicando que, en las condiciones ensayadas, la sobre expresión de una única enzima no logró aumentar el flujo metabólico hacia la producción de PHB.

Palabras clave

PHB

pgi

tpiA

fba

Abreviaturas

PHA - Polihidroxicanoatos

PHB - Poli-3-hidroxicbutirato

HA - ácidos hidroxicanoicos

IIBCE - Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Km - Kanamicina

DO - Densidad óptica

PHA-SCL (*Short Chain Length*) - poli-hidroxicanoatos de cadena corta

PHA-MCL (*Medium Chain Length*) - poli-hidroxicanoatos de cadena media

3HB – 3-hidroxicbutirato

PLA - Poliésteres de ácido láctico

ED - Entner-Doudoroff

Q - Productividad

X-gal - β -D-galactopiranosido

Nal - Ácido Nalidíxico

Y - rendimiento

°C - grados Celsius

g - gramos

mg - miligramos

L - litros

mL - litros

μ L - microlitro

M - Molar

mM - milimolar

rpm - revoluciones por minuto

V - voltios

nm - nanómetros

DMSO - Dimetilsulfóxido

h - horas

Índice

1. Introducción	12
1.1 Plásticos	12
1.2 Plásticos biodegradables	13
1.2.1 Biosíntesis de PHA.....	15
1.2.2 Aplicaciones de PHA.....	16
1.2.3 Producción industrial de PHA	17
1.3 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	19
1.4 Ingeniería metabólica.....	21
2. Objetivos	23
2.1 Objetivo general.....	23
2.2 Objetivos específicos	23
3. Materiales y métodos	24
3.1 Medios de cultivo, antibióticos y <i>buffers</i>	24
3.2 Bacterias y plásmidos	24
3.3 Reacciones de PCR y electroforesis en gel de agarosa.....	25
3.4 Lisados celulares.....	27
3.5 Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina.....	28
3.6 Preparación de <i>E. coli</i> TOP10 competentes.....	28
3.7 Construcción de Z69 (pBBR1MCS-2:: <i>pgi</i>)	29
3.7.1 Amplificación por PCR del gen <i>pgi</i>	29
3.7.2 Digestión del vector con <i>EcoRV</i> o <i>SmaI</i>	30
3.7.3 Ligación.....	32
3.7.4 Transformación de células químicamente competentes de <i>E. coli</i> TOP10.....	33
3.7.5 Verificación de la construcción pBBR1MCS-2:: <i>pgi</i>	33
3.7.6 Movilización del plásmido pBBR1MCS-2:: <i>pgi</i> a <i>H. seropedicae</i> Z69....	34

3.8	Ensayos de producción de PHB	35
3.8.1	Determinaciones analíticas	35
3.8.1.1	Densidad óptica (DO)	35
3.8.1.2	Biomasa celular.....	36
3.8.1.3	Concentración de PHB.....	36
3.8.1.4	Concentración de glucosa	37
3.8.1.4	Rendimientos y productividad	37
4.	Resultados y discusión	38
4.1	Verificación de las cepas Z69 (pBBR1MCS-2:: <i>fba</i>) y Z69 (pBBR1MCS-2:: <i>tpiA</i>).....	38
4.2	Construcción del mutante Z69 (pBBR1MCS-2:: <i>pgi</i>).....	39
4.2.1	Amplificación por PCR del gen <i>pgi</i> y digestión del vector con <i>EcoRV</i> y <i>SmaI</i>	39
4.2.2	Ligación y transformación de células químicamente competentes de <i>E. coli</i> TOP10.....	40
4.2.3	Verificación del sentido del inserto	42
4.3	Evaluación de la producción de PHB y rendimiento en Z69 (pBBR1MCS-2:: <i>tpiA</i>)	44
4.4	Evaluación de la producción de PHB y rendimiento en Z69 (pBBR1MCS-2:: <i>fba</i>).....	47
4.5	Evaluación de la producción de PHB y rendimiento en Z69 (pBBR1MCS-2:: <i>pgi</i>).....	50
4.6	Discusión general.....	53
5.	Conclusiones	56
6.	Perspectivas a futuro	57
7.	Referencias.....	58

Índice de figuras

Figura 1: Estructura general de PHA.....	13
Figura 2: Ruta metabólica para la síntesis y degradación de PHB	16
Figura 3: Ruta Entner-Doudoroff lineal y cíclica.....	22
Figura 4: Mapa del plásmido pBBR1MCS-2	31
Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa.....	38
Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa.....	39
Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa.....	42
Figura 8: Electroforesis en gel de agarosa.....	43
Figura 9: Perfil de producción en Z69 (pBBR1MCS-2:: <i>tpiA</i>).	44
Figura 10: Perfil de producción en Z69 (pBBR1MCS-2)	45
Figura 11: Perfil de producción en Z69 (pBBR1MCS-2:: <i>fbA</i>).....	47
Figura 12: Perfil de producción en Z69 (pBBR1MCS-2)	48
Figura 13: Perfil de producción en Z69 (pBBR1MCS-2:: <i>pgi</i>).....	50
Figura 14: Perfil de producción en Z69 (pBBR1MCS-2)	51

Índice de tablas

Tabla 1: Propiedades físicas de P(3HB), P(3HB-HV), P(4HB) y PET.....	14
Tabla 2: Producción de PHA.....	18
Tabla 3: Antibióticos utilizados en el trabajo.....	24
Tabla 4: Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo.....	25
Tabla 5: Programa de amplificación de PCR.....	26
Tabla 6: Mezcla de reacción de PCR.....	26
Tabla 7: Cebadores utilizados en este trabajo.....	27
Tabla 8: Mix de PCR para amplificación de gen <i>pgi</i>	30
Tabla 9: Reactivos y cantidades utilizadas para las digestiones.....	31
Tabla 10: Condiciones de ligación.....	32
Tabla 11: Resultado de las ligaciones.....	40
Tabla 12: Productividad máxima de Z69 (pBBR1MCS-2:: <i>tpiA</i>) y control.....	46
Tabla 13: Productividad máxima de Z69 (pBBR1MCS-2:: <i>fba</i>) y control.....	49
Tabla 14: Productividad máxima de Z69 (pBBR1MCS-2:: <i>pgi</i>) y control.....	52

1. Introducción

1.1 Plásticos

Globalmente, los plásticos constituyen un conjunto heterogéneo de materiales formados por compuestos orgánicos naturales o sintéticos. Estos materiales son maleables, por lo que pueden ser moldeados en objetos sólidos de diferentes formas. Los plásticos petroquímicos son sintetizados a partir de derivados del petróleo, generando en algunos casos materiales de gran elasticidad y flexibilidad en cierto rango de temperaturas. Estos compuestos son muy versátiles, poseen una amplia gama de aplicaciones lo que ha llevado a mejorar la calidad de vida de los seres humanos. Es así como se emplean para la elaboración de utensilios desechables, embalajes y accesorios, entre otros. También pueden ser utilizados para elaborar herramientas con una vida media más extensa, sin la necesidad de ser desechadas luego de un uso.

Durante el siglo pasado fueron determinantes a la hora de mejorar las condiciones de vida de la humanidad y promover avances importantes en la tecnología. En 2021 se produjeron 390,7 millones de toneladas de plástico en el mundo. El 90,2% fueron plásticos producidos a partir de combustibles fósiles, 8,3% provinieron de plásticos reciclados post consumo y el 1,5% representó la producción de bioplásticos (1). Alrededor del 50% de estos plásticos son desechados luego de poco tiempo de uso y muchas veces son usados una única vez. Un problema asociado al uso de plásticos petroquímicos es que la mayor porción de ellos tiene una velocidad de degradación muy baja, lo que genera problemas asociados a su disposición final además de provenir de fuentes limitadas, no renovables (2–4). Miles de toneladas de plásticos son arrojados al mar, lo cual ocasiona contaminación y la muerte de los animales que los ingieren por accidente (5). Por este motivo, se han buscado soluciones como los procesos de incineración, reciclaje, o la reutilización. Desafortunadamente, estas soluciones presentan grandes desventajas, por lo que no son consideradas 100% efectivas (5). La incineración de plásticos es potencialmente peligrosa y muy costosa. Durante la combustión, se pueden desprender compuestos dañinos para la salud como el cianuro de hidrógeno. En cuanto al reciclaje, el mismo consume mucho tiempo y debido a la gran variedad de aditivos y pigmentos, el uso del material reciclado es limitado (6).

1.2 Plásticos biodegradables

Los plásticos biodegradables pueden producirse a partir de fuentes renovables. El uso de plásticos biodegradables se presenta como una solución prometedora. Dentro del grupo de plásticos biodegradables de origen biológico, se encuentran los poliésteres de ácido láctico (PLAs), los bioplásticos basados en almidón, los basados en celulosa y los polihidroxialcanoatos (PHAs) (7). Estos últimos son biopolímeros con propiedades termoplásticas producidos naturalmente por arqueas y diversas cepas bacterianas Gram- y Gram+, cianobacterias y bacterias fotosintéticas partir de fuentes renovables (2, 8, 9). Los PHAs son biopolímeros de alto peso molecular, biodegradables y biocompatibles. En general, los microorganismos acumulan estos polímeros en condiciones desbalanceadas de crecimiento: en presencia de un exceso de fuente carbonada y limitación de algún nutriente esencial como N, O, P, S, etc. (5, 10). Los PHAs son acumulados en el citoplasma como gránulos y pueden llegar a representar el 80% del peso seco celular bajo condiciones óptimas de acumulación (2, 11).

En cuanto a la estructura química, los PHAs son poliésteres, constituidos por unidades de hidroxíácido (monómero) (Figura 1), en forma de homopolímeros o heteropolímeros.

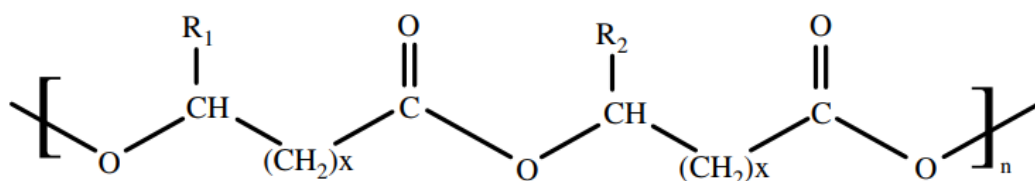


Figura 1: Estructura general de PHA. R1/R2 corresponden a grupos alquilo, x = 1 al 4 y n = 100 al 30.000 (12).

El poli-3-hidroxiбутирато (PHB) es un homopolímero compuesto de monómeros de cadena corta de 3-hidroxiбутирато, con cuatro átomos de carbono. Este fue el primer PHA en ser identificado en 1926 por Lemoingé a partir de *Bacillus megaterium* (4) y es considerado el PHA más abundante y, por ende, es el más estudiado (13). Es el PHA producido por la mayor cantidad de microorganismos en la naturaleza a partir de carbohidratos, alcoholes como el glicerol o ácidos grasos (14). Además, es altamente

cristalino debido a su estructura de cadena lineal y puede ser encontrado como polímero virgen o como parte de copolímeros y mezclas (15).

Las propiedades de los PHAs varían considerablemente dependiendo del largo de la cadena carbonada del monómero que lo compone, clasificándose en PHA-SCL (*Short Chain Length*) y PHA-MCL (*Medium Chain Length*). Los PHA-SCL contienen monómeros con cadena carbonada de 3 a 5 átomos de carbono mientras que las unidades de los PHA-MCL contienen entre 6 y 14 átomos de carbono. También existen los PHAs mixtos, los cuales están compuestos por monómeros de cadena corta y monómeros de cadena media (5, 16). La temperatura de fusión, la temperatura de transición vítrea, la resistencia a la tracción y el porcentaje de elongación a la ruptura son afectados por el largo de la cadena (Tabla 1). El PHB pertenece al grupo de cadena corta, tiene baja permeabilidad al O₂ y buenas propiedades termoplásticas, comparadas con los polímeros obtenidos a partir de petróleo. De todos modos, es más rígido y frágil que el polipropileno (4). En la tabla 1 se observan las propiedades físicas de diferentes PHAs, además de las propiedades del tereftalato de polietileno.

Tabla 1: Propiedades físicas de P(3HB), P(3HB-HV), P(4HB) y PET (tereftalato de polietileno). Adaptado de Philip *et al.* y Awaja *et al.* (12, 17).

Propiedades	P(3HB) ¹	P(3HB-3HV) ²	P(4HB) ³	PET
Temperatura de fusión (°C)	177	150	60	265
Temperatura de transición vítrea (°C)	4	-7,25	-50	92
Resistencia a la tracción (MPa)	40	25	104	1700
Alargamiento a la rotura (%)	6	20	1000	-

1: poli-3-hidroxibutirato, 2: poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato), 3: poli-4-hidroxibutirato

Como se mencionó anteriormente, los PHAs se caracterizan por ser biocompatibles y biodegradables. La biocompatibilidad es la característica de un material de no ejercer ningún efecto sobre los organismos vivos, células aisladas o su entorno biológico (18). Además, no se debe generar ningún compuesto tóxico durante la degradación del polímero. En el caso del PHB, se observa una alta compatibilidad debido a la presencia natural del 3-hidroxibutirato en el torrente sanguíneo de humanos y animales. Además, se ha demostrado que monómeros y oligómeros de hidroxialcanoatos

derivados de PHA ejercen funciones bioactivas (19). Es por ello por lo que los PHAs, especialmente PHB, se presentan como posibles candidatos para utilizar en el área médica.

En cuanto a la biodegradabilidad, se consideran biodegradables los plásticos que pueden ser degradados ya sea por hidrólisis química o por enzimas secretadas por microorganismos (20). Los PHAs pueden ser fácilmente degradados a dióxido de carbono y agua cuando se los deposita en diversos ecosistemas como suelos, aguas residuales y lagos. Además, cuentan con la habilidad de poder degradarse bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas, mediante métodos térmicos o utilizando despolimerasas microbianas (12). Su biodegradación depende fuertemente de las condiciones ambientales como la temperatura, el pH y los nutrientes disponibles. Estas características los vuelven fuertes candidatos para competir con el plástico convencional, ya que poseen propiedades plásticas similares a varios termoplásticos utilizados hoy en día (21).

1.2.1 Biosíntesis de PHA

La composición del PHA que produce un microorganismo depende del sustrato carbonado adicionado al medio de cultivo, de las rutas metabólicas empleadas y de la especificidad de enzima PHA sintasa que polimeriza los monómeros constituyendo el biopolímero (22).

La biosíntesis de los PHAs puede separarse en dos etapas. En primera instancia, se sintetizan los tioésteres de HAs, como (R)-hidroxiacil-CoA. Para sintetizar los HAs, participan diferentes vías metabólicas del metabolismo central, las rutas catabólicas de carbohidratos, la β -oxidación o la síntesis *de novo* de ácidos grasos. El metabolismo de carbohidratos o ácidos grasos, generan intermediarios que son transformados en tioésteres por las enzimas presentes en los organismos productores de PHAs. En la segunda etapa se da la polimerización de los tioésteres, catalizada por la enzima PHA sintasa.

La vía clásica de síntesis de PHB se muestra en la Figura 2. Comienza con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA formando una molécula de acetoacetil-CoA, reacción catalizada por la enzima β -cetotiolasa. Luego el acetoacetil-CoA es reducido a 3-hidroxiacetil-CoA a través de la enzima acetoacetil-CoA reductasa

dependiente de NADPH. Finalmente se produce la polimerización de los monómeros 3-hidroxiacetil-CoA, produciendo PHB. La última reacción es catalizada por la PHB sintetasa (2, 22).

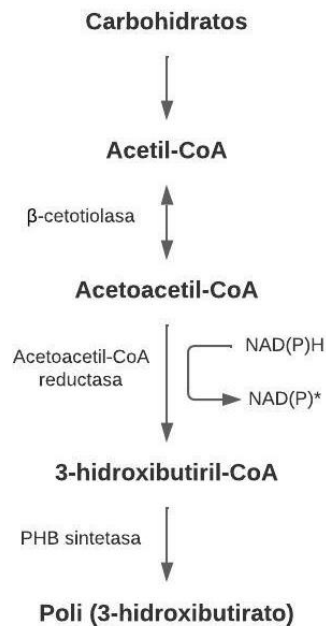


Figura 2: Ruta metabólica para la síntesis de PHB a partir de carbohidratos. Se indican las principales enzimas y los productos implicados en el proceso. Adaptado de González et al. 2012 (5).

1.2.2 Aplicaciones de PHA

Las propiedades de biodegradabilidad y biocompatibilidad, así como la estabilidad a altas temperaturas, la elasticidad, la dureza y el bajo grado de porosidad superficial convierten a los PHAs en grandes candidatos a ser utilizados como material biológico con aplicaciones en diversos campos como la medicina y la agricultura entre otros. Pueden ser utilizados como biocombustibles, materiales de empaque, envases, productos sanitarios y dispositivos médicos (9, 11).

Existe una gran curiosidad en utilizar estos polímeros como *carriers* para administrar fármacos. El mayor objetivo en la administración de fármacos es que el medicamento se administre de manera controlada y específica para mejorar la eficacia. Los PHAs, debido a su origen biológico, se han utilizado como material para producir tabletas y nanopartículas entre otros. En estos casos, una vez que el *carrier* llega a destino,

se degrada el compartimento y se libera el fármaco. Además, se ha utilizado el PHB como vehículo en tejido transdérmico y para la distribución de antibióticos (9, 11).

Los PHAs también pueden ser utilizados en el campo de la ingeniería de tejidos. Se pueden utilizar como matrices en el crecimiento celular. Además, han sido utilizados en ingeniería de tejidos óseos, cardíacos y cerebrales. Se han utilizado como biocompuestos para la regeneración de células osteoblásticas, para reemplazar válvulas defectuosas del corazón humano y para dar soporte a las neuronas primarias (23–25).

Los PHAs tienen varias aplicaciones en la agricultura. El uso de plásticos convencionales en la agricultura aumentó a 7,4 millones de toneladas en 2019, generando preocupaciones. Es por ello por lo que los PHAs aparentan ser soluciones prometedoras. Los mismos pueden ser utilizados como mantillos o redes agrícolas, o como bolsas de cultivo. La mayor ventaja de este material es su compostabilidad, la cual permite la eliminación del bioplástico en el suelo. Además, los PHAs son una fuente de poder reductor y matriz de crecimiento microbiano. Esto hace que el uso de bolsas de cultivo de PHA, no contamine los cuerpos de agua y desnitrifique los arroyos y lagos cercanos a los campos agrícolas. También, los PHAs pueden ser utilizados para la liberación controlada de pesticidas e insecticidas (9, 26).

1.2.3 Producción industrial de PHA

La primera iniciativa de producción industrial de PHAs comenzó en la década de los '80 (5). A lo largo de estos años de investigación y desarrollo, diferentes empresas intentaron producir estos polímeros. Actualmente, son varias las compañías en el mundo que están produciéndolos, principalmente a escala piloto. Los trabajos de investigación y desarrollo en este tema continúan, aunque la producción de los PHAs no se ha podido establecer a escala industrial por el alto costo de producción. El factor que más contribuye en el precio final de los PHAs es el costo de la materia prima (fuente carbonada) y las bajas relaciones de conversión de estas en el producto final (4, 27).

Actualmente, existen varias empresas que se encuentran produciendo PHAs a escala piloto e industrial. En la Tabla 2, se observan algunas de las compañías productoras junto con la capacidad de producción y el precio por kg.

Tabla 2: Producción de PHA de diferentes compañías a escala piloto e industrial, junto con costos de producción. Adaptado de Kumar *et al.* (11).

Productores	PHA y nombre comercial	Microorganismo	Capacidad de producción (ton/año)	Precio (kg⁻¹) (€)
Bio-On Srl., Italia	PHB, esferas de PHBV, (minerv®-PHA)	<i>Cupriavidus necator</i>	10.000	-
Mitsubishi Gas Chemical Company Inc., Japón	Biogreen®, PHB	-	10.000	2,50 – 3,00
Biomatera, Canadá	PHA resins	Bacteria no patógena, no transgénica aislada del suelo	-	-
BluePHA, China	PHBVHHx, PHV, P3HP3HB, P3HP4HB, P3HP, P4HB	Cepas microbianas desarrolladas mediante herramientas de biología sintética	-	-
Telles, EE.UU.	PHB Mirel™	<i>Ralstonia eutropha</i>	50.000	1,5
PHB Industrial Company, Brasil	PHB Biocycle®	-	50	-
Kaneka Corporation, Japón	PHB-PHHx (AONILEX®)	<i>Ralstonia eutropha</i>	3500	-
Biomer Inc., Alemania	PHBV y PHB Biomer®	<i>Alcaligenes latus</i>	50	3,00 – 5,00
Newlight Technologies LLC, EE.UU.	PHA resins	Biocatalizador Newlight 9x	-	-
PHB Industrial S.A., Brasil	PHB; PHBV (BIOCYCLE®)	<i>Alcaligenes sp.</i>	3000	-
Tianan Biologic, Ningbo, China	PHBV, PHBV + Ecoflex blend Enmat®	<i>Ralstonia eutropha</i>	10.000	3,26

PolyFerm, Canadá	mcl-PHA (VersaMer™ PHA)	Cepa microbiana salvaje	-	-
P&G, EE.UU.	PHBH Nodax™	-	20.000 – 50.000	2,5
Shenzhen EcomannBiotechnology Co. Ltd., China	Pellets de PHA, resinas, microbeads (AmBio®)	-	5000	-
SIRIM Bioplastics Pilot Plant, Malasia	PHA	-	2000	-
Lianyi Biotech, China	PHBH Nodax™	-	2000	3,7
Tianjin GreenBio Material Co., China	P(3,HB) films, pellets (Sogreen®)	-	10.000	-

De acuerdo con lo observado en la Tabla 2, el costo de producción es de aproximadamente 3,37 € por kilogramo, mientras que la producción de polímeros sintéticos como el propileno o polietileno cuestan aproximadamente 0,32 € por kilogramo (11). Estos altos costos hacen que la producción de PHAs no sea competitiva frente a la industria de los plásticos convencionales. Por lo tanto, la investigación actual sobre este tema está orientada principalmente a la utilización de sustratos baratos, a optimizar el proceso fermentativo, la búsqueda de nuevas cepas bacterianas y/o introducción de modificaciones genéticas en cepas productoras para mejorar su eficiencia mediante cambios del metabolismo celular. Por lo cual, en este trabajo proponemos la utilización de *Herbaspirillum seropedicae* como nuevo organismo productor de PHB, con la adición de modificaciones genéticas que permitan aumentar el porcentaje de acumulación.

1.3 *Herbaspirillum seropedicae*

Herbaspirillum seropedicae es una bacteria Gram- que pertenece a la sub-clase de las β -proteobacterias. Son capaces de establecerse como endófitos de plantas, colonizando los espacios intercelulares de hojas y raíces como células individuales o micro-colonias. Pueden colonizar diversas plantas, incluyendo caña de azúcar, arroz y maíz, y son capaces de promover el crecimiento vegetal (28). Estas bacterias se destacan por su capacidad de crecer en presencia de diversos sustratos carbonados como glucosa,

fructosa, D-xilosa, L-arabinosa, entre otros (28, 29). Además, tienen pocos requerimientos nutricionales, son de crecimiento rápido y no se han descrito aislamientos patógenos. Su crecimiento se puede dar entre un rango de pH desde 5,3 a 8 y su temperatura óptima es 34°C, aunque puede crecer a 30°C (28). Cuando son cultivadas en el laboratorio, no requieren vitaminas ni cofactores y es de rápido crecimiento (28). Es por ello por lo que se las considera como buenas candidatas en el área biotecnológica para la síntesis de compuestos con valor agregado.

En cuanto al metabolismo carbonado en *H. seropedicae*, en la década de los '90, en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), a partir de extractos celulares de cultivos crecidos en presencia de glucosa, se determinó mediante medidas de actividad enzimática la presencia de la ruta de Entner-Doudoroff (ED) completa y la ruta de las pentosas fosfato (PP) en el sentido biosintético. Asimismo, no se detectó actividad de la enzima 6-fosfofructoquinasa (Pfk), que cataliza la reacción de fosforilación de la fructosa 6-fosfato a fructosa 1,6 bifosfato, de la ruta Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) por lo que *H. seropedicae* no utilizaría la glicólisis para degradar la glucosa (Datos no publicados). Estos resultados fueron corroborados en el 2011, cuando se secuenció y publicó el genoma completo de *H. seropedicae* (30).

A principios de la década de los 2000, Catalán et al. lograron establecer que las cepas de *H. seropedicae* Z67, Z69 y Z68 eran capaces de acumular niveles significativos de PHB cuando se las cultivaba en presencia de glucosa como fuente carbonada. En este ensayo se logró alcanzar un contenido de PHB de 40% de peso seco. Además, se determinó que la cepa Z69, utilizada en este trabajo, posee la ruta clásica de síntesis de PHB (Figura 2), en donde cada monómero de 3HB se sintetiza a partir de dos moléculas de acetil-CoA y una molécula de NADPH (2). En la actualidad, se dispone la secuencia completa del genoma de las cepas SmR1, Z67 y Z69. A través del análisis del genoma, se lograron identificar 13 potenciales genes involucrados en el metabolismo del PHB (2, 30).

1.4 Ingeniería metabólica

La ingeniería metabólica se puede definir como el mejoramiento de actividades celulares por manipulación de la célula empleando la tecnología del ADN recombinante. En estos casos se pueden manipular las funciones enzimáticas, de transporte o regulatorias con el fin de analizar el funcionamiento metabólico de un organismo, identificar modificaciones genéticas que permitan optimizar la biosíntesis de un producto de interés y construir nuevas cepas recombinantes (31).

El aumento de la productividad o la biosíntesis de productos mediante la inactivación o sobreexpresión de genes por ingeniería genética se ha incrementado en los últimos años, pero no siempre con resultados exitosos. Es necesaria una mejor comprensión de las vías metabólicas empleadas en el proceso para lograr identificar cambios genéticos capaces de reproducir resultados exitosos (2).

Estudios de flujos metabólicos mediante el análisis de modos elementales de flujo, realizados en cultivos de *H. seropedicae* en presencia de glucosa como única fuente de carbono, permitió corroborar la presencia de la ruta de ED en esta bacteria. En estas condiciones la ruta de ED funcionaba en forma lineal (Figura 3). Por otro lado, los análisis de flujos metabólicos permitieron identificar, dentro de la red metabólica propuesta, otras rutas que aseguraban una mayor producción de PHB. Por lo cual, se identificó que un funcionamiento cíclico de la ruta de ED (Figura 3) se traducía en un mayor rendimiento de transformación de glucosa en PHB. Este funcionamiento cíclico, que involucra al pool de triosas fosfato, permitiría generar más poder reductor como NADPH, precursor de la síntesis de PHB. Para ello, sería necesario aumentar el flujo a través de la gluconeogénesis, mediante la sobre expresión de las enzimas involucradas en el funcionamiento cíclico de ED (Figura 3). En trabajos previos, se construyó la cepa recombinante de *H. seropedicae* Z69 con la sobre expresión del gen *fbp*. Este gen codifica para la enzima fructosa-1,6-bifosfatasa que cataliza la conversión de fructosa 1,6 bifosfato a fructosa 6-fosfato (Figura 3). Al realizar los ensayos de crecimiento y acumulación de PHB, observaron que la sobre expresión no aumentaba la producción del polímero. En el funcionamiento cíclico de ED participan otras reacciones, como son la conversión de gliceraldehido 3-fosfato a dihidroxiacetona, catalizada por la enzima triosa

fosfato isomerasa (TpiA) codificada por el gen *tpiA*, la reacción catalizada por la enzima glucosa 6-fosfato isomerasa (Pgi), que transforma la fructosa 6-fosfato en glucosa 6-fosfato, codificada por el gen *pgi* y la reacción que convierte a la fructosa 1,6 bifosfato en triosas catalizada por la fructosa-bifosfato aldolasa (Fba) codificada por el *fba*.

Es por ello que se propone sobre expresar el gen *fba*, *tpiA* y *pgi* en *H. seropedicae* cepa Z69 y evaluar la producción de PHB a partir de glucosa como fuente de carbono. Cabe destacar que las cepas recombinantes conteniendo las copias extras de los genes *fba* y *tpiA* fueron construidas por la Lic. Sabina Fleitas en un trabajo anterior.

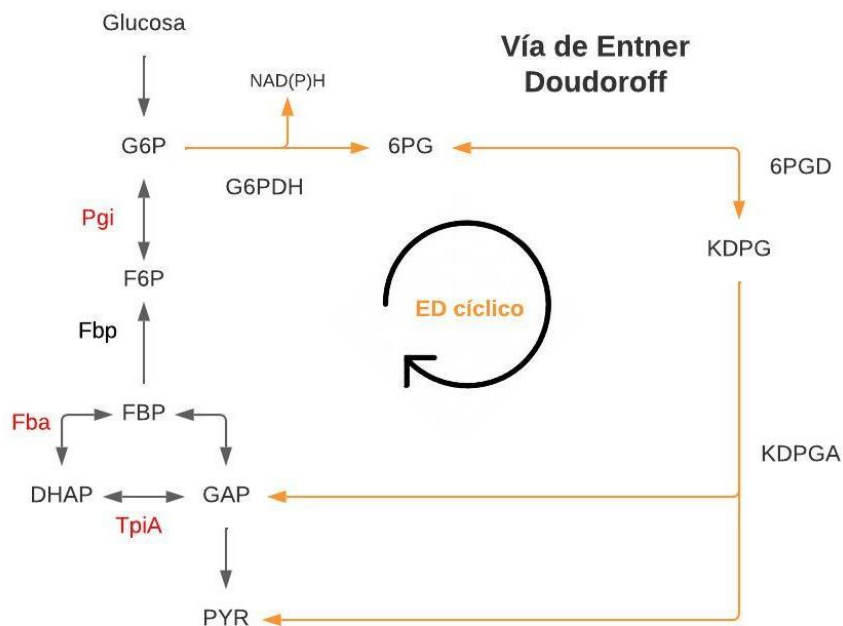


Figura 3: Ruta Entner-Doudoroff lineal (en color amarillo) y cíclica (en color negro). G6P: Glucosa 6-fosfato. G6PDH: Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. F6P: Fructosa 6-fosfato. FBP: Fructosa-1,6-bisfosfato. 6PG: 6-fosfogluconato. 6PGD: 6-fosfogluconato deshidrogenasa. GAP: Gliceraldehído-3-fosfato. DHAP: Dihidroxiacetona fosfato. KDPG: 2-Keto-3-deoxi-6-fosfogluconato. KDPGA: 2-Keto-3-deoxifosfogluconato aldolasa. PYR: Piruvato. En rojo se muestran las enzimas que se sobre expresaron en este trabajo. Adaptado de Jojima *et al.* (32).

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Optimizar la producción de PHB en *H. seropedicae* Z69 a partir de glucosa.

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1 Construir la cepa recombinante Z69 (pBBR1MCS-2::*pgi*), derivada de la cepa salvaje Z69 portando copias extra del gen *pgi* bajo el control de un promotor fuerte.
- 2.2.2 Evaluar el rendimiento de transformación de glucosa en PHB en las cepas recombinantes derivadas de la cepa Z69, conteniendo, de forma independiente, copias extra de los genes *fba*, *tpiA* y *pgi*.

3. Materiales y métodos

3.1 Medios de cultivo, antibióticos y buffers

Medio TY (Tryptona – Extracto de levadura): Tryptona 5 g, extracto de levadura 3 g, CaCl₂ 0,05 g, H₂O 1 L, Agar 18 g (en caso de preparar medio sólido) (33).

Medio LB (Luria - Bertani): Tryptona 5 g, extracto de levadura 3 g, NaCl 5 g, H₂O 1 L, Agar 18 g (en caso de preparar medio sólido) (34).

Medio LGI: NH₄Cl 2,14 g, KH₂PO₄ Anhidro 11,9 g, K₂HPO₄ Anhidro 2,13 g, MgSO₄ 0,1 g, CaCl₂ 15 mg, FeCl₂.6H₂O 10 mg, Na₂MoO₄.2H₂O 2 mg, pH 7,0 H₂O 1 L. La glucosa 1M y el *buffer* MES 1M, pH 7,0 se esterilizaron por separado en autoclave (20 minutos a 121°C) y se adicionaron al medio de cultivo a la concentración final indicada en cada caso (35).

Tabla 3: Antibióticos utilizados en el trabajo.

Antibiótico	Sigla	Concentración (µg/mL)
Kanamicina	Km	50
Ácido Nalidíxico	Nal	30

Buffer TAE (Tris-acetato-EDTA) 50x: Tris base 242 g, ácido acético glacial 57,1 mL, EDTA 0,5 M pH 8,0 100 mL, H₂O 842,9 mL (36).

3.2 Bacterias y plásmidos

En la Tabla 4 se describen las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este trabajo. La cepa *H. seropedicae* Z69 fue aislada originalmente por Baldani *et al.* y actualmente disponible en el Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (CRB-JD) con el número BR 14611.

Para conservar las cepas por largos períodos de tiempo, las suspensiones celulares, provenientes de cultivos líquidos frescos, se almacenaron a -80°C en presencia de glicerol a una concentración de 20% (p/v).

Tabla 4: Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo. R: resistente, S: susceptible.

Cepas	Características relevantes	Referencia
<i>H. seropedicae</i> Z69	Nal ^R , Km ^S	Baldani <i>et al.</i>
Z69 (pBBR1MCS-2)	Utilizada como control en los ensayos de crecimiento. Nal ^R , Km ^R	Construidas por Lic. Fleitas
Z69 (pBBR1MCS-2:: <i>fba</i>)	Nal ^R , Km ^R	Construidas por Lic. Fleitas
Z69 (pBBR1MCS-2:: <i>tpiA</i>)	Nal ^R , Km ^R	Construidas por Lic. Fleitas
Z69 (pBBR1MCS-2:: <i>pgi</i>)	Nal ^R , Km ^R	Construida en este trabajo
<i>E. coli</i> TOP10	Organismo huésped de plásmidos y construcciones de interés	<i>Invitrogen</i>
<i>E. coli</i> TOP10 (pBBR1MCS-2:: <i>pgi</i>)	Cepa donadora en conjugación triparental. Km ^R	Construida en este trabajo
<i>E. coli</i> TOP10 (pRK2013)	Cepa ayudante en conjugación triparental	-
Plásmidos		
pBBR1MCS-2	Replicable en <i>H. seropedicae</i> Z69, contiene un promotor fuerte en <i>LacZ</i> y Km ^R .	Kovach <i>et al.</i>
pRK2013	Genes de transferencia RK2 clonados en un replicón ColE1 y Km ^R .	Ditta <i>et al.</i>

3.3 Reacciones de PCR y electroforesis en gel de agarosa

Las reacciones de PCR (reacción en cadena de la polimerasa, de sus siglas en inglés) se realizaron en el termociclador GenePro (Bioer) empleando las condiciones de la Tabla 5. Cada reacción se realizó en un volumen final de 20 µL, empleando los reactivos según se detalla en la Tabla 6.

Tabla 5: Programa de amplificación de PCR.

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5:00	1
Desnaturalización	95	0:30	30
Hibridación	60	0:30	
Extensión	72	1:30	
Extensión final	72	10:00	1

Tabla 6: Mezcla de reacción de PCR.

Reactivos	Concentración final	Volúmenes (µL)
Mango Mix 2x (<i>Bioline</i>)	1x	10 µL
Cebador <i>forward</i> 10 mM	0,5 mM	1 µL
Cebador <i>reverse</i> 10 mM	0,5 mM	1 µL
Agua		7 µL
ADN	-	1 µL
Volumen final	-	20 µL

El ADN utilizado en las reacciones PCR provinieron de lisados celulares o de extracciones de ADN plasmídico mediante lisis alcalina (punto 3.4 y 3.5).

Para la visualización de los fragmentos de PCR, se realizaron electroforesis en geles de agarosa 1% en *buffer* TAE 1x. Se incorporó en el gel de agarosa 0,2 µL del intercalante GoodView (SBS) luego de fundida la agarosa. Las electroforesis se corrieron a 90 V durante 40 minutos y se utilizó un marcador de peso molecular de 1.000 bp (Accuris SmartCheck) para determinar el tamaño de los productos analizados.

Para la visualización de los productos de PCR, se utilizó un transiluminador con luz ultravioleta (Biriden).

Los cebadores utilizados en este trabajo se muestran en la Tabla 7. Los genes *tpiA*, *pgi* y *fba*, los cebadores fueron diseñados por la Lic. Sabina Fleitas y se sintetizaron en Macrogen Inc. (Corea).

Tabla 7: Cebadores utilizados en este trabajo.

Cebadores (5' → 3')		
<i>tpiA</i>	<i>Forward</i>	GATGGCAAGCGGCTACAATG
	<i>Reverse</i>	CGGCTGACAAACCCCTTACT
<i>pgi</i>	<i>Forward</i>	TTTCCTGATCTTGCCTGCGT
	<i>Reverse</i>	GCTCATGGACGACTCCTCAG
<i>fba</i>	<i>Forward</i>	GCAGAAGGGAGACCTGATCG
	<i>Reverse</i>	CAAAAACCGGAACCGCCATT
M13	<i>Forward</i>	GTAAAACGACGGCCAG
	<i>Reverse</i>	CAGGAAACAGCTATGAC

3.4 Lisados celulares

Una ansada de células frescas de las cepas de *E. coli* y *H. Seropedicae*, crecidas en medio sólido LB y TY respectivamente, se resuspendieron en tubos de 1.5mL conteniendo 100 µL de agua mQ. Las suspensiones se mezclaron mediante agitación mecánica en vortex, se incubaron durante 15 minutos a 95-100°C y finalmente se colocaron durante 20 minutos a -20°C. Antes de utilizar el lisado, éste se centrifugó a 10.400 rpm (*Labnet, spectrafuge 24D*) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se utilizó 1 µL de sobrenadante como molde para las reacciones de PCR.

3.5 Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina

Se cultivaron las células *E. coli* TOP10 (pBBR1MCS-2::*pgi*) en 5 mL de medio LB con Km durante toda la noche con agitación a 37°C, a 200 rpm. Se centrifugó todo el cultivo en tubos de 1,5 mL a 12.000 rpm (*Labnet, spectrafuge 24D*) durante 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y a las células se les agregaron 300 µL de solución I fría (50 mM glucosa, 25 mM Tris.HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0)) y 5 µL de RNAsa (10 mg/mL) y 300 µL de la solución II (8,8 mL de H₂O ultrapura + 0,2 mL de NaOH 10M + 1 mL SDS 10%). Los tubos se invirtieron varias veces para mezclar y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. En este paso, las células se lisan y la solución se torna transparente. Luego, se agregaron 300 µL de cloroformo, se suspendió con vortex y posteriormente se agregaron 300 µL de solución III (60 mL de acetato de potasio 5 M, 11,5 mL ácido acético glacial, 28,5 mL H₂O). Se centrifugó durante 10 minutos a 14.000 rpm (*Labnet, spectrafuge 24D*). Se retiró la fase superior a un tubo de 1,5 mL nuevo y se agregaron 660 µL de isopropanol. Se centrifugó durante 30 minutos a 14.000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se lavó el *pellet* con 500 µL de etanol 70% frío y se centrifugó durante 10 minutos a 14.000 rpm. Se descartó el etanol y se secó la muestra utilizando el speedvac (Labconco). El ADN purificado se disolvió en 50 µL de agua ultrapura (36).

3.6 Preparación de *E. coli* TOP10 competentes

Se cultivaron células de *E. coli* TOP10 durante toda la noche en tubos de ensayo con 5 mL de caldo LB en un agitador orbital a 200 rpm a 37°C. Luego se tomaron 3 mL del cultivo y se transfirieron a un matraz Erlenmeyer de 1 L conteniendo 300 mL de caldo

LB. Se incubó con agitación a 200 rpm y 37°C hasta que el cultivo alcanzara una DO_{600nm} en el entorno de 0,2 – 0,3. Se colectaron todas las células en dos tubos Falcon® de 50 mL, centrifugando a 7.400 rpm (*Sigma*, 3-30K) durante 5 minutos a 4°C. Se lavaron los *pellets* con 10 mL de $CaCl_2$ 0,1 M estéril y frío, y se repitió la centrifugación. Se suspendió cada *pellet* en 2,5 mL de $CaCl_2$ 0,1 M frío, se juntaron las suspensiones en un solo tubo y se mantuvieron durante 30 minutos en frío. Se volvió a centrifugar y se suspendió el *pellet* en 20 mL de $CaCl_2$ 0,1 M, glicerol 20% (p/v). Se fraccionó en tubos de 1,5 mL en alícuotas de 100 μ L y se almacenaron a -80°C hasta el momento de utilizarse. Finalmente, se realizó un control de contaminación en placas de petri con LB agar de la suspensión celular obtenida (36).

3.7 Construcción de Z69 (pBBR1MCS-2::*pgi*)

3.7.1 **Amplificación por PCR del gen *pgi***

Se amplificó mediante PCR el gen *pgi* utilizando como molde el ADN genómico de *H. seropedicae* Z69, previamente extraído con el kit Quick DNA Fungal/Bacterial Miniprep (Zymo Research) siguiendo el protocolo de los fabricantes. Para esta reacción de amplificación se utilizó la enzima Taq polimerasa *proof-reading* (*Velocity DNA polymerase*, *Bioline*) y cebadores diseñados específicamente para el gen *pgi* (Tabla 7). Las condiciones de reacción de PCR y las cantidades empleadas se muestran en la Tabla 8. El programa de amplificación utilizado se encuentra descrito en la Tabla 5.

La obtención de un amplicón de tamaño esperado se verificó mediante su visualización en un gel de electroforesis. El fragmento fue purificado mediante la utilización del kit comercial Zymoclean Gel DNA Recovery (Zymo Research), siguiendo el protocolo de los fabricantes.

Tabla 8: Mix de PCR para amplificación de gen *pgi*.

Reactivos	Concentración y/o cantidades finales	Volúmenes (μL)
Hi-Fi <i>Buffer</i> 5x	1x	10 μL
Agua	-	30 μL
Cebador <i>forward</i> 10 mM	0,5 mM	2,5 μL
Cebador <i>reverse</i> 10 mM	0,5 mM	2,5 μL
DMSO	4,5%	2,25 μL
dNTPs 10 μM	0,34 μM	1,7 μL
<i>Velocity DNA polymerase</i> (<i>Bioline</i>) 2 U/ μL	1U	0,5 μL
ADN (aprox. 40 ng/ μL)	20 ng	0,5 μL
Volumen final	-	50 L

3.7.2 Digestión del vector con *EcoRV* o *SmaI*

Se realizó la digestión del vector pBBR1MCS-2 (37) (Figura 4) con las enzimas de restricción *EcoRV* (*Invitrogen*, 00313332) o *SmaI* (*Bioron*, 250135S). Se seleccionaron estas enzimas ya que realizan un único corte en el plásmido, generando extremos romos. El vector pBBR1MCS-2 fue seleccionado ya que es replicable en *H. seropedicae* Z69, es resistente a Km y contiene un promotor fuerte en *LacZ* (37).

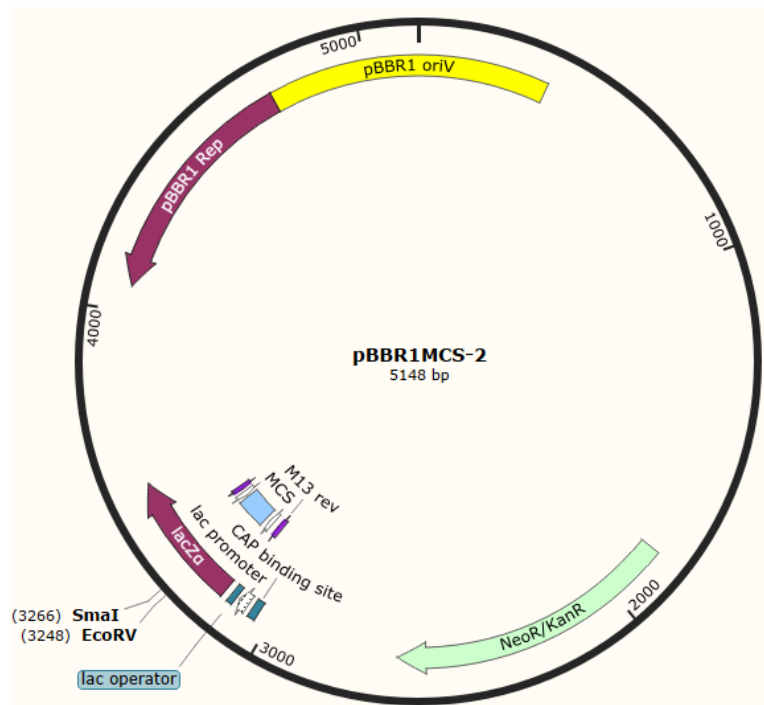


Figura 4: Mapa del plásmido pBBR1MCS-2. Se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción *EcoRV* y *SmaI* y los sitios de unión de los cebadores M13.

La Tabla 9 muestra los reactivos y las cantidades utilizadas para realizar las digestiones. La digestión con la enzima *EcoRV* se incubó a 37°C mientras que la digestión con *SmaI* se incubó a 30°C. Ambas reacciones se incubaron toda la noche.

Tabla 9: Reactivos y cantidades utilizadas para las digestiones.

Reactivos	Cantidades (μL)	Concentración
Enzima	2	20 U/μL
Buffer 10x	2	-
Vector	10	8 ng/μL
Agua	6	-
Volumen final	20	-

3.7.3 Ligación

El gen *pgi*, obtenido por la amplificación por PCR, se clonó en el sitio *EcoRV* del vector pBBR1MCS-2 (37). La ligación se llevó a cabo ensayando diferentes ligasas T4 de ADN y se evaluaron diferentes condiciones de ligación (Tabla 10).

Tabla 10: Condiciones de ligación. Se muestran las enzimas utilizadas junto con las concentraciones del vector y del inserto empleadas, el tiempo de incubación y la temperatura.

Marca y número de catálogo de la enzima ligasa T4 de ADN	Temperatura (°C)	Tiempo de incubación	Concentración del vector (ng)	Concentración del inserto (ng)
SBS (LINK-30)	16	Toda la noche	8	600
<i>ThermoFisher</i> (EL0011)	25	6 horas	8	300
<i>Invitrogen</i> (11558726)	24	5 minutos	8	750
<i>Takara</i> (2011A)	13	Toda la noche	24	700

Se realizaron controles de ligación en donde solo se utilizaron las ligasas y el plásmido previamente digerido.

Se calcularon las relaciones molares de inserto y vector para todas las ligaciones utilizando la ecuación a continuación.

$$\text{Relación molar} \frac{\text{inserto}}{\text{vector}} = \frac{\text{ng inserto}}{\text{pb inserto}} \times \frac{\text{pb vector}}{\text{ng inserto}}$$

La cantidad de pares de bases de inserto utilizada fue de 1.700 pb y la de vector fue de 5.144 pb. Las concentraciones se estimaron a partir de las electroforesis en gel de

agarosa, comparando la intensidad de banda con el marcador de peso molecular según lo especificado por el fabricante.

3.7.4 Transformación de células químicamente competentes de *E. coli* TOP10

A un tubo de células *E. coli* TOP10 químicamente competentes preparadas en el punto 3.2.5, se le adicionó 15 μ L de cada una de las ligaciones mencionadas en la Tabla 10. Esta mezcla se incubó durante 40 minutos en frío, luego se incubó 2 minutos a 42°C e inmediatamente se incubó por 2 minutos más en hielo. Se agregó 1 mL de medio LB líquido y se incubó una hora en agitador a 37°C, a 200 rpm.

Se rastrillaron 200 μ L de la suspensión celular en una placa con medio sólido LB, Km y X-gal (20 μ g/mL). El X-gal es un sustrato que cuando es hidrolizado por β -galactosidasa desarrolla un color azul. Esta enzima es codificada por el gen *LacZ* presente en el sitio de clonado del vector. El X-gal se utiliza como indicador para diferenciar las células que incorporaron el plásmido con inserto que inactiva la enzima (colonias blancas) de las que incorporaron el plásmido sin inserto (colonias azules).

Como control negativo se usó una suspensión de células químicamente competentes sin ADN y como control positivo se utilizó una suspensión de células al cual se le agregó 1 μ L de ADN plasmídico (14 ng/ μ L). Las placas se incubaron a 37°C toda la noche.

3.7.5 Verificación de la construcción pBBR1MCS-2::*pgi*

Para la verificación del sentido del inserto, se realizó una reacción de PCR empleando lisados de las colonias blancas de la cepa *E. coli* TOP10 (pBBR1MCS-2::*pgi*) como molde de ADN. Se utilizaron los cebadores M13F y el cebador *forward* del gen *pgi* (Tabla 6). Se siguieron los pasos indicados en 3.3.

Además, para verificar la correcta inserción del gen *pgi*, se extrajo el ADN plasmídico mediante lisis alcalina de las colonias blancas seleccionadas y fueron secuenciadas en MacroGen Inc. (Corea) con el cebador M13R. La secuencia obtenida se

analizó por blatsn empleando como referencia, el genoma de *H. seropedicae* Z69 (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).

3.7.6 Movilización del plásmido pBBR1MCS-2::*pgi* a *H. seropedicae* Z69

El plásmido pBBR1MCS-2::*pgi* se movilizó a *H. seropedicae* Z69 mediante una conjugación triparental. Se empleó *E. coli* TOP10 (pRK2013) como cepa ayudante, *E. coli* TOP10 (pBBR1MCS-2::*pgi*) como cepa portadora del vector construido y *H. seropedicae* Z69 como cepa receptora. La cepa ayudante contiene el plásmido pRK2013, plásmido auxiliar para la movilización de plásmidos no auto transmisibles. Este plásmido contiene los genes de transferencia RK2 clonados en un replicón ColE1y confiere resistencia a Km (38).

Se partió de un cultivo de *H. seropedicae* Z69 en 5 mL de caldo TY cultivado durante toda la noche, a 30°C y 180 rpm. Además, se creció *E. coli* TOP10 (pRK2013) y *E. coli* TOP10(pBBR1-MCS2::*pgi*) en tubos conteniendo 5 mL de caldo LB y Km durante toda la noche a 37°C y 200 rpm. Luego, se transfirieron 100 µL del cultivo de Z69 a un nuevo tubo con 5 mL de medio TY fresco y se incubó hasta fase exponencial (4 horas) a 30°C. En el caso de los cultivos de *E. coli*, se repicaron a dos tubos con 5 mL de caldo LB sin antibiótico para cada cepa. En un tubo, se agregaron 5 µL de cultivo y en el otro 20 µL. Se incubaron 4 horas a 37°C con agitación mecánica a 200 rpm. Transcurrido el tiempo, se seleccionaron los tubos que tuvieran aproximadamente la misma DO. Sobre una placa con medio TY sólido, se colocó 30 µL del cultivo de Z69, 30 µL del cultivo de *E. coli* TOP10 (pRK2013) y 30 µL *E. coli* TOP10 (pBBR1MCS-2::*pgi*) formando una única gota en el centro de la placa. De la misma forma, se realizaron los controles negativos correspondientes. Para ello, se colocó 30 µL de cada cultivo de *E. coli* o 30 µL del cultivo de Z69. Las placas de Petri se incubaron a 30°C durante 24 horas (39).

Transcurrido el tiempo, se tomó cada gota con el ansa y se resuspendió en 1 mL de medio líquido TY. Mediante técnica de rastrillo se plaquearon 100 µL de cada suspensión celular en placa de Petri con medio TY, Km y Nal y se incubaron a 30°C durante 48hrs, hasta la visualización de colonias aisladas. Las colonias obtenidas se repicaron a medio TY, Km y Nal. Se verificó la presencia del vector con inserto mediante

PCR utilizando el cebador M13R y el cebador *reverse* del gen *pgi*, a partir de lisados de estas colonias. Se siguieron los pasos indicados en 3.3.

3.8 Ensayos de producción de PHB

Los ensayos de producción de PHB se realizaron en matraces Erlenmeyer de 2 L conteniendo 300 mL de medio LGI suplementado con glucosa 30 g/L, MES 50 mM pH 7,0 y Km.

Para la obtención del pre-inóculo, se cultivaron las cepas recombinantes derivadas de *H. seropedicae* Z69 durante 24 horas en tubos de ensayo con 5 mL de medio TY y Km. Se utilizaron 5 mL de estas suspensiones celulares para inocular matraces Erlenmeyer de 1 L conteniendo 100 mL de medio LGI suplementado con glucosa 10 g/L y Km. Los mismos fueron incubados durante 24 horas, luego de ese tiempo se utilizaron aproximadamente 30 mL de dicho cultivo para inocular los matraces de 2 L de manera de partir con una densidad óptica (DO_{620nm}) de aproximadamente 0,5. Los cultivos se incubaron a 30°C con agitación orbital mecánica a 180 rpm. Se realizaron tres réplicas biológicas por cada cepa a estudiar.

A lo largo del período de incubación, se tomaron muestras, de forma aséptica, a distintos tiempos para determinar DO_{620nm} , biomasa celular, concentración de PHB y concentración de glucosa. A continuación, se detalla cómo se procedió para cada determinación.

3.8.1 Determinaciones analíticas

3.8.1.1 Densidad óptica (DO)

Se determinó la DO de cada cultivo mediante espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu) a una longitud de onda de 620 nm, empleando agua como blanco y realizando diluciones de la muestra en agua en caso de ser necesario.

3.8.1.2 Biomasa celular

La biomasa celular se determinó por gravimetría, midiendo el peso seco de las suspensiones celulares crecidas en medio líquido en estufa de cultivo a 60°C. Para ello se colocó un volumen conocido de cultivo en un tubo de 1,5 mL (previamente pesado) y se centrifugó a 10.000 rpm (*Labnet, spectrafuge 24D*) por 10 minutos. El *pellet* se lavó dos veces con 1 mL de agua desionizada. Finalmente, se determinó la biomasa de los pellets celulares, hasta la obtención de peso constante.

La biomasa, expresada como gramos de peso seco por litro de cultivo, se calcula como:

$$\text{Biomasa (g/L)} = \left[\frac{(\text{peso tubo con biomasa} - \text{peso tubo vacío})}{\text{volumen (mL)}} \right] \times 1000$$

3.8.1.3 Concentración de PHB

La concentración de PHB se determinó por gravimetría. Para ello se colocó un volumen conocido de cultivo bacteriano en un tubo cónico de 10 o 30 mL (*Corex*®) previamente rotulado y pesado. Se tomaron diferentes volúmenes de muestra según la estimación del contenido de PHB, con el fin de obtener una cantidad de producto medible. Las células se cosecharon por centrifugación a 10.000 rpm (*Hitachi, 20PR-52*) durante 10 minutos. El sobrenadante se almacenó para realizar otras determinaciones a -20°C.

El PHB acumulado fue purificado a partir del *pellet* de células obtenido. El *pellet* celular se lisó mediante el agregado de un volumen de hipoclorito 5% (p/v) y posterior incubación a 37°C durante 2 horas. Transcurrido dicho tiempo los tubos fueron centrifugados durante 10 minutos a 10.000 rpm (*Hitachi, 20PR-52*). Se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con 10 mL de agua desionizada (10 min a 10000 rpm). Los tubos con el polímero extraído se secaron a 60°C hasta peso constante.

La concentración de PHB se calculó de la siguiente manera:

$$PHB \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{[(\text{peso tubo con biomasa}) - (\text{peso tubo vacío})] * 1000}{\text{volumen de cultivo (mL)}}$$

El contenido de PHB se define como el porcentaje en peso de PHB acumulado en las células secas totales y se calcula a partir de los datos de biomasa y concentración de PHB.

3.8.1.4 Concentración de glucosa

Se determinó la concentración de glucosa en los sobrenadantes de las muestras utilizadas para determinar PHB. Para ello, se utilizó el kit de glicemia enzimática AA líquida (Weiner), según el protocolo modificado por la Universidad ORT Uruguay. Las mediciones se realizaron en el lector de microplacas ClarioStar Plus (BMG Labtech).

3.8.1.4 Rendimientos y productividad

Para calcular el rendimiento de la transformación de glucosa en PHB $Y_{PHB/gluc}$, se utilizó la siguiente ecuación:

$$Y_{PHB/gluc} = \left[\frac{(\text{concentración PHB tiempo}_x - \text{concentración PHB tiempo}_0)}{(\text{concentración glucosa tiempo}_0 - \text{concentración glucosa tiempo}_x)} \right]$$

Para calcular la productividad, se dividió la concentración de PHB (g/L) entre el tiempo en el que se obtuvo esa cantidad.

4. Resultados y discusión

4.1 Verificación de las cepas Z69 (pBBR1MCS-2::*fba*) y Z69 (pBBRMCS-2::*tpiA*)

Se verificó mediante PCR, la presencia de la construcción pBBR1MCS-2::*fba* y pBBR1MCS-2::*tpiA* en las cepas Z69 (pBBR1MCS-2::*fba*) y Z69 (pBBR1MCS-2::*tpiA*) que fueron generadas por Sabina Fleitas en el laboratorio de Bioquímica y Genómica Microbiana (BIOGEM) del IIBCE.

Se realizó una reacción de PCR utilizando como cebadores el M13F y el cebador *forward* de los genes *fba* y *tpiA*.

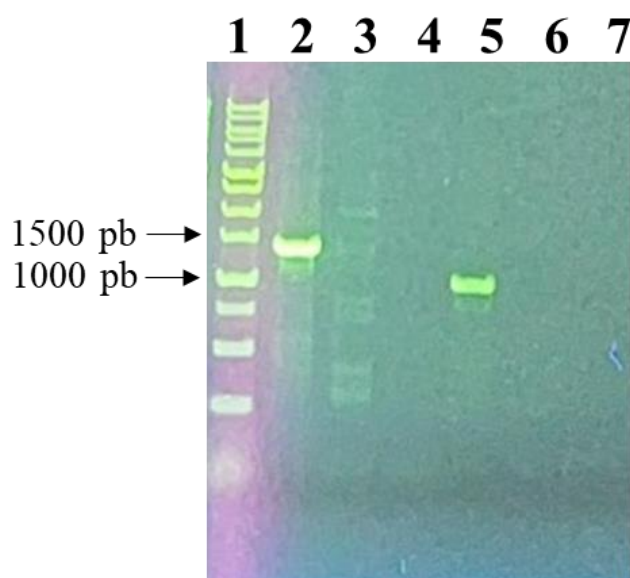


Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa 1%. Carril 1: Marcador de peso molecular (Accuris SmartCheck). Se sembraron 5 μ L de cada producto de PCR. Carriles 2 al 4: productos de PCR obtenidos al emplear los cebadores M13F y *fba* F Carriles 5 al 7: productos de PCR obtenidos al emplear cebadores M13F y *tpiA* F. En el Carril 2 se usó como templado lisado de Z69 (pBBR1MCS-2::*fba*) y en el carril 5 lisado de Z69 (pBBR1MCS-2::*tpiA*). En los Carriles 3 y 6 se realizó un control negativo empleando como templado el lisado de Z69 (pBBR1MCS-2). En los Carriles 4 y 7 los respectivos controles sin ADN.

En la electroforesis de los productos de PCR (Figura 5, carril 2) se observa una banda levemente menor a 1.500 pb que corresponde al tamaño esperado para el gen *fba*.

En el carril 5 se observa una banda de aproximadamente 1.000 pb correspondiente al tamaño esperado del gen *tpiA*. En el carril 6, correspondiente al control negativo, no se observa amplificación, como era de esperar, ya que se empleó como molde el vector sin inserto. En el carril 3, correspondiente al control negativo con el vector sin inserto, se observan bandas muy tenues, correspondientes a amplificación inespecífica.

4.2 Construcción del mutante Z69 (pBBR1MCS-2::*pgi*)

4.2.1 **Amplificación por PCR del gen *pgi* y digestión del vector con *EcoRV* y *SmaI***

Se amplificó mediante PCR el gen *pgi* utilizando como molde ADN genómico de *H. seropedicae* Z69 y empleando una Taq polimerasa *proof-reading*. Para ello, se utilizaron los cebadores *forward* y *reverse* del gen *pgi*. La verificación del tamaño del producto obtenido se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa 1%. Se realizaron las digestiones del plásmido pBBR1MCS-2 con las enzimas *EcoRV* o *SmaI*.

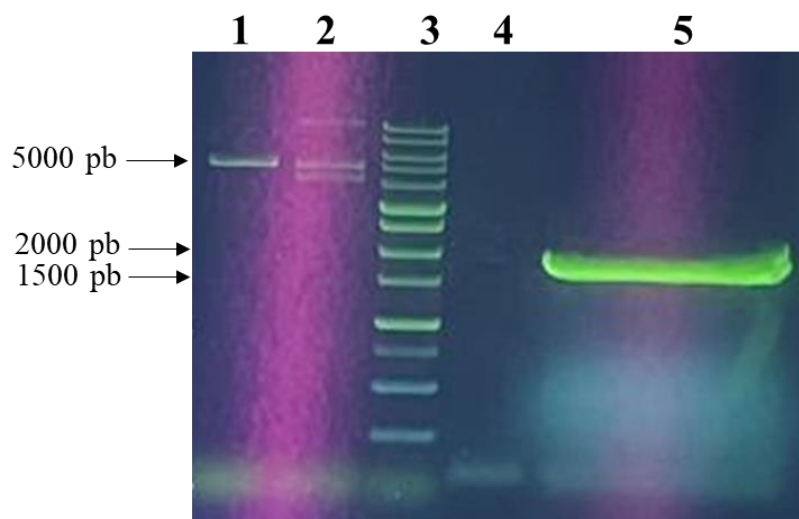


Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa 1%. Carriles 1 y 2: 5 μ L de la digestión del plásmido pBBR1MCS-2 realizada con *EcoRV* o con *SmaI*, respectivamente. Carril 3: marcador de peso molecular (Accuris SmartCheck). Carriles 4 y 5: control negativo sin ADN molde y producto de PCR del gen *pgi* empleando ADN de Z69 como molde

Como se observa en la Figura 6, se obtuvo un único amplicón en el carril 5, con un tamaño de aproximadamente 2.000 pb, lo cual corresponde al tamaño del gen *pgi*

(1.700 pb). En el carril correspondiente al control negativo de PCR, no se observa amplificación. Se purificó la banda del producto de PCR para utilizarlo en la ligación posteriormente.

En cuanto a las digestiones, se observa una única banda de tamaño esperado, correspondiente al plásmido lineal en el Carril 1, lo cual indica la digestión total con *EcoRV*. Por otra parte, la enzima *SmaI* logró digerir parcialmente el plásmido, ya que se observan al menos tres bandas, que corresponderían a las tres conformaciones del plásmido: superenrollado siendo la banda de menor tamaño, lineal y circular abierto siendo la banda de mayor tamaño.

4.2.2 Ligación y transformación de células químicamente competentes de *E. coli* TOP10

Se realizaron diferentes ligaciones del plásmido pBBR1MCS-2, previamente digerido con *EcoRV*, con el amplicón del gen *pgi* y las ligasas indicadas en la Tabla 10. Se tomaron 15 μ L de ligación, se transformaron las células de *E. coli* químicamente competentes y se rastrillaron 200 μ L de la suspensión celular en una placa con medio sólido LB, Km y X-gal (20 μ g/mL). En la Tabla 11, se detallan los resultados.

Tabla 11: Resultado de las ligaciones. Se muestra la cantidad de colonias blancas y azules. También se observa la cantidad de inserto y vector empleado.

Enzima ligasa T4 de ADN	Colonias blancas	Colonias azules	Vector (ng)	Inserto (ng)	Relación molar (Inserto/Vector)
<i>SBS</i> (LINK-30)	0	2	8	600	227
<i>ThermoFisher</i> (EL0011)	0	1	8	300	113
<i>Invitrogen</i> (11558726)	0	0	8	750	284
<i>Takara</i> (2011A)	28	30	24	700	88

Con respecto a la enzima de marca *SBS*, se obtuvieron dos colonias azules y ninguna blanca. En este caso no se realizaron controles de ligación. El inserto se encontraba en mayor cantidad que el vector (relación molar fue de 227), lo cual es lo deseado ya que de esta forma se disminuye la probabilidad de auto ligación del vector.

En cuanto a la enzima de marca *ThermoFisher*, se obtuvo una sola colonia azul. En el control de ligación se obtuvieron 30 colonias azules. El control de ligación constó en utilizar únicamente la enzima con el vector, sin utilizar el inserto. Además, la relación molar fue de 113, encontrándose el inserto en mayor cantidad que el vector. Sin embargo, no se obtuvieron colonias blancas y se obtuvo una única colonia azul. Para poder concluir que la enzima es la responsable de obtener una eficiencia tan baja, se deberían haber transformado células con la digestión, ya que las 30 colonias azules obtenidas en el control pueden provenir tanto de una autoligación o del vector sin digerir.

Para la enzima de *Invitrogen*, no se obtuvieron colonias blancas ni colonias azules. Al realizar el control de ligación, siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante, tampoco se obtuvieron colonias, lo que indica que la enzima no se encontraba activa.

Debido a estos resultados, se realizaron controles de transformación empleando el plásmido sin digerir y se obtuvieron más de 200 colonias, indicando que no habría problemas con la transformación de estas células químicamente competentes, ni con el protocolo de transformación.. Esto nos indica que el problema es con la ligación, presumiblemente es con las ligasas T4 de ADN empleadas y/o el protocolo de ligación. Además, la ligación de extremos romos tiene menor eficiencia que las ligaciones con extremos cohesivos.

Finalmente, se obtuvieron 28 colonias blancas y aproximadamente 30 colonias azules al utilizar la enzima de marca *Takara*. En este caso, no se realizó el control de ligación. Además, la relación molar utilizada fue de 88, lo cual permitió obtener un buen número de colonias positivas. Se seleccionaron 10 de las colonias blancas obtenidas y se realizaron lisados para realizar un PCR que permitiera verificar la presencia del inserto y su sentido. También se extrajo de ADN plasmídico para verificar lo mismo, pero mediante secuenciación.

4.2.3 Verificación del sentido del inserto

Para la verificación del sentido del inserto, se realizó una reacción de PCR utilizando los cebadores M13R y *pgi reverse*. Como se observa en la Figura 7, solamente hay amplificación en el carril 7, indicando que solamente la colonia 5 contiene el inserto en el sentido correcto. Asimismo, el tamaño del amplicón, de aproximadamente 2000 pb, corresponde al gen *pgi*. El ADN plasmídico de esta colonia se envió a secuenciar. El análisis de la secuencia por blastn mostró que el inserto correspondía al gen *pgi* y que se encontraba insertado en el sentido correcto.



Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa 1%. En todos los casos se sembraron 5 μ L de cada producto de PCR utilizando los cebadores M13R y *pgi reverse* y lisados de las colonias blancas de *E. coli* TOP10 (pBBR1MCS-2::*pgi*) (Carriles 2 al 10). Carril 1: marcador de peso molecular (Accuris SmartCheck). Carril 11: control negativo sin ADN molde.

4.2.4 Movilización del plásmido pBBR1MCS-2::*pgi* a *H. seropedicae* Z69

Luego de la verificación del sentido del inserto, se tomó la única colonia positiva y se procedió a realizar la conjugación triparental. En este caso, la colonia positiva demostró haber incorporado el gen en el sentido correcto para su transcripción. Se empleó *E. coli* TOP10(pRK2013) como cepa ayudante, *E. coli* TOP10(pBBR1MCS-2::*pgi*) como cepa donadora y *H. seropedicae* Z69 como cepa receptora.

Luego de realizada la conjugación y obtenidas las colonias aisladas de la cepa *H. seropedicae* Z69 (pBBR1MCS-2::*pgi*), se verificó la presencia del vector con inserto mediante PCR utilizando el cebador M13R y el cebador *reverse* del gen *pgi*. Se utilizaron como molde, lisados de seis colonias seleccionadas a partir de la placa que contenía colonias presuntamente positivas. Los resultados se observan en la Figura 8.

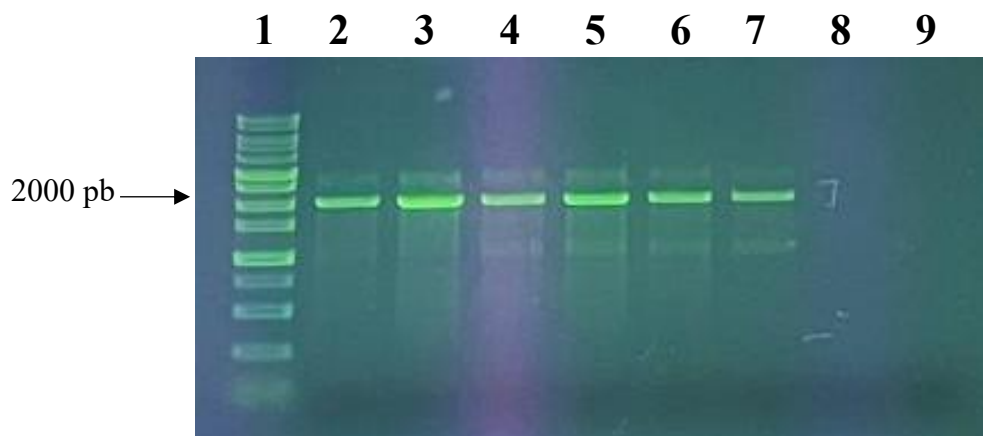


Figura 8: Electroforesis en gel de agarosa 1%. Se sembraron 5 μ L de cada producto de PCR empleando los cebadores M13R y *pgi reverse*. Carril 1: Marcador de peso molecular (Accuris SmartCheck). Carriles 2 al 9: productos de PCR empleando, como molde lisados de las colonias de *H. seropedicae* Z69 (pBBR1MCS-2::*pgi*) obtenidas luego de la conjugación triparental. Carril 8: control negativo con lisado de Z69 como molde. Carril 9: control negativo sin molde.

En los carriles 2 al 7 se observan bandas del tamaño esperado que corresponden al gen *pgi* proveniente del plásmido transferido a Z69, con un tamaño de aproximadamente 2.000 pb, sugiriendo que la conjugación triparental fue exitosa. Al utilizar el cebador M13 que se une al vector y el cebador *reverse* que se une al gen *pgi*, se puede afirmar que las cepas de Z69 incorporaron el plásmido con el inserto.

4.3 Evaluación de la producción de PHB y rendimiento en Z69 (pBBR1MCS-2::*tpiA*)

La evaluación de la producción de PHB en Z69 (pBBR1MCS-2::*tpiA*) se realizó en cultivos en medio mínimo LGI en presencia de glucosa 30 g/L como única fuente de carbono y Km. Como cepa control se utilizó Z69 (pBBR1MCS-2), la cual porta el vector vacío. Se realizaron tres réplicas biológicas de cada cepa.

Los cultivos fueron incubados a 30°C con agitación orbital a 180 rpm. A lo largo de la incubación se tomaron muestras a tiempo inicial 0h, 16h, 19h, 22h, 25h, 28h y 43h. Dichas muestras se utilizaron para determinar el crecimiento mediante determinación de biomasa, concentración del PHB y glucosa remanente.

El perfil de producción de biomasa, PHB y determinación de glucosa remanente para la cepa recombinante Z69 (pBBR1MCS-2::*tpiA*) y para la cepa control Z69 (pBBR1MCS-2) se muestran en las Figuras 9 y 10.

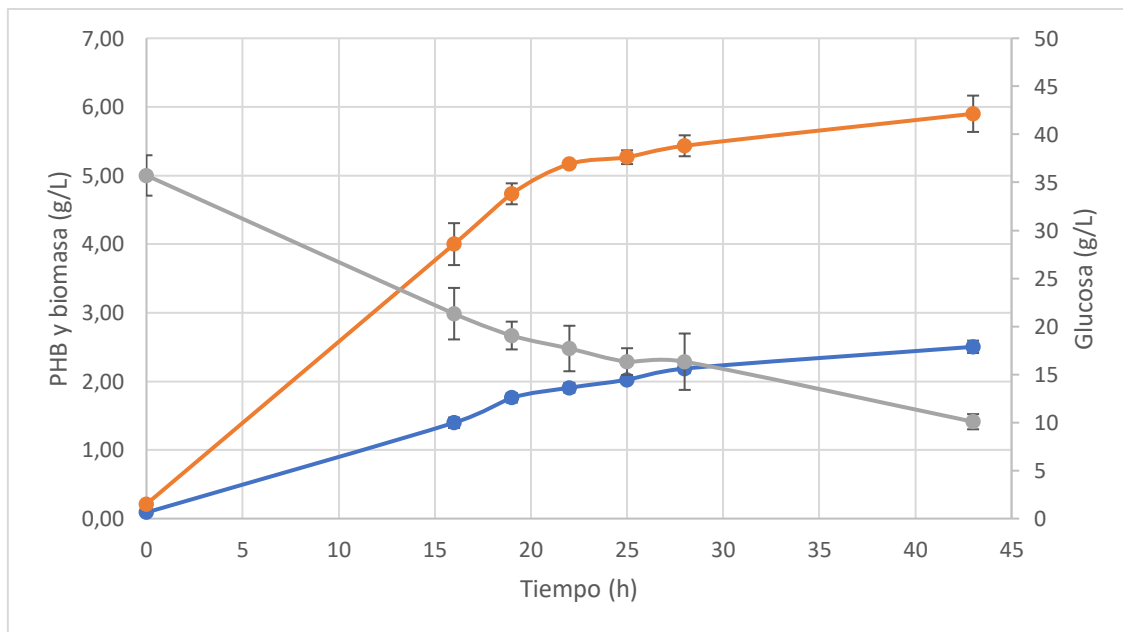


Figura 9: Perfil de producción de biomasa, PHB, y determinación de glucosa en la cepa recombinante Z69(pBBR1MCS-2::*tpiA*). Línea azul: PHB en g/L. Línea naranja: biomasa en g/L. Línea gris: glucosa en g/L. Las barras de error corresponden al desvío estándar.

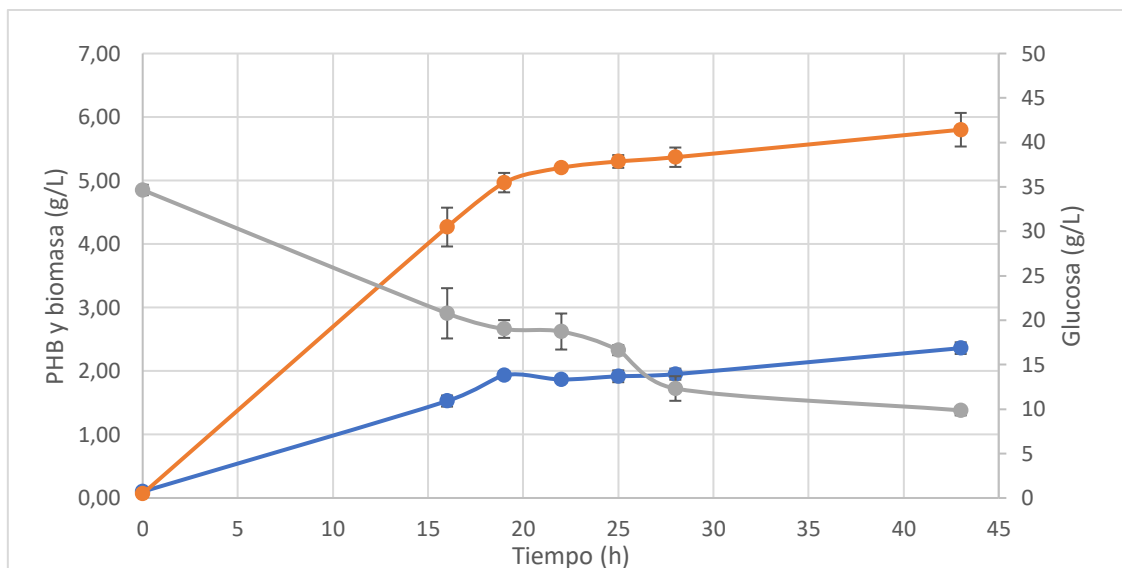


Figura 10: Perfil de producción de biomasa, PHB, y determinación de glucosa en la cepa control Z69 (pBBR1MCS-2). Línea azul: PHB en g/L. Línea naranja: biomasa en g/L. Línea gris: glucosa en g/L. Las barras de error corresponden al desvío estándar.

Como se observa en las Figuras 9 y 10, para ambas cepas se observa un aumento en la producción de PHB a medida que el cultivo crece. Asimismo, la glucosa se va consumiendo durante el crecimiento y síntesis PHB. A las 20 hrs de incubación, el cultivo llega a la fase estacionaria la cual se mantiene hasta las 43 hrs, en ese momento la concentración de glucosa remanente fue de aproximadamente 10 g/L para ambos ensayos. Esta es una concentración esperable ya que estudios previos observaron que el reactivo limitante era el amonio, acabándose antes que el carbono (2).

La acumulación máxima de PHB en la cepa control fue de 2,4 g/L a las 43 horas mientras que, para la cepa recombinante, la acumulación fue de 2,5 g/L al mismo tiempo. En cuanto a la biomasa, se obtuvieron 5,8 g/L para la cepa control y 5,9 g/L para la cepa recombinante, resultando en un porcentaje de acumulación de PHB de 40,7% para la cepa control y 42,5% para la cepa recombinante a las 43 horas.

Los rendimientos máximos de transformación fueron de 0,12 g/g para la cepa control a las 19 horas y 0,11 g/g para la cepa recombinante a las 28 horas. El rendimiento de la cepa recombinante a las 19 horas fue 0,10 g/g.

La Tabla 12 muestra las productividades máximas obtenidas y en el tiempo alcanzado.

Tabla 12: Productividad máxima de Z69 (pBBR1MCS-2::*tpiA*) y Z69 (pBBR1MCS-2)

Cepa	Tiempo (h)	Q (g/L.h)
Z69 (pBBR1MCS-2:: <i>tpiA</i>)	19	0,093
Z69 (pBBR1MCS-2)	19	0,102

Para ambas cepas, las productividades máximas ocurrieron a las 19 horas con una diferencia de 0,009 g/L.h. Esta diferencia parecería no ser importante a la hora de producir PHB. En este tiempo, los porcentajes de acumulación fueron de 38,9% para la cepa control y 37,2% para la recombinante. En este caso, los porcentajes de acumulación no demuestran grandes diferencias con los porcentajes de acumulación máximos, siendo estos 40,7% para el control y 42,5% para la recombinante. La diferencia de tiempo es de 24 horas, siendo esta una diferencia importante a la hora de producir PHB de forma industrial. De todos modos, no existe gran diferencia entre la cepa control y la cepa recombinante. En cuanto a los rendimientos, a las 19 horas, fueron similares para ambas cepas (0,10 g/g para la recombinante y 0,12 g/g para el control). No se observa para Z69 (pBBR1MCS-2::*tpiA*) una mejora en la transformación de glucosa en polímero. Ambas cepas tienen un comportamiento similar en cuanto a crecimiento, acumulación de PHB y consumo de glucosa. Estos resultados demuestran que la sobre expresión del gen *tpiA*, que codifica para la proteína triosa fosfato isomerasa involucrada en la vía ED, no tendría un efecto sobre la acumulación de PHB.

4.4 Evaluación de la producción de PHB y rendimiento en Z69 (pBBR1MCS-2::*fba*)

La evaluación de la producción de PHB en Z69 (pBBR1MCS-2::*fba*) se realizó en cultivos en medio mínimo LGI en presencia de glucosa 30 g/L como única fuente de carbono y Km. Como cepa control se utilizó Z69 (pBBR1MCS-2), la cual contiene el vector vacío. Se realizaron tres réplicas biológicas de ambas cepas.

Los cultivos fueron incubados a 30°C mediante con agitación orbital a 180 rpm. A lo largo de la incubación se tomaron muestras a tiempo inicial (0h), 12h, 15h, 18h, 21h y 36h. Dichas muestras se utilizaron para determinar el crecimiento mediante determinación de biomasa, concentración del PHB y glucosa remanente.

El perfil de producción de PHB y de crecimiento (Biomasa) de la cepa Z69 (pBBR1MCS-2::*fba*) y de la cepa control Z69 (pBBR1MCS-2) se muestra en las Figuras 11 y 12.

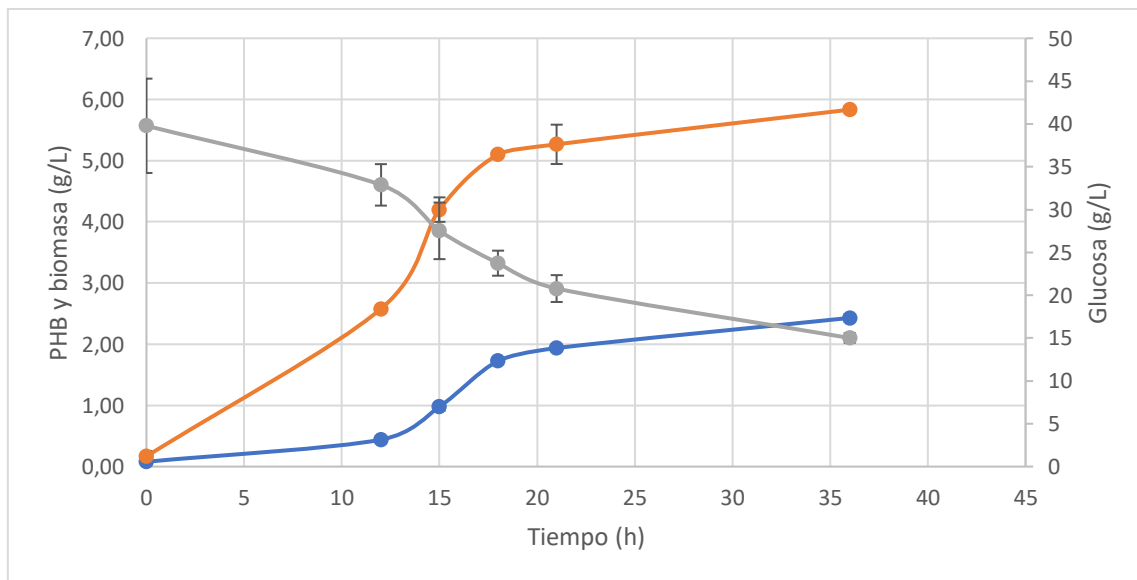


Figura 11: Perfil de producción de PHB, y concentración de glucosa en la cepa recombinante Z69 (pBBR1MCS-2::*fba*). Línea azul: PHB en g/L. Línea naranja: biomasa en g/L. Línea gris: glucosa en g/L. Las barras de error corresponden al desvío estándar.

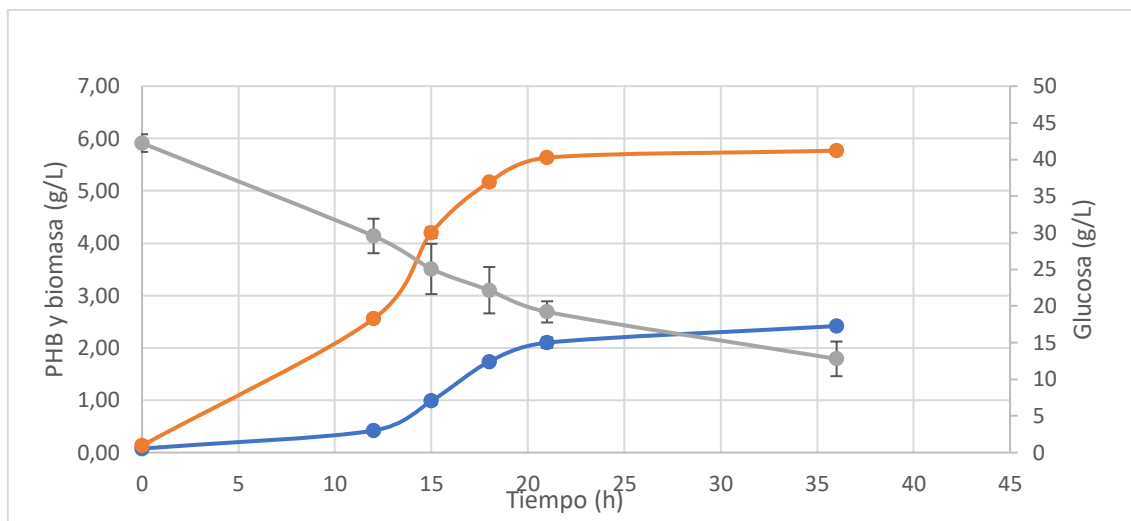


Figura 12: Perfil de producción de PHB, y concentración de glucosa en la cepa recombinante Z69 (pBBR1MCS-2). Línea azul: PHB en g/L. Línea naranja: biomasa en g/L. Línea gris: glucosa en g/L. Las barras de error corresponden al desvío estándar.

En las Figuras 11 y 12, se observa un aumento de producción de PHB lo largo del tiempo, alcanzando el máximo a las 36 horas para ambos cultivos. Ambas cepas produjeron 2,4 g/L de PHB.

Con respecto a la glucosa, la concentración disminuyó a lo largo del tiempo para ambos cultivos. A las 36 horas, la concentración de glucosa remanente en el medio de cultivo fue de 12,8 g/L para la cepa control y 15,0 g/L para la cepa recombinante.

Se obtuvieron 5,8 g/L de biomasa para la cepa control y para la cepa recombinante a tiempo final (Figura 11 y 12). Los porcentajes de acumulación en este tiempo fueron de 41,9% para la cepa control y 41,7% para la recombinante.

En cuanto a los rendimientos máximos de transformación, la cepa recombinante obtuvo 0,12 g/g a las 18 horas mientras que la cepa control obtuvo 0,08 g/g.

La Tabla 13 muestra las productividades máximas de la cepa recombinante y la cepa control, junto con los tiempos en los que se obtuvieron.

Tabla 13: Productividad máxima de Z69 (pBBR1MCS-2::*fba*) y Z69 (pBBR1MCS-2)

Cepa	Tiempo (h)	Q (g/L.h)
Z69 (pBBR1MCS-2:: <i>fba</i>)	18	0,096
Z69 (pBBR1MCS-2)	21	0,100

Al comparar productividades y tiempos junto con los controles, Z69 (pBBR1MCS-2::*fba*), obtuvo un productividad de 0,096 g/L.h a las 18 horas mientras que la productividad máxima del control fue de 0,100 g/L.h a las 21 horas. A las 18 horas, la productividad de la cepa control fue de 0,096 g/L.h. Esta cepa fue la única que obtuvo una productividad máxima en un tiempo distinto a su cepa control. Los rendimientos de transformación de glucosa en PHB también siguieron con la línea temporal ya que el mayor rendimiento de la cepa recombinante se obtuvo a las 18 horas (0,12 g/g) y el del control se obtuvo a las 21 horas (0,08 g/g). En estos tiempos, la producción de PHB fue de 1,7 g/L (18 horas) para la cepa recombinante y 2,1 g/L para la cepa control (21 horas). Los porcentajes de acumulación fueron de 33,9% para la recombinante y 37,3% para el control. Analizando los resultados, el bajo porcentaje de acumulación de la cepa recombinante no permite establecer el tiempo 18 horas como un tiempo óptimo de producción. Sin embargo, a la hora 18 se obtuvo el mayor rendimiento de transformación y la mayor productividad.

Además, la producción de PHB continuó, llegando al máximo a tiempo final, donde la productividad fue de 0,067 g/L.h y la acumulación fue de 41,65%.

Para ambas cepas, tanto el crecimiento como la acumulación de PHB y consumo de glucosa fueron similares. Esto sugiere que la sobre expresión del gen *fba*, partícipe de la vía ED cíclica, no logró aumentar la acumulación de PHB.

4.5 Evaluación de la producción de PHB y rendimiento en Z69 (pBBR1MCS-2::p*gi*)

La evaluación de la producción de PHB en Z69 (pBBR1MCS-2::p*gi*) se realizó en cultivos en medio mínimo LGI en presencia de glucosa 30 g/L como única fuente de carbono y Km. Al igual que para las otras cepas recombinantes analizadas anteriormente en este ensayo, se utilizó Z69 (pBBR1MCS-2) como control. Se realizaron tres réplicas biológicas de ambas cepas.

Los cultivos fueron incubados a 30°C con agitación orbital a 180 rpm. A lo largo de la incubación se tomaron muestras a tiempo inicial 0h, 12h, 15h, 18h, 21h, 24h y 39h. Dichas muestras se utilizaron para determinar el crecimiento mediante determinación de biomasa, concentración del PHB y glucosa remanente.

Las Figuras 13 y 14 muestran la producción de PHB, el crecimiento celular y el consumo de glucosa. La Figura 13 corresponde a Z69 (pBBR1MCS-2::p*gi*) y la Figura 14 corresponde a Z69 (pBBR1MCS-2).

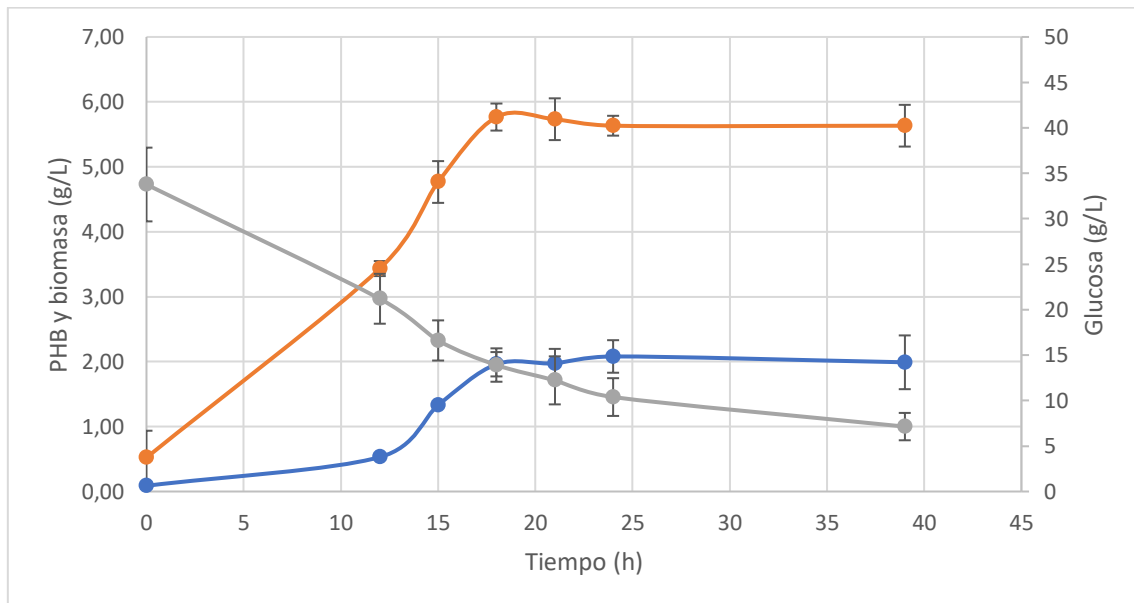


Figura 13: Perfil de producción de biomasa, PHB y concentración de glucosa en la cepa recombinante Z69 (pBBR1MCS-2::p*gi*). Línea azul: PHB en g/L. Línea naranja: biomasa en g/L. Línea gris: glucosa en g/L. Las barras de error corresponden al desvío estándar.

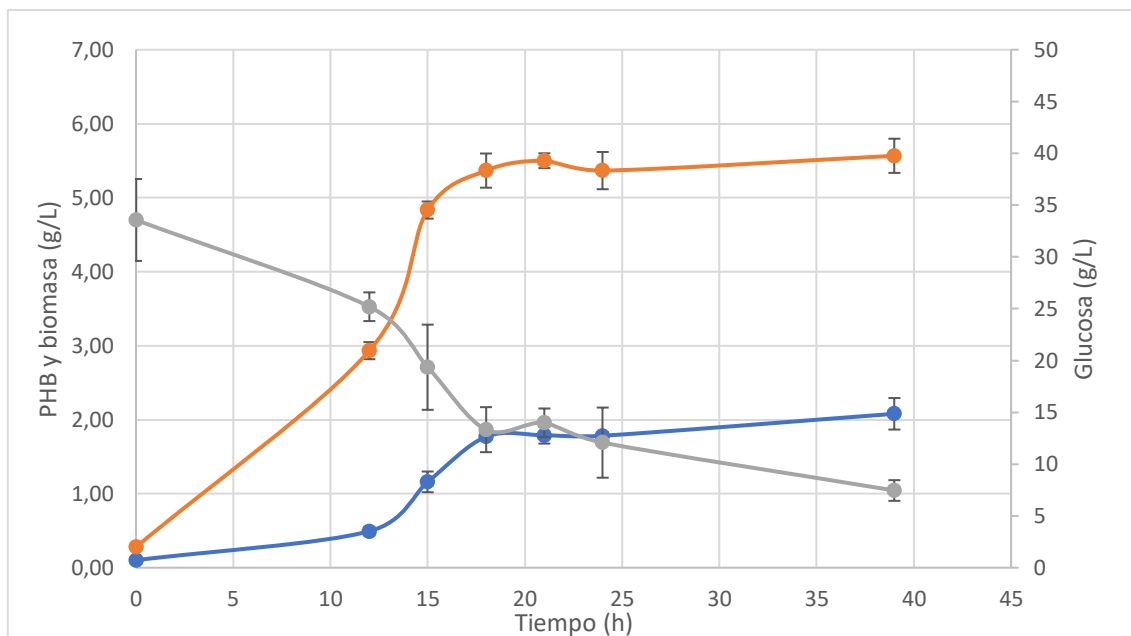


Figura 14: Perfil de producción de biomasa, PHB y concentración de glucosa en la cepa control Z69 (pBBR1MCS-2). Línea azul: PHB en g/L. Línea naranja: biomasa en g/L. Línea gris: glucosa en g/L. Las barras de error corresponden al desvío estándar.

La producción de PHB resultó máxima a la hora 39 para la cepa control y a la hora 24 para la cepa recombinante. La cepa control logró acumular 2,1 g/L de PHB a las 39 horas mientras que la cepa recombinante acumuló 2,0 g/L en ese horario. A las 24 horas, la cepa control acumuló 1,8 g/L de PHB y la cepa recombinante acumuló 2,1 g/L.

A las 39 horas, se obtuvieron 5,6 g/L de biomasa para ambas cepas mientras que a la hora 24, se obtuvieron 5,4 g/L para la cepa control y 5,6 g/L para la recombinante. Los porcentajes de acumulación máximos de PHB fueron de 37,3% para el control y 36,9% para la recombinante.

En cuanto a los rendimientos de transformación, la cepa recombinante obtuvo un rendimiento máximo de 0,10 g/g a las 18 horas y la cepa control obtuvo un máximo de 0,09 g/g a las 21 horas.

La Tabla 14 muestra las productividades máximas de las cepas Z69 (pBBR1MCS-2::p*gi*) y Z69 (pBBR1MCS-2) junto con los tiempos en los que se alcanzaron.

Tabla 14: Productividad máxima de Z69 (pBBR1MCS-2::*pgi*) y Z69 (pBBR1MCS-2)

Cepa	Tiempo (h)	Q (g/L.h)
Z69 (pBBR1MCS-2:: <i>pgi</i>)	18	0,109
Z69 (pBBR1MCS-2)	18	0,098

Las productividades máximas tuvieron una diferencia de 0,011 g/L.h. En este tiempo, los porcentajes de acumulación fueron de 33,0% para la cepa control y 34,0% para la cepa recombinante. A las 39 horas, en donde se obtuvo el mayor porcentaje de acumulación para la cepa control, la productividad fue de 0,053 g/L.h. A las 24 horas, en donde se dio la mayor acumulación de PHB en la cepa recombinante, la productividad de esta fue de 0,087 g/L.h. A las 24 horas, se obtuvo el máximo de producción de PHB y biomasa para la cepa recombinante. En cuanto a los rendimientos, los máximos alcanzados fueron a las 18 horas para la cepa recombinante y a las 21 horas para la cepa control. A las 24 horas, los $Y_{\text{PHB}/\text{gluc}}$ fueron de 0,09 g/g para Z69 (pBBR1MCS-2::*pgi*) y 0,08 g/g para Z69 (pBBR1MCS-2). La diferencia existente entre los rendimientos máximos y los alcanzados a las 24 horas, no parecería importante a la hora de producir PHB a escala industrial, lo cual permitiría seleccionar la hora 24 como el tiempo óptimo de producción.

Estos resultados sugieren que la sobre expresión del gen *pgi* no es la indicada para aumentar la transformación de glucosa en PHB en las condiciones del ensayo.

4.6 Discusión general

H. seropedicae Z69 logró acumular un porcentaje de PHB de aproximadamente 40% en la cepa control. Este valor coincide con resultados previos obtenidos por Catalán *et al.* 2007 (29).

La selección de éstas tres enzimas, como blancos de modificación genética para aumentar la síntesis de PHB, surgió del análisis de flujos metabólicos mediante el estudio de modos elementales de flujo. En estos estudios se logró identificar un modo elemental de flujo que se ajustaba a las condiciones experimentales. Esta solución correspondía a un funcionamiento lineal por la ruta de ED presente en *H. seropedicae*. En la ruta de ED lineal, por cada mol de glucosa se producen 1 mol de poder reductor en forma de NADPH y 2 moles de piruvato. Asimismo, en estos estudios se obtuvieron otros modos elementales de flujos, algunos de los cuales los rendimientos de transformación de glucosa en PHB eran mayores (moles de PHB por moles de glucosa). Uno de ellos mostraba un funcionamiento cíclico de la ruta de ED, involucrando el pool de triosas fosfato. Este funcionamiento estaría generando mayor cantidad de NADPH, molécula clave, junto con el acetyl-CoA, para la síntesis de PHB (2).

Es interesante destacar que el funcionamiento cíclico de la vía ED ha sido demostrado en otros microorganismos, entre ellos bacterias del medio ambiente, como *Pseudomonas putida* sometidas a condiciones de estrés o también en *E. coli* recombinante con el operón *phbCBA* en condiciones de acumulación de PHB (40, 41). Lee *et al.* lograron acumular más PHB al aumentar el número de copias de la enzima *tpiA* en *E. coli* recombinante. En este caso, lograron un aumento de 0,4 g/L a 1,6 g/L de PHB utilizando glucosa como fuente de carbono (42).

Continuando con posibles modificaciones genéticas para aumentar la síntesis de PHB, se han descrito varios estudios que incorporaron modificaciones genéticas a distintos microorganismos productores para aumentar su producción. Lee *et al.* lograron aumentar la producción de PHB de un 50,2% a un 65% al sobre expresar el gen *phaC*, que codifica para la PHB sintasa, en *Alcaligenes latus*. En este estudio se concluyó que la copia del gen promovió un aumento en el flujo de producción de PHB (43). En otro estudio se construyeron cepas recombinantes de *A. eutrophus* sobre expresando los genes

phbCAB, *phbAB* y *phbC* para estudiar su efecto en la acumulación de PHB. El operón *phbCAB* corresponde a las enzimas β -cetotiolasa (*phbA*), acetoacetyl-CoA reductasa (*phbB*) y PHA sintasa (*phbC*). Se observó que la cepa recombinante que contenía la copia del gen *phbC*, acumulaba la mayor cantidad de PHB en comparación con la cepa control. Esto permitió concluir que la PHB sintasa era la enzima más crítica en la biosíntesis del PHB. El porcentaje de acumulación aumentó de un 33,2% a un 40,7% (44).

En este trabajo, los rendimientos entre las cepas recombinantes y sus controles determinaron que la sobre expresión de los genes estudiados no logró aumentar el rendimiento de transformación de glucosa en PHB. Lo que sugiere que no se logró incrementar el flujo metabólico hacia la producción de PHB. De todos modos, al tener una concentración final de glucosa de aproximadamente 10 g/L en los tres ensayos, se podría continuar con la producción por más tiempo, debido a que las bacterias en general acumulan PHB en presencia de exceso de fuente carbonada y limitación de algún nutriente. Asimismo, se ha descrito que la acumulación de PHB en *H. seropedicae* se encuentra parcialmente asociada al crecimiento lo cual podría indicar que un aumento en el tiempo de producción podría resultar en un aumento de producción de PHB (2). Sin embargo, las productividades disminuyen a lo largo del tiempo, lo que sugiere que un aumento en el tiempo no sería una ventaja para las empresas productoras de PHB. Además, la similitud de los resultados entre la cepa control y las cepas recombinantes podrían mantenerse.

Debido a que los resultados no fueron los esperados, sería fundamental realizar medidas de actividad enzimática para comprobar la sobre expresión de las enzimas estudiadas o cuantificar el ARNm mediante RT-qPCR. Asimismo, se podrían evaluar estas mismas cepas recombinantes bajo otras condiciones de cultivo, como por ejemplo bajo condiciones limitantes de oxígeno, amonio o en cultivos continuos donde se pueda fijar una velocidad de crecimiento óptima para la acumulación de PHB ya que la misma en *H. seropedicae* está parcialmente asociada al crecimiento.

Al comparar los resultados obtenidos en este trabajo, junto con los consultados en la bibliografía, se sugiere que la acumulación de un polímero no depende exclusivamente de las enzimas involucradas en su síntesis. La sobre expresión de las enzimas seleccionadas en este trabajo, por si solas, no lograron derivar el flujo de carbono hacia

un incremento en la síntesis de PHB. Esto puede deberse a que se genera un cuello de botella, ya que la sobre expresión de una sola enzima, lograría aumentar solamente el flujo a través una reacción y no de toda la red metabólica, generando una limitación por parte de la reacción siguiente. El hecho de sobre expresar únicamente una enzima, como el caso de los genes *tpiA*, *fba* y *pgi*, no lograría incrementar el flujo, pudiendo ser otra opción sobre expresar dos o las tres enzimas en conjunto.

5. Conclusiones

Mediante la metodología realizada se logró construir la cepa recombinante Z69 (pBBR1MCS-2::*pgi*) de manera exitosa.

Las cepas Z69 (pBBR1MSC-2::*tpiA*), Z69 (pBBR1MSC-2::*fba*) y Z69 (pBBR1MSC-2::*pgi*) crecidas en medio definido con glucosa como única fuente de carbono no lograron aumentar el rendimiento de transformación de glucosa en PHB, con respecto al control. Estos resultados indican que la sobreexpresión de un solo gen no logra aumentar la producción de PHB.

6. Perspectivas a futuro

Realizar medidas de actividad de las enzimas codificadas por los genes *fba*, *tpiA* y *pgi*, para confirmar que existe la sobre expresión de las enzimas estudiadas.

Realizar ensayos con diferentes condiciones de cultivo para tratar de optimizar la producción de PHB.

Construir una cepa recombinante sobre expresando los tres genes estudiados en este trabajo con el fin de lograr un aumento en el flujo metabólico de la producción de PHB en *H. seropedicae* Z69.

7. Referencias

- 1 Plastics Europe. Plastics – the Facts 2022. [Internet]. Octubre 2022. [Citado enero 2023]. Disponible desde: <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2022/#:~:text=Plastics%20%E2%80%93%20the%20Facts%20is%20an,industry's%20contribution%20to%20European%20society.>
- 2 Catalán AI. Desarrollo de estrategias dirigidas a modificar el metabolismo de *Herbaspirillum seropedicae* para mejorar la producción de polihidroxicanoatos (Tesis de doctorado). Montevideo: Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE); 2016.
- 3 Responsabilidad Social E y S. Plásticos: qué son, características, tipos y reciclaje. [Internet]. Diciembre 2021. [Citado enero 2023]. Disponible desde: [https://responsabilidadsocial.net/plasticos-que-son-caracteristicas-tipos-y-reciclaje/?noamp=mobile.](https://responsabilidadsocial.net/plasticos-que-son-caracteristicas-tipos-y-reciclaje/?noamp=mobile)
- 4 Castilho LR, Mitchell DA, Freire DMG. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. *Bioresource Technology*. 2009 ;100(23):5996–6009. doi:10.1016/J.BIORTECH.2009.03.088
- 5 González García Y, Meza Contreras JC, González Reynoso O, Córdova López JA. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates: Plastic microbial | Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: Plásticos de origen microbiano. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 2013;29(1).
- 6 Khanna S, Srivastava AK. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*. 2005;40(2). doi:10.1016/j.procbio.2004.01.053
- 7 RAJAPACK S.A. Tipos de plásticos biodegradables en el mundo del embalaje. <https://www.rajapack.es/blog-es/tipos-plasticos-biodegradables>. 2019 Oct.
- 8 Chen GQ, Zhang J, Wang Y. White Biotechnology for Biopolymers: Hydroxyalkanoates and Polyhydroxyalkanoates: Production and Applications. In: *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*. 2015. doi:10.1016/B978-0-444-63453-5.00018-5

- 9 Sharma V, Sehgal R, Gupta R. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Properties and Modifications. *Polymer*. 2021;212. doi:10.1016/j.polymer.2020.123161
- 10 Kadowaki MA, Müller-Santos M, Rego FG, Souza EM, Yates MG, Monteiro RA, Pedrosa FO, Chubatsu LS, Steffens MB. Identification and characterization of PhbF: A DNA binding protein with regulatory role in the PHB metabolism of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. *BMC Microbiology*. 2011;11. doi:10.1186/1471-2180-11-230
- 11 Kumar M, Rathour R, Singh R, Sun Y, Pandey A, Gnansounou E, Andrew Lin KY, Tsang DCW, Thakur IS. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Opportunities, challenges, and prospects. *Journal of Cleaner Production*. 2020;263. doi:10.1016/j.jclepro.2020.121500
- 12 Philip S, Keshavarz T, Roy I. Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2007;82(3). doi:10.1002/jctb.1667
- 13 Anderson AJ, Dawes EA. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*. 1990;54(4). doi:10.1128/membr.54.4.450-472.1990
- 14 Koller M, Mukherjee A. A New Wave of Industrialization of PHA Biopolyesters. *Bioengineering*. 2022;9(2). doi:10.3390/bioengineering9020074
- 15 McAdam B, Fournet MB, McDonald P, Mojicevic M. Production of polyhydroxybutyrate (PHB) and factors impacting its chemical and mechanical characteristics. *Polymers*. 2020;12(12). doi:10.3390/polym12122908
- 16 Tan GYA, Chen CL, Li L, Ge L, Wang L, Razaad IMN, Li Y, Zhao L, Mo Y, Wang JY. Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): A review. *Polymers*. 2014;6(3). doi:10.3390/polym6030706
- 17 Awaja F, Pavel D. Recycling of PET. *European Polymer Journal*. 2005;41(7). doi:10.1016/j.eurpolymj.2005.02.005
- 18 Fundació Universitat Empresa de les Illes Balears. Ensayos de biocompatibilidad. [Internet]. [Citado enero 2023]. Disponible desde: <https://fueib.org/es/investigadors/65/otri/catalogo/2/706/servicio/ensayos-de->

- 28 Baldani JJ, Baldani VLD, Seldin L, Dobereiner J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1986;36(1). doi:10.1099/00207713-36-1-86
- 29 Catalán AI, Ferreira F, Gill PR, Batista S. Production of polyhydroxyalkanoates by *Herbaspirillum seropedicae* grown with different sole carbon sources and on lactose when engineered to express the *lacZlacY* genes. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007;40(5). doi:10.1016/j.enzmictec.2006.10.008
- 30 Pedrosa FO, Monteiro RA, Wassem R, Cruz LM, Ayub RA, Colauto NB, Fernandez MA, Fungaro MHP, Grisard EC, Hungria M, et al. Genome of *herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. *PLoS Genetics*. 2011;7(5). doi:10.1371/journal.pgen.1002064
- 31 Bailey JE. Toward a science of metabolic engineering. *Science*. 1991;252(5013). doi:10.1126/science.2047876
- 32 Jojima T, Igari T, Noburyu R, Watanabe A, Suda M, Inui M. Coexistence of the Entner–Doudoroff and Embden–Meyerhof–Parnas pathways enhances glucose consumption of ethanol-producing *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology for Biofuels*. 2021;14(1). doi:10.1186/s13068-021-01876-3
- 33 Beringer JE. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology*. 1974;84(1). doi:10.1099/00221287-84-1-188
- 34 BERTANI G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. 1951;62(3).
- 35 Cavalcante VA, Dobereiner J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*. 1988;108(1). doi:10.1007/BF02370096
- 36 Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set)*. Molecular cloning: a laboratory manual. 2001.
- 37 Kovach ME, Elzer PH, Steven Hill D, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, Peterson KM. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*. 1995;166(1). doi:10.1016/0378-1119(95)00584-1

- 38 Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR. Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1980;77(12 II). doi:10.1073/pnas.77.12.7347
- 39 Malán AK, Tuleski T, Catalán AI, de Souza EM, Batista S. *Herbaspirillum seropedicae* expresses non-phosphorylative pathways for d-xylose catabolism. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2021;105(19). doi:10.1007/s00253-021-11507-4
- 40 Nickel PI, Chavarría M, Fuhrer T, Sauer U, De Lorenzo V. *Pseudomonas putida* KT2440 strain metabolizes glucose through a cycle formed by enzymes of the Entner-Doudoroff, embden-meyerhof-parnas, and pentose phosphate pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(43). doi:10.1074/jbc.M115.687749
- 41 Hong SH, Park SJ, Moon SY, Park JP, Lee SY. In silico prediction and validation of the importance of the Entner-Doudoroff pathway in poly(3-hydroxybutyrate) production by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2003;83(7). doi:10.1002/bit.10733
- 42 Lee SH, Kang KH, Kim EY, Chae TU, Oh YH, Hong SH, Song BK, Jegals J, Park SJ, Lee SY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for enhanced biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) based on proteome analysis. *Biotechnology Letters*. 2013;35(10). doi:10.1007/s10529-013-1246-y
- 43 Lee YH, Seo IS, Jung YM, Huh TL. Construction of transformant *Alcaligenes latus* enforcing its own cloned *phbC* gene and characterization of poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis. *Biotechnology Letters*. 2000;22(11). doi:10.1023/A:1005628908532
- 44 Park JS, Park HC, Huh TL, Lee YH. Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus* transformants harbouring cloned *phbCAB* genes. *Biotechnology Letters*. 1995;17(7). doi:10.1007/BF00130360