

Tesis Doctoral

Efectos del sistema regulador CreBC sobre el flujo de carbono en *Escherichia coli* y su manipulación para incrementar la síntesis de compuestos de interés industrial

Godoy, Manuel Santiago

2014-03-28

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Godoy, Manuel Santiago. (2014-03-28). Efectos del sistema regulador CreBC sobre el flujo de carbono en *Escherichia coli* y su manipulación para incrementar la síntesis de compuestos de interés industrial. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Godoy, Manuel Santiago. "Efectos del sistema regulador CreBC sobre el flujo de carbono en *Escherichia coli* y su manipulación para incrementar la síntesis de compuestos de interés industrial". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-03-28.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**“Efectos del sistema regulador CreBC
sobre el flujo de carbono en
Escherichia coli y su manipulación para
incrementar la síntesis de compuestos
de interés industrial”.**

Lic. Manuel Santiago Godoy

Directora de tesis: *Dra. María Julia Pettinari*

Consejero de estudios: *Nancy I. Lopez*

Lugar de trabajo: Laboratorio de Genética Bacteriana, Dpto. de Qca. Biológica, FCEyN, UBA.

Buenos Aires, 2014

Agradecimientos

Se inaugura aquí el discurso del agradecimiento, mezclado y confundido con otros conceptos como el esfuerzo, la templanza, la alegría y el trabajo, desde una perspectiva personal, porque lo que han escrito otros, ya está escrito. Eso sí, no quisiera ser desordenado: el contexto en el que se enmarcan estos agradecimientos amerita cierta rigurosidad. Para ello segmenté este discurso en párrafos breves e inconexos, porque *orden* no es necesariamente *coherencia*. Una convención previa hace falta para economizar notación: le diremos *agradecido* al que emite el agradecimiento, y *agradeciente* al que lo recibe (Notarán que la cacofonía de esta palabra se atenúa a medida que transcurre este texto).

Sobre las jerarquías de los agradecimientos. *Conviene decir que no hay. Las jerarquías fomentan la comparación, y la comparación la competencia. Desafortunadamente, por más esfuerzo que se haga en evitar este tipo de cuestiones, el orden en el que aparecen los agradecimientos establece una jerarquía implícita. Sin embargo, hay dos claros agradecientes a los que se le permite darles una clara distinción del resto: la familia y el jefe (la jefa!). Y ya que estamos empiezo por ellos.*

A mis viejos les quiero agradecer... puff, por dónde empezar. Les quiero agradecer por hacer de mis logros una satisfacción personal, por tenerme paciencia los días que llegaba tarde (o muy tarde) y de mal humor (o muy mal humor) y me esperaban con la cena preparada. Pero sin dudas, les agradezco por haber puesto a mi disposición la sensibilidad y la ética que hacen falta para ser buena persona, y por haber propiciado las condiciones para que se desarrollara mi vocación. A mis hermanos (Ignacio y Rocío) les agradezco por la infancia compartida, los juegos, las peleas que siempre me tenían como claro perdedor. Les agradezco por lo que me han hecho reír, y porque cada día somos más hermanos. A Ignacio y a Anita les agradezco por hacerme tío de esa gorda preciosa, que nos tiene a todos babosos (¡Como te quiero Piiiiii!). La sumo a Tere, y a la familia Ciarlo en todo su conjunto y extensión, a los Vita y a Carlitos Marcón.

A Julia Pettinari, mi directora de tesis, le voy a agradecer algo que noté en ella ni bien cruzamos la primera palabra: su buena onda. Julia genera un ambiente de trabajo en el que te sentís a gusto, y en el que es grato estar, algo que para mí es fundamental. Le agradezco que haya defendido mi trabajo en numerosas oportunidades, y que me haya dado la libertad para poner algunos de mis delirios a prueba (no todos, y por eso también gracias!). Sumo en este párrafo a las otras autoridades del laboratorio. A la Dr. Beatriz Méndez, la voz de la experiencia, a quien recurro cuando necesito la palabra autorizada de una química, y a Nancy, quien recurre a mí cada vez que necesita correr algo pesado... no mentira, a Nancy por su gran predisposición, su afabilidad, y porque maneja muy bien el arte de la sugerencia.

Agradecer es resignarse a entrar en un campo minado de clichés. Caer en un lugar común durante el agradecimiento es inevitable, por eso no conviene afligirse si se repite una

estructura gramatical o un concepto: es físicamente imposible tener un motivo de agradecimiento distinto para cada persona a quien se quiere agradecer (sin caer en los agradecimientos triviales, cotidianos o inapropiadamente específicos como por ejemplo “te agradezco por prestarme tal o cual enzima/tal o cual equipo” “por sacarme las placas de la estufa el sábado” o similares). Por otro lado, que el motivo de agradecimiento se repita para distintos agradecientes, no les quita su mérito. Conviene eso sí, agregar una seña particular por persona, un guiño: el agradecimiento es la ocasión en la que uno debe hacer sentir especial al agradeciente. Daremos ejemplos de cómo combinar estas ideas con el grupo de agradecientes que comparte el mayor número de motivos de agradecimientos: los compañeros de trabajo. Prestar atención.

Pau, te agradezco por tirarme buenas ideas para experimentos, por haber entendido el nivel de locura que tuve estos últimos tiempos al darme prioridad para largar experimentos, y por permitirme ejercitar mi tolerancia al desorden. José, a vos todavía te tengo que dar unas buenas trompadas. Al margen de esto, creo que en estos meses te he pedido más favores que en ¡todo el doctorado! también te cuento que presto mucha atención a tus palabras y tomo nota de ellas: sé que te estás preparando para ser una persona sabia. Rubia, a vos te agradezco no ser convencional, tus sarcasmos hilarantes, estar al pie del cañón en momentos de estrés, y que nos podamos pelear con la tranquilidad de que al rato se nos pasa. Eso sí, haceme la gauchada de leer bien las indicaciones que te dejo, OK? Carlita-DIII-MAAAR-TIII-NOOO!! Sos una muy linda persona. Tu humor me hace reír a carcajadas, aún en los peores HPLC-days (a ese nivel ;). Te preocupas por levantar el ánimo y hacer que la gente se sienta a gusto. Catone: la falta que haces en el labo! Daba gusto quedarse hasta tarde en tu compañía: si habremos charlado esperando a que la banda amarilla del gel se cayera! En esos ratos nos hemos confiado, como quien dice, las penas y las alegrías. Lau: gracias por la abrazoterapia, fundamental en momentos complicados. Anto y Esmé: es un gusto trabajar con ustedes. No tienen dramas, siempre que pueden ayudan, y no las conozco de mal humor. Pablo: sos un oráculo, lo que te pregunto lo sabés. Pero lo que más te agradezco es que te hagas un tiempo para contestar mis mails, algunos de ellos abarrotados de preguntas. Te bancas mi retórica y cada vez que tenés la oportunidad, tirás buena onda. ¡Muchas gracias por todo Pablin! Aleli: la hermana mayor del coli-team, te agradezco porque mis primeros pasos en el labo los dí con vos y con Andre (¡hace mucho tiempo ya!), a quien también le estoy agradecido. Jime, a vos te tengo que agradecer el haber confiado en mí para codirigir a Evangelina. Fue un gesto de fe importante. También te agradezco los consejos que me has prestado. Mati: otro con el que me descostillo de la risa. Gracias por estar siempre atento a lo que me pasa y preocuparte. Gon: la distancia no te ha hecho menos partcipe de esta sección, e inclusive en tus visitas has sabido traerme cosas útiles. Alzo la copa por las locuras con las que nos divertiste durante tu paso por el labo y por el compromiso ético que nos une. Evita: te agradezco los medios, las charlas de pasillo ¡y que te aguantes mis delirios!

Agrupaciones forzadas de agradecientes pueden resultar ofensivas. Muchas veces en honor a la brevedad, cometemos asociaciones impropias de personas, combinando lo incombible. Es preferible establecer, si hiciese falta, varios grupos naturales de agradecientes y decir poco, que

en poco meter a muchos. Pensar en la frase “lo bueno si es breve, dos veces bueno” y establecer una relación.

A las ruzalitas históricas Mer y Marianita (agrego aca al otrora ruzalito Mariano) y a los nuevos ruzalitos Joaqui y Pablo. A las Piuritas Euge, Estefi y Lili. A Marina Piuri. Muchas gracias por estar dispuestas siempre a dar una mano, prestar cosas, preocuparse por uno. A Sandra que hace de lo difícil algo fácil, con autoridad y sin dramas. Ustedes son una extensión de nuestra familia científica y refendan el significado de la palabra solidaridad con su generosidad y con su compañía.

A toda la gente de viro, a la que he recurrido innumerables veces por equipos, agua μ q, y consultas de todo tipo. Un agradecimiento especial a las chicas de viro, por el aguante, y por dejarme participar de sus festejos (Belu, Maru, Vero, Euge, Juli, Ana “Pesadilla” Carro, Luana), a las chicas jefas (Cybele, Andea, Erina, y Sandrita), a los muchachos y a la cúpula también.

A los de inmuno (Anita, Delfi, Belu, Nancy, Rodri, a los jóvenes Joaquín, Martín y Agustín, y a Vero, por supuesto), por mantener mi medula ósea siempre en funcionamiento, considerarme un sujeto sano, prestar equipos y sobre todo, por tener don de gente.

A los cortoncitos Celina, Fede, Nati y Astrid, por ser buenos vecinos y atender mis consultas con la mayor atención.

A todo el equipo del ICB2 (USP, San Pablo), empezando por Gregorio Cabrera Gomez, una eminencia y un gran tipo. A Luiziana, Marilda y Aelson por el excelente trato que recibí. A los becarios: Amanda, Debora, Kelly, Cristiane, Lucas, Siddharta, por darme una mano cuando se las pedí, y un agradecimiento muy espacial a Johanna Bocanegra y Daniela Licio, quienes, si hacía falta, dejaban de hacer lo que estaban haciendo para ayudarme con mis fermentaciones.

A mis amigos de cursada: Cons, Ailin, Eve, Romi, Juli, Artur, Leo, Fran y Marie. Pucha, me da bronca tener no poder agradecerles uno por uno. Me conocieron hace once años atrás, y todavía me aguantan. Eso tiene su mérito, y acá su reconocimiento. También le agradezco a Marian y a Noe por hacer causa común conmigo y alivianar con sus charlas las horas de viaje que compartimos. Sociabilizar los problemas cotidianos y los logros con todos ustedes ha sido muy buena terapia. Nos hemos visto crecer, formarnos, y muchos de ustedes ya han dejado caer gajos a la tierra, que germinarán y crecerán (Maite) o están en eso (Santiago y ¿Tomás?).

A quienes alguna vez intenté transmitirles algo, desde el llano: Evangelina: primera “hija” formal, gracias por tu simpatía y respeto, fue un honor haber hecho, por mínima que fuere, una contribución a tu tesina. Mercedes Zalduendo: gracias por el buen humor, aprender rápido y darme una mano importante con los experimentos de mi tesis. Martin Garramone, un grande. De paso breve por el labo pero rendidor, fuiste de gran ayuda para construir las mutantes. Sos un tipo con buena vibra y con garra (busqué sinónimos para no ser tan obvio, pero no estaban a la altura). Conviene rodearse de gente así, como ustedes.

A las autoridades de QB, Adalí, Silvia Rossi, Sandra y Nancy, por mostrar su interés en que siga en el departamento, habilitando los medios para sobrellevar las contingencias laborales que se presentaron. Agrego aca a Ayelen, paciente para explicar y dar una mano con los miles de trámites que tuve que hacer.

Un agradecimiento especial a Daniel Guebel, un hallazgo del último tramo de mi doctorado. Me dio una gran ayuda con la parte más ríspida de mi tesis, cálculos, modelos, etc. Aportó a la solidez de este trabajo con rigurosidad de análisis. Una excelente persona.

Y por último a los amigos de la vida, a los que trato de no hablarles de mi trabajo para no aburrirlos. A Taty una amigaza de aquellas, a Pao, Luquitas, Lean, Lore y a Rodri (si habremos tenido charlas filosóficas vos y yo eh!). Con ustedes comparto además de la amistad, nada menos que los ideales. A Leito Indaburo, el rey del sarcasmo. A Tou, que lo tengo olvidado pero sigue tan amigo como siempre. Y por supuesto, a Sabrina y Marianella, quienes me conocen desde hace más de 20 años y son dos personas fundamentales en mi vida.

Las mejores conclusiones del agradecimiento son generalidades. Conviene siempre darle un cierre a una sección de agradecimientos invocando valores universales y emotivos como la tesonería, la templanza, la solidaridad. No recurrir al golpe bajo.

El doctorado ha sido una etapa de mucho trabajo, por el que he sacrificando sábados, domingos, feriados, horas de sueño, todo el sueño en sí. Ha sido por lo mismo una etapa de formación, en lo profesional, en lo intelectual y en lo personal. Me ha dejado mucho más de lo que se escribe en una tesis. Pero en la tesis, ese esfuerzo toma una forma particular, ordenada, con métrica y lógica. Quienes lean este trabajo deben saber todo el esfuerzo que significó, y toda la ayuda que hizo que ese esfuerzo no saliera de una sola persona.

MUCHAS GRACIAS.

Índice

Índice	2
Resumen	10
Abstract.....	12
INTRODUCCIÓN	14
Introducción	15
PRIMERA PARTE. Reguladores globales: sistemas de dos componentes (TCSs).....	16
<i>Mecanismo de transferencia de la señal de los TCSs.....</i>	16
<i>Distribución de los TCSs.....</i>	17
<i>El regulador global CreBC.....</i>	18
CreC en el regulón <i>pho</i>	18
Constitución del operón <i>creABCD</i>	19
En busca de la molécula ligando de CreC	19
Secuencia conservada de reconocimiento de CreB.....	20
CreC como regulador de fósforo.	21
<i>Mecanismos principales de regulación del flujo de carbono.....</i>	21
Represión catabólica.....	22
Mecanismo de acción de CAP	23
SEGUNDA PARTE. Respuesta al estrés oxidativo.....	24
<i>Generación de especies reactivas de oxígeno</i>	24
<i>Sistemas de defensa frente al estrés oxidativo.....</i>	25
<i>Regulación de la respuesta al estrés oxidativo en E. coli</i>	26
El regulón <i>oxyR</i>	27
El regulón <i>soxRS</i>	27
TERCERA PARTE. Metabolitos de interés industrial.	28
<i>Manipulación de los flujos de carbono y energía para la síntesis de compuestos de interés biotecnológico en E.coli.....</i>	28
<i>Succinato</i>	30
Aplicaciones e importancia económica del succinato	30
Organismos y biodiversidad.....	31
Fisiología, bioquímica y genética.....	32
Estrategias genéticas empleadas para la optimización de la producción de ácido succínico.....	33
Sobreexpresión de enzimas carboxilantes.	35
<i>Los Polihidroxialcanoatos</i>	36
Características de los distintos PHA e importancia biotecnológica	37
Síntesis de PHA.....	38
Producción de PHA en <i>E. coli</i> recombinante	39
Objetivos.....	41
MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
Cepas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.	43

Cepas, plásmidos y oligonucleótidos.....	43
Medio LB (Luria-Bertani).....	44
Medio mínimo M9 y M9m.....	45
SOB y SOC.....	45
Antibióticos y aditivos.....	45
Cultivos aeróbicos y de baja aerobiosis en frasco agitado.....	45
Cultivos anaeróbicos.....	45
Ensayos en biorreactor.....	45
Manipulaciones genéticas y técnicas de biología molecular.....	46
Extracción de Plásmidos.....	46
Digestión con enzimas de restricción.....	46
Purificación de DNA.....	46
Reacciones de ligado.....	46
Electroforesis en geles de agarosa.....	46
Cuantificación de DNA.....	47
Preparación de células competentes.....	47
Transformación de células competentes.....	47
<i>Reemplazo alélico (técnica de Datsenko y Wanner).....</i>	48
Construcción de las mutantes $\Delta creC$, $\Delta creB$ y $\Delta creBC$	48
Construcción de cepa K1060C (<i>creC510</i>).....	48
Construcción de cepas mutantes para la producción de PHB y succinato.....	48
Métodos analíticos.....	51
Determinación de biomasa.....	51
Cuantificación de ácidos en sobrenadante y PHB.....	51
Determinación de fuentes de carbono en sobrenadante.....	52
Determinación de etanol.....	52
Determinación de nitrógeno amoniacal.....	52
Determinación de cociente redox.....	52
Determinación de la tasa de consumo de oxígeno.....	53
Pruebas fisiológicas.....	53
Estudios por cartometría de la expresión de promotores con Gfp como gen reportero.....	53
Análisis estadístico de los resultados.....	53
Manipulación de proteínas.....	54
Preparación de extractos celulares y determinación de proteínas.....	54
Determinación de actividad enzimática.....	54
Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	54
CAPÍTULO I.....	55
Prefacio.....	56
Caracterización del crecimiento y el metabolismo de mutantes <i>creC</i>.....	59
Biomasa final y velocidad de crecimiento en distintas fuentes de carbono.....	59
Síntesis de ácidos orgánicos.....	60
<i>Estudio de la actividad enzimática acetato quinasa (ACK) y lactato deshidrogenasa (LDH).....</i>	64
Caracterización enzimática de las cepas <i>creC</i> en distintos niveles de aireación.....	64

Efectos del citrato férrico en la síntesis de ácidos orgánicos.....	66
Análisis de la participación del regulador de la respuesta CreB, en el fenotipo metabólico de las cepas <i>creC</i>	69
Coeficientes [etanol]/[acetato] y evaluación de la concentración de la fuente de carbono en la actividad regulatoria de CreC.....	72
Evaluación de los posibles efectos de CreC sobre la regulación transcripcional de los genes <i>ackA</i> , <i>ldhA</i> y <i>focA</i>	74
Medición de la actividad reportera en fluorímetro.....	75
Medición de la actividad reportera por citometría de flujo.....	76
Corroboración de la correcta expresión de los sistemas reporteros.....	76
Medición de la actividad reportera de <i>ackA</i> y <i>ldhA</i>	77
Sensibilidad al estrés oxidativo.....	79
Crecimiento en medio sólido M9 con azul de toluidina.....	79
Estudio de la vulnerabilidad de las cepas K1060 y DC1060 a agentes oxidantes.....	80
Estudio del estado redox intracelular.....	82
Las cepas productoras de PHB son incapaces de crecer en M9T.....	82
Evaluación de la respuesta fisiológica a la diamida.....	83
Determinación del cociente NADH/NAD ⁺	83
Gráfico 12. Determinación de la relación NADH/NAD ⁺ y NADPH/NADP ⁺ en cepas K1060 y DC1060, en cultivos crecidos en M9 glucosa en condiciones de baja y alta aerobiosis. Las cepas ensayadas fueron la K1060, K106C (<i>creC510</i>) y la DC1060 ($\Delta creC$).....	84
Consumo de oxígeno.....	84
Búsqueda preliminar de posibles blancos de regulación de CreBC.....	86
CAPÍTULO II.....	89
Prefacio.....	90
Fermentaciones preliminares en baja aerobiosis: condiciones I.A y I.B.....	92
<i>Condición I.A (Baja aerobiosis – M9-Glucosa)</i>	92
Cinética de crecimiento.....	92
Producción de ácidos.....	93
<i>Condición I.B (Baja aerobiosis - Glicerol)</i>	95
Cinética de crecimiento.....	95
Producción de ácidos.....	96
<i>Conclusiones de la condición I</i>	97
Fermentaciones con provisión ilimitada de oxígeno: condiciones II A y B.....	98
<i>Condición II. A (Alta aerobiosis - M9-Glucosa)</i>	98
Cinética de crecimiento.....	98
<i>Modificaciones del medio M9 para mejorar el crecimiento</i>	100
<i>Condición II. B (Alta aerobiosis - M9m-glucosa)</i>	102
Cinética de crecimiento y producción de ácido acético.....	102
Fermentaciones con aireación media: condiciones III.A y III.B.....	104
<i>Condición III.A (Aireación media – M9m-glucosa)</i>	105
Cinética de crecimiento.....	105
Perfil de ácidos.....	108
<i>Condición III.B (Aireación media - M9m-glicerol)</i>	109
Cinética de crecimiento.....	109

Perfil de ácidos	110
CAPÍTULO III	113
Prefacio	114
Inserción de los operones <i>phaBAC</i> (<i>Azotobacter</i> sp.) y <i>phaCAB</i> (<i>R. eutropha</i>) en el cromosoma de <i>E. coli</i> para mejorar la producción de PHB.	116
Inserción de los genes <i>phaBAC</i> en el cromosoma.	116
Evaluación de la producción de PHB en cepas PL1060-KF.....	117
Estudio de los efectos de CreC en la producción de PHB y succinato.	119
Evaluación del efecto del bicarbonato en la fisiología de nuestras cepas de estudio.	119
Efectos del regulador CreC en la producción de PHB y análisis del perfil de ácidos de las cepas productoras.....	123
Construcción de una colección de mutantes para la eliminación de vías competitivas de la producción de PHB y succinato.	125
<i>Caracterización preliminar de las cepas mutantes.</i>	<i>126</i>
<i>Producción de PHB en mutantes metabólicas.</i>	<i>129</i>
<i>Redireccionamiento de vías metabólicas y sobre-expresión de genes endógenos de E. coli para mejorar la producción de succinato.</i>	<i>131</i>
Fundamentos de la estrategia	131
Evaluación de la estrategia planteada	133
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES FINALES.	137
Los que se sabía de CreC.....	138
La actividad transcripcional de <i>ldhA</i> y <i>ackA</i> y la cuestión del piruvato.....	140
Contribución de los ensayos de biorreactor.	142
Un efecto inesperado de CreC: interviene en la respuesta al el estrés oxidativo. ..	143
¿Un problema de eficiencia?	145
La producción de PHB.....	145
La producción de succinato.....	146
Conclusiones finales.....	147
BIBLIOGRAFÍA.	149

Resumen

La supervivencia de un organismo depende, al menos en parte, de su habilidad para sentir y responder a cambios en el ambiente. En las bacterias, los cambios en las características físicas y nutricionales del ambiente generan respuestas inmediatas, a través de la regulación de conjuntos de genes en respuesta a un estímulo específico del ambiente y a señales metabólicas.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de cambios en CreC, el sensor del sistema regulador de dos componentes CreBC, sobre el metabolismo central de *E. coli*. Se estudió el efecto de mutaciones en el gen *creC* en cepas crecidas en medio mineral M9 con glucosa y glicerol como fuente de carbono, y en distintas condiciones de aerobiosis. La ausencia de CreC generó mayores efectos en M9 glucosa y en bajas tensiones de oxígeno tanto para la secreción de metabolitos (acetato, formiato, lactato y succinato) como para las actividades enzimáticas acetato quinasa (ACK) y lactato deshidrogenasa (LDH). De los cuatro metabolitos mencionados, la cepa $\Delta creC$ (DC1060) produjo más acetato, formiato y succinato y menos lactato, y reportó una mayor actividad ACK y menor actividad LDH.

El estudio de los niveles de transcripción a través de fusiones transcripcionales del gen *gfp* (codifica la proteína verde fluorescente, Gfp) a los promotores de los genes de las enzimas estudiadas *ackA* (ACK) y *ldhA* (LDH) confirmaron que la menor actividad LDH de la cepa DC1060 se correspondía con niveles inferiores de transcripto del gen (en la fase exponencial). Para la fusión *ackA-gfp*, en cambio, los niveles de transcripción fueron leve pero significativamente menores en la cepa mutante respecto a la salvaje (K1060) en esta fase, en contraposición a lo observado para la actividad ACK. La transcripción de este gen en la fase estacionaria, pasó a ser mayor en la cepa DC1060, demostrando un alto nivel de complejidad en la dinámica regulatoria de CreC sobre *ackA*.

Mediante estudios similares a los antes descritos pero realizados con mutantes para los genes $\Delta creB$, $\Delta creC$ y la doble mutante $\Delta creBC$, se estableció que los efectos de CreC están mediados exclusivamente por CreB.

Se realizaron ensayos fisiológicos en los que se observó que la cepa mutante es más sensible a agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno y el paraquat, probablemente como resultado de un estado intracelular más oxidado respecto de la cepa salvaje (como se pudo establecer a partir de los coeficientes $[\text{etanol}]/[\text{acetato}]$, y los niveles de NADH/NAD^+ intracelulares). También se observó que esta cepa tiene un consumo de oxígeno más bajo (-30%) que la salvaje.

Se realizaron ensayos en biorreactor con diferentes niveles de aireación (bajo, medio y alto) y dos fuentes de carbono (glicerol y glucosa) para caracterizar fermentativamente a las cepas

K1060 y DC1060, a fin de establecer una estrategia para mejorar la producción de succinato y PHB, en conjunto con los resultados mencionados.

Las mayores diferencias entre ambas cepas se observaron nuevamente a bajas concentraciones de oxígeno. De estas diferencias se destacan los siguientes resultados: (i) No hubo producción de lactato, y los niveles de etanol fueron muy bajos para ambas cepas y fuentes de carbono; (ii) el succinato fue detectable sólo en la cepa mutante con glucosa, pero a niveles inferiores que los obtenidos en los cultivos de frasco agitado; (iii) el formiato y el acetato, en medio mineral con glucosa, se produjeron en mayor cantidad para la cepa $\Delta creC$; (iv) la relación [etanol]/[acetato] volvió a reflejar un estado de mayor oxidación intracelular en la cepa $\Delta creC$ (sólo con glucosa); (v) en glicerol como fuente de carbono, se observó un *lag* más pronunciado y una mayor energía de mantenimiento en la cepa DC1060 respecto a la K1060.

Cuando se evaluó la producción de PHB mediante la expresión heteróloga de los genes *phaCAB* de *R. eutropha*, se vio que en glucosa la cepa mutante produce casi un 50% más de este polímero. Al probar los efectos del bicarbonato sobre la producción de succinato, vimos que la síntesis de este último aumentaba sólo en la cepa mutante.

Para ver si era posible mejorar la producción de estos metabolitos, construimos una colección de cepas con distintas mutaciones de forma de anular las vías metabólicas competitivas. Estas mutaciones involucraron a los genes *ackA*, *ldhA*, *ptsG*, *adhE* y, por su puesto, *creC*. En el caso del PHB, ninguna de las cepas mejoró el desempeño de la simple mutante $\Delta creC$, quizás debido a que ya se alcanzó el máximo nivel de polímero tolerable por la célula. En el caso del succinato, además se sobre-expresaron dos carboxilasas de *E. coli* (la PEP carboxilasa y la PEP carboxiquinasa), cada una en combinación con la enzima formiato deshidrogenasa (Fdh1) de *Candida Boidinii*. De las distintas combinaciones estudiadas, la cepa que tuvo mayor producción de succinato fue la triple mutante $\Delta creC$, $\Delta ackA$, $\Delta adhE$, sobreexpresando las enzimas PEP carboxilasa y la Fdh1, llegando a alcanzar una concentración de 6 mM de succinato.

Abstract

The survival of an organism depends, at least in part, on its ability to sense and respond to changes in the environment. In bacteria, changes in the physical and nutritional characteristics of the environment generate immediate responses, controlled through the regulation of sets of genes in response to specific environmental stimuli and metabolic signals.

The effect of changes in CreC, the sensor of the two component CreBC control system, on the central metabolism of *E. coli* was evaluated. In this work, the effect of mutations in *creC* on central metabolism, were analyzed in M9 mineral medium with glucose and glycerol as the carbon source, and under different oxygen availability conditions. The absence of CreC generated more changes in glucose and low oxygen tensions for the secretion of metabolites (acetate, formate, lactate and succinate) and for the activity of the enzyme acetate kinase (ACK) and lactate dehydrogenase (LDH). Of the four metabolites mentioned, the $\Delta creC$ (DC1060) strain produced more acetate, formate and succinate and less lactate, and reported a higher activity of ACK and lower activity of LDH.

The study of the transcription levels via transcriptional fusions of *gfp* (coding for the green fluorescent protein, Gfp), to the promoters of the genes of the enzymes studied: *ackA* (ACK) and *ldhA* (LDH), confirmed that the reduced LDH activity of strain DC1060 matched lower levels of gene transcript (in exponential phase). For the *ackA-gfp* fusion, however, transcript levels were slightly but significantly lower in the mutant strain compared to the wild type (K1060) at this stage, as opposed to the enzymatic activity observed for ACK. The transcript of this gene in the stationary phase became higher in the DC1060 strain, demonstrating a high level of complexity in the regulatory dynamics of CreC over *ackA*.

On similar studies using a $\Delta creB$ mutant, and a $\Delta creBC$ double mutant, it was established that the observed effects are exclusively mediated by CreB.

Physiological studies indicated that the mutant strain is more sensitive to oxidizing agents such as hydrogen peroxide and paraquat, probably resulting from a more oxidized intracellular state when compared to the wild type (as could be established through the [ethanol] / [acetate] ratio, and the intracellular levels of NADH / NAD⁺). It was also noted that this strain has a lower oxygen consumption rate than the wild type (-30 %). Tests were performed in a bioreactor with different aeration levels (low, medium and high) and two carbon sources (glycerol and glucose) to characterize the fermentation behavior of K1060 and DC1060 strains in order to establish a strategy to improve the production of succinate and PHB. The largest differences between the two strains were again observed at low oxygen concentrations. These differences can be summarized as : (i) there was no lactate production, and ethanol levels were very low for both strains and carbon sources , (ii) succinate was detectable only in the mutant strain with glucose, but to lower levels than in shake flask cultures , (iii) acetate and formate were produced in greater quantities by the $\Delta creC$ strain in mineral medium with glucose, (iv) the ratio [ethanol] / [acetate] again reflects an increased intracellular oxidation state in the $\Delta creC$

strain (only with glucose), (v) with glycerol as a carbon source , a more pronounced lag and increased maintenance energy was observed in strain DC1060 compared to K1060. When PHB production was evaluated in strains carrying the *phaCAB* of *R. eutropha*, the $\Delta creC$ mutant produced nearly 50% more of this polymer in glucose. When the effects of bicarbonate on succinate production were tested, we saw that the synthesis of this acid was only increased in the mutant strain.

To see if it was possible to improve the production of these metabolites, we created a collection of strains with different mutations to eliminate the competitive metabolic pathways. These mutations involved *ackA*, *ldhA*, *ptsG*, *creC*, and *adhE*. In the case of PHB, none of the strains improved the performance of the single mutant $\Delta creC$, perhaps because the maximum tolerable level of polymer and was already reached by the single mutant. In the case of succinate, the over- expression of two *E. coli* carboxylases (PEP carboxylase and PEP carboxykinase) was analyzed, each in combination with the enzyme formate dehydrogenase (Fdh1) of *Candida boidinii*. Of the various combinations tested, the strain with the highest succinate production was the triple mutant $\Delta creC$, $\Delta ackA$, $\Delta adhE$ overexpressing PEP carboxylase and Fdh1, which reached a final concentration of 6 mM succinate.

Introducción

Introducción

En la naturaleza, los seres vivos están constantemente sometidos a cambios en el ambiente. Estos cambios, que involucran tanto factores físicos como químicos, generan estrés en los organismos. Este surge a partir de limitaciones en recursos fundamentales para el desarrollo y sostenimiento de la vida (como el C, N, el P y el O₂), o por la existencia de condiciones desfavorables de pH, temperatura, salinidad, etc [1]. La supervivencia de un organismo depende, al menos en parte, de su habilidad para sentir y responder a estos cambios en el ambiente. Los mecanismos de sensación y respuesta a estrés se encuentran universalmente distribuidos en los seres vivos. Por ejemplo, cuando los mamíferos perciben una amenaza repentina, una gran cantidad de adrenalina detona la conocida respuesta de “lucha o huida”. A nivel celular existen muchos mecanismos para sentir y adaptarse a una gran cantidad de cambios. En los organismos complejos, dicha respuesta fisiológica al estrés requiere además de la correcta regulación de numerosos órganos y sistemas.

Los cambios físicos y nutricionales en el ambiente generan reacciones inmediatas en las bacterias, a través de complejas redes regulatorias que involucran conjuntos de genes, en respuesta a un estímulo específico del ambiente y a señales metabólicas. La mayoría de las respuestas a estrés involucran múltiples niveles regulatorios y una batería de reguladores, incluyendo la mayoría de los reguladores globales, que interactúan entre sí permitiendo ajustar la respuesta a un gran número de condiciones. Las respuestas a estrés incluyen diferentes aspectos de la fisiología de las células, como la composición de la membrana y la pared celular, la síntesis de macromoléculas, el sistema de control de plegado de proteínas y la regulación del flujo de carbono y energía dentro de la célula. Las biomoléculas que intervienen para sentir los cambios ambientales y la presencia de diferentes factores de estrés son muy variadas. En muchos casos las señales son sentadas por proteínas especiales, tanto de membrana como citoplasmáticas, que luego las transmiten directamente a los ácidos nucleicos, a otras proteínas regulatorias, o producen señales químicas que luego interactúan con diferentes moléculas blanco. Algunas de estas proteínas sensoras son serina-treonina-tirosinas quinasa-proteasas (STYK), como las proteínas Rsb que activan la respuesta del factor sigma σ^B en *Bacillus subtilis* y muchas otras bacterias. Otras son las adenilato ciclasas, que generan AMPc en bacterias entéricas como *E. coli*, en respuesta a condiciones nutricionales como bajos niveles de la fuente de carbono. Una forma interesante de transducción de señales es el diGMP cíclico, el cual consiste en dos moléculas de guanosinas monofosfato unidas mediante sus carbonos 3' al carbono 5' recíproco, formando una suerte de círculo de ribosas fosfato. Enzimas especiales denominadas diguanilato ciclasas, junto a fosfodiesterasas específicas, hacen que estas pequeñas moléculas efectoras se destruyan. Muchas proteínas

señal en esta vía poseen ambos dominios: diguanilato ciclasa y diguanilato fosfodiesterasa. Esta vía de señalización está presente en numerosas especies bacterianas, y cumplen diversos roles en los procesos de formación de biofilms, unión a superficies, regulación de la fotosíntesis y motilidad. Sin embargo, poco se sabe sobre cómo actúan estos efectores [2].

PRIMERA PARTE. Reguladores globales: sistemas de dos componentes (TCSs)

Un tipo de control muy difundido en bacterias es el ejercido por los sistemas de dos componentes o TCR por sus siglas en inglés (*two component systems*), en los cuales la tarea de detectar la señal y dar una respuesta están perfectamente divididas en dos proteínas por separado. Las proteínas del primer componente, el sensor de la señal (SS), pertenecen a una extensa familia de histidina quininas que se autofosforilan cuando son activadas por la señal apropiada. El segundo elemento, el regulador de la respuesta (RR), es generalmente un miembro de la familia de los factores de transcripción, el cual se ve activado por la fosforilación de un residuo de aspartato con un fosfato donado por la fosfohistidina del sensor de la señal [3].

Los sistemas regulatorios tienen diferentes niveles jerárquicos y mecanismos de acción que permiten una gran diversidad de respuestas. Existen mecanismos regulatorios con diferentes velocidades de respuesta, algunos prácticamente inmediatos, como por ejemplo la regulación alostérica de enzimas, o las modificaciones postraduccionales, y otros más lentos, como el control transcripcional. La posibilidad de responder a muchas señales simultáneas, necesaria para ajustarse a las condiciones del medio, se logra mediante la acción concertada de múltiples reguladores que actúan a diferentes niveles jerárquicos. La mayoría de los reguladores son regulados por los de nivel jerárquico superior, y a su vez regulan a otros de nivel jerárquico inferior. Los reguladores de mayor nivel se denominan reguladores globales, que son los que afectan de manera directa o indirecta a todos los genes de un organismo.

Mecanismo de transferencia de la señal de los TCSs

Hace aproximadamente una década atrás el término “dos componentes” fue acuñado para describir una nueva clase de sistema regulatorio presente en bacterias. Al día de hoy, este tipo de reguladores se ha encontrado en cientos de sistemas en eubacteria, archaea, y en unos pocos organismos eucariotas. Los TCS sirven como un mecanismo acoplado de estímulo-

respuesta que permite a los organismos sensor y responder a una gran diversidad de cambios en las condiciones ambientales [3].

El sistema prototípico consiste en una proteína histidinkinasa (HK) que contiene un núcleo quinasa conservado, y una proteína reguladora de la respuesta (RR), que posee un dominio regulatorio también conservado. Los estímulos extra e intracelulares son sensados por la HK, y sirven para modular su actividad. La HK luego transfiere un grupo fosfato al RR en una reacción catalizada por este último. La transfosforilación del RR resulta en la activación de un dominio efector que provoca la respuesta específica.

La química general de la transferencia de grupo fosfato en los TCS consiste de tres reacciones de transfosforilación y dos fosfoproteínas intermediarias:

1. Autofosforilación: $\text{HK-His} + \text{ATP} \rightarrow \text{HK-His} \sim \text{P} + \text{ADP}$
2. Transfosforilación: $\text{HK-His} \sim \text{P} + \text{RR-Asp} \rightarrow \text{HK-His} + \text{RR-Asp} \sim \text{P}$
3. Desfosforilación: $\text{RR-Asp} \sim \text{P} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{RR-Asp} + \text{P}_i$

Primero se transfiere el δ -fosfato del ATP a una His conservada de la HK. Luego, el RR cataliza el pasaje de este P a una Asp conservada en una cadena lateral de su propio dominio regulatorio. Finalmente el P es transferido desde esta Asp hasta un residuo de agua en una reacción de hidrólisis. Todos los reactivos requieren iones divalentes, siendo probablemente el Mg^{2+} el catión relevante in vivo.

Distribución de los TCSs

Un análisis global muestra que los TCSs se encuentran en los tres dominios: Bacteria, Archaea, y Eukarya. Los componentes de los TCS están presentes en 864 de los 899 genomas completamente secuenciados al 2010, incluyendo todos los 21 phyla representados. Las únicas especies que carecen de TCSs son los patógenos (por ejemplo, las especies de *Mycoplasma*) y los endosimbiontes (como las especies de *Amoebophilus*) con genomas severamente reducidos. A diferencia del dominio Bacteria, los TCSs están presentes sólo en el ~50% de los genomas de Archaea. Parecen estar completamente ausentes en los phyla Crenarchaeota, Corarchaeota, y Nanoarchaeota. Los TCSs se encuentran en 33 de los 42 genomas de Euriarchaeota, y el único representante del phylum Thaumarchaeota: *Nitrosopumilus maritimus* SCM1. Menos del 30% de los genomas eucariotas codifican TCSs. Desde la base de datos SMART se pueden identificar TCSs en hongos y plantas, pero están ausentes en metazoos y protistas [4].

Existe poca información sobre los TCSs en Archaea, pero estudios experimentales han revelado aspectos muy interesantes de lo que sucede en eucariotas. Los hongos unicelulares

típicamente codifican un pequeño número de histidinkinases, mientras que los genomas de varios hongos filamentosos poseen entre 11 y 21 histidinkinases [4].

Con respecto al origen evolutivo de los TCSs, existe un consenso general. Se estima que los progenitores de los TCS fueron los sistemas de un componente (OCSs), debido a su baja complejidad, gran abundancia, y amplia variedad de dominios sensores y regulatorios, en comparación con los TCSs. Un análisis filogenético indica que los TCSs se originaron en Bacteria e irradiaron hacia Archaea y Eucarya vía múltiples eventos de transferencia horizontal. Esta observación también se sostiene por la mayor abundancia y distribución de TCS en Bacteria en comparación con Archaea y Eucarya [4].

La relación de coevolución entre HKs y RRs resulta evidente de los árboles filogenéticos construidos a partir de múltiples alineamientos de secuencias correspondientes a estas proteínas. Las HKs y RR relacionados suelen estar codificados en los genomas de forma adyacente uno de otro, lo que da mayor sustento a la idea de que coevolucionaron. Sin embargo, se han encontrado muchos HKs y RRs huérfanos (es decir que no están codificados de forma adyacente), que poseen una función muy importante en múltiples organismos. Más aún, el contexto genómico y los métodos filogenéticos no siempre coinciden a la hora de predecir HKs y RRs relacionados, y la clasificación en base a la estructura tridimensional de los dominios puede fracasar totalmente si no se apoya en criterios filogenéticos.

El regulador global CreBC

CreC en el regulón *pho*

Originalmente se designó a CreC como PhoM, del cual se sabía que era capaz de actuar como dador de fosfato a PhoB, un regulador de la respuesta que controla la expresión del regulón *pho*. Dicho regulón codifica funciones que están involucradas en el mantenimiento de la homeostasis del fosfato inorgánico citoplasmático (por ejemplo, la fosfatasa alcalina, PhoA) y cuyo control está preponderantemente ejercido por el TCS PhoBR [5]. La autofosforilación de PhoR se produce cuando la concentración de fosfato inorgánico cae por debajo de un valor umbral. El resultado es la fosforilación de PhoB vía transferencia de fosfato, causando un incremento en la afinidad de esta proteína por la “*pho box*”, un motivo específico de unión al DNA. La unión de PhoB a la *pho box* estimula o, en algunos casos reprime, la transcripción del gen río abajo (Wanner, 1996; Makino et al., 1996). En mutantes nulas del gen *phoR*, la activación del regulón *pho* depende de CreC, el cual no responde a las concentraciones de fosfatos inorgánicos intracelulares, sino a la fuente de carbono en el medio de cultivo. Por ejemplo, la expresión de PhoA es inducida en mutantes *phoR2* durante el crecimiento en medio mineral mínimo con glucosa, acetato o piruvato como fuentes de carbono y energía [7].

En base a estos hallazgos, se sugirió que la función normal de CreC es la de monitorear cambios en la presencia de carbono y que la respuesta cruzada con PhoB refleja similitudes entre CreC y PhoR en el hecho de que ambos sirven como dadores de fosfato para PhoB. Dado que el respuesta cruzada sólo se evidencia en mutantes que carecen de la actividad PhoB-fosfatasa de PhoR, esta regulación probablemente no posea ninguna relevancia fisiológica en cepas salvajes [5].

Constitución del operón *creABCD*

El gen *creC* es parte del operón *creABCD* (Amemura, 1986) junto con otros tres marcos de lectura abiertos. La función de CreA es por el momento desconocida. El gen *creD* fue anotado en varias fuentes de acceso público como el gen codificante de la proteína responsable de la tolerancia a colicina E2, una proteína con actividad antibiótica cuyo blanco de acción es el DNA [9]. Dicha anotación estaba basada en el hecho de que mutantes resistentes a colicina E2 (fenotipo Cet2) sobreexpresaban este gen, al cual se lo bautizó primero como *cet* para luego ser reabutilizado como *creD*, por ser el cuarto gen en el operón *cre* [10]. La responsable de dicha sobreexpresión no era una mutación en *creD*, sino que se trataba de una sustitución nucleotídica en la secuencia codificante del gen *creC*. Finalmente Cariss *et al.* demostraron que mutantes de delección de *creD* conservaban el fenotipo Cet2 y asociaron la tolerancia a colicina E2 con la sobreproducción de otra proteína, YieJ [11], cuya transcripción es regulada por CreB. CreB es un activador transcripcional que actúa reclutando a la RNA polimerasa de forma similar a la de otras proteínas con dominio *winged-helix* RR, como sucede con PhoB, un RR con el cual posee homología.

En busca de la molécula ligando de CreC

Wanner y Wilmes-Riesenberg presentaron datos que sugerían que CreC responde a cambios en la fuente de carbono. Para medir la activación de esta proteína, explotaron el hecho de que CreC activado es capaz de transfosforilar PhoB (y así estimular la producción de fosfatasa alcalina, Bap) en una mutantes *phoR68* [12]. Ellos demostraron que la producción de Bap aumentaba en medio mínimo con acetato o piruvato comparado con medio mínimo glucosa, sugiriendo que CreC es activado en estas condiciones de crecimiento. Sin embargo, mientras que el efecto del acetato sobre la producción de Bap era totalmente dependiente de CreC, el efecto del piruvato se reducía sólo en parte tras ser eliminado el gen *creC*. Los autores concluyen que existe una regulación de Bap que es independiente de CreC y PhoB y demostraron que el regulador interviniente es el acetilfosfato, el cual actúa como dador de fosfato sobre PhoB. Durante el crecimiento en medio mínimo con piruvato, los niveles de acetilfosfato aumentan, provocando la fosforilación de PhoB e induciendo la producción de Bap [13], [14].

En estudios posteriores Cariss *et al* [12], intentaron determinar el ligando de activación de CreC con mayor precisión. Si bien no lograron dar con la molécula precisa que desencadena la autofosforilación de CreC, pudieron determinar con mayor precisión la naturaleza de la misma. Estudiando la actividad del gen *creD* como gen reportero en ensayos de β -galactosidasa, observaron que en presencia de medio mínimo suplementado con piruvato, formiato y malato (en mayor medida), o con lactato y acetato (de forma más moderada), la expresión de CreD aumentaba significativamente en condiciones aeróbicas de crecimiento. No sucedía lo mismo cuando la fuente de carbono era arabinosa, fructosa, gluconato, o glucosa, aunque que esta última sí era capaz de inducir un aumento en la expresión de CreD en microaerobiosis. Ellos mencionan que la fermentación de glucosa origina la formación de acetato y lactato, el cual proviene del piruvato, es decir que durante este proceso se encuentran presentes los metabolitos que en aerobiosis habían demostrado activar CreC. Como conclusión, los autores de este trabajo sugieren que el ligando responsable de la activación de CreC es un metabolito intermediario presente en altas concentraciones durante la fermentación de la glucosa y durante el crecimiento en fuentes de carbono gluconeogénicas.

Secuencia conservada de reconocimiento de CreB

Por muchos años luego del descubrimiento de CreBC, no hubo ningún hallazgo respecto de la identificación de los genes del regulón *cre*. La clave para la detección de algunos miembros de este regulón fue provista por la observación de que existía alta similitud de secuencia entre el sistema CreBC de *E. coli* y el sistema de transducción de señales de dos componentes BlrAB de *Aeromonas hydrophyla* [15]. El sistema BlrAB de *A. hydrophyla* regula la expresión del regulón blrAB, el cual comprende tres genes que codifican β -lactamasas (*cepH*, *imiH* y *anpH*), y al menos un gen adicional (*blrD*), homólogo de *creD* en *E. coli*. Avison encontró que el nivel de expresión de *cepH*, *imiH* y *ampH* era dependiente de CreBC cuando los tres genes se clonaban junto a sus secuencias regulatorias en *E. coli* DH5 α . De esta manera fue posible definir la secuencia de reconocimiento *cre/blr* (TTCAC n nnnnnTTCAC, en donde n representa cualquier nucleótido) localizada en posición -60 respecto del sitio de inicio de la transcripción [15]. Una búsqueda bioinformática reveló que existen 8 unidades transcripcionales en el genoma de *E. coli* que contienen esta secuencia consenso en su zona promotora. Mediante ensayos de qPCR se cuantificó la cantidad de mensajeros en cepas salvajes y mutantes para el gen *creC*, llegando a la conclusión de que efectivamente estos genes son regulados por CreC (siete activados y uno reprimido). A la fecha, los genes en los que se ha visto activación por parte de este regulador global son *ackA-pta* (codifican las enzimas acetato quinasa y fosfotransacetilasa resp.), *talA* (transaldolasa A, enzima de la vía no oxidativa del ciclo de las pentosas fosfato), *radC* (cuyo producto está involucrado en la reparación del DNA dependiente de RecA), *trgB* (una ADP-ribosa pirofosforilasa), *yieI*, *yidS* (ambas sin función asignada) y *creD*. La expresión de *malE*, cuyo producto es un componente del transportador de maltosa, es reprimido por CreBC.

CreC como regulador de fósforo.

El regulón fosfato (*pho*) incluye numerosos genes y operones para la incorporación y degradación de fuentes extracelulares de fósforo. Estos genes están reprimidos cuando el Pi, la fuente preferida de P, está presente en exceso, y se inducen en varios órdenes de magnitud cuando Pi se encuentra en concentraciones limitantes. Esta inducción requiere de las proteínas asociadas PhoB y PhoR, las cuales constituyen el TCS para el control del Pi. En condiciones de bajo Pi, PhoR se autofosforila y transfiere su fosfato a PhoB, el cual induce la respuesta génica. En mutantes *phoR*, el operón Pho está altamente regulado, pero no responde al Pi, sino que los genes presentes en este regulón pasan a ser regulados por la fuente de carbono presente en el medio vía un control que permanece silente en las células *phoR+*. Para el estudio de esta vía de regulación, los investigadores utilizaron a *phoA*, el gen estructural de la fosfatasa alcalina bacteriana (Bap), como un reportero de la expresión del regulón Pho. La presencia de glucosa o mutaciones en los genes que codifican la adenilato ciclasa (*cya*) o la proteína receptora del AMP cíclico (*crp*), llevan a la inducción de *phoA* en las mutantes *phoR*. Esta inducción requiere del SS CreC y del RR PhoB [13].

Mecanismos principales de regulación del flujo de carbono.

Uno de los sistemas regulatorios más importantes en bacterias es el que coordina la expresión de genes involucrados en la utilización de fuentes de carbono y energía. Todas las células deben tener acceso a sustancias que contengan carbono y energía, las cuales degradan para generar ATP y moléculas más pequeñas que sirvan como bloques de construcción para la síntesis de componentes celulares [2].

En ambientes ricos en nutrientes, las bacterias pueden crecer en presencia de una diversa gama de fuentes de carbono y energía, algunas de las cuales pueden ser usadas de forma más eficiente que otras. La regulación catabólica es el mecanismo por el cual las células utilizan la fuente de carbono y energía preferencial. Históricamente, a esta regulación se la denominó como represión catabólica basada en el hecho de que las células, cuando se encuentran creciendo en presencia de una fuente de carbono preferencial, como la glucosa, reprimen la expresión de los operones involucrados en la utilización de fuentes de carbono más pobres. Sin embargo la denominación de *represión catabólica* es errónea, ya que en al menos algunos sistemas regulatorios de *E. coli*, los genes bajo el control catabólico son activados cuando sólo están presentes fuentes de carbono pobres. La *represión catabólica* también es denominada *efecto glucosa* porque la glucosa, que produce el más alto rendimiento de ATP, usualmente reprime la expresión de los operones que codifican genes para la utilización de otras fuentes de carbono. Cuando *E. coli* crece en presencia de glucosa y otra fuente de carbono no preferida, como galactosa, las células crecen únicamente a expensas de la glucosa. Cuando ésta se acaba, el crecimiento se detiene por un tiempo, mientras las células preparan la maquinaria enzimática para la degradación de la galactosa. Luego de los cambios regulatorios

apropiados, el crecimiento se reestablece pero a una velocidad menor. Este patrón de crecimiento se denomina diauxia, y es comúnmente observado durante el crecimiento en una mezcla de fuentes de carbono [2].

Represión catabólica

El término represión catabólica se usa actualmente para describir un fenómeno general en los microorganismos por el cual la presencia de una fuente de carbono en el medio puede reprimir la expresión de determinados genes y operones, cuyos productos están generalmente implicados en la utilización de fuentes de carbono alternativas [16].

En la mayor parte de los casos conocidos, la fuente de carbono preferida es la glucosa, siendo el ejemplo paradigmático el de la diauxia glucosa-lactosa de *E. coli* [17]. Sin embargo, la bacteria láctica *Streptococcus thermophilus* prefiere la lactosa por sobre la glucosa, indicando que la adaptación a nichos ecológicos especiales puede devenir en la elección de prácticamente cualquier hidrato de carbono como sustrato favorito [18]. Mientras que la existencia de CCR es general, los mecanismos que llevan a la represión pueden ser bastante distintos. La presencia de una fuente de carbono represora puede resultar en bajas concentraciones de los inductores de vías catabólicas alternativas, en la actividad alterada de reguladores específicos, o en la activación de proteínas regulatorias globales como la proteína de activación de genes catabólicos (CAP) en las enterobacterias o la proteína de control catabólico (CcpA) en bacterias Grampositivas con bajo contenido de GC [16].

En una controversia relativamente reciente sobre la contribución de diferentes mecanismos de CCR a la diauxia glucosa-lactosa de *E. coli*, se ha demostrado que la inhibición de la lactosa permeasa y la subsiguiente falta de inducción es lo que da origen a la represión del operón lac en la presencia de ambos azúcares, más que la represión causada por CAP [17]. Que esto haya sucedido en una de las especies procariontas más estudiadas demuestra que aún quedan muchas cosas por saber sobre los CCR, sobre todo en especies menos conocidas.

La forma en la que los hidratos de carbono son incorporados por la bacteria puede diferir mucho dependiendo de las proteínas involucradas en el transporte. La diferencia más llamativa en el proceso de transporte radica en si la entrada del hidrato de carbono es en la forma fosforilada o no, una distinción que es especialmente importante para el CCR. El transporte y consecuente fosforilación se realizan mediante componentes del sistema fosfotransferasas de carbohidratos (PTS) dependiente de PEP [19] (Ilustración 1). Este sistema consiste en permeasas de azúcares PST, también denominadas como enzimas II (EII), y dos proteínas PTS generales, enzima I (EI) y la histidin-proteína (HPr), que participan en la fosforilación de todos los hidratos de carbono transportados por el PTS. Las permeasas específicas están compuestas por hasta cuatro dominios (EIIA, B, C, D), de los cuales al menos uno está unido a membrana. Estos dominios proteicos pueden estar separados o juntos como una sola cadena polipeptídica. La permeasa de *E. coli*, la cual consiste en una proteína unida a membrana (EIIC_{Bglc}) y una citoplasmática (EIIA_{Bglc}) es quizás la permeasa integrante del PST mejor conocida. La cadena de fosforiltransferasa del PTS comienza con EI y PEP, sigue vía HPr,

EII y EIIB hasta el azúcar, el cual es transportado por EIIC, y se transforma en un azúcar fosforilado el cual debe ser metabolizado inmediatamente. En cambio, los hidratos de carbono que son interiorizados en una forma no fosforilada independientemente al PTS, necesitan ser fosforilados por una quinasa previamente a ser catabolizados. Si más de un hidrato de carbono está presente en el medio de cultivo, la bacteria normalmente toma y utiliza sólo una fuente de carbono al mismo tiempo y deja el otro sustrato en el medio para ser usado posteriormente. La principal causa del uso preferencial de azúcares se da al impedir la inducción específica de los genes catabólicos. Mediante procesos como la exclusión del inductor, expulsión del inductor o el control de la actividad de reguladores a través de la fosforilación, la presencia de azúcares preferidos deviene en la falta de expresión de caminos alternativos[16].

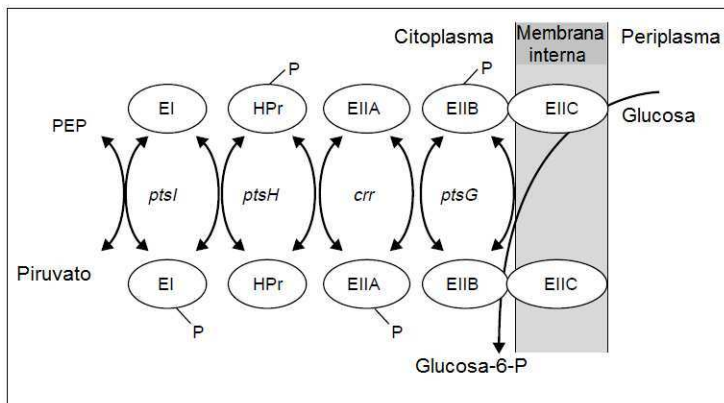


Ilustración 1. Esquema de los componentes del sistema PTS y de cómo funciona el transporte del grupo fosfato desde el PEP hasta la glucosa.

Mecanismo de acción de CAP

Una de las consecuencias mejor estudiadas de la disponibilidad de hidratos de carbono es la activación de sistemas de control transcripcionales globales, los cuales son mecánicamente diferentes en bacterias entéricas y bacterias grampositivas con bajo porcentaje de G+C. Mientras que en las bacterias entéricas se detona un mecanismo de activación que usa a la proteína CAP [20], y la CCR es el resultado de una disminuida activación de genes catabólicos, en bacterias grampositivas con bajo porcentaje de G+C existe una regulación negativa mediada por CcpA [21].

En *E. coli*, CAP activa la transcripción de más de 100 promotores y está, en algunos casos, involucrada en la represión. La activación es un proceso bien estudiado mecánicamente y estructuralmente, cuanto menos en promotores simples dependientes de CAP. CAP requiere del efector alostérico cAMP para unirse eficientemente al DNA. La regulación global depende entonces de las concentraciones intracelulares de cAMP. A su vez las concentraciones intracelulares de cAMP es ajustada por la adenilato ciclasa, cuya actividad depende de la forma fosforilada de $EIIA_{glc}$ ($P-EIIA_{glc}$). Además de controlar los genes catabólicos de carbohidratos,

CAP está directamente involucrada en la modulación de un gran número de otros procesos celulares que exceden la regulación del uso de hidratos de carbono.

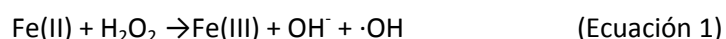
Por otro lado, el consumo de azúcares está controlado por reguladores pleiotrópicos. Un gran número de genes glucolíticos, gluconeogénicos y otros relacionados con la glucosa están controlados por Cra (formalmente FruR) y Mlc. [22], [23]. El control de la estabilidad del mRNA de estos genes por parte de CsrA ofrece un nivel extra de complejidad en la regulación [24].

SEGUNDA PARTE. Respuesta al estrés oxidativo

Generación de especies reactivas de oxígeno

Los organismos aeróbicos utilizan el oxígeno molecular (O_2) para la respiración o la oxidación de los nutrientes con el fin de obtener energía. Los subproductos reactivos de la oxidación, tales como el anión radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y los radicales hidroxilo altamente reactivos ($\cdot OH$), se generan continuamente en las células cultivadas aeróbicamente. La mayoría de estos productos derivan de las reducciones univalentes secuenciales del oxígeno molecular catalizadas por varias enzimas de la cadena respiratoria asociadas a la membrana. Los datos experimentales indican que, en *E. coli*, la cadena respiratoria puede representar hasta un 87 % del total de la producción de H_2O_2 . Agentes ambientales tales como la radiación UV, o numerosos compuestos que generan O_2 intracelular (agentes redox como menadiona y paraquat) pueden también causar estrés oxidativo, que surge cuando aumenta la concentración de oxígeno activo a un nivel que excede el de la capacidad de defensa de las células [25].

Los blancos biológicos para estas especies de oxígeno altamente reactivas son el DNA, RNA, proteínas y lípidos. Gran parte del daño es causado por los radicales hidroxilo generados a partir de H_2O_2 a través de la reacción de Fenton (Ecuación 1), que requiere de hierro (u otro ion divalente de metal, tal como cobre) y una fuente de equivalentes de reducción (posiblemente NADH) para regenerar el metal. Los lípidos son importantes objetivos durante el estrés oxidativo. Los radicales libres pueden atacar directamente ácidos grasos poli-insaturados en las membranas de lípidos e iniciar la peroxidación.



Un efecto primario de la peroxidación lipídica es una disminución en la fluidez de membrana, lo que altera las propiedades de la membrana y puede afectar proteínas unidas a membrana

significativamente. Este efecto actúa como un amplificador, ya que se forman más radicales, y los ácidos grasos poliinsaturados se degradan a una variedad de productos. Algunos de ellos, como aldehídos, son muy reactivos y pueden dañar moléculas tales como proteínas [26]. A diferencia de los radicales libres, los aldehídos son de larga vida y pueden, por tanto, difundir desde el sitio de su origen y alcanzar objetivos de ataque que son distantes del evento que originó el radical libre inicial, en calidad de "segundos mensajeros tóxicos" de las reacciones en cadena de complejos iniciados.

El DNA también es un objetivo principal: las especies reactivas atacan tanto las bases como los residuos de los azúcares, produciendo roturas de simple y doble cadena, adiciones en grupos de bases y azúcares, y entrecruzamientos (*crosslinking*) con otras moléculas, todas lesiones que bloquean la replicación [27].

Con respecto de la oxidación de proteínas están documentadas varias clases de daños, incluyendo la oxidación de grupos sulfhidrilo, la reducción de disulfuros, la modificación de grupos prostéticos o en grupos metálicos, el entrecruzamiento proteína-proteína y la fragmentación de péptidos. Todas estas modificaciones son perjudiciales para la célula, ya que conducen a una pérdida de la función de las membranas y proteínas, y bloquean la replicación del DNA o causan mutaciones [28].

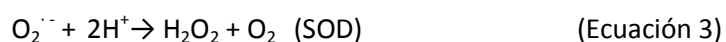
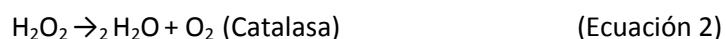
Sistemas de defensa frente al estrés oxidativo

La aparición del oxígeno en la atmósfera condujo al desarrollo de mecanismos de defensa que permitieron mantener la concentración de los radicales derivados de O_2 a niveles aceptables o reparar los daños provocados. El hierro juega un papel significativo en los sistemas biológicos (transporte, almacenamiento y activación de moléculas de oxígeno, reducción de ribonucleótidos, activación y descomposición de peróxidos, y transporte de electrones). El Fe^{2+} se requiere para el crecimiento de casi todas las células vivas. Debido a sus posibles efectos perjudiciales, en bacterias la solubilización del hierro y su metabolismo son regulados estrictamente a dos niveles: (i) la entrada a la célula por receptores unidos a membrana específicos, y (ii) en el interior de la célula, por dos proteínas, bacterioferritina y ferritina, muy similar a la ferritina eucariota, pero con actividad de ferroxidasa. Algunas moléculas están presentes constitutivamente ayudando a mantener un entorno intracelular libre de ROS o secuestrándolo. Entre estas moléculas están los antioxidantes no enzimáticos tales como las reservas de NADPH y NADH, el β -caroteno, ácido ascórbico, el α -tocoferol, y el glutatión (GSH). El GSH, presente en altas concentraciones, mantiene un ambiente intracelular altamente reductor, y su forma reducida se mantiene por acción de la glutatión reductasa, utilizando NADPH como una fuente de equivalentes de reducción. Además, existen enzimas específicas que colaboran con este objetivo, como las superóxido dismutasas y las peroxidasas [25].

También existen defensas secundarias, que incluyen los sistemas de reparación del DNA y enzimas proteolíticas y lipolíticas. Las enzimas de reparación del DNA incluyen a la endonucleasa IV, que es inducida por el estrés oxidativo, y la exonucleasa III, que se induce en la fase estacionaria y en las células que sufren hambreado. Las células procariontas poseen además catalizadores capaces de reparar directamente algunas modificaciones covalentes en la estructura primaria de las proteínas. Una de las más frecuentes modificaciones es la reducción de enlaces disulfuro oxidados: (i) la tiorredoxina reductasa transfiere electrones de NADPH a la tiorredoxina a través de un transportador de flavina, (ii) la glutaredoxina también es capaz de reducir los enlaces disulfuro, pero utilizando GSH, como dador de electrones, y (iii) las proteína disulfuro isomerasa facilitan las reacciones de intercambio de disulfuro con sustratos proteicos inactivos, además de tener actividad chaperona. La oxidación de metionina a sulfóxido de metionina puede ser reparado por metionina sulfóxido reductasa. Los datos experimentales recientes, demuestran que los residuos de metionina expuestos en la superficie en torno a al sitio activo, se oxidan preferentemente sin pérdida de actividad catalítica, y se sugirió que los residuos de metionina podría funcionar como un sistema de defensa antioxidante "de última oportunidad " para las proteínas [25].

Regulación de la respuesta al estrés oxidativo en *E. coli*.

Dos superóxido dismutasas (SOD), que convierten O_2^- a H_2O_2 y O_2 , se han descrito en *E. coli*: una enzima que contiene hierro, cuya expresión es modulada por los niveles intracelulares de este metal [38] , y una SOD que contiene manganeso. Esta última es la enzima predominante durante el crecimiento aeróbico, cuya expresión está regulada transcripcionalmente por lo menos por seis sistemas de control. Una tercera actividad SOD, con propiedades silimilares a la CuZn-SOD eucariota, se ha encontrado en el espacio periplásmico de *E. coli*. En esta especie, el H_2O_2 es eliminado por dos catalasas, produciendo H_2O y O_2 (Ecuación 2): hidroperoxidasa I (HPI), que está presente durante el crecimiento aeróbico y es transcripcionalmente controlada a diferentes niveles, e hidroperoxidasa II (HPII), la cual es inducida durante la fase estacionaria [25].



Los genes de la superóxido dismutasa y catalasa de *E. coli* son miembros de dos importantes regulones del estrés oxidativo: los regulones *oxyR* y *soxRS*, así como el regulón de estrés general *rpoS*.

El regulón *oxyR*

OxyR, una proteína de 34 kDa que forma un homotetrámero, es un homólogo de la familia LysR en *E. coli*. OxyR regula negativamente la expresión de su propio gen, *oxyR*, y positivamente un gen de ARN pequeño adyacente, *oxyS*. OxyR controla un regulón de casi 40 genes, que protegen a la célula de la toxicidad del peróxido de hidrógeno. En consecuencia, los mutantes *oxyR* son hipersensibles a H₂O₂, y la expresión constitutiva del regulón OxyR como producto de mutaciones constitutivas en *oxyR*, aumenta la resistencia. OxyR también tiene un papel en la protección contra el estrés térmico, el UV cercano, el oxígeno singulete, la peroxidación celular mediada por daños a lípidos, y la muerte mediada por neutrófilos [25].

La inducción transcripcional de los promotores dependientes de este regulador se produce cuando OxyR se convierte en su estado oxidado. En este estado, OxyR reconoce cuatro elementos ATAG con un espaciado de 10 pares de bases. El espaciado de estos elementos permite a las cuatro subunidades de OxyR unirse a cuatro ranuras mayores adyacentes en un lado de la hélice del DNA. El OxyR reducido se une a sólo dos ranuras principales. En presencia de H₂O₂, el residuo de azufre de Cys199 se oxida y forma un enlace disulfuro reversible con Cys208. En consecuencia, las formas del dominio regulador OxyR oxidada y reducida tienen diferencias estructurales significativas. El OxyR oxidado se une cooperativamente con la RNA polimerasa para regular positivamente la transcripción de algunos genes, mientras que cuando está reducida OxyR regula negativamente a otros genes, tales como *agn43* y *stiA* [29].

En *E. coli* y *S. enterica*, 28 genes son inducidos por OxyR y 10 genes son reprimidos. En mutantes *oxyR*, las mutaciones que suprimen la sensibilidad al peróxido de hidrógeno dan como resultado un aumento en los niveles de expresión de los miembros del regulón OxyR, hidroperoxidasa I (codificadas por *katG*) y reductasa hidropéroxido de alquilo (catalasa Ahp, codificada por *ahpCF*), que confiere resistencia a H₂O₂ exógeno. La regulación homeostática de H₂O₂ endógeno es capaz de compensar la ausencia de catalasa en cepas mutantes, al reducir el H₂O₂ a niveles similares a los de la cepa salvaje [29].

El regulón *soxRS*

SoxRS es un regulador de genes de respuesta al estrés oxidativo en *E. coli*, incluyendo el gen de la superóxido dismutasa de manganeso de sodio. Los genes *soxR* y *soxS* son adyacentes y se transcriben de forma divergente. Las proteínas codificadas por estos genes constituyen un sistema de regulación en dos etapas: cuando SoxR se activa, induce la expresión de *soxS*, que a su vez regula varios genes importantes en la respuesta al estrés oxidativo. SoxR (acrónimo de *super-oxide Response*) en *E. coli* afecta la resistencia a paraquat. Otros agentes que activan SoxR, y por lo tanto el regulón SoxRS, incluyen el óxido nítrico y altos niveles de peróxido de hidrógeno. Mientras que SoxR se une al promotor *soxS* en ambas formas (reducido y oxidado), sólo la oxidación monovalente de los grupos [2Fe -2S] de SoxR activa la expresión *soxS* y de los genes río abajo del regulón [30]. Una vez que la situación de estrés es superada, SoxR se reduce por una SoxR reductasa dependiente de NADPH no identificada y/o a través de la acción de los productos de los genes *rsxABCDGE* (por *reducers of SoxR*) y *rceC*. SoxR se activa ,

directa o indirectamente, por los radicales superóxido, pero el grado de su activación en respuesta a radicales dismutasa no está claro. Se ha descrito recientemente que la oxidación de SoxR (estado activo) se debe a la oxidación directa por ciclos redox propios, que está en sintonía con los trabajos anteriores que muestran que SoxR no detecta directamente superóxido [29]. SoxR puede ser oxidado por las drogas redox de ciclo redox porque (a) SoxR no está activo en los mutantes de superóxido dismutasa (donde los niveles de superóxido son elevados), (b) la actividad SoxR no se reduce cuando la superóxido dismutasa se sobreexpresa, y (c) SoxR se puede activar en presencia de drogas de ciclo redox anaeróticamente [31]. Por otra parte, Liochev y Fridovich (1991) encontraron que la expresión de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa dependiente de SoxRS es mayor en una cepa control que en una cepa de *E. coli* que sobreexpresa MnSOD cuando son expuestas a paraquat, lo que sugiere que los superóxidos generados por el paraquat, pero no el paraquat *per se*, provocan la activación de SoxR [32].

Por la transcripción de *soxS* mediada por SoxR, se modula la expresión de más de 100 genes. Varios de estos genes tienen un papel en la respuesta al estrés oxidativo, incluyendo la MnSOD para la dismutación del superóxido, *nfo* (endonucleasa IV) para la reparación del DNA, y *yggX* para la protección de las proteínas hierro-azufre. La huella de ADNasa I y ensayos de *Gel Shift* con proteína purificada SoxS indican que SoxS se une directamente por lo menos a los promotores de *sodA*, *micF*, *nfo*, *zwf* y *waaY* [29].

TERCERA PARTE. Metabolitos de interés industrial.

Manipulación de los flujos de carbono y energía para la síntesis de compuestos de interés biotecnológico en *E.coli*

La utilización de procesos biológicos, principalmente microbianos, permite obtener productos a partir de fuentes de carbono renovables. Sin embargo, los costos de la mayoría de los procesos microbianos son altos, y tienen altos consumos de energía. Por ejemplo, estudios recientes de ciclo de vida han mostrado en el caso del PHB que la síntesis de este polímero biodegradable consume grandes cantidades de energía, y que el mayor gasto energético corresponde a la agitación en el biorreactor [33]. En otros procesos microbianos, como en la producción de biogas a partir de algas, también se observó una gran demanda de energía eléctrica [34].

Para lograr procesos de bajo consumo energético y por lo tanto de sostenibilidad aumentada, se necesita profundizar el conocimiento sobre fisiología microbiana y procesos regulatorios, de manera de controlar y modificar el crecimiento bacteriano en un biorreactor. En el caso de los

bioproductos reducidos, es indispensable modificar el flujo de carbono y energía para lograr las condiciones necesarias para su síntesis en condiciones de baja disponibilidad de O₂.

E. coli y otros microorganismos aerobios facultativos pueden adaptar su metabolismo a la disponibilidad de O₂. Las respiraciones aeróbica y anaeróbica y la fermentación son diferentes caminos metabólicos que permiten a las bacterias facultativas optimizar la generación de energía de acuerdo a los niveles de O₂ en el ambiente circundante [35]. La elección del camino metabólico en estos organismos está ligada a la disponibilidad de aceptores de electrones, que en el caso de *E. coli* pueden ser O₂, nitrato, nitrito, fumarato y dimetil sulfóxido [36].

En este microorganismo, diversas redes regulatorias sofisticadas e interrelacionadas activan o reprimen la expresión de los caminos metabólicos de acuerdo a las condiciones ambientales. En ausencia de un aceptor de electrones adecuado y/o en un contexto intracelular apropiado, *E. coli* opta por caminos de fermentación.

En *E. coli* la regulación transcripcional comprende una red de reguladores específicos y globales. Estos últimos controlan operones que pertenecen a distintos grupos funcionales. Varios de los reguladores globales controlan el metabolismo central, afectando el flujo de carbono y poder reductor dentro de la célula.

La manipulación de estos flujos ofrece nuevas alternativas de ingeniería metabólica, en las que, en lugar de realizar manipulaciones en genes individuales para modificar pasos puntuales de vías metabólicas, se utilizan variantes de genes regulatorios para modificar numerosos pasos de varias vías metabólicas simultáneamente, para lograr cambios globales.

De nuestros trabajos anteriores se desprende que el catabolismo central de carbono es regulado, entre otros factores, en forma conjunta por los sistemas ArcAB y CreBC, en especial en condiciones de crecimiento con restricción en la disponibilidad de O₂. Hemos utilizado mutaciones en *arcA* para aumentar la disponibilidad de poder reductor, incrementando la síntesis de diferentes compuestos reducidos en condiciones de baja aireación.

Con respecto a la función que desempeña CreC en el metabolismo bacteriano, se sabe, como fue descrito anteriormente, que regula varios genes que afectan el flujo de carbono dentro de la célula, y que es activado en medio mínimo y en condiciones de baja aerobiosis, pero aún es mucho lo que queda por elucidar. Dado que en trabajos previos hemos analizado en profundidad el efecto metabólico de mutaciones en *arcA*, y que hemos observado en estas mutantes un efecto importante de CreBC, el paso siguiente es la caracterización metabólica del efecto de este regulador poco conocido, a fin de analizar su potencial uso en la manipulación de *E. coli* para la obtención de cepas de interés biotecnológico.

Succinato

Aplicaciones e importancia económica del succinato

Actualmente se venden más de 1500 toneladas de ácido succínico a nivel mundial, a un costo promedio de US\$ 5.90±8.80/kg (dependiendo de la pureza), producido en gran parte a partir de butano a través de anhídrido maleico. Únicamente el ácido succínico destinado a la industria alimenticia es obtenido a partir de fermentación [37].

Existen cuatro mercados o usos principales para el ácido succínico. El primero y más grande es el que lo utiliza como surfactante y/o detergente. El segundo mercado es como quelante iónico utilizado en la galvanoplastia para prevenir la corrosión y el rayado de los metales. El tercero es el mercado de alimentos, donde se usa como modificador del pH, saborizante o agente antimicrobiano. El cuarto mercado es en la industria farmacéutica para la fabricación de antibióticos, aminoácidos, y vitaminas. El mercado en su totalidad genera una suma de US\$ 400 millones al año [37].

El ácido succínico de origen biológico podría reemplazar *commodities* basados en el benceno e intermediarios petroquímicos, reduciendo la contaminación ambiental del proceso de manufacturación y consumo de aproximadamente 250 compuestos derivados del benceno [38].

Debido a su estructura de ácido dicarboxílico saturado, el ácido succínico puede ser convertido en 1,4-butanodiol, tetrahidrofurano, δ -butirolactona y otros cuatro químicos que tienen un mercado mundial de 275×10^6 kg/año. En el campo de la catálisis, se han hecho los avances necesarios para convertir el ácido succínico en estos intermediarios químicos. Por ejemplo, el succinato puede ser fácilmente hidrogenado a 1,4-butanodiol y posteriormente carbonilado a ácido adípico[37]. A continuación se muestran algunos de estos compuestos intermediarios basados en el ácido succínico que están actualmente bajo investigación o en una etapa piloto de desarrollo.

- **1,4-Butanodiol (BDO):** La demanda en Estados Unidos por este compuesto aumentó de 318.000 tn en 1999 a 408.000 en 2004. El 51% del BDO se utiliza para producir tetrahidrofurano. El resto es utilizado para producir δ -butirolactona (20%), y resinas de alta performance de tereftalato de polibutileno (20%) para las industrias electrónica y automovilística. El BDO puede producirse a partir de ácido succínico en un proceso de dos pasos [39].
- **δ -butirolactona (GBL):** las nuevas regulaciones en el uso de químicos orgánicos volátiles han abierto nuevos mercados para solventes como el GBL y su derivado principal la N-metil-2-pirrolidona. La N-metil-2-pirrolidona ha sido recomendado como reemplazo del cloruro de metileno, debido a que es mucho menos volátil, y por lo tanto puede ser capturado y reciclado sin liberar emisiones tóxicas en la atmósfera. El mercado del cloruro de metileno en EEUU es del orden de 36.000 tn por año.

- **Ácido Adípico (o ácido hexanodioico):** es utilizado para fabricar nylon. El mercado actual en EEUU para el ácido adípico es de ~900,000 tn con una capacidad mundial de más de 2.700 tn/año [39]. El benceno es la principal materia prima para su producción, pero el precio del mismo ha aumentado dramáticamente en los últimos años, de US\$ 0,40/l en 2003 a US\$ 1,01/l en 2005. Dos métodos alternativos para producir ácido adípico involucran succinato. El succinato y el peróxido de hidrógeno se utilizan en lugar de ácido nítrico para evitar las emisiones tóxicas de óxidos nítricos. El otro método, que aún no es competitivo respecto a la manufacturación petroquímica, hidrogena succinato a BDO, el cual es posteriormente carbonilado a ácido adípico [40]. El succinato, el ácido adípico, el BDO y el etileno pueden ser combinados para fabricar un plástico biodegradable denominado Bionelle [41].
- **Tetrahidrofurano (THF):** es un importante solvente de reacción, y es también utilizado en la producción de politetrametilenglicol (componente de elastómeros de uretano, fibras de poliuretano, etc). Actualmente se produce a partir de BDO [39].
- **Esteres alifáticos lineales:** estos compuestos son utilizados en la producción de resinas, plásticos, y otros compuestos.
- **Sales de succinato:** 92.000 tn de sales son utilizadas por año como anticongelantes. Las sales de succinato pueden reemplazar a las sales que actualmente se usan ofreciendo un mejor desempeño y menores efectos negativos sobre el medio ambiente [39]. Las sales de succinato también pueden ser agregadas al alimento para rumiantes y animales monogástricos. Su efecto benéfico se basa en su capacidad para promover la producción de propionato en el rumen, aumentando el material glucogénico y precursor en la síntesis de proteínas. Por otro lado, las sales de succinato pueden servir como fuente de energía y reguladores del pH en animales monogástricos como los cerdos jóvenes.

El succinato puede ser producido por fermentación a un costo de US\$ 0,55-1,10/kg (Paster et al. 2003). Con este costo de producción, los derivados del succinato descritos anteriormente (con la excepción de las sales de succinato y el ácido adípico) son competitivas o casi competitivas con los costos actuales de manufacturación sintética, permitiendo que comience a ser viable la construcción de instalaciones para su producción.

Organismos y biodiversidad

El ácido succínico es un intermediario común en las rutas metabólicas de numerosos microorganismos anaeróbicos y aeróbicos facultativos. Por ejemplo el succinato se forma a partir de azúcares o aminoácidos por bacterias productoras de propionato como las especies de *Propionibacterium*, bacterias típicamente intestinales como *E. coli*, *Pectinatus* sp., *Bacteroides* sp., y bacterias del rumen como *Ruminococcus flavefaciens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Bacteroides amylophilus*, *Prevotella ruminicola*, *Succinimonas amylolytica*, *Succinivibrio dextrinisolvens*, *Wolinella succinogenes*, y *Cytophaga succinicans*. También se han reportado algunas cepas de *Lactobacillus* que producen ácido succínico en medio Man-Rogosa-Sharpe [37].

Muchos de los microorganismos productores de ácido succínico han sido aislados del rumen porque en este ecosistema el succinato actúa como un importante precursor de propionato, el cual es absorbido a través de la pared del rumen para su posterior oxidación y obtención de energía, así como un precursor biosintético para el animal.

Succinivibrio dextrinsolvens prospera en el rumen cuando la dieta del animal es rica en almidón, y forma succinato, acético, formiato y lactato como productos finales en la fermentación de la glucosa [42]. *Actinobacillus succinogenes* 130Z es un osmotolerante, anaerobio facultativo que habita en el rumen y que posee la habilidad de utilizar un amplio rango de sustratos incluyendo la L-arabinosa, celobiosa, fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, manitol, manosa, sacarosa y D-xylosa [43]. Esta bacteria del rumen produce succinato en concentraciones muy altas junto con acetato, pivato, formiato o etanol. El succinato también es producido por microorganismos aislados del sistema digestivo de otros animales. Por ejemplo, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, fue aislado de la boca de la raza canina Beagle. Es una especie gram-negativa, anaerobio obligado que produce succinato, acetato, formiato, etanol y lactato a partir de glucosa y lactosa [44].

Fisiología, bioquímica y genética.

Todas las bacterias productoras de ácido succínico realizan fermentaciones ácido mixtas, produciendo diferentes cantidades de succinato junto con otros productos incluyendo el etanol, lactato, acetato y formiato. *E. coli*, por ejemplo, produce succinato como producto minoritario cuando fermenta, típicamente 12mol/100mol glucosa [37]. Por otro lado, *A. Succiniproducens* sintetiza succinato hasta una concentración de 120 mol/mol de glucosa [45]. Esta diferencia pone en relieve que la fisiología de las bacterias productoras de succinato varía significativamente. *A. Succiniciproducens*, a diferencia de *E. coli* y *A. Succinogenes*, es un anaerobio obligado. Tanto *A. succiniciproducens* como *A. succinogenes* utilizan exclusivamente la ruta del fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, mientras que *E. coli* utiliza múltiples vías para formar ácido succínico [43]. Principalmente, *A. succinogenes*, a diferencia de *E. coli* o *A. Succiniciproducens*, es un osmófilo moderado, con una alta tolerancia por sales de succinato, lo cual es crucial para los procesos de recuperación posteriores.

A. succinogenes forma succinato por la vía de la PEP carboxiquinasa, utilizando cuatro enzimas clave (PEP carboxiquinasa, malato deshidrogenasa, fumarasa, y fumarato deshidrogenasa), mientras que en *E. coli* se han reconocido seis caminos para la formación de ácido succínico y la ruta de la PEP carboxiquinasa juega un papel menor [43], [46]

La existencia de diferentes enzimas indican la existencia de diferentes caminos para la formación de succinato en *E. coli* y los estudios de Alam y Clark [46] también indican múltiples rutas para la formación de succinato. Ellos encontraron que una mutante negativa de la fumarato reductasa de *E. coli* seguía produciendo succinato a concentraciones de 15-40% comparadas con la cepa salvaje.

El camino de la PEP carboxiquinasa utilizado para la síntesis de ácido succínico por *A. succiniciproducens* y *A. succinogenes* es regulado por los niveles de CO₂ [45]. En estas bacterias, la PEP carboxilasa (PEP carboxiquinasa) funciona catabólicamente para fijar CO₂, producir ácido láctico y sintetizar oxaloacetato a partir de PEP. A bajos niveles de CO₂ (10 mol CO₂/100 mol glucosa), *A. succiniciproducens* produce ácido láctico como principal producto reducido mientras que *A. succinogenes* produce etanol. Bajo altas concentraciones de CO₂ (100 mol CO₂/100 mol glucosa), el succinato es el principal producto reducido y sólo se producen trazas de ácido láctico o etanol.

Se ha demostrado que las concentraciones de CO₂ regulan los niveles de enzimas clave del camino de la ruta de la PEP carboxiquinasa en *A. succinogenes* [45]. Los niveles de PEP carboxiquinasa aumentan, mientras que la alcohol deshidrogenasa y la lactato deshidrogenasa son indetectables. Consecuentemente, el CO₂ funciona como un aceptor de electrones y altera el flujo del PEP, el cual se transforma en piruvato y lactato o etanol a bajas concentraciones de CO₂ pero forma succinato a altos niveles de este gas.

El hidrógeno también aumenta la relación del succinato/acetato producido durante la fermentación de la glucosa en *A. succinogenes* crecida en medio mínimo, pasando de 1 a 1,5 [43]. Los electrones con bajo potencial redox generados en la oxidación de piruvato se utilizan para reducir fumarato a succinato. De esta forma, durante la fermentación de la glucosa la relación molar succinato/acetato es igual a uno. En presencia de glucosa e hidrogeno *A. succinogenes* puede generar electrones de bajo potencial mediante su hidrogenasa, haciendo que el PEP fluya hacia succinato más que hacia piruvato.

Estrategias genéticas empleadas para la optimización de la producción de ácido succínico

Algunas estrategias para la optimización de la producción de ácido succínico se han basado en reproducir en *E. coli* los caminos metabólicos de organismos que sintetizan naturalmente dicho ácido. Sang Jun Lee y colaboradores, secuenciaron el genoma de *Mannheimia succiniciproducens*, una bacteria gran negativa aislada del rumen bovino cuyo principal producto de fermentación es el ácido succínico, y realizaron un análisis *in silico* de su genoma para comparar su metabolismo central del carbono con el de *E. coli* [47]. Descubrieron que los diferentes perfiles metabólicos de estas especies se debían a las diferentes rutas metabólicas presentes en ambas. Así seleccionaron los genes *ptsG*, *pykF*, *mgo*, *sdhABCD*, y *aceBA* para ser mutados en *E. coli*. Construyeron diferentes mutantes a las que progresivamente iban anulando los genes mencionados, hasta tener una mutante múltiple en la cual todos ellos estaban anulados. Ni siquiera esta cepa severamente modificada manifestó un fenotipo fermentativo muy distinto al de la cepa silvestre. Los autores concluyeron de esta parte que la falta de resultados positivos se debió a la imposibilidad de realizar un análisis *in silico* que comprendiese la totalidad de las posibles mutaciones genéticas y sus combinaciones. En el mismo trabajo, decidieron descartar esta cepa y realizaron un modelo *in silico* para predecir un nuevo conjunto de mutaciones que optimizasen la formación de succinato. Mutaron los genes *ptsG* y *pykFA* y triplicaron en 24hs la producción de succinato (de 2,4 a 8,2 mM) en

anaerobiosis, llegando a consumir toda la glucosa presente en el medio (50mM) a las 80hs con una producción de succinato de 17,3 mM. Posteriores mutaciones para eliminar la síntesis de productos competitivos (*pfl* y *ldhA*) no sólo disminuyeron el ácido succínico sintetizado, sino que además resultaron un impedimento para que la cepa creciera normalmente en anaerobiosis por la ausencia de caminos para restituir el *pool* de cofactores de reducción [47].

Un grupo chino, cuatro años después del trabajo anteriormente citado, partió de un punto similar, al generar una cepa con dos de las mutaciones nulas estudiadas por Sang Jun Lee: *pflB* y *ldhA*. Conscientes de que dichas mutaciones devienen en serias dificultades para crecer en anaerobiosis, sobreexpresaron la enzima malato deshidrogenasa (MDH) nativa de *E. coli*, una enzima NADH-dependiente miembro de la familia de las 2-ceto ácido deshidrogenasas, junto con la LDH. Si bien la sobreexpresión de *mdh* resultó efectiva para restituir el crecimiento en anaerobiosis, los productos principales de fermentación fueron el acetato y el formiato. Al agregar bicarbonato de sodio al medio en una concentración de 10g/l, aumentaron la producción de succinato tanto en la cepa mutante como en la cepa control, haciendo de este compuesto el principal producto de fermentación (aprox 40mM).

Jantama realizó una combinación de ingeniería genética y evolución metabólica para mejorar la producción de ácido succínico en una cepa de *E. coli* sin recurrir a genes heterólogos o sobreexpresión de genes endógenos [48]. Partió de una cepa mutada en genes que codifican enzimas del metabolismo fermentativo, *ack*, *adhE* y *ldhA*. Esta cepa, por verse afectada su capacidad para regenerar NAD⁺ a partir de NADH, posee una capacidad limitada para crecer a bajas tensiones de oxígeno. En lugar de recurrir a una estrategia racional para mejorar este hecho, decidieron someter esta cepa a evolución metabólica mediante continuos pasajes en medio mineral con distintas concentraciones de glucosa como única fuente de carbono, esperando que en los sucesivos pasajes, el cultivo se fuera enriqueciendo en variantes con mayores tasas de división celular. Así, las variantes que se replicasen con mayor velocidad, deberían ser aquellas que produjesen más ATP, el cual, por las mutaciones presentes en el genoma de esta cepa, debería producirse casi exclusivamente a partir del NAD⁺ generado en la síntesis de succinato vía malato y fumarato. Esta estrategia les permitió mejorar el rendimiento del succinato de 0,17 mol/mol de glucosa, en la cepa salvaje a 0,74 mol/mol de glucosa en la nueva cepa KJ017. Tras posteriores modificaciones en otros genes (*pflB*, *mgsA*, *poxB*) obtuvieron una nueva cepa a la que llamaron KJ073 la cual es capaz de producir succinato a un rendimiento que alcanza 1,2-1,6 mol/mol de glucosa, y una concentración final de 622-733 mM de ácido succínico a las 96hs de cultivo.

Berrios-Rivera y colaboradores, sobreexpresaron la enzima formiato deshidrogenasa (FDH) de *Candida boidinii* para ver, entre otras cosas, cómo afectaba la producción de metabolitos. Observaron una importante redistribución del perfil de secreción tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. La sobreexpresión de FDH provocó un aumento en la disponibilidad de NADH con respecto a la glucosa consumida de 2 a 4 mol NADH/mol glucosa consumida, promoviendo la síntesis de productos reducidos, entre ellos el succinato, el cual aumentó su concentración absoluta un 44% (aerobiosis) y un 200% (anaerobiosis) [49].

Sobreexpresión de enzimas carboxilantes.

El flujo de carbono en el nodo de PEP sirve para regular la cantidad de succinato producido durante la fermentación de la glucosa en anaerobiosis. Además, este paso debe proveer suficiente energía (ATP) para el crecimiento, mantenimiento y la formación de precursores para la biosíntesis. Las bacterias del rumen que producen succinato como producto principal utilizan una PEP carboxiquinasa que conserva la energía en la producción de OAA. *E. coli*, como ya mencionamos anteriormente, no es una buena productora de succinato. La PEP carboxilasa es la principal enzima responsable de fijar CO₂ para formar OAA. A diferencia de la PEP carboxiquinasa, la PEP carboxilasa cataliza la reacción de forma irreversible debido a la pérdida de energía asociada a la liberación de un fosfato inorgánico [50]. También existen en *E. coli* dos caminos alternativos para producir succinato a partir de la fijación de CO₂. Estos caminos están ligados a la oxidación de NADH y NADPH y son llevados a cabo por las enzimas málicas codificadas en los genes *maeA* y *maeB*, respectivamente, las cuales catalizan reversiblemente la carboxilación de piruvato dando como producto malato. Ambas enzimas permiten conservar la energía liberada durante la reacción como ATP. Salvo la PEP carboxilasa, las tres vías restantes de fijación de CO₂ mencionadas, en presencia de altas concentraciones de glucosa, funcionan en la dirección opuesta, es decir que cumplen un rol en la gluconeogénesis para metabolizar los ácidos orgánicos presentes en el medio [51], [52].

Estos hechos no pasaron desapercibidos por muchos investigadores que buscaron, mediante distintas estrategias, aumentar la síntesis de succinato modificando la expresión de las enzimas mencionadas, en sus versiones endógenas o utilizando genes homólogos de otros microorganismos.

Millard (1996) clonó en vectores de expresión los genes endógenos *ppc* y *pck* de *E. coli*. En ensayos de frasco agitado creció las cepas con medio rico (LB) en presencia de 23 g/l de glucosa y 0,15g de MgCO₃, con los tubos sellados para generar la condición de anaerobiosis. Al consumirse totalmente la glucosa, al cabo de 18hs, vieron que la sobreexpresión de la PEP carboxilasa generó un aumento significativo en la producción de succinato mientras que la sobreexpresión de la PEP carboxiquinasa no, dando un perfil de secreción de ácidos orgánicos muy similar a la cepa control. Dado que, como se mencionó antes, la PCK conserva la energía en forma de ATP, pudiendo esto redundar en un mayor crecimiento y una mayor producción de ácido succínico (tal como ocurre en *A. succiniciproducens*), el resultado que obtuvieron no fue el que esperaban. Los autores atribuyeron las diferencias observadas a que la PCK de *A. succiniciproducens* poseería propiedades cinéticas más beneficiosas para la producción de ácido succínico [53].

En un trabajo posterior al de Jantama mencionado en la sección anterior, en el que una cepa de *E. coli* que fue modificada por ingeniería genética y evolución metabólica mejoró cuantitativamente su capacidad para producir succinato, el mismo grupo se abocó a determinar las causas genéticas que le habían conferido a las cepas obtenidas por evolución metabólica su gran capacidad para producir succinato. Mediante un prolijo diseño experimental llegaron a la conclusión de que los cambios que dieron origen al fenotipo obtenido eran tres: i) pérdida de la represión por glucosa mediada por Crp, ii) mayor incorporación de glucosa a través del sistema la permeasa GalP y iii) una mutación puntual en

la región río arriba del gen *pck* [50]. En su conjunto, estos cambios promovieron una mayor expresión del gen *pck* que es en última instancia, la explicación a nivel metabólico por la cual esta cepa de *E. coli* produce más succinato. Un trabajo contemporáneo a este demostraba que la sobreexpresión de la *pck* era dañina para el crecimiento de *E. coli* en medio mínimo, al disminuir la velocidad de crecimiento, de consumo de glucosa y el rendimiento del succinato [54].

En consecuencia, la diferencia podría deberse al cambio en la forma en la que esta cepa incorpora la glucosa, ya no por el sistema de PTS (a causa de una mutación en el gen *ptsI*) si no por el sistema GalP. Mientras que el primero utiliza la energía conservada en el enlace fosfato del PEP para introducir glucosa activamente, liberando Pi, el segundo fosforila ATP hacia ADP, generando un sistema que reemplaza al PTS y deja disponible una mayor cantidad de PEP para ser transformado en OAA.

Los Polihidroxicanoatos.

Los polihidroxicanoatos (PHA) son poliésteres producidos por una gran variedad de especies de bacterias como compuestos intracelulares de reserva de carbono y energía. Estos compuestos se acumulan bajo condiciones limitantes de nutrientes en presencia de exceso de fuente de carbono, a niveles que pueden alcanzar hasta el 90% del peso seco de la célula. Los PHA juegan un papel importante en el balance redox celular y en la supervivencia y resistencia a estrés de aquellas bacterias capaces de producirlos (Madison y Huisman, 1999). Además, son interesantes desde el punto de vista biotecnológico porque poseen propiedades similares a las de los plásticos derivados del petróleo y tienen la gran ventaja de ser biodegradables y poder ser producidos a partir de recursos renovables.

Desde el descubrimiento del polihidroxi-butarato (PHB) en *Bacillus megaterium* en 1926 por Legmoine, se han encontrado más de 90 géneros bacterianos capaces de producir una gran variedad de PHA, compuestos por diferentes monómeros que le otorgan distintas propiedades físicas y químicas. Los PHA están constituidos por cadenas lineales de unidades de 3-hidroxicanoato donde el grupo carboxilo forma una unión éster con el grupo hidroxilo vecino (Ilustración 2).

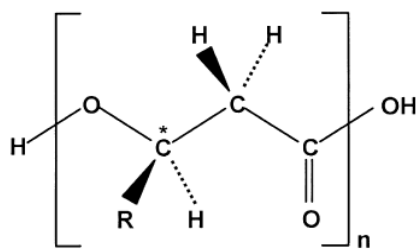


Ilustración 2: Estructura química de los PHA. Todos los monómeros tienen un centro quiral (*) en la posición R. En el polihidroxi-butarato el R= CH₃; polihidroxi-valerato R= C₂H₅ y en los PHA compuestos por monómeros de longitud de cadena media (PHAmcl) R= C₃H₇ – C₁₁H₂₅; con un N que va desde 100-30000 monómeros (Zinn y col., 2001).

Características de los distintos PHA e importancia biotecnológica

Los distintos tipos de PHA se suelen clasificar en base al largo de la cadena de carbonos que componen los monómeros como PHA de cadena corta (PHAscl) y PHA de cadena media (PHAmcl). Los PHAscl están formados por monómeros (R)-hidroxialcanoato de 3 a 5 carbonos, mientras que los PHAmcl están formados por (R)-hidroxialcanoato alifáticos de 6 a 14 carbonos. En todos los PHA caracterizados hasta el momento el átomo de carbono hidroxil sustituido es de la configuración quiral (R) [55].

Si bien la mayoría de las bacterias acumulan uno u otra clase de polímero, existen ciertas cepas bacterianas capaces de producir copolímeros, es decir, un gránulo compuesto por monómeros de PHAscl y PHAmcl. *Pseudomonas* sp. 61-3 es capaz de producir polímeros con distinta composición pudiendo sintetizar una mezcla de poli (3-hidroxi butirato), como homopolímero, y un copolímero que consiste en unidades de poli (3-hidroxi butirato-co-3-hidroxialcanoato) de 4 a 12 átomos de carbono [56].

Los PHA pueden tener distinto peso molecular, siendo el valor promedio de 4×10^6 Da. Las diferentes propiedades encontradas en los distintos tipos de polímeros se asocian a su composición monomérica. Los PHAscl son termoplásticos con alto grado de cristalinidad, siendo el PHB el más estudiado de estos polímeros, que en forma de homopolímero es rígido y frágil. Mientras que los PHAmcl son elásticos y pegajosos, con bajo grado de cristalinidad y bajas temperaturas de fusión ($T_m < 50^\circ\text{C}$) [57]. Las propiedades de los copolímeros pueden variar entre las que presentan los PHAscl y PHAmcl, según la proporción de monómeros de cadena media y corta que los constituyan. Estas características hacen de los PHA polímeros interesantes desde el punto de vista biotecnológico debido a la similitud de sus propiedades con las de los plásticos derivados del petróleo. En especial las cualidades físicas de los PHAmcl hacen que resulten adecuados para aplicaciones biomédicas [58].

En la naturaleza los microorganismos son capaces de degradar los PHA hasta CO_2 y agua en condiciones aeróbicas. La tasa de degradación de un fragmento depende de la composición del polímero, su forma física, sus dimensiones, y, de manera importante, de las condiciones ambientales (Ilustración 3). En aguas residuales, la tasa de degradación de un fragmento de PHB puede variar en el orden de unos meses y hasta años en agua de mar [59] siendo la luz UV un factor que puede acelerar el proceso de degradación de los distintos PHA [55]. Esto constituye una gran ventaja frente a los plásticos derivados de hidrocarburos, los cuales se acumulan como desechos, dado que no son biodegradables. Por otra parte, utilizan las escasas reservas petroquímicas del planeta. En contraste, los PHA pueden producirse en base a la utilización de recursos naturales renovables [60].



Ilustración 3: Degradación en un Compost de botellas realizadas con PHA.

Los millones de toneladas de desechos generados cada año por plásticos derivados del polietileno y el polipropileno ha despertado un interés creciente en generar posibles polímeros termoplásticos biodegradables a partir de recursos renovables, como es el caso de los PHA. Sin embargo, el elevado costo de producción de estos bioplásticos, frente al bajo costo de los polímeros derivados del petróleo, hacen de este un producto poco competitivo (desde un aspecto económico y comercial) y su uso resulta limitado. Esto ha motivado diversas líneas de investigación orientadas a la búsqueda de nuevos organismos productores y al estudio de las distintas vías metabólicas que permitan aumentar los niveles de producción a menor costo. Estas investigaciones involucran la utilización de distintos organismos nativos o recombinantes para lograr un uso más eficiente del sustrato por parte del microorganismo, mejores técnicas de recuperación y purificación y la utilización de sustratos más económicos. Al mismo tiempo se busca mejorar las propiedades físicas de los PHA.

La investigación en torno a los PHA también se ha centrado en las diferentes aplicaciones. Al ser biocompatibles pueden ser utilizados en el área biomédica. La ventaja principal en este campo es que pueden ser introducidos en el cuerpo humano y no requerir su eliminación por vías quirúrgicas por tratarse de un plástico biodegradable. En su forma pura o en combinación con otros materiales, los PHA son usados como hilos de suturas, guías nerviosas para médula ósea, clavos ortopédicos, etc. Los PHA utilizados en aplicaciones médicas requirieren un alto grado de pureza durante el proceso de extracción [55].

Síntesis de PHA

Los genes relacionados con la biosíntesis de PHA suelen estar agrupados en el genoma bacteriano. En *Ralstonia eutropha* (ahora denominada *Cupriavidus necator*) los genes involucrados en la producción de PHB han sido estudiados en detalle. Dichos genes están organizados en el operón *phaCABR* [61]. El gen *phaC* codifica la PHA polimerasa (o sintasa), *phaA* codifica la β -ceto-tiolasa, *phaB* codifica una acetoacetil-CoA reductasa dependiente de NADP y *phaR* que codifica un regulador.

Otros genes relacionados con el metabolismo del PHA en esta especie codifican las proteínas de la familia de fasinas, proteínas asociadas a los gránulos. Las fasinas representan una clase

de proteínas no catalíticas que están formadas por un dominio hidrofóbico que se asocia con la superficie de gránulos de PHA, y un dominio hidrofílico expuesto al citoplasma de la célula, resultando en una proteína anfipática. En el caso particular de *R. eutropha* se han identificado 4 tipos de fasinas distintos (PhaP1, PhaP2, PhaP3 y PhaP4) aunque se le otorga una mayor importancia dentro del metabolismo de los PHA a la fasina PhaP1 [62].

La mayoría de las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* se caracterizan por acumular PHAmcl. Los genes involucrados en la biosíntesis de este tipo de polímeros incluyen 2 genes que codifican polimerasas de clase II (*phaC1* y *phaC2*), que están separados por un gen que codifica una depolimerasa (*phaZ*). El gen *phaD* está ubicado inmediatamente río abajo de *phaC2* y río arriba de los genes *phaF* y *phal*, los cuales se transcriben en dirección opuesta. Phal y PhaF son consideradas proteínas estructurales y regulatorias del tipo fasina [63].

En *Pseudomonas* los genes *phaG* y *phaJ* que codifican las enzimas (R)-3-hidroxiacil ACP:CoA y (R)-enoil-CoA hidratasa, respectivamente, están normalmente ubicados en otro sitio del genoma con respecto al grupo de genes que contiene polimerasas y depolimerasas. En *Pseudomonas* las enzimas PhaG y PhaJ son las encargadas de proveer de sustrato a la PHA polimerasa a partir de metabolitos intermediarios de la síntesis de novo y β -oxidación de ácidos grasos, respectivamente.

Producción de PHA en *E. coli* recombinante

Debido a los numerosos inconvenientes asociados a la producción de PHAs en bacterias productoras naturales, la producción heteróloga de PHAs en *E. coli* surge como una alternativa interesante. *E. coli* presenta varias ventajas sobre los productores naturales ya que, al no tener la capacidad de sintetizar el polímero, tampoco posee la maquinaria enzimática necesaria para degradarlo [64]. Además, puede crecer a altas velocidades y a temperaturas óptimas mayores que los productores naturales, y es fácil de lisar. *E. coli* es el microorganismo más conocido, su genoma se encuentra totalmente secuenciado, y tanto su fisiología y comportamiento han sido estudiados con mucho detalle, por lo cual presenta una mayor facilidad para realizar manipulaciones genéticas con el fin de aumentar los rendimientos del polímero [65]. La primera vez que se produjo PHB en *E. coli* fue en el año 1988, cuando se clonaron los genes *pha* de *C. necator* [66]. Desde entonces se han identificado y clonado en *E. coli* los genes responsables de la síntesis del polímero de varios géneros bacterianos como es el caso de los genes de *Methylobacterium extorquens*, *Rhizobium meliloti*, *Caulobacter crescentus*, y *Streptomyces aureofaciens* [59]. Se estudiaron diferentes cepas de *E. coli* recombinantes conteniendo los genes *pha* de *C. necator*, obteniéndose porcentajes máximos de acumulación de hasta un 90 % del peso seco [66], un contenido que supera los niveles acumulados por la mayoría de los productores naturales. En nuestro laboratorio se clonaron los genes

responsables de la síntesis de PHB de *Azotobacter* sp. FA8 en *E. coli*, resultando en la cepa K24K [67]. Con esta cepa se realizaron ensayos de acumulación en cultivos en lote alimentado, con lactosuero como sustrato, obteniéndose un 72.9% de acumulación del polímero con respecto al peso seco. Uno de los problemas observados en la producción de PHB en organismos recombinantes es la estabilidad de los genes de la biosíntesis durante la fermentación. La producción de PHB se ve fuertemente disminuida debido a la pérdida del vector conteniendo los genes responsables de la síntesis del polímero en la mayoría de la población bacteriana, ya que las células carentes de plásmidos poseen una velocidad de crecimiento mayor respecto de las recombinantes [68]. Este problema ha sido parcialmente resuelto modificando el gen que confiere resistencia a antibióticos en el plásmido que lleva los genes *pha* [69], o agregando secuencias de estabilización, como el locus *hok/sok* o par del plásmido R1 [70].

La producción de PHB en *E. coli* no depende solamente de la correcta expresión de los genes *pha*, sino que se ve afectada por otros factores. Como se ha mencionado previamente, la síntesis de PHB se produce a partir de acetyl-CoA y requiere poder reductor para su síntesis. Se han realizado diferentes manipulaciones metabólicas tendientes a aumentar la disponibilidad de los sustratos necesarios para la síntesis de PHA. Entre estos estudios se encuentra uno en el cual se inactivó el gen *pta*, que codifica una fosfato-acetil transferasa que actúa en la vía de síntesis de acetato, de manera de aumentar la cantidad de acetyl-CoA disponible para la producción de PHB [71]. En otro trabajo se inactivó el gen *pgi*, el cual codifica una fosfoglucoisomerasa (la cual cataliza la conversión de glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato en la vía de glucólisis, Ilustración 4), para que el carbono se redirija hacia la vía de las pentosas fosfato y haya más NADPH disponible para la producción de PHB [72].

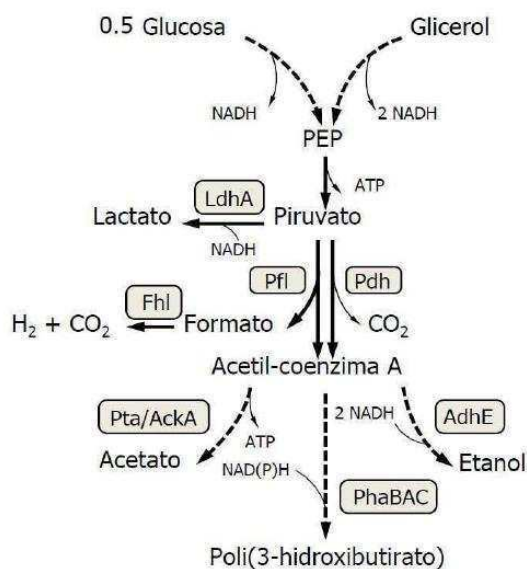


Ilustración 4. Principales vías metabólicas involucradas en el catabolismo de glucosa y glicerol en *E. coli* recombinante productora de PHB. Las enzimas relevantes se muestran en las cajas grises. Las abreviaturas corresponden a: PEP, fosfoenolpiruvato; LdhA, D-lactato deshidrogenasa; Pfl, piruvato-formato liasa; Pdh, piruvato deshidrogenasa; Pta/AckA, fosfotransacetilasa/acetato quinasa; AdhE, acetaldehído/alcohol deshidrogenasa; PhaBAC, enzimas involucradas en la síntesis de poli(3-hidroxiacetato) [PhaB, acetoacetyl-coenzima A reductasa; PhaA, β -cetotiolasa; y PhaC, PHA sintasa]. Las líneas punteadas representan más de un

paso bioquímico.

Por otro lado, también se han realizado manipulaciones que involucran reguladores que afectan el flujo de carbono y poder reductor. Se estudió la producción de PHB en cepas de *E. coli* que expresan los genes *pha* de *Azotobacter* sp. FA8, con mutaciones en el gen regulador global *arcA* [69]. La acumulación microaeróbica de PHB se vio favorecida en las mutantes *arcA*, probablemente porque la desregulación redox en estas mutantes provee de una mayor cantidad de equivalentes de reducción para la síntesis del polímero, en comparación con la cepa salvaje.

Objetivos

Los objetivos generales de este trabajo son:

- Estudiar los efectos de CreC sobre el metabolismo central de *E. coli*, considerando distintos niveles de aireación y de fuentes de carbono.
- Establecer los niveles de regulación sobre los que estaría actuando a través de la cuantificación de actividades enzimáticas (nivel post-traduccionales) y el estudio de la actividad promotora (transcripcional) de genes fermentativos.
- Describir los efectos de CreC sobre aspectos fisiológicos relacionados con el estrés oxidativo y el estado redox intracelular.
- Realizar cultivos en bioreactor con tensiones de oxígeno bien establecidas y distintas fuentes de carbono para caracterizar fermentativamente a la cepa $\Delta creC$, y poder evaluar su potencialidad como productora de compuestos de interés industrial.
- Evaluar el efecto de CreC sobre la síntesis de PHB y succinato.
- Establecer una estrategia de ingeniería metabólica para mejorar la producción de estos compuestos.

Materiales y Métodos

Cepas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

Cepas, plásmidos y oligonucleótidos. Las cepas de *E. coli* utilizadas a lo largo de este trabajo derivan en su mayoría de K-12, y se detallan en la

Tabla 1, junto a los plásmidos y oligonucleótidos utilizados. Las cepas se mantuvieron como suspensiones bacterianas gliceroladas a -70°C .

Tabla 1: Cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en la presente tesis.

Capas y plásmidos	Característica relevante	Fuente o referencia
Cepas		
58-161, F-,SR	F-, <i>relA1</i> , <i>rpsL100(strR)</i> , <i>spoT1</i> , <i>metB1</i> , <i>creC510</i>	[73]
K1060	F-, <i>fadE62</i> , <i>lacI60</i> , <i>tyrT58(AS)?</i> , <i>fabB5</i> , <i>mel-1</i>	[74]
DB1060	Idem K1060, $\Delta creC::FRT$	Este trabajo
DBC1060	Idem K1060, $\Delta creB::FRT$, $\Delta creC::FRT$	Este trabajo
DC1060	Idem K1060, $\Delta creB::FRT$	Este trabajo
CE1060	Idem K1060, $\Delta creB::FRT$, $\Delta adhE::FRT$	Este trabajo
CEA1060	Idem K1060, $\Delta creB::FRT$, $\Delta adhE::FRT$, $\Delta ackA::FRT$	Este trabajo
CEAL1060	Idem K1060, $\Delta creB::FRT$, $\Delta adhE::FRT$, $\Delta ackA::FRT$, $\Delta dhA::FRT-kam$	Este trabajo
CEAP1060	Idem K1060, $\Delta creB::FRT$, $\Delta adhE::FRT$, $\Delta ackA::FRT$, $\Delta ptsG::FRT$	Este trabajo
CEL1060	Idem K1060, $\Delta creB::FRT$, $\Delta adhE::FRT$, $\Delta dhA::FRT-kam$	Este trabajo
PL1060-KF	Idem K1060, $\Delta dhA::(phaBAC_{Azotobacter}-kan-oriR6K)$	Este trabajo
PL1060R-KF	Idem K1060, $\Delta dhA::(phaCAB_{R. eutropha}-kan-oriR6K)$	Este trabajo
BW25113	<i>rrnB3</i> , $\Delta lacZ4787$, <i>hsdR514</i> , $\Delta (araBAD)567$, $\Delta (rhaBAD)568$, <i>rph-1</i>	[75]
JW4362-1	Idem BW25113, $\Delta creC724::kan$	[75]
JW4361-1	Idem BW25113, $\Delta creB723::kan$	[75]
JW1375-1	Idem BW25113, $\Delta dhA744::kan$	[75]
JW2293-1	Idem BW25113, $\Delta ackA778::kan$	[75]
JW1228-1	Idem BW25113, $\Delta adhE748::kan$	[75]
JW1087-2	Idem BW25113, $\Delta ptsG763::kan$	[75]
DH5 α	<i>fhuA2</i> $\Delta (argF-lacZ)U169$, <i>phoA</i> , <i>glnV44</i> , $\Phi 80 \Delta (lacZ)M15$, <i>gyrA96</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> .	[76]
MG1655	<i>rfb-50 rph-1</i> .	[77]
S17-1 λ -pir	<i>TpR SmR recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR-M⁺RP4</i> : 2-Tc:Mu: Km Tn7 λ pir.	[78]
Plásmidos		
pCP20	Vector conteniendo la recombinasa FLP de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; FLP λ cl857 λ PR repA(Ts), Apr Cmr	[79]
pEcPck	Vector conteniendo el gen <i>pck</i> de <i>E. coli</i> bajo el promotor de <i>lacZ</i> , Amp ^R	[80]

pEcPpc	Vector conteniendo el gen <i>ppc</i> de <i>E. coli</i> bajo el promotor de <i>lacZ</i> , Amp ^R	[80]
pSBF2	Vector conteniendo el gen <i>fdh1</i> de <i>Candida Boidinii</i> bajo el promotor de <i>lacZ</i> . Km ^R	
pKD4	Vector utilizado como templado en la amplificación de FRT- <i>kan</i> -FRT; <i>oriR6Kγ</i> , Apr, Kmr	[79]
pKD46	Vector conteniendo las funciones λ-Red (<i>γ β exo</i>) expresadas a partir del promotor <i>ParaB</i> , inducible por arabinosa; <i>oriR101</i> , <i>repA101(ts)</i> , Apr	[79]
Oligonucleótidos		
pck/F	CAGGATCCGCTAAGGAGCAGTGAAATG	Este trabajo
pck/R	ATAAGCTTCATTACAGTTTCGGAC	Este trabajo
ppc/F	AAAGATCTCTGGGGTAATATGAACG	Este trabajo
ppc/R	GAAAGCTTGCAGAAGAGGAAGATTAG	Este trabajo
pQE/F	CCCGAAAAGTGCCACCTG	
pQE/R	GTTCTGAGGTCATTACTGG	
che-cre/F	TTAATCAGCTACAACATCC	Este trabajo
creC-F	CCTGAGGGGCCTGTAATG	Este trabajo
creC-R	CTGCACCGTATAAAGCTC	Este trabajo
creB-F	ATTAGCGCGTTCCTGTC	[81]
creB-R	GCATGCCGATACGCATTA	[81]
M13/F	GTAAAACGACGGCCAGT	
M13/R	GCGGATAACAATTCACACAGG	
UA-ack/1	CCGCTCGAGCGGCCACGTCTTTGAGTAA	[82]
UA-ack/2	CGGGATCCTGCATCGATGATGGCAAA	[82]
UA-ldh/1	CCGCTCGAGCCAGCTCAAAGCCAAAGG	[82]
UA-ldh/2	CGGGATCCATAACAGCGCGAGAACGG	[82]
UA-foc/1	CCGCTCGAGTAGACACCCGCTCTTCG	[82]
UA-foc/2	GATCTAGAGCGTTTGCTGCACATCAG	[82]
pUA66/FW4	CATCAGATCCTTGCGGGC	Este trabajo
pUA66/R	GCGAAAGTAGTGACAAGTG	Este trabajo
DcreC/F	TAGGCCTGATAAGACGTGGCGCATCAGGCATCGTGACCGAATGCCGGA TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Este trabajo
DcreC/R	GCCGCGTCTTATCATGCCTACCAAACATATTGAAATTACGGGTATTTGTAC ATATGAATATCCTCCTTAG	Este trabajo
creC-KF/F	GTCAAAGAAGTTAAACCGGGCGTGCGAAGAGCAACGGAGGGGACGTTG ATCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Este trabajo
creC-KF/R	GACGTGTTCTGATCCACTTCGGCGCTTAGCGTGATGCAACCGCTCTCGG GCATATGAATATCCTCCTTAG	Este trabajo
DcreB-F	TTAGCGGGTTCCTGTATGCCGTGGCGGCAATAACAGAGGCGATTAT GGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Este trabajo
DcreB-R	GCCCAGCAACAACCGCATGCCGATACGCATTACAGGCCCTCAGGCTATA CATATGAATATCCTCCTTAG	Este trabajo
pSEVA228/F	TTTCGTCTCAGCCAATCC	Este trabajo
pSEVA228/R2 4b	CCAGGGTTTTCCAGTCAC	

Medio LB (Luria-Bertani). Para el mantenimiento rutinario de las cepas y durante la construcción de mutantes, se utilizó medio LB (extracto de levadura 5 g · l⁻¹; triptona 10 g · l⁻¹; y NaCl 5 g · l⁻¹), o medio LB sólido [conteniendo agar 1,5% (m · vol⁻¹)]. El medio LB

agar blando contuvo agar 0,75% ($m \cdot vol^{-1}$). La solución de criopreservación [LB suplementado con glicerol 15% v/v pH = 8,0] fue utilizada para conservación de las cepas a $-70^{\circ}C$.

Medio mínimo M9 y M9m. Los cultivos en frasco agitado para la caracterización metabólica de las distintas mutantes se desarrollaron en medio mínimo M9 conteniendo Na_2HPO_4 6 g/l; KH_2PO_4 3,0 g/l; NH_4Cl 1 g/l; NaCl 0,5 g/l; citrato férrico amoniacal 0,06 g/l (cuando corresponde); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2mM; $CaCl_2$ 0,01 mM $pH_{inicial} = 7,2 \pm 0,2$. Las fuentes de carbono y la concentración de las mismas variaron según el experimento. Para los ensayos en biorreactor se modificó la composición del mismo y se lo denominó M9m (igual al M9 pero $(NH_4)_2SO_4$ 2,8 g/l, KH_2PO_4 3,0 g/l, $MgSO_4$ 0,02 g/l y citrato férrico amoniacal 0,06 g/l).

SOB y SOC. Para el crecimiento de células a transformar se utilizó SOB [triptona 2 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 8,56 mM, KCl 2.5mM, $MgCl_2$ 10mM y $MgSO_4$ 10mM (ambas sales de magnesio se agregaron luego de autoclavar al resto de los componentes del medio en H_2O_{dd}). Para preparar células electrocompetentes se omitieron las sales de magnesio de forma de disminuir la cantidad de iones en el medio, y se agregó glicerol (30 g/l). El SOC posee la misma composición que el SOB, pero esta suplementado con glucosa 30 g/l.

Antibióticos y aditivos. Los antibióticos utilizados y sus concentraciones finales fueron: Ap, $100 \mu g \cdot ml^{-1}$; Km, $50 \mu g \cdot ml^{-1}$ y Cm, $34 \mu g \cdot ml^{-1}$. En todos los casos, las soluciones antibióticos se esterilizaron por filtración (membrana de acetato de celulosa de $0,22 \mu m$ de poro), y se agregaron a las concentraciones requeridas después de autoclavar los restantes componentes del medio ($121^{\circ}C$, 1 atm, 20 min).

Cultivos aeróbicos y de baja aerobiosis en frasco agitado. Para alta aerobiosis se utilizó un volumen variable de medio (10, 25, 50 ml etc) según el caso, manteniendo una proporción (volumen medio)/(volumen frasco) de 1/10 en un agitador de agua a 250 rpm. Para la condición aquí llamada de *Baja aerobiosis* o microaerobiosis se utilizó una proporción (volumen medio)/(volumen frasco) de $\frac{1}{2}$ y 125 rpm de agitación. Todos los cultivos se realizaron a $37^{\circ}C$ a menos que se indique lo contrario.

Cultivos anaeróbicos. Los cultivos se desarrollaron en medio mínimo M9 en tubo sellados herméticamente, con volumen de medio hasta colmar el recipiente (7,5 ml). La fuente carbonada fue glucosa 30 g/l (ca. 167 mM). Además, y para evitar la pérdida de condiciones anaeróbicas durante la toma de muestras para análisis, en el momento de tomar cada una de las muestras se procedió a sacrificar un tubo entero. Los cultivos se llevaron a cabo a $37^{\circ}C$ con una agitación vertical de 4 r.p.m. para evitar la sedimentación de la biomasa. Los cultivos de trabajo se inocularon a una densidad óptica medida a 600 nm (DO600) inicial de 0,1 a partir de un cultivo de 14 h crecido en las mismas condiciones, el cual, del mismo modo, fue inoculado a una DO600 inicial de 0,1 pero a partir de un cultivo crecido en condiciones aeróbicas.

Ensayos en biorreactor. Los cultivos en biorreactor se llevaron a cabo en dos fermentadores distintos: **i) Condición I:** Fermentador Bioengineering Lab Fermenter, modelo RALF 3.7 L. **ii) Condiciones II y III:** Realizadas en fermentador B. Braun Biostat, 4L BioReactor, conectado a analizadores de CO_2 y O_2 (Bluesens) para la cuantificación de estos gases y gaseados con aire

atmosférico con flujo constante de 1 l/min por medio de un flujímetro automático (Bronkhorst High – Tech B.V, E-7000). Para los cultivos se emplearon 2 L de medio M9 o M9m (según se indica en secc. Resultados). La agitación se reguló según la necesidad del experimento. El pH se controló a $7,10 \pm 0,1$ por el agregado automático de NaOH 3N o H₂SO₄ 3N. Para prevenir la formación de espuma se utilizó antiespumante comercial (Antifoam 289, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) de forma manual. El oxígeno disuelto en el medio se midió utilizando una sonda polarimétrica de oxígeno de Ag/AgCl (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland).

Manipulaciones genéticas y técnicas de biología molecular.

Extracción de Plásmidos. La extracción se realizó a partir de 1-5 ml de cultivo, en función del número de copias del vector, crecidos *overnight* en LB (con el antibiótico correspondiente adicionado) se centrifugaron durante 3 min. a 8000 rpm para obtener el *pellet* de células. Este se resuspendió en 150 μ l de *buffer 1*, luego se agregaron 150 μ l de *buffer 2*, se mezcló por inversión, se incubó 5 min a temperatura ambiente y luego se adicionaron 150 μ l de *buffer 3*. Se centrifugó 10 min a 13000 rpm y se tomó cuidadosamente el sobrenadante. A dicho sobrenadante se adicionaron 900 μ l de Etanol absoluto, se centrifugó 20 min a 13000 rpm, se descartó el sobrenadante y se lavó con 500 μ l de Etanol 70 %. Luego se descartó el etanol y se dejó secar 30 min a 42°C para que se evapore el etanol remanente. Una vez eliminado todo resto de etanol se resuspendió en 50 μ l de H₂Odd. La composición de los *buffers* utilizados se especifica en el anexo. En casos donde fue necesaria la obtención de plásmidos con mayor grado de pureza (secuenciación o cortes con enzimas de restricción y posterior ligado) se utilizó un kit comercial, Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), y se procedió siguiendo las especificaciones del fabricante.

Digestión con enzimas de restricción. La digestión con enzimas de restricción (marca New England Biolabs o Promega) se realizó siguiendo protocolos estándares (Sambrook y col., 1988) y las instrucciones de los fabricantes.

Purificación de DNA. Se utilizaron los *kits* comerciales de Qiagen (Qiaex II gel extraction kit) para la purificación de fragmentos de DNA obtenidos por reacciones de PCR o tratados con enzimas de restricción en mezcla de reacciones, siguiendo las especificaciones del fabricante.

Reacciones de ligado. Se utilizó la enzima T4 DNA ligasa de Promega o New England Biolabs, siguiendo las especificaciones del fabricante. La relación DNA inserto/DNA vector fue de 3:1 o 1:1 según las concentraciones obtenidas. La reacción se llevó a cabo por un periodo de 16 a 18 h a 16°C.

Electroforesis en geles de agarosa. Para la visualización y la posterior purificación de fragmentos de DNA obtenidos de reacciones de PCR o de cortes con enzimas de restricción con

rangos de tamaño de 3000 a 500 pb se utilizó una concentración de agarosa de 0,8 a 1 %. Para la separación de fragmentos menores de 500 pb se aumentó el porcentaje de agarosa utilizado para facilitar su visualización. Las electroforesis se realizaron utilizando *buffer* TAE a 100 volts en cubas de Sigma (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA). Como marcadores de peso molecular se utilizaron el DNA del fago λ digerido con *HindIII* (NEB), y la escalera de 1 kb de Promega. Los geles se tiñeron con solución de bromuro de etidio ($0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$) durante 15 min. El DNA se visualizó con un transiluminador de luz UV y los geles se fotografiaron con una cámara digital Kodak Digital Science CD120.

Cuantificación de DNA. La calidad y cantidad de DNA utilizado en los distintos procedimientos se realizó mediante geles de agarosa mediante el analizador digital 1D Image Analysis Software (Kodak Digital Science), utilizando como patrón 100 ng de λ *HindIII*.

Preparación de células competentes. Para la obtención de células competentes de las diferentes cepas de *E. coli* requeridas se inocularon 10 ml de LB con dos o tres colonias aisladas de un cultivo de 24 h realizado en medio sólido y se incubaron *overnight* a 30-37°C y 200 rpm. Este cultivo se utilizó para inocular 50 ml de SOB-glicerol 30 g/l, en un erlenmeyer de 500 ml, partiendo de una $DO_{600\text{nm}}$ inicial de 0,05. Se incubó a 30°C y 200 rpm alrededor de 3 horas o hasta alcanzar una DO de 0,5. Luego se procedió a incubar durante 10 min a 4°C y se obtuvo el *pellet* celular mediante centrifugación (10 min a 4000 rpm a 4°C). Los pasos posteriores varían según si se prepararon células competentes por tratamiento químico (quimiocompetentes) o electrocompetentes. **i) Quimiocompetentes.** El *pellet* se resuspendió en 8 ml de *buffer* TB o una solución de CaCl_2 0,1 M, se incubó nuevamente 10 min (1 hora para el caso de CaCl_2) a 4°C y se centrifugó por 10 min a 4°C a 4000 rpm. Se resuspendió el *pellet* suavemente en 2 ml de TB frío y 140 μl de DMSO (o CaCl_2 0,1 M y glicerol 10 % m/v). **ii) Elctorcompetentes.** El *pellet* se lavó tres veces con 25 ml de glicerol 10% m/v en $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ y se resuspendieron en 1 ml de la misma solución de lavado. En cualquiera de los casos las células se separaron alícuotas de 50 μl . Las mismas se conservaron a -70°C hasta su utilización.

Transformación de células competentes. i) Quimiocompetentes. Para realizar ensayos de transformación en células quimiocompetentes se agregaron 5-10 μl de DNA (10-50 ng), a 50 μl de células competentes, se incubaron 30 min en hielo, luego se aplicó un golpe térmico a 42°C durante 90 segundos y nuevamente se incubó en hielo por 10 min. **ii) Electrocompetentes.** 2 μl de DNA se agregaron a 50 μl de células competentes. La electroporación se efectuó en un electroporador BioRad Micro Pulser™ en cubas de 0,2 cm, en el programa 2 que ofrece el equipo. Para la recuperación de ambos tipos de células competentes se agregaron 500 μl de SOC y se incubó 1 h a 37°C con agitación constante (150 rpm). Al terminar el periodo de recuperación se centrifugaron las células 5 min a 5000 rpm y se sembró el *pellet* celular en placas con medio de selección según correspondiese.

Reemplazo alélico (técnica de Datsenko y Wanner).

Construcción de las mutantes $\Delta creC$, $\Delta creB$ y $\Delta creBC$. Las cepas DC1060, DC1060 y DBC1060 se construyeron siguiendo el método de reemplazo alélico mediado por las funciones λ -Red. Se amplificó por PCR un casete de resistencia a kanamicina (FRT-*kan*-FRT) utilizando el plásmido pKD46 como templado y los oligonucleótidos correspondientes (ver Tabla 1). Dicho fragmento de DNA contiene el gen *kan* (el cual codifica una aminoglicosido 3'fosfotransferasa) flanqueado por las secuencias FRT (por *FLP recognition target*). El producto de PCR fue purificado utilizando un *kit* comercial, siguiendo las instrucciones del proveedor, y utilizado para transformar células electrocompetentes de *E. coli* K1060, conteniendo el plásmido pKD46. Las células transformantes se seleccionaron por su resistencia a kanamicina (Km^R) y la inserción cromosomal del fragmento se corroboró por PCR utilizando los primers correspondientes y por posterior secuenciación. Para despojar a la célula del casete de kanamicina, se transformaron las células recombinantes con el plásmido pCP20 el cual contiene la recombinasa FLP de *Saccaromices cerevisiae* y el gen *cat* que confiere resistencia al cloranfenicol. Se seleccionaron las células $Km^S Cm^R$ y se corroboró la pérdida del casete en cuestión mediante PCR con los primers correspondientes y por contraselección en kanamicina. El plásmido pCP20 (el cual es termosensible) se curó repicando las cepas dos veces a 42°C.

Construcción de cepa K1060C (*creC510*). La construcción de la cepa de *E. coli* portando la mutación *creC510* (K1060C) se realizó en dos etapas. En la primera etapa se colocó en la cepa 58-161 (*creC510*) un casete de selección de kanamicina en una región intergénica 5 kb río arriba del operón *creABCD*, mediante la técnica de Datsenko, dando origen a la cepa 58-KF. Esta nueva cepa, en la segunda etapa, se utilizó como dadora en un ensayo de transducción generalizada por fago P1. La cepa K1060 actuó como cepa receptora, y las células transductantes se seleccionaron por su resistencia a kanamicina. La presencia de la mutación se corroboró rápidamente por un ensayo de PCR de colonias con un primer *reverse* que hibrida específicamente (en su extremo 3'), sobre la citosina que constituye la mutación puntual del alelo *creC510*, y otro *forward* que no distingue mutación alguna, obteniéndose así producto de amplificación solamente cuando se utiliza como templado DNA con el alelo *creC510*. La resistencia a kanamicina se eliminó con el plásmido pCP20 de forma idéntica a lo descrito previamente.

Construcción de cepas mutantes para la producción de PHB y succinato. Para construir las mutantes CE1060, CEL1060, CEA1060, CEAP1060, CEAL1060 y CEAP1060 cuyos genotipos se especifican en la Tabla 1, se fue mutando secuencialmente la cepa DC1060 ($\Delta creC$) con el casete conteniendo el gen de *kan* y la región flanqueada a los genes *adhE*, *ackA*, *ptsG* y *ldhA*. Estos casete, a diferencia de las mutaciones anteriores, no se amplificaron a partir del plásmido templado pKD4 sino del DNA genómico de cepas de la colección Keio [75] contenido los alelos mencionados ya interrumpidos por dicho casete. Dado que las cepas de esta colección fueron mutadas mediante la técnica de Datsenko-Wanner previamente descrita, la extracción del marcador de selección se llevaba a cabo mediante el plásmido pCP20 antes de mutar el siguiente gen.

Construcción de cepas conteniendo los genes *phaBAC* de *Azotobacter sp. 8* y *phaCAB* de *Ralstonia eutropha*. Para construir la cepa PL1060 (*ldhA::phaBAC*) y PL1060R (*ldhA::phaCAB*) se utilizó la técnica de Datsenko-Wanner. La estrategia para alcanzar dicho cometido se distingue de los casos anteriores en que en los las mutantes mencionadas con anterioridad, simplemente se estaba anulando un gen preexistente en el genoma, mientras que en las cepas PL1060 y PL1060R la mutación consistió en transferir un operón entero hacía el genoma de *E. coli* (Ilustración 5). Dado que el fragmento de DNA excedía las 5 KB y temiendo que el tamaño canónico de la región homóloga para la recombinación, fuera muy pequeña se decidió una estrategia que alternativa a la amplificación directa por PCR del fragmento insertal, la cual implicó la construcción de un replicón con todos los elementos necesarios para dar el fragmento lineal de interés. Dicho plásmido se denominó pMSG1 conteniendo los genes *phaBAC* de *Azotobacter sp. 8*, el gen de resistencia *kan* entre dos secuencias FRT y un ori condicional (R6K) removible (también entre FRT). Brevemente, se insertó en el plásmido pJP24 (conteniendo los genes *phaBAC*) el producto de amplificación de los primers km-FRT/F y km-FRT/R, con los cuales se amplificó el *cassette* removible *kan-FRT* del plásmido pKD4. El clonado se hizo a partir de un sitio único HindIII presente en el plásmido pJP24, y un par de sitios de corte para la misma enzima introducidos en amplicón a través de los extremos 5' de los primers. A este nuevo plásmido se lo denominó pJP24KF. Por otra parte se levantaron dos regiones externas al gen *ldhA* de *E. coli* por PCR (fragmentos LdhA1 y LdhA2) y el origen de replicación condicional del plásmido pKD4 incluyendo un sitio FRT (Ori-FRT). Estos tres fragmentos independientes se ensamblaron para dar un fragmento completo a través de restricciones, ligaciones y reamplificaciones secuenciales. Las restricciones se realizaron a partir de sitios únicos de corte introducidos en los fragmentos a través de los primers. Las regiones LdhA1 (0,4 kb) y LdhA2 (0,7 kb) se ensamblaron entre sí por corte y ligado de sus sitios BamHI. Al producto de la ligación se lo reamplificó con los primers externos del nuevo fragmento sin realizar un clonado (fragmento de 1,1 kb). El procedimiento para pegar el fragmento Ori-FRT (0,7 kb) al fragmento de 1,1kb fue similar, pero utilizando un sitio EcoRI. Este fragmento (O12) de 1,8kb se reamplificó por los primers externos. El plásmido pMSG1 resultó de la unión del fragmento O12 con una porción del plásmido pJP24KF producto de la digestión con XhoI. Esta enzima, al cortar también en los extremos de O12, sirvió para dejar extremos cohesivos en ambas componentes del futuro plásmido (pMSG1). Dado que las combinaciones posibles entre estos fragmentos eran dos y sólo una resultaba útil, se rastreó entre los clones obtenidos de la transformación con el ligado, aquel que presentase la orientación correcta de las partes.

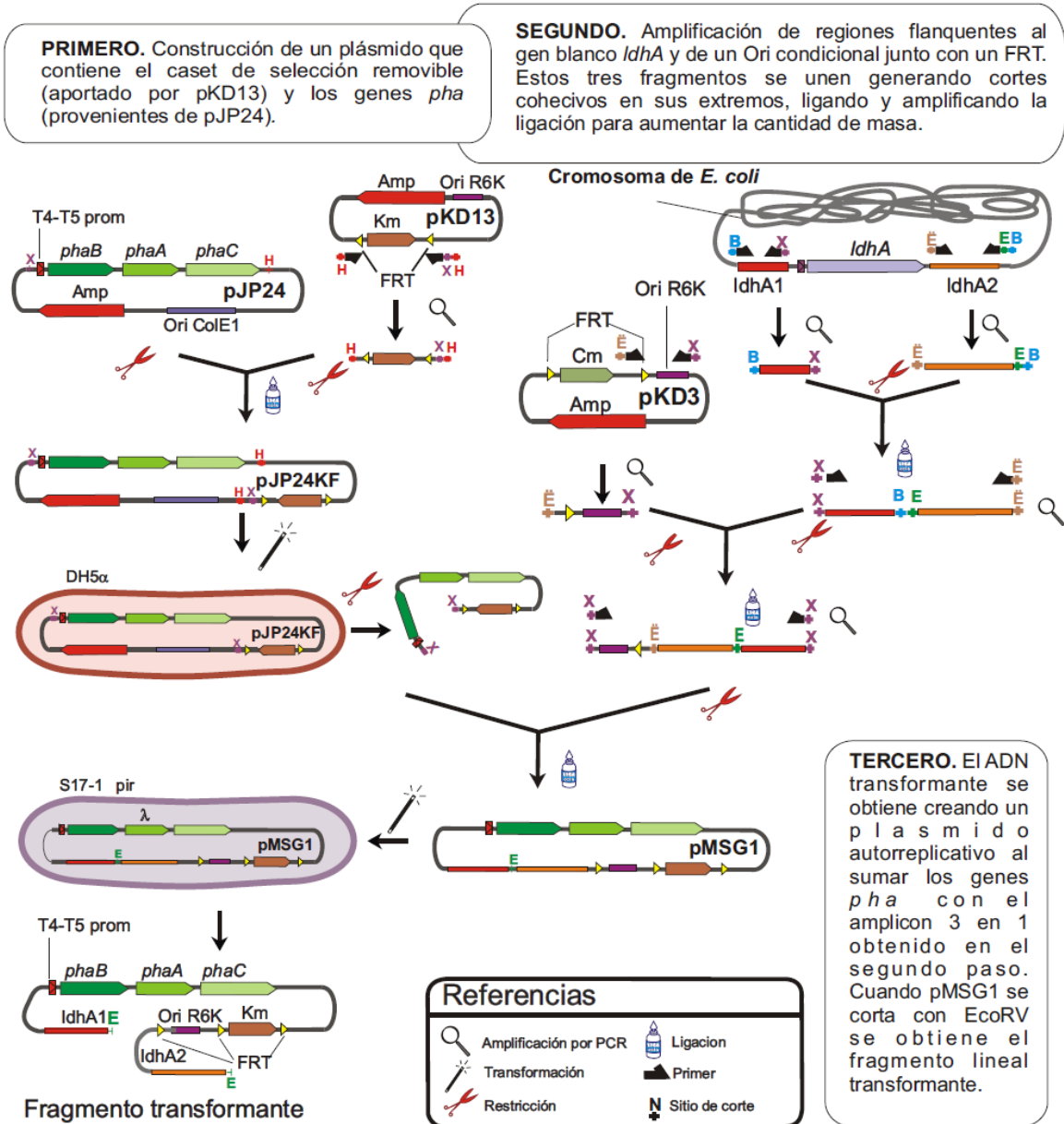


Ilustración 5. Estrategia empleada para la construcción de la cepa PL1060-KF.

Una vez que el plásmido pMSG1 se aisló, se amplificó en la cepa contenedora (S17-1 λ pir). Para poder transformar a la cepa K1060, se linealizó el plásmido con la enzima EcoRV, dejando ambas regiones de homología en los extremos de la molécula lineal de DNA. El producto de la digestión se purificó por kit y se introdujo en la cepa K1060 mediante electroporación (20ng de DNA), siguiendo la técnica de Datsenko-Wanner, dando lugar a la cepa PL1060-KF.

En el caso de la cepa PL1060R-KF, se transfirió el fragmento EcoRI-BamHI del plásmido pTZ18U-PHB el plásmido pJP24-KF cortado con las mismas enzimas para liberar la porción conteniendo cassette con el gen *kan-FRT*, el gen *bla* (resistencia a ampicilina) y el origen de replicación ColE1. A este plásmido se lo denominó pPHB-KF, el cual se lo cortó con XhoI, se

aisló el fragmento conteniendo los genes *phaCAB* y el cassette *kan-FRT*, y se los ligó al fragmento O21, también digerido con XhoI. Se transformó esta mezcla de ligación y se rastrearon y aislaron las colonias que poseían la orientación correcta de los fragmentos de DNA. A este plásmido se lo denominó pMSG2. Para utilizarlo como fragmento lineal en el reemplazo alélico, se cortó pMSG2 con la enzima Mull, dado que la enzima EcoRV corta dentro del operón *phaCAB*. A la cepa K1060 transformada con este fragmento se la denominó PL1060R-KF.

Métodos analíticos

Determinación de biomasa. El crecimiento celular se estimó por turbidimetría, registrando la DO600 del cultivo (o una dilución apropiada del mismo) en un espectrofotómetro GeneSys5 UV-Vis (Spectronic Instruments Inc., Rochester, New York, EE.UU.). La concentración celular se expresó como g biomasa (materia celular seca) · l⁻¹ de cultivo. Con este fin, se tomaron muestras valoradas de los cultivos (*ca.* 10 ml) a distintos tiempos según se detalla en la descripción de cada experimento, se centrifugaron (8.000 r.p.m., 4°C, durante 5 min), se lavaron dos veces por resuspensión (utilizando 1 vol de NaCl 9 g/l) y centrifugación, y el sedimento celular fue secado en estufa a 65°C hasta peso constante.

Cuantificación de ácidos en sobrenadante y PHB. El sobrenadante obtenidos por centrifugación de muestras de 1 ml tomadas de los frascos y centrifugadas inmediatamente durante 1 min a 13.000 r.p.m. y 4°C. Los sobrenadantes se filtraron a través de membranas de 0,22 µm de poro, y se guardaron a 4°C hasta el análisis por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Los ácidos de fermentación (citrato, piruvato, acetato, D-lactato, formiato y succinato) fueron detectados utilizando un equipo de cromatografía líquida de alta presión (HPLC; Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, Maryland, EE.UU.) con una columna de intercambio de cationes (Aminex HPX-87H; BioRad Labs., Hercules, California, EE.UU.), un detector de índice de refracción diferencial (Waters, Milford, Massachusetts, EE.UU.), y un detector UV-Vis (SPD-10A, Shimadzu Scientific Instruments). La elución se desarrolló utilizando H₂SO₄ 2,5 mM como fase móvil con un flujo constante de 0,6 ml/min, y la columna fue operada a 50°C.

Para cuantificar la cantidad de PHB intracelular, se realizó una reacción de hidrólisis ácida con ácido sulfúrico concentrado, mediante la cual todo el polímero es degradado a ácido crotónico, un compuesto separable y cuantificable por HPLC (60°C, flujo de 0,7 ml/min, H₂SO₄ 7mM, columna Aminex HPX-87H). Aproximadamente 10 mg de *pellet* celular liofilizado se incubó 40 min a 90°C con 1 ml de H₂SO₄ concentrado, tras lo cual se agrega cuidadosamente 4 ml de H₂O_{dd}, se diluye (1/10 a 1/40) y se filtra con membranas de 0,45 µm HAWP (Millipore). Para la cuantificación absoluta del PHB se somete al mismo procedimiento cantidades conocidas de PHB comercial (Sigma-Aldrich).

Las inclusiones de PHB fueron detectadas cualitativamente por tinción y observación al microscopio con el colorante Azul de Nilo. Dicho colorante es una oxazina básica soluble en agua y en alcohol etílico. La forma oxazona (Nile pink) se forma por la oxidación espontánea del Azul de Nilo en solución acuosa, y es soluble en lípidos neutros que se encuentran en estado líquido a la temperatura de la coloración [83]. El colorante se precalentó a 55°C para luego sumergir los extendidos de los cultivos en el colorante durante 10 min. Se lavó con agua y se eliminó el exceso de colorante mediante el lavado con ácido acético 8 % durante un minuto. Se dejó secar y se observó al microscopio bajo una longitud de onda de 460 nm. Los gránulos del polímero fluorescen de color naranja.

Determinación de fuentes de carbono en sobrenadante. La glucosa y el glicerol remanente en sobrenadantes se midió con *kits* comerciales, o bien por HPLC procesando las muestras de la misma forma que lo descrito para la determinación de ácidos. El detector empleado en este caso fue de índice de refracción (Shodex, Kawasaki, Kanagawa, Japan) a 35 °C. Para la cuantificación absoluta se prepararon patrones de cada sustancia con concentraciones conocidas de las mismas.

Determinación de etanol. El etanol producido se midió empleando un *kit* comercial o bien mediante cromatografía gaseosa. El cromatógrafo gaseoso fue un HP7890 Series GC System, (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos).

Determinación de nitrógeno amoniacal. La concentración de amoníaco se determinó en un potenciómetro (Orion 4 STAR), con electrodo específico para la detección de amoníaco (Orion 9512HPBNWP) después de la alcalinización de la muestra (pH > 9) con NaOH 10 M. Soluciones de concentraciones conocidas de (NH₄)₂SO₄ (10, 25, 50, 100, 250 y 500 ppm de nitrógeno) se utilizaron para obtener la curva de calibración.

Determinación de cociente redox. Los cocientes NADH/NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleotido reducido y oxidado respectivamente) y NADPH/NADP⁺ (nicotinamina adenina fosfato dinucleotido, reducido y oxidado respectivamente) fueron cuantificados en los pellets celulares de 1 ml provenientes de los cultivos en frasco agitado en condiciones de alta aerobiosis y baja aerobiosis. Las muestras de los cultivos analizados fueron transferidas a tubos de plástico pre-enfriados y la actividad metabólica fue interrumpida al sumergirlos en N₂ líquido y se guardaron a -75°C por no más de 24hs hasta la determinación enzimática. Las muestras fueron tratadas con 300 µl de 0,2 M HCl (para la extracción de NAD(P)H) o 0,2 M NaOH (para la extracción de NAD(P)⁺). La extracción ácida/alcalina fue realizada a 50°C por 10 min, rápidamente fueron colocadas en hielo. Las suspensiones fueron luego neutralizadas agregando gotas de HCl o NaOH (1 M) y los restos (debris) celulares fueron removidos centrifugando a 12.000 rpm por 5 min. Luego los sobrenadantes fueron transferidos a nuevos tubos e inmediatamente empleados para medir el uso de cofactores. La determinación de nucleótidos se realizó según el protocolo descrito por Bernosky y Swan, usando bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-difeniltetrazolio como aceptor final de electrones, con las modificaciones descritas por Nikel et al. [84]. En todos los casos se realizó por triplicado en dos cultivos independientes y se normalizó el contenido de dinucleótidos por el peso seco obtenido de un ml de cultivo.

Determinación de la tasa de consumo de oxígeno. Se utilizaron cultivos crecidos en M9 glucosa 30 g/l y baja aerobiosis, inoculados a partir de precultivos crecidos *over night*. Una vez que los cultivos alcanzaron la mitad de la fase exponencial (DO_{600nm} 0,4-0,6) se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 minutos. El pellet obtenido se lavó con solución fisiológica una vez y tras ser centrifugado nuevamente, se lo resuspendió en solución fisiológica ajustando a $DO_{600nm}=2$. Para la determinación del consumo de oxígeno se empleó un electrodo polagrafófico tipo Clark (Biological O₂ Monitor, Model 53, Yellow Springs Instruments Inc.). En la cuba de medición se colocaron 3 ml de solución fisiológica con la fuente de carbono a respirar en una concentración de 0,2 g/l, y se saturó dicha solución de oxígeno dejando la cuba abierta durante 3 minutos con agitación magnética a 30°C. Se tomó una alícuota de las células (1ml) de y cerrando rápidamente la cámara, se determinó la caída de la saturación de oxígeno de la mezcla en el tiempo. Al final de la medición, se corroboró la DO_{600nm} de la mezcla analizada y una alícuota fue conservada para la posterior determinación de proteínas según el método de Lowry.

Pruebas fisiológicas. El fenotipo Dye se analizó sembrando diluciones de cultivos de 18hs en solución fisiológica (NaCl 8,5 g/l) en medio M9 agar al que se le agregó azul de toluidina en una concentración final de 0,2 µg/ml (M9T). A este medio se lo suplementó con ácido succínico (0,6 g/l), glicerol (30g/l) o glucosa (30 g/l). Los cultivos líquidos de 18hs se realizaron en medio M9 glucosa 30 g/l. Para las pruebas de resistencia a peróxido de hidrógeno, y diamida se realizaron cultivos de 8hs en M9 glucosa 30g/l y se plaquearon 100-200 µl con rastrillo para formar un césped o directamente se agregaron las células mezcladas en M9-agar blando. Sobre este césped se colocaron filtros de celulosa y en ellos se agregaron 5µl de la solución a probar. Se probó el peróxido de hidrogeno al 15% y 30% (5µl/filtro), y la diamida al 0,5 M y 0,1M (5µl/filtro).

Estudios por cartometría de la expresión de promotores con Gfp como gen reportero. Para poder distinguir el ruido de los eventos celulares reales se utilizó una calibración previa realizada con *P.extremaustralis*-GFP y el filtro FIT-C, en la cual se determinaron los parámetros a emplear en el citometro para detectar solo la población bacteriana, utilizándose siempre los mismos para los experimentos subsiguientes. Los resultados fueron analizados con el programa Flowing Software 2.5.1, de acceso público (<http://www.flowingsoftware.com/>). Se registraron por muestra como mínimo 10.000 eventos. Los experimentos se hicieron por triplicado la primera vez y una segunda vez por cuadruplicado.

Análisis estadístico de los resultados. La diferencia entre dos poblaciones de valores se puso a prueba mediante t-test con un $p<0,05$ para ser consideradas significativas. Para el caso de estadística no paramétrica, en el cual no se podía presumir a priori la distribución normal del universo muestral, se utilizó el test-U de Mann y Whitney (resultados de citometría de flujos).

Manipulación de proteínas

Preparación de extractos celulares y determinación de proteínas. Las cepas bacterianas a partir de las cuales se realizaron los ensayos fueron crecidas en medio LB durante 24 h. Para la extracción, se centrifugaron 20 ml del cultivo a 13.000 r.p.m. y 4°C, y el sedimento resultante se lavó dos veces por resuspensión en solución de lisis [Tris·HCl 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM (pH = 8)], y centrifugación. Finalmente, la biomasa se resuspendió en 1 ml de la misma solución conteniendo, además, fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF; Sigma-Aldrich) 1 mM como inhibidor de proteasas. La ruptura de las células se realizó por sonicación (Ultrasonic Homogenizer; Cole Parmer Instruments Co., Chicago, Illinois, EE.UU.). Se efectuaron 6 ciclos de sonicación de 10 s cada uno, con intervalos en baño de hielo entre cada ciclo de 10 s. Finalmente, los restos celulares fueron separados de la fracción citosólica centrifugando los extractos a 13.000 r.p.m. durante 30 min a 4°C. La concentración total de proteínas fue determinada por el método de Lowry *et al.* (1951), utilizando albúmina sérica bovina cristalina como estándar.

Determinación de actividad enzimática. i) Acetato quinasa. Para determinar la actividad acetato quinasa (ACK) se colocaron aprox. 50 µg de proteínas en la solución de reacción (acetato de potasio 800 mM, MgCl₂ 10mM, 50 mM Tris·HCl (pH = 7.4), 10 mM ATP, y 700 mM de hidroxilamida neutralizada (gota a gota con 1 volumen de KOH 3,5 mM). Se incubó a temperatura ambiente por cinco minutos y se detuvo la reacción con una solución acuosa de ácido tricloroacético 10% (m/v). Inmediatamente después se agregó 1,25% (m/v) FeCl₃ en HCl 1N. Luego de otros cinco minutos de incubación a temperatura ambiente, se centrifugó la mezcla (1 min, 13.000 rpm) y se midió la absorbancia del sobrenadante a 540 nm. Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µmol de acetil-hidroxamato en 5 min a 25°C. **ii) lactato deshidrogenasa.** 50 µg de proteínas se colocaron en *buffer* fosfato de sodio 10mM (pH=7,5), con 25 mM de piruvato, y NADH 7,5 mM. Se midió el cambio de absorbancia a 340 nm a 30°C hasta no ver variaciones. Se utilizó un coeficiente de extinción molar de (εNADH) de 6,22 mM⁻¹·cm⁻¹, el cual representa la diferencia entre los coeficientes de extinción de el NADH y el NAD⁺. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µmol de producto en 1 minuto at 30°C.

Electroforesis en geles de poliacrilamida. Cuando fue necesario corroborar la sobreexpresión de alguna proteína, se corrió el extracto proteico en un gel de poliacrilamida. Las electroforesis desnaturizantes en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) se realizaron en una cuba de electroforesis para proteínas vertical (10 cm × 10 cm × 1 mm; BioRad Labs.). Se utilizó una concentración de acrilamida en el gel separador de 15% (m · vol-1), mientras que la concentración en el gel concentrador fue de 4,5% (m · vol-1). La solución para la corrida electroforética contuvo Tris 25 mM; glicina 0,2 M; y SDS 3,5 mM. La electroforesis se desarrolló con amperaje constante (20 mA) hasta que las muestras atravesaron el gel concentrador; a partir de ese momento la corriente se aumentó a 30 mA.

Capítulo I

Prefacio

El primer capítulo de esta tesis está dedicado a la caracterización fisiológica del regulador CreC de *E. coli*. Dado que las líneas de trabajo del laboratorio se enfocan en la obtención de productos de interés biotecnológico, nos centramos en el estudio del metabolismo central, y en particular, de las vías fermentativas. La elección de *E. coli* para nuestras investigaciones se debe a que este microorganismo no sólo es uno de los principales modelos de estudio en la microbiología, sino que además es una de las herramientas biotecnológicas a la que más se acude a la hora de buscar sistemas sencillos y eficaces de producción de compuestos biológicos de interés industrial. Consiguientemente, desenmarañar las complejas redes regulatorias que controlan su metabolismo es de gran valor a la hora de diseñar estrategias con fines biotecnológicos.

La elección del regulador CreC, poco estudiado hasta ahora, como objeto de estudio, no es tan evidente. Una de las líneas que desarrolla nuestro laboratorio desde hace más de una década y media, es el estudio fisiológico, genético y metabólico de diferentes cepas bacterianas productoras de PHA [81], [85], [86]. El objetivo final de las investigaciones, además de incrementar el conocimiento básico, es el desarrollo de cepas bacterianas y procesos biotecnológicos potencialmente aplicables para la obtención de PHA a nivel industrial. Una de las premisas que rigen la producción industrial de compuestos de origen microbiológico es la de minimizar los costos de aireación. La baja disponibilidad de oxígeno, que se produce naturalmente durante el crecimiento a altas densidades de microorganismos aerobios, muchas veces está ligada a baja productividad, en especial en aquellos compuestos que requieren mucho poder reductor (es decir, un metabolismo principalmente aeróbico) para su síntesis. Normalmente al disminuir la disponibilidad de oxígeno se reprimen los caminos metabólicos aerobios, que producen poder reductor, afectando el tipo y la cantidad de compuestos producidos [67]. Es por ello que en nuestro laboratorio se empezó a estudiar a ArcA, un regulador global muy conocido que actúa reprimiendo genes relacionados con la respiración aeróbica, como posible blanco de manipulación genética.

Como parte de una estrategia habitual de genética bacteriana, se construyeron mutantes *arcA* por transducción generalizada mediada por el fago P1. Estas cepas resultaron tener características extremadamente beneficiosas para la producción de compuestos reducidos (PHB, por ejemplo). Más tarde, se comprobó que los efectos observados en una de las cepas que tenía características especialmente favorables (CT1062) no sólo se debían a la mutación en el gen *arcA*, sino también en otro gen localizado muy próximo a *arcA*, denominado *creC*. El gen *creC* de esta cepa no tenía una secuencia salvaje: codificaba una versión de *creC* en la cual su activación era constitutiva. Posteriormente se descubrió que este alelo mutante (*creC510*) no estaba originalmente en la cepa salvaje, sino que se había sido transferido junto con el marcador *arcA::Km* durante el proceso de transducción generalizada utilizado durante la construcción de la cepa.

Trabajos previos [12] habían indicado que CreC respondía a la fuente de carbono del medio, pero poco se sabía sobre su rol en el metabolismo central. Este aspecto fue estudiado en nuestro laboratorio, principalmente durante la tesis doctoral de P. Nickel, en el contexto de las mutaciones *arcA* y el control redox [87]. En base a los resultados obtenidos en estos trabajos, decidimos enfocarnos en estudiar los efectos de CreC, comenzando por la construcción de dos mutantes de nuestra cepa de referencia (K1060): (i) una mutante *creC510* (K1060C) y (ii) una $\Delta creC$ (DC1060). Con estas cepas comenzamos a caracterizar los parámetros básicos de crecimiento en distintas fuentes de carbono (glucosa, glicerol y acetato), y distintos niveles de aerobiosis. Para los experimentos en frasco agitado definimos tres niveles de aireación distintos, que son los que nos van a acompañar en buena parte de esta tesis, determinados por el grado de agitación y por la relación (volumen medio)/(volumen del recipiente), en base a experimentos realizados con anterioridad en nuestro laboratorio.

También se obtuvieron los perfiles de producción de ácidos, observándose claras diferencias entre la mutante *creC* y la cepa salvaje. Al analizar la actividad enzimática de dos de las enzimas involucradas en la síntesis de los ácidos analizados, la lactato deshidrogenasa y la acetato quinasa, se vió una fuerte correlación entre la actividad de éstas y la producción de lactato y acetato, sugiriendo que CreC tiene un efecto sobre la regulación de los genes *ldhA* y *ackA*. Posteriormente se construyeron dos mutantes más: la mutante $\Delta creB$ y la doble mutante $\Delta creBC$, para analizar si los efectos observados se daban por medio de CreC o por interacción (*crossstalk*) con otros reguladores globales. Se estudiaron sus perfiles de ácidos y las correspondientes actividades enzimáticas para compararlas con los de las cepas DC1060 y K1060.

Profundizar el estudio de la regulación de CreC implicaba analizar si la producción de ácidos y la actividad de las enzimas que intervienen en su producción, estaban directamente controlados por CreC, es decir, si CreC afectaba su transcripción. Para contestar esta pregunta clonamos los promotores de los genes *ackA*, *focA* y *ldhA* río arriba del gen de la proteína verde fluorescente (*gfp*) en un plásmido. Los niveles de expresión de esta proteína se midieron por fluorimetría y citometría de flujo.

Impulsados por la evidencia recolectada en los distintos experimentos, que indicaban una relación de CreC con el estado redox intracelular, decidimos realizar una prueba fenotípica clásica, la sensibilidad al colorante azul de toluidina, que se utilizó en su momento para caracterizar el gen *arcA*. Este colorante desvía los electrones de la cadena respiratoria, generando un aumento en la producción de ROS, que inhibe el crecimiento de las células. De este experimento, en el cual se observó un aumento de sensibilidad al colorante para la cepa *creC*, surgieron nuevos interrogantes relacionados con la eficiencia que tiene esta cepa para llevar a cabo el proceso de detoxificación de ROS. Llevamos adelante una serie de ensayos para evaluar el efecto de CreC durante el crecimiento en presencia de agentes oxidantes como el peróxido de hidrogeno y el paraquat. Evaluamos también la capacidad respiratoria de *E. coli* en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono, para tratar de relacionar el estado fisiológico en estas condiciones, en las cuales se sabe que CreC está activo, con la sensibilidad a ROS.

Por último, para analizar una serie de hipótesis relacionadas con la influencia de CreC en estado redox intracelular, medimos en las mutantes la relación entre cofactores oxidados y

reducidos (coeficiente NADH/NAD^+), un claro indicador del grado de poder reductor que existe dentro de las células, en condiciones de alta y baja aerobiosis.

Podemos resumir los objetivos específicos de este capítulo en los siguientes puntos:

- Caracterizar el crecimiento y el perfil de ácidos de las mutantes $\Delta creC$ y $creC510$ en distintas fuentes de carbono y niveles de aireación.
- Establecer si el efecto de CreC sobre las vías metabólicas que regularía se da a nivel transcripcional, focalizándonos en las principales vías metabólicas afectadas por el mismo.
- Evaluar si los efectos descritos en este trabajo de CreC están mediados por CreB.
- Establecer si existe un vínculo entre CreC y la resistencia al estrés oxidativo.
- Determinar el estado redox intracelular en función de la presencia o ausencia de CreC.
- Caracterización preliminar de cepas con alelos mutantes de $creC$ ($\Delta creC$, $creC510$, y $creC$ salvaje)

Caracterización del crecimiento y el metabolismo de mutantes *creC*.

Biomasa final y velocidad de crecimiento en distintas fuentes de carbono.

Para realizar los primeros estudios sobre el rol de CreC en el metabolismo del carbono de *E. coli*, se construyeron dos cepas con variantes alélicas del gen *creC* salvaje. En una variante se interrumpió dicho gen mediante la técnica de Datsenko descrita en materiales y métodos, insertando en su secuencia genómica un casete de resistencia a kanamicina flanqueado por sitios FRT, los cuales permitieron remover el gen que confiere la resistencia al antibiótico mediante la maquinaria enzimática aportada por el plásmido termosensible pCP20. A esta cepa, en la cual *creC* fue eliminado, se la denominó DC1060. Por otro lado, en estudios previos realizados en nuestro laboratorio, se observó que la coexistencia de dos mutaciones independientes en *E. coli*, una anulando el gen *arcA* y otra sustituyendo el gen *creC* por el alelo *creC510*, daba origen a un fenotipo particular en el cual la producción de equivalentes de reducción (NADH/NADPH) se encontraba desregulada favoreciendo la síntesis de metabolitos reducidos como el PHB [81], [85], [88]. El alelo *creC510* da lugar a una sustitución aminoacídica en la arginina de la posición 77 de CreC, por una prolina. De este cambio resulta una cepa en la que CreC está constitutivamente activo [81]. En base a los resultados observados en la mutante *arcA*, se decidió analizar el impacto fenotípico del alelo *creC510* en un contexto *arc+*. Por ello se construyó una cepa isogénica de K060 en la que se reemplazó el gen salvaje de *creC* por *creC510*. Esto se hizo colocando un marcador de selección (resistencia a la km) próximo al operón *creABCD* por la misma técnica de Datsenko en la cepa de *E. coli* 58-161, una cepa de colección que posee el alelo *creC510*. Una vez construida esta cepa (58-KF) se transfirió el gen *creC510* por transducción generalizada a K1060, y se removió el casete de resistencia de forma idéntica a como se hizo con DC1060, para obtener la cepa K1060C, que tiene el alelo *creC510* en un contexto isogénico con K1060 y DC1060.

Con estas tres cepas (K1060, DC1060, K1060C) se realizaron cultivos en frascos agitados utilizando fuentes de carbono con distintos niveles de oxidación: glucosa (30 g/l), glicerol (30 g/l) y acetato de potasio (6 g/l). Estas fuentes de carbono se combinaron con dos niveles de aireación distintos, salvo acetato de potasio la cual sólo se probó en alta aerobiosis. De este modo se abarcó un espectro de situaciones metabólicas acotado pero representativo de acuerdo a las condiciones en las que CreC podría estar cumpliendo un rol detectable en el fenotipo de *E. coli*. Los parámetros analizados fueron la velocidad de crecimiento y la biomasa total a las 24 horas de cultivo (Tabla 2).

La velocidad de crecimiento máxima (μ_{\max}) no varió entre las cepas dentro de un mismo tratamiento. En alta aerobiosis y con glucosa la μ_{\max} se mantuvo en torno a los $0,53 \text{ h}^{-1}$, con glicerol alrededor de $0,45 \text{ h}^{-1}$ y cuando se utilizó acetato la μ_{\max} fue de aproximadamente $0,13 \text{ h}^{-1}$. Cuando la aireación se disminuyó también bajaron, como era de esperar, las velocidades máximas de crecimiento. En glucosa y glicerol este parámetro bajó a $0,45 \text{ h}^{-1}$ y $0,31 \text{ h}^{-1}$ respectivamente para todas las cepas.

Los valores de biomasa final tampoco se vieron alterados por la presencia o ausencia de CreC. Con glucosa las tres cepas estudiadas llegaron a 1,05 g/l de biomasa total para el nivel de oxígeno más alto. Cuando la aeración se disminuyó, la biomasa formada fue de tan sólo un tercio. Algo similar ocurrió con glicerol como fuente de carbono, si bien estos valores fueron sutilmente superiores a los de glucosa.

Cepa y condición	Velocidad máxima (μ_{max} [h^{-1}])			Biomasa final 24 hs (g/l)	
	Glucosa	Glicerol	Acetato	Glucosa	Glicerol
<i>Alta Aerobiosis</i>					
K1060	0,56 (0,06)	0,45 (0,03)	0,13 (0,01)	1,06 (0,12)	1,19 (0,04)
K1060C	0,53 (0,09)	0,45 (0,04)	0,13 (0,02)	1,07 (0,03)	1,23 (0,06)
DC1060	0,52 (0,05)	0,43 (0,03)	0,17 (0,04)	1,01 (0,05)	1,34 (0,02)
<i>Baja Aerobiosis</i>					
K1060	0,47 (0,02)	0,30 (0,03)	-	0,31 (0,04)	0,34 (0,03)
K1060C	0,45 (0,01)	0,30 (0,04)	-	0,36 (0,02)	0,38 (0,01)
DC1060	0,45 (0,03)	0,32 (0,02)	-	0,34 (0,05)	0,38 (0,03)

Tabla 2: Velocidad de crecimiento máxima (μ_{max}) y biomasa final a las 24 hs (g/l) de las cepa K1060 (salvaje), DC1060 (creC) y K1060C (creC510) en tres fuentes de carbono y dos condiciones de aireación. Entre paréntesis se muestra el desvío estándar

Estos resultados no revelaron grandes diferencias entre las diferentes cepas en relación al crecimiento y biomasa final. Curiosamente, la cepa DC1060 fue capaz de crecer eficientemente en glicerol, en contraste con lo descrito en algunos trabajos previos [89].

Síntesis de ácidos orgánicos

Si bien otros grupos de trabajo ha publicado trabajos muy interesantes sobre las condiciones que detonan la activación de CreC [90], así como la secuencia nucleotídica a la que se estaría uniendo el regulador asociado CreB [89], poco se sabe sobre las consecuencias que tiene este sistema de regulación sobre el metabolismo central de *E. coli*. Estos trabajos sugirieron que la señal activadora es un compuesto presente en condiciones gluconeogénicas y fermentativas. En base a estas observaciones, es lógico esperar que este regulador posea un efecto sobre el metabolismo central del carbono. A esto se suma la evidencia aportada por trabajos previos realizados en el laboratorio [81], [85], [91], en los cuales se confirma la participación del alelo *creC510* en los altos niveles de catabolismo, asociados a un aumento en la concentración de NADH y NADPH detectados en cepas *arcA*. A fin de analizar el efecto de CreC sobre el metabolismo central del C, decidimos estudiar el efecto de las distintas mutaciones de CreC en

el perfil de producción de ácidos orgánicos. Las condiciones de aireación y fuentes de carbono empleadas fueron las mismas que para la determinación de los parámetros cinéticos.

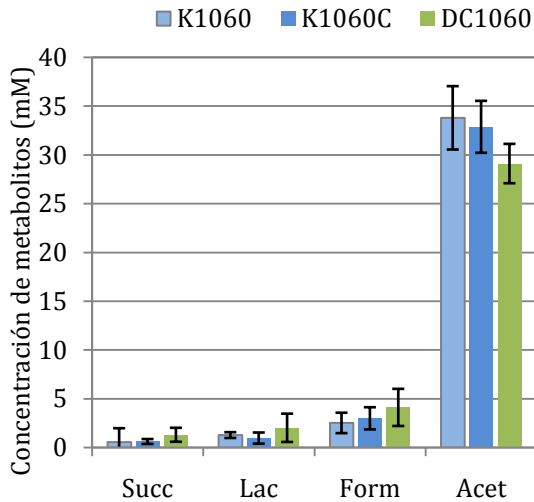
En M9 glucosa $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y con alta aireación [250 rpm, relación (volumen medio)/(volumen recipiente) = 1/10], los cultivos bacterianos dieron lugar a un perfil metabólico en el cual el acetato fue el producto preponderante. Los niveles de succinato, lactato, y formiato fueron para esta condición muy bajos. Las tres cepas produjeron niveles similares de estos metabolitos. Con glicerol sucedió algo parecido. El acetato producido fue menor que con glucosa, lo cual es de esperar dado que como señala Chang [92], la tasa de incorporación de glicerol no es lo suficientemente alta como para excretar grandes cantidades de acetato, un compuesto que se secreta en altas cantidades cuando existe un desbalance entre la velocidad de fuente de carbono incorporada (como en el caso de la glucosa) y la capacidad de la célula de metabolizarla. De esta forma el acetato funcionaría como una suerte de válvula de escape que evita la congestión de las rutas centrales de carbono por la acumulación de metabolitos en el citoplasma. Sin embargo, a diferencia de lo ocurrido con glucosa, con glicerol la cantidad de acetato producido fue menor en el caso de la cepa DC1060 ($\Delta creC$). Esta disminución llegó a ser de un 50% aproximadamente con respecto a la cepa salvaje (K1060) y la mutante constitutiva (K1060C), las cuales no variaron significativamente entre sí.

Cuando se disminuyó el nivel de aireación mediante una agitación más suave (125 rpm) y una relación (volumen de medio)/(volumen del recipiente) mayor (1/2), las células aumentaron la producción de metabolitos de fermentación y se detectaron en el sobrenadante succinato, lactato, y formiato en concentraciones muy superiores a las encontradas en la condición de alta aerobiosis. También se produjo ácido acético, pero a diferencia de los otros metabolitos mencionados, la concentración de este ácido disminuyó para todas las cepas, como se observa normalmente en cultivos de *E. coli*.

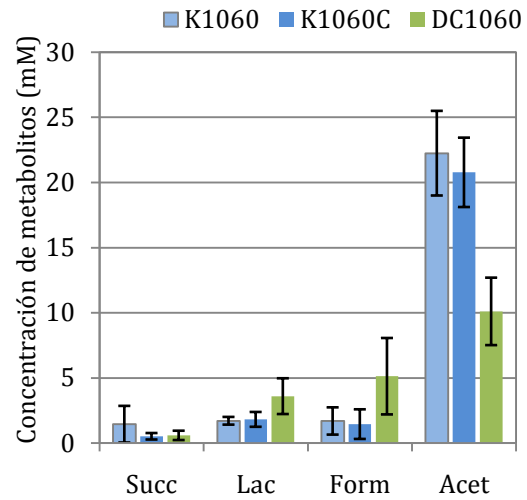
En el caso de los cultivos con glucosa, la cepa K1060C mostró diferencias pequeñas pero significativas en la síntesis de lactato y formiato con respecto a la cepa salvaje, de los cuales produjo 18% y 60% más respectivamente, mientras que para el resto de los metabolitos las diferencias no fueron significativas. Sin embargo, la cepa $\Delta creC$ dio lugar a un perfil de secreción de ácidos completamente distinto. En glucosa, las variaciones de la DC1060 con respecto a la K1060 fue de: 1100% más para succinato, 40% menos lactato, 190% más formiato y 20% más acetato. Para etanol hubo un pequeño aumento no significativo.

En glicerol, el acetato fue el único metabolito para el cual se observaron diferencias entre las cepas K1060 y K1060C, reportando una pequeña disminución en la mutante constitutiva. Las mayores diferencias fueron nuevamente observadas entre la cepa salvaje y DC1060. En este caso las variaciones fueron en las concentraciones de lactato, formiato y acetato de -40%, +150% y +17% respectivamente. El succinato pasó de ser indetectable para las cepas K1060 y K1060C, a sintetizarse en una concentración de 0,7 mM en la DC1060. El etanol, que no presentó diferencias significativas en ninguna de las otras condiciones estudiadas, se detectó en niveles 15 veces superiores en el sobrenadante de la cepa $\Delta creC$ a diferencia de lo observado en cultivos con glucosa.

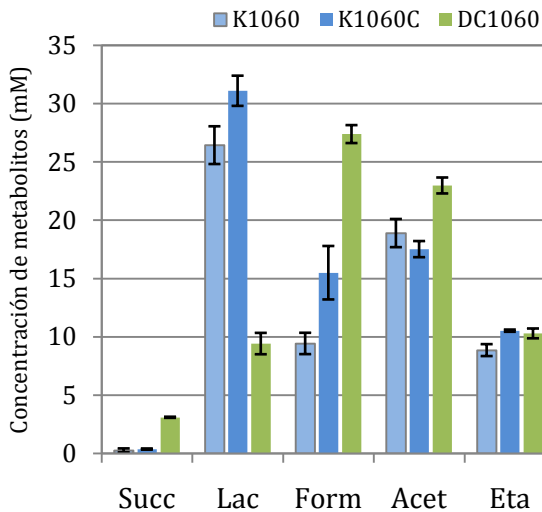
Alta aerobiosis - Glucosa



Alta aerobiosis - Glicerol



Baja Aerobiosis - Glucosa



Baja aerobiosis - Glicerol

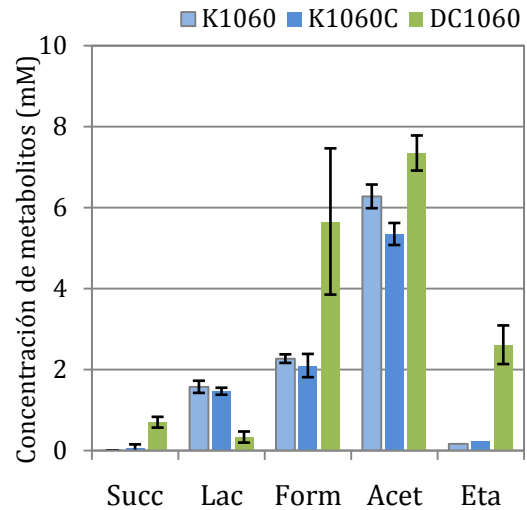


Gráfico 1: Perfil de secreción de ácidos de cultivos las cepas K1060 (salvaje), K1060C (*creC510*) y DC1060 ($\Delta creC$) crecidos en M9 con glucosa o glicerol como fuente de carbono. Los niveles de aireación fueron alto y bajo. Abreviatura: Succ, succinato; Lac, lactato; Form, formiato; Acet, acetato.

En uno de los primeros trabajos sobre CreBC, se observó que este regulador se activa en medio mínimo, y que cuando *E. coli* crece en condiciones en las cuales CreC se encuentra activo, una serie de genes sufre una regulación positiva, manifestando este hecho en un aumento en su transcripción [89]. Dos de estos genes constituyen el dueto *pta-ackA* (fosfotransacetilasa y acetato quinasa respectivamente), principal responsable de la producción de acetato. Unos años más tarde, un nuevo trabajo revisó los resultados del primero, redefiniendo las condiciones en las que CreBC está activo para incluir niveles de

aireación muy restringidos [90]. En base a estos dos trabajos, en los cuales hay varias imprecisiones a la hora de definir condiciones específicas, es posible deducir que los efectos de CreBC son muy sensibles tanto a las fuentes de carbono como a la disponibilidad de O₂. En nuestros experimentos, en los cuales todos los cultivos se hicieron en medio mínimo, observamos que la concentración de acetato producido por la cepa $\Delta creC$ es menor a la de la cepa salvaje solamente en alta aerobiosis, ya que en baja aerobiosis se observó el efecto opuesto. Estos resultados parecerían contradecir a los de los trabajos mencionados anteriormente.

Hay varios factores a considerar al momento de analizar estas discrepancias. Si analizamos las rutas metabólicas relacionadas con el metabolismo del acetato, vemos que existe otra vía importante de producción de este metabolito en *E. coli*, la de la piruvato oxidasa (*poxB*), una proteína de membrana periférica que convierte piruvato, ubiquinona y H₂O, en acetato, ubiquinol y CO₂. Su rol ha sido asociado al crecimiento aeróbico. Una posibilidad es que esta fuese la enzima responsable del aumento del acetato en las cepas $\Delta creC$, y no la acetato quinasa. También podría estar ocurriendo que en dichas cepas lo que estuviera afectado no fuera la síntesis de acetato, sino su consumo. Esta opción no es tan probable dado que durante el crecimiento en glucosa existe lo que se conoce como represión catabólica (ver introducción), por el cual el acetato no sería consumido en presencia de glucosa (recordemos que la concentración de glucosa utilizada en estos ensayos se encuentra en exceso por lo que, en el tiempo que lleva el experimento, no llega a consumirse totalmente).

Otra explicación alternativa podría involucrar niveles de regulación posteriores al transcripcional. Una mayor tasa de transcripción no garantiza niveles superiores de traducción ni de estabilidad de una proteína. Dado que las observaciones de Avison [12] están basadas en ensayos transcripcionales, no puede descartarse la existencia de instancias posteriores de control (postranscripcionales, transduccionales o postraduccionales), que pudieran explicar las discrepancias entre el efecto transcripcional reportado en trabajos anteriores y el perfil de ácidos observado en nuestros experimentos.

Si ninguna de estas hipótesis fueran ciertas, aún podríamos suponer que existe un efecto cepa-específico que genere discrepancias entre lo observado por el grupo de Avison y el nuestro. Fenómenos de este estilo, que se han atribuido a procesos de microevolución, se han observado en *E. coli* en trabajos que analizaron los reguladores RpoD, RpoS, σ^D, σ^{70} , σ^S , y ppGpp [93] [94], y para otras especies procariontas cuya regulación en los genes de virulencia es también cepa específico [95], [96].

Por otra parte, como hemos mencionado en la introducción, se ha observado un efecto regulador de CreC sobre la actividad fosfatasa alcalina, pero únicamente en ausencia del principal regulador del fosfato, PhoR, reflejando que existen efectos regulatorios que normalmente están enmascarados y que sólo son evidentes en contextos genéticos específicos. Dado que no se puede descartar la existencia de diferencias genotípicas entre las cepas (adicionales a las descritas en la literatura), sería posible que las diferencias observadas pudieran deberse a mutaciones desconocidas (en genes estructurales o regulatorios). Para poder descartar esta posibilidad sería necesario secuenciar completamente y comparar los genomas de las cepas involucradas, lo cual está por fuera de los objetivos de este trabajo.

En las secciones siguientes intentaremos echar luz sobre estas cuestiones, a través de experimentos diseñados para corroborar o descartar las explicaciones planteadas en las líneas precedentes.

Estudio de la actividad enzimática acetato quinasa (ACK) y lactato deshidrogenasa (LDH).

Caracterización enzimática de las cepas *creC* en distintos niveles de aireación.

Los ensayos hasta ahora descriptos nos han dado un panorama del rol de CreC sobre el metabolismo central de *E. coli*. En todas en las condiciones estudiadas se vieron efectos de este regulador global sobre el perfil de metabolitos producidos. Sin embargo, brindaron más información los cultivos realizados con glucosa como fuente de carbono. A raíz de estos resultados decidimos estudiar los efectos de las mutaciones a nivel de la actividad enzimática, que nos brinda una idea de la cantidad de enzima funcional presente en nuestro sistema.

La LDH fermentativa es una enzima soluble dependiente de NADH que convierte piruvato en ácido D-láctico. Esta reacción consume un NADH por piruvato, reciclando de esta manera el NADH generado durante la glicólisis. La LDH fermentativa se induce aproximadamente diez veces en cultivos anaeróbicos en pH ácidos. Aparte de la LDH codificada en el locus *ldhA*, existen otras dos enzimas homónimas en *E. coli*, la cuales son flavoproteínas unidas a membrana, acopladas a la cadena respiratoria y descritas como lactato oxidasas. Estas enzimas, una específica para el D-isómero y la otra para el L-isómero, son requeridas para el crecimiento aeróbico en lactato [97].

Por su parte, la actividad ACK es llevada a cabo por una enzima codificada en el locus *ackA*. La conversión de acetyl-CoA en acetato está mediada por ella y por una acetyl fosfotransferasa (codificada en el locus *pta*), las cuales convierten al acetyl-CoA en acetato vía acetyl fosfato, como una forma de direccionar el flujo excedente y también convierte el acetato exógeno nuevamente en acetyl-CoA [98]. Por otro lado, sabemos que el gen *ackA* se encuentra regulado por CreBC, pero no hay ningún dato en la bibliografía que sugiera que *ldhA* esté sujeta a la regulación por este sistema. Si a esto sumamos el hecho de que, según nuestros resultados, la regulación de uno y del otro serían antagónicas (cuando uno se activa el otro se inactiva por la ausencia de CreC) resulta interesante utilizar los productos de estos dos genes como testigos del efecto del regulador global en cuestión.

Con este objetivo, se determinó la actividad enzimática de acetato quinasa (ACK) y lactato deshidrogenasa (LDH) presente en *pellets* celulares provenientes de cultivos crecidos en tres niveles de aireación: alta, baja/micro, y anaerobiosis. Se eligió además una condición extra a modo de control negativo (alta aerobiosis, en medio rico LB) en la que sabemos por bibliografía que CreC se encuentra inactivo. Las cepas estudiadas fueron la K1060, la K1060C y la DC1060, en la fase exponencial de su crecimiento (6-8hs). Para estos estudios se agregó al

medio citrato férrico, debido a que este compuesto demostró incidir positivamente en el crecimiento celular (ver Capítulo II). En paralelo se corrieron en HPLC los sobrenadantes de estos cultivos al momento de ser cosechados (6-8 hs aprox.) y a las 24hs, para corroborar que en la etapa temprana del crecimiento el perfil de ácidos era similar al de 24hs.

Comenzando por la actividad ACK, en LB y en M9 alta aerobiosis, no se observan diferencias significativas entre las cepas, como tampoco hay (para M9 Alta Aerobiosis en fase exponencial) una mayor producción de acetato (**Gráfico 2**). Al disminuir el grado de aireación (BA), la actividad acetato quinasa aumenta en la cepa DC1060 con respecto a la K1060 (+50%). También es mayor en esta cepa con respecto a la salvaje, la cantidad de acetato liberado al medio (79 ± 7 mol/g vs. 53 ± 5 mol/g, resp.). Al pasar a una condición de anaerobiosis, esta tendencia se conservó, tanto a nivel enzimático como a nivel de metabólico. La actividad ACK fue mayor en la cepa mutante $\Delta creC$ (+50%) y además produjo más acetato, aunque en este caso los valores relativizados a la biomasa son equivalentes. En anaerobiosis el crecimiento de las cepas K1060 y K1060C fue paupérrimo. La biomasa final fue menor en estas cepas a la de la DC1060 y la formación de flóculos fue mayor.

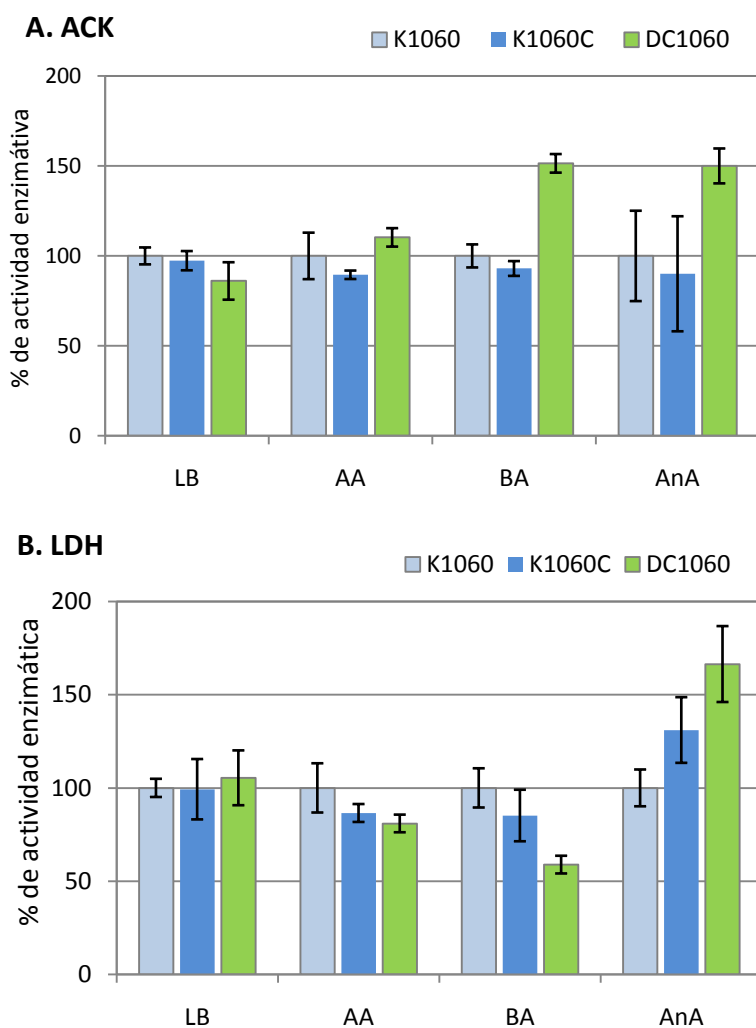


Gráfico 2. Actividades enzimáticas ACK (A) y LDH (B) de cultivos realizados en LB con alta aerobiosis (LB), y en M9 glucosa 30 g/l en condiciones de alta aerobiosis (AA), baja aerobiosis (BA) o anaerobiosis total (AnA). Los valores de actividad enzimáticas están relativizados a los valores de AE de la cepa control (K1060) de cada tratamiento y expresados en forma porcentual para su mejor comprensión.

Respecto a la actividad LDH, en LB y en M9 alta aerobiosis, al igual que lo ocurrido con la ACK, no se observaron diferencias entre las distintas cepas. En baja aerobiosis, la actividad LDH es mayor en la cepa K1060 con respecto a la DC1060 (+65% aprox.), pero en anaerobiosis esto se revierte y la cepa $\Delta creC$ es la que pasa a manifestar una mayor actividad LDH, superándola en más de un 60% a la cepa salvaje. Este dato es compatible con las cantidades de lactato secretadas a las 24hs por sendas cepas. Sin embargo, en la fase exponencial no se observaron diferencias significativas en la cantidad de este ácido.

La cepa K1060C, con la expresión constitutivamente activa de CreC, no presentó en ninguno de los tratamientos, diferencia alguna respecto de la cepa salvaje. Los valores promedio se mantuvieron cercanos a los de la K1060, o intermedios entre ésta y la DC1060, pero con desvíos importantes en estos casos.

Como corolario de estos experimentos podríamos decir que las diferencias observadas en la síntesis de ácido acético y ácido láctico entre la cepa salvaje y la mutante $\Delta creC$ son, por lo menos en parte, el resultado de actividades ACK (vía *pta-ackA*) y LDH (*ldhA*) alteradas. No podemos descartar que haya más factores implicados, como vías alternativas de síntesis/degradación, distinta disponibilidad de sustratos, etc, pero sería poco probable que existiese margen para que más factores puedan sumarse al de las actividades enzimáticas, siendo las diferencias entre las cepas salvaje y $\Delta creC$ tan categóricas. En este sentido, como mencionamos para el caso de LDH en anaerobiosis, la variación en la actividad enzimática entre estas dos cepas, es mayor que la diferencia en la cantidad de ácidos producida. Dicho de otro modo, si la cantidad de producto de una enzima dependiera solamente de la cantidad presente de esta enzima (no hubiese reactivos limitantes, y las condiciones intracelulares fueran idénticas), a juzgar por las actividades enzimáticas registradas, deberíamos ver variaciones mayores en las concentraciones de sus productos entre una cepa y la otra. Eso podría indicar la existencia de otros mecanismos que estén atenuando las diferencias vistas en las actividades enzimáticas respecto de los productos cuya formación catalizan.

Efectos del citrato férrico en la síntesis de ácidos orgánicos.

En experimentos de biorreactor que se van a detallar en el siguiente capítulo, se demostró que el hierro, en forma de citrato férrico o citrato férrico amoniacal, es capaz de mejorar el crecimiento de nuestra cepa en el medio mineral utilizado. Este hallazgo hizo que nos planteáramos las posibilidades de seguir nuestros experimentos con o sin el agregado de este micronutriente. Dado que buena parte de nuestro trabajo se enfoca directa o indirectamente en potenciales aplicaciones biotecnológicas, nos pareció acertado incorporarlo en nuestros experimentos. Sin embargo, debíamos comprobar que los efectos de CreC que estábamos estudiando se conservaran, si no en términos absolutos, por lo menos en términos relativos, demostrando que los mismos no dependían de la presencia o ausencia de este micronutriente. Por este motivo repetimos los ensayos de 24 horas en alta aerobiosis y baja aerobiosis, con citrato férrico en M9 glucosa 30 g/l.

Comparando la biomasa alcanzada en los ensayos en M9 con y sin hierro, vemos una diferencia significativa en la condición de alta aerobiosis (Tabla 3). Sin hierro el cultivo creció hasta llegar a una biomasa de aproximadamente $1,05 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ en todas las cepas estudiadas,

mientras que con hierro la biomasa final fue algo mayor, en torno a los $1,26 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Los cultivos de microaerobiosis se mantuvieron en valores similares de biomasa ($0,35 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), pero con hierro la cepa K1060 tuvo un valor algo mayor al de la DC1060. En anaerobiosis, una nueva condición en los estudios que realizamos, los niveles de biomasa alcanzados por las cepas salvaje y la mutante constitutiva, fueron significativamente inferiores, quedando en valores cercanos a la mitad. A simple vista pudo observarse en los tubos de las cepas K1060 y K1060C la presencia de flóculos, indicando que en estas condiciones las células estaban atravesando algún tipo de estrés.

En lo que respecta a la producción de ácidos, en aerobiosis los cultivos con hierro produjeron menos ácido acético (aproximadamente la mitad), siendo éste el principal producto en esta condición. Como veremos en la siguiente sección, los cultivos de biorreactor, al agregárseles citrato férrico, disminuyeron la producción de acetato relativa a la biomasa de $75 \text{ mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (mol de producto por gramo de biomasa) a $42 \text{ mol}\cdot\text{g}^{-1}$, indicando un efecto del hierro negativo sobre la síntesis de este compuesto (Tabla 13).

En baja aerobiosis, si bien las tendencias entre las cepas se conservaron, también se registró una disminución en la cantidad de metabolitos sintetizados. El lactato fue el que más varió, pasando de $18\pm 2 \text{ mM}$ sin hierro a $26\pm 2 \text{ mM}$ con hierro en la K1060 y de $4\pm 2 \text{ mM}$ a $9\pm 1 \text{ mM}$ en la DC1060. El formiato varió también, pero más significativamente en la cepa mutante $\Delta creC$: de $15\pm 1 \text{ mM}$ sin hierro pasó a $27\pm 1 \text{ mM}$ con hierro. En el acetato, sin embargo, no se registraron mayores diferencias en esta condición.

La condición de anaerobiosis, que no había sido estudiada previamente, también se ensayó. Si consideramos la cantidad producida de cada metabolito relativo a la biomasa, vemos que estos aumentaron al pasar de una condición microaeróbica a una anaeróbica. El etanol se destacó en este sentido al aumentar siete veces su concentración en la cepa K1060 ($43\pm 9 \text{ mol}\cdot\text{g}^{-1}$ a $300\pm 67 \text{ mol}\cdot\text{g}^{-1}$). Algo más de tres veces aumentó en la DC1060 ($47\pm 4 \text{ mol}\cdot\text{g}^{-1}$ vs. $149\pm 12 \text{ mol}\cdot\text{g}^{-1}$). Algo llamativo ocurrió con el acetato, el cual ya no fue producido en mayor concentración por la cepa salvaje, si no que esta vez fue mayor en la cepa mutante $\Delta creC$.

Podemos decir entonces que el citrato férrico, si bien puede incidir en la cantidad absoluta de algunos metabolitos, no afecta las diferencias asociadas a los efectos de CreC, y que tiene un efecto positivo sobre el crecimiento, fundamentalmente en condiciones de alta aerobiosis, y más leve en baja aerobiosis.

24hs	X	Succinato		Lactato		Formiato		Acetato		Etanol	
	g/L	mM	mM/g	mM	mM/g	mM	mM/g	mM	mM/g	mM	mM/g
Alta Aerobiosis											
K1060	1,29 (0,02)	0,5 (0,1)	0,4 (0,1)	1,0 (0,1)	1,0 (0,1)	ND	ND	18 (3)	14 (2)	12 (2)	9,0 (1,0)
K1060C	1,25 (0,01)	1,3 (1,3)	1,0 (1,0)	2,0 (0,1)	1,0 (0,1)	ND	ND	16 (1)	12 (1)	11 (1)	9,0 (0,1)
DC1060	1,25 (0,01)	0,3 (0,0)	0,3 (0,1)	1,0 (0,1)	1,0 (0,1)	ND	ND	13 (1)	11 (1)	7 (1)	6,0 (0,1)
Baja Aerobiosis											
K1060	0,39 (0,02)	0,10 (0,01)	0,4 (0,1)	18 (2)	46 (8)	7 (1)	17 (3)	21 (2)	53 (5)	16 (3)	43 (9)
K1060C	0,35 (0,02)	0,20 (0,01)	0,5 (0,1)	17 (2)	48 (8)	8 (1)	22 (3)	19 (1)	54 (1)	17 (1)	48 (1)
DC1060	0,33 (0,01)	2,00 (0,20)	5,9 (0,5)	4 (2)	11 (4)	15 (1)	44 (3)	26 (2)	79 (7)	16 (2)	47 (4)
Anaerobiosis											
K1060	0,09 (0,01)	0,2 (0,1)	ND	12 (1)	48 (5)	16 (1)	115 (21)	8 (1)	57 (9)	26 (1)	300 (67)
K1060C	0,08 (0,01)	0,1 (0,2)	3,1 (1,5)	11 (2)	47 (8)	15 (2)	135 (13)	7 (1)	65 (6)	25 (1)	369 (59)
DC1060	0,23 (0,01)	1,8 (0,1)	9,4 (0,9)	16 (1)	77 (7)	22 (1)	116 (10)	11 (1)	61 (4)	28 (2)	149 (12)
Exponencial											
Alta Aerobiosis											
K1060	0,39 (0,04)	ND	ND	0,7 (0,1)	1,8 (0,4)	0,6 (0,4)	1,5 (1)	5,6 (0,3)	14 (1)		
K1060C	0,32 (0,10)	ND	ND	1,1 (0,2)	3,9 (1,7)	1,7 (0,5)	6,0 (3)	5,1 (1,0)	16 (2)		
DC1060	0,37 (0,08)	1,0 (1,7)	3,6 (6,0)	0,2 (0,1)	0,6 (0,2)	0,8 (0,7)	2,0 (2)	5,9 (1,0)	15 (1)		
Baja Aerobiosis											
K1060	0,15 (0,02)	ND	ND	8,0 (0,3)	55,0 (8,6)	3,5 (0,1)	24 (2)	4,1 (0,2)	28 (4)		
K1060C	0,15 (0,01)	ND	ND	8,0 (0,8)	43,1 (2,2)	4,0 (0,4)	31 (3)	4,2 (1,2)	30 (9)		
DC1060	0,12 (0,01)	1,1 (0,1)	9,1 (0,9)	2,0 (0,5)	16,0 (3,7)	9,7 (0,4)	77 (4)	7,5 (0,6)	59 (5)		
Anaerobiosis											
K1060	0,11 (0,04)	ND	ND	1,0 (0,6)	10,1 (8,5)	7,9 (2,1)	79 (6)	4,0 (1,3)	40 (9)		
K1060C	0,08 (0,01)	ND	ND	1,1 (0,6)	11,7 (7,6)	6,8 (0,4)	78 (1)	3,4 (0,2)	39 (1)		
DC1060	0,24 (0,01)	1,0 (0,1)	4,2 (0,4)	1,0 (0,4)	4,0 (1,4)	13,6 (1,5)	56 (5)	8,0 (1,4)	33 (7)		

Tabla 3. Biomasa y metabolitos presentes en cultivos de M9 glucosa 30 g/L con citrato férrico a las 24hs y en fase exponencial. Las concentraciones de ácidos están expresadas en valores absolutos (mM) o relativizados a la biomasa (mol/g). Entre paréntesis se muestra el desvío estándar. ND: no detectado.

Análisis de la participación del regulador de la respuesta CreB, en el fenotipo metabólico de las cepas *creC*.

Como mencionamos en la introducción, el regulador de la respuesta de CreC es CreB. Esta proteína es homóloga a *phoB*, la cual es a su vez el RR de *phoR*, regulador del regulón Pho [15]. Esta similitud es probablemente la responsable de que CreC sea capaz de interactuar con ambas. Más allá de estos datos, no se conocen interacciones de CreC con otras moléculas regulatorias, pero no es posible descartar que las haya.

Para saber si los efectos de CreC sobre el metabolismo central de *E. coli* que observamos en nuestros ensayos se dan vía *creB*, construimos mutantes nulas del gen *creB* y del par de genes *creBC*, mediante la misma técnica de Datsenko descrita en materiales y métodos. De esta forma contamos con un repertorio de cuatro cepas: la cepa K1060 (salvaje para *creBC*), las cepa DB1060 ($\Delta creB$), la DC1060 ($\Delta creC$), y la doble mutante DBC1060 ($\Delta creBC$).

Los ensayos se realizaron con M9 glucosa (30 g/l) como fuente carbono y citrato férrico, en las dos condiciones donde vimos un claro efecto de CreC a nivel fisiológico: i) baja aerobiosis y ii) anaerobiosis. Si el perfil de ácidos varía de la misma forma dentro del conjunto de mutantes respecto de la cepa salvaje, estaríamos en condiciones de decir que CreC y CreB son ambas necesarias y suficientes para producir el fenotipo que hemos observado en las mutantes *creC*. En otras palabras, CreC dependería sólo de CreB y viceversa en lo que respecta a los efectos metabólicos observados en *E. coli*.

Condición/cepa	X (DO _{600nm})	Succinato (mM)	Lactato (mM)	Formiato (mM)	Acetato (mM)
Baja Aerobiosis					
K1060	1,20 (0,05)	0,2 (0,1)	22,8 (1,0)	10,4 (0,4)	20,9 (0,2)
DB1060	1,22 (0,05)	2,4 (0,2)	8,8 (0,5)	18,2 (1,1)	27,5 (0,0)
DC1060	1,14 (0,02)	2,4 (0,1)	10,5 (0,2)	18,5 (0,1)	26,8 (0,8)
DBC1060	1,11 (0,02)	2,3 (0,1)	9,1 (1,3)	17,3 (1,3)	26,3 (2,8)
Anaerobiosis					
K1060	0,43 (0,06)	0,4 (0,4)	8,3 (2,7)	12,3 (2,9)	6,1 (2,2)
DB1060	0,65 (0,06)	2,1 (0,3)	12,1 (2,7)	22,1 (2,6)	11,8 (1,6)
DC1060	0,69 (0,05)	2,1 (0,8)	12,8 (2,5)	23,6 (3,0)	12,9 (2,6)
DBC1060	0,66 (0,03)	2,1 (0,1)	15,1 (0,2)	20,8 (0,1)	11,4 (0,6)

Tabla 4. Biomasa (densidad óptica medida a 600 nm) y metabolitos presentes en cultivos de M9 glucosa 30 g/L con citrato férrico a las 24hs. Las concentraciones de ácidos están expresadas en valores absolutos (mM). Entre paréntesis se muestra el desvío estándar.

En baja aerobiosis la similitud entre las cepas mutantes se puede apreciar a simple vista. Los metabolitos que más difieren entre la cepa salvaje y el conjunto de las mutantes son el lactato y el formiato, el primero siendo el doble en la cepa K1060 respecto a las mutantes, y el formiato duplicándose en estas últimas respecto a la K1060. Respecto al crecimiento, todas las mutantes se

desempeñaron de forma similar, en torno al margen de densidad óptica de 1,15 aprox. La doble mutante no sumó en magnitud los efectos de las simples mutantes, lo cual es consistente con el hecho de que los efectos vistos en cada mutante se generan al afectarse el mismo mecanismo regulatorio.

Si bien en baja aerobiosis demostramos que los efectos de CreC se dan vía CreB, esto no debería ser necesariamente cierto para lo que ocurre en ausencia total de oxígeno. En estas condiciones, frente a un concierto distinto de reguladores operando sobre la expresión génica, podríamos ver que CreC ya no ejerce su rol exclusivamente vía CreB, sino que podría estar fosforilando otros reguladores de respuesta. Nuestros ensayos en frasco agitado sobre el perfil de ácidos estaría indicando que esto no es así, es decir, que en ausencia de oxígeno, tal como ocurre en baja aerobiosis, CreC operaría excluyentemente en combinación con CreB para producir los cambios fenotípicos descritos. La similitud entre los metabolitos estudiados es mayor entre las cepas mutantes, que entre alguna de ellas y la cepa salvaje.

Dado que el crecimiento de la cepa K1060 fue marcadamente diferente al de las cepas mutantes (como vimos que ocurría en los ensayos previos de actividad enzimática) realizamos curvas de crecimiento para comparar el comportamiento de las cuatro cepas.

Todas las cepas mutantes de este ensayo crecieron de la misma forma, con la típica fase exponencial seguida de una fase estacionaria. La cepa salvaje, en cambio, mostró una dinámica completamente distinta, con grandes dificultades para crecer. Como se mencionó en la sección precedente, hacia el final de los cultivos anaeróbicos se podía observar que la cepa K1060 presentaba flóculos, síntoma de algún tipo de estrés que pudiera estar sufriendo.

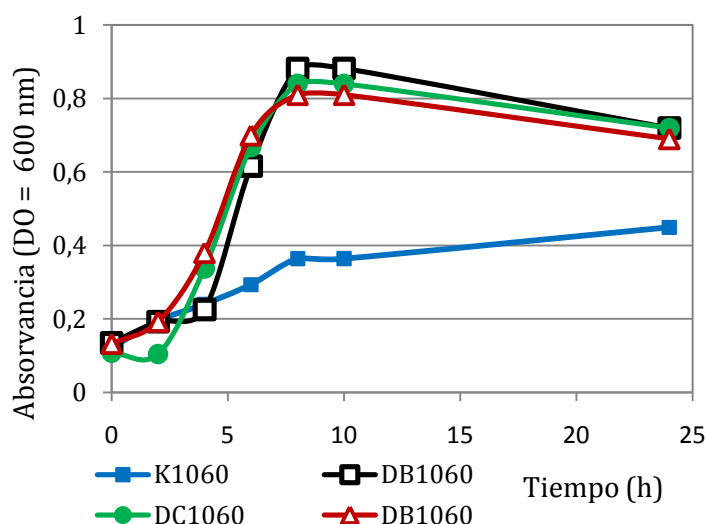


Gráfico 3. Curvas de crecimiento de cepas K1060, DB1060, DC1060 y DBC1060 en anaerobiosis con M9 glucosa 30 g/l y citrato férrico.

Para ver si era posible contrarrestar este efecto tan marcado sobre el crecimiento de K1060, se crecieron en las mismas condiciones distintos cultivos de esta cepa con variaciones en el medio de cultivo (con y sin CaCl_2 , tiamina, bicarbonato de sodio, con pequeñas cantidades de extracto de levadura y triptona), pero ninguna permitió mejorar de forma significativa el crecimiento de la

cepa salvaje, lo cual estaría indicando que este pobre crecimiento no es producto de alguna auxotrofia condicional.

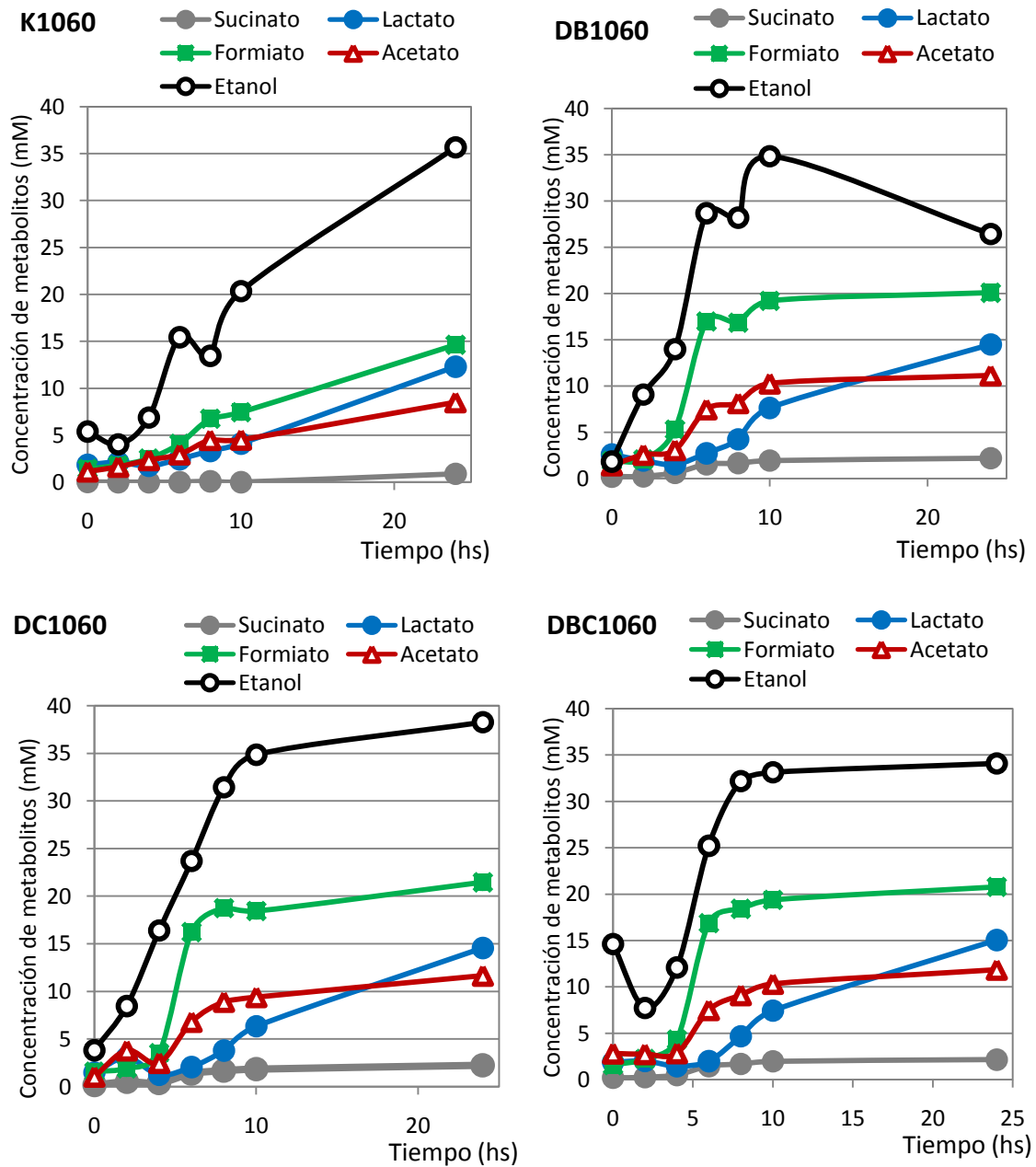


Gráfico 4. Cultivos en anaerobiosis de K1060, DC1060, DB1060 y DBC1060. El medio empleado fue M9-glucosa 30 g/L con citrato férrico. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado. Los resultados exhibidos corresponden a un experimento representativo.

De esta forma, sin haber podido mejorar el desempeño de la cepa K1060 respecto de la formación de biomasa en anaerobiosis, decidimos comparar la cinética de formación de productos de secreción entre las cuatro cepas (K1060, DB1060, DC1060, DBC1060). Para ello se siguió la

producción de ácidos orgánicos y etanol en función del tiempo en condiciones de anaerobiosis con medio M9 glucosa 30 g/l.

Los resultados pueden verse en el gráfico (Gráfico 4. Cultivos en anaerobiosis de K1060, DC1060, DB1060 y DBC1060). El medio empleado fue M9-glucosa 30 g/L con citrato férrico. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado. Los resultados exhibidos corresponden a un experimento representativo. A primera vista, las cepas mutantes produjeron los metabolitos de la misma forma, con dos claras etapas determinadas por el crecimiento celular. A las seis horas de comenzado el cultivo, las cepas mutantes dejaron de producir formiato y acetato. Un par de horas más tarde se detuvo la síntesis de etanol, cuando los cultivos ya estaban definitivamente en la fase estacionaria. El lactato, sin embargo, comenzó a ser significativa a partir de la hora seis, y continuó aumentando pese a haberse detenido el crecimiento celular.

La cepa K1060 en cambio, presentó una dinámica completamente distinta. En principio no se observan dos etapas distintas en la secreción de metabolitos. A partir de la cuarta hora, el etanol en sobrenadante aumenta y sigue aumentando hasta el final del cultivo (32 mM). Los otros ácidos comienzan a aumentar a partir de la hora seis. Las principales diferencias entre la cepa salvaje y la mutante son nuevamente los ácidos fórmico y acético.

Con todo esto, podemos concluir que entre las cepas mutantes analizadas hasta aquí no vemos diferencias en cuanto al crecimiento celular y al perfil de ácidos, con lo cual los efectos observados en baja aerobiosis y anaerobiosis serían producto de la interacción de CreC con CreB exclusivamente.

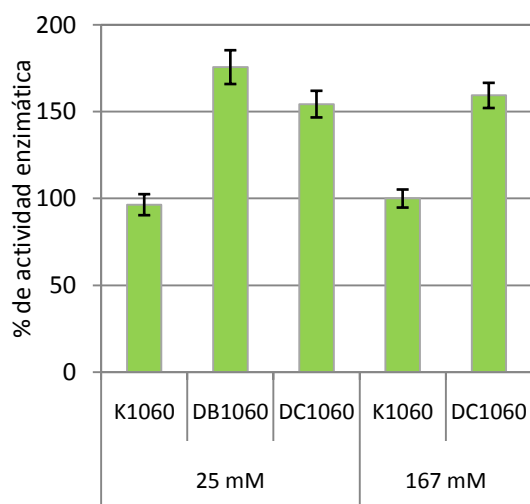
Coefficientes [etanol]/[acetato] y evaluación de la concentración de la fuente de carbono en la actividad regulatoria de CreC

Estudios previos de nuestro equipo de investigación se centraron, como ya lo hemos mencionado, sobre el efecto del regulador ArcA sobre el metabolismo de *E. coli* en cepas *creC510* (constitutivo). La mayor parte de los ensayos realizados muestran un efecto concertado entre ambos reguladores, pero son de difícil comparación con nuestros resultados dado que permanentemente se analiza la contribución de ambos, agregando la variable *arcA* al análisis. Sin embargo, en un trabajo de 2009, Nickel realiza experimentos con la cepa K1060 y una derivada ($\Delta creB$), la cual denomina IV1060 [87]. Dado que la cepa IV1060 es isogénica respecto a nuestra cepa $\Delta creB$, DB1060, podrían compararse los resultados. Los experimentos que realiza Nickel en este trabajo van desde el análisis de metabolitos producidos, hasta la medición de la actividad enzimática. Sin embargo, la dificultad interpretativa que se presenta es en relación a las condiciones de crecimiento. En sus experimentos, el sistema utilizado para cultivar los microorganismos es el de lote continuo, con un régimen de oxígeno y glucosa limitado, mientras que en nuestro caso utilizamos frascos agitados con glucosa en exceso. Cuando se comparan los resultados de ambos trabajos se observan diferencias en las concentraciones de metabolitos. En el trabajo de Nickel la mutante produce menor cantidad de etanol y de los ácidos acético y fórmico, aunque no hubo diferencias en la síntesis de lactato. Al medir las actividades de algunas enzimas, observaron que tanto las actividades de LDH y de ACK eran menores para la cepa

mutante. En nuestros experimentos, la actividad de ACK fue mayor para la mutante, acompañada por una mayor producción de acetato. Sin embargo, la actividad LDH en ambos trabajos fue menor para la mutante.

Para evaluar si las diferencias en los resultados obtenidos por Nickel con los nuestros se debía a la concentración de glucosa empleada, realizamos cultivos en medio mínimo M9 con citrato férrico y una concentración de glucosa de 25mM, la cual es casi 7 veces menor a la empleada previamente por nosotros (167mM o 30g/l). Comparamos así las actividades ACK y LDH de las cepas K1060 y DB1060 crecidas en M9 glucosa 25mM con citrato férrico. También probamos las actividades enzimáticas de la cepa DC1060 en ambas concentraciones para ver si la concentración de la fuente de carbono condicionaba los efectos visto en los ensayos anteriores.

A. ACK



B. LDH

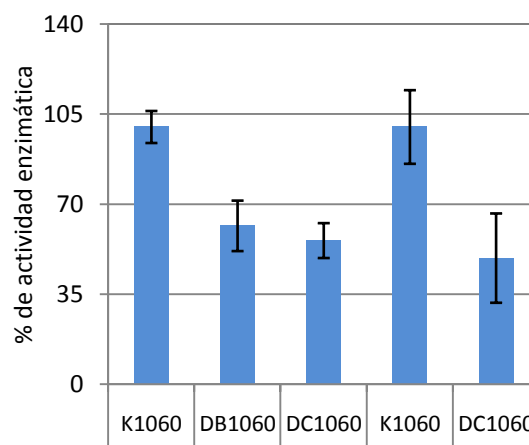


Gráfico 5: Actividades ACK (A) y LDH (B) de cultivos crecidos en baja aerobiosis y medio M9 con dos concentraciones distintas de glucosa para las cepas K1060 (25mM y 167mM), DB1060 (25mM) y DC1060 (25mM y 167mM). Los cultivos se cosecharon en fase exponencial. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Con 25mM de glucosa la cepa DB1060 se comportó exactamente igual que la DC1060 con respecto a la cepa salvaje (Gráfico 5). La actividad ACK fue mayor en las mutantes y si bien el incremento medio de estas en relación a la K1060 no fue idéntico (70% y 50% respec.) son estadísticamente similares ($P < 0,05$). Al comparar las concentraciones de glucosa ensayadas, vemos que ambas producen un incremento del 50% en la actividad ACK en la cepa DC1060 respecto a la cepa salvaje, a la vez que inducen una disminución también del 50% en la actividad LDH en la mutante respecto de la salvaje.

Estos resultados estarían indicando tres cosas: (i) que concentraciones de glucosa bajas son suficientes para observar un efecto de CreBC sobre las actividades enzimáticas estudiadas (ii) que aparentemente la concentración de glucosa no es el factor determinante para explicar las diferencias entre los dos trabajos, que podrían entonces deberse a otros factores en los que

difieren en las condiciones de cultivo empleadas (iii) que se confirma la necesaria interacción entre CreB y CreC para detonar los efectos observados hasta ahora.

Al analizar más detalladamente los resultados de ambos trabajos, se observa una coincidencia en la relación de coeficientes [etanol]/[acetato] entre las cepas salvaje y mutante, reflejando que la cepa mutante tiene un estado intracelular más oxidado. En el caso del trabajo de Nikel, este coeficiente fue de $0,47 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ para la cepa salvaje (K1060) y $0,35 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ para la mutante *creB* (IV1060), es decir, la cepa mutante estaba un 25% más oxidada que la salvaje. Los coeficientes obtenidos en el presente trabajo, que se muestran en la Tabla 5, indican la misma relación entre los estados redox intracelulares (una disminución del 26% de la mutante con respecto de la salvaje en baja aerobiosis).

Capa	Alta Aerobiosis	Baja Aerobiosis	Anaerobiosis
K1060	0,64	0,80	3,45
K1060C	0,73	0,90	3,77
DC1060	0,56	0,60	2,68

Tabla 5: Coeficientes Etanol/Acetato obtenido en cada condición estudiada (Alta, baja y anaerobiosis).

Evaluación de los posibles efectos de CreC sobre la regulación transcripcional de los genes *ackA*, *ldhA* y *focA*.

Con el objeto de estudiar si el aumento de la actividad enzimática ACK y LDH tiene un origen transcripcional, construimos una serie de plásmidos con el gen reportero *gfp*. El sistema seleccionado fue diseñado y corroborado por el equipo de trabajo de Alon [82]. El vector utilizado fue pUA66, en el cual se insertaron las regiones promotoras de los genes *ldhA* y *ackA* a partir de fragmentos clonados por PCR. Los *primers* empleados fueron los mismos que utilizó Alon para construir la biblioteca de promotores que está descrita en la anterior cita. Dichos *primers* contienen la región de corte de dos enzimas de restricción (XhoI y BamHI), lo cual permite clonar direccionadamente el producto de amplificación. Además de los genes mencionados, se incluyó el promotor del operón *focA-pflB*, el cual codifica el transportador de formiato FocA y un componente (PflB) de la enzima piruvato-formiato liasa, la cual produce formiato y acetil-CoA a partir de piruvato y Coenzima A. En este caso, los *primers* utilizados contienen las enzimas XhoI y BglII.

Una vez contruidos y verificados los plásmidos por restricción y secuenciación, se transformaron en las cepas K1060 y DC1060 para comparar sus niveles de transcripción, además del vector vacío que fue utilizado como control negativo.

Medición de la actividad reportera en fluorímetro.

En una primera ronda de ensayos buscamos medir la fluorescencia de la proteína Gfp en un fluorímetro (Fluostar Optima) utilizando placas multipocillos preparadas para tales propósitos. Los valores de fluorescencia se normalizaron por los valores de DO y para cada cepa se restó dicho cociente con el obtenido con la cepas control (K1060/pUA66 y DC1060/pUA66). Los ensayos se realizaron en medio M9 glucosa con citrato férrico, y baja aireación. Se tomaron muestras en la fase exponencial (8h, $DO_{600nm}=0,7$ aprox.) y a las 24h.

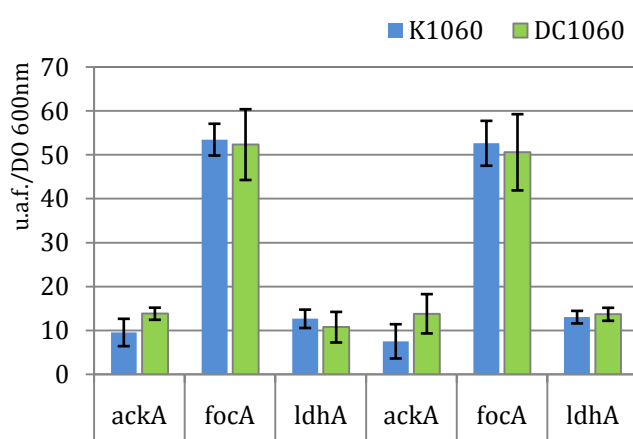


Gráfico 6. Ensayos de actividad promotora de los genes *ackA*, *focA* y *ldhA* en M9 glucosa a las 6h y 24h. La proteína reportera es Gfp. La medición se realizó en un fluorímetro Fluostar Optima con placas de 96 pocillos de células separadas del medio de cultivo por centrifugación y resuspendidas en solución fisiológica. En el eje de ordenadas se representa el cociente entre las unidades arbitrarias de fluorescencia (u.a.f.) que mide el equipo y la absorbancia. A este cociente se le descontó la fluorescencia basal correspondiente a cada cepa conteniendo el plásmido vacío.

En estos ensayos no se pudieron ver diferencias significativas en la expresión del promotor de *ackA* en los puntos analizados (Gráfico 6). Lo mismo podría decirse para el promotor *ldhA*. Sin embargo, está claro que estos resultados no son informativos. Más aún, los valores de fluorescencia del control negativo fueron inferiores pero no muy distintos a los que se obtuvieron para algunas cepas, entre ellas, las que portaban el gen *focA*. Esto podría estar sugiriendo dos cosas: (i) que no se estaba expresando correctamente el gen *gfp* en las distintas construcciones y por este motivo no se vieron diferencias entre las cepas o (ii) el método no es lo suficientemente sensible como para detectar las diferencias. En una segunda aproximación, se midieron por citometría de flujo las mismas muestras fijadas con paraformaldehído, aprovechando que esta técnica es capaz de medir la fluorescencia célula por célula, lo que permite incluso distinguir subpoblaciones dentro de la misma muestra. A continuación se detallan los resultados obtenidos.

Medición de la actividad reportera por citometría de flujo.

Corroboración de la correcta expresión de los sistemas reporteros

Las mismas muestras utilizadas para medir por fluorimetría previa fijación utilizando paraformaldehído 2% (concentración final), fueron analizadas utilizando un citómetro de flujo.

Para contestar el primer interrogante, acerca del correcto funcionamiento del sistema reportero, comparamos la intensidad de fluorescencia para ambos puntos (8h y 24h) y ambas cepas receptoras (K1060 y DC1060). La comparación se estableció entre las construcciones con los promotores de los genes a estudiar (*ackA*, *focA* y *ldhA*) y el plásmido vector (con el gen *gfp* sin promotor). Como se muestra en el Gráfico 7, las construcciones pUA-*ldhA* y pUA-*ackA* son funcionales en ambas cepas y en los dos puntos muestreados, con intensidades medias que son un orden de magnitud mayores a las del vector vacío. La construcción con el promotor de *focA* (pUA-*focA*), en cambio, se comportó como el vector vacío, sugiriendo que dicho plásmido no es funcional.

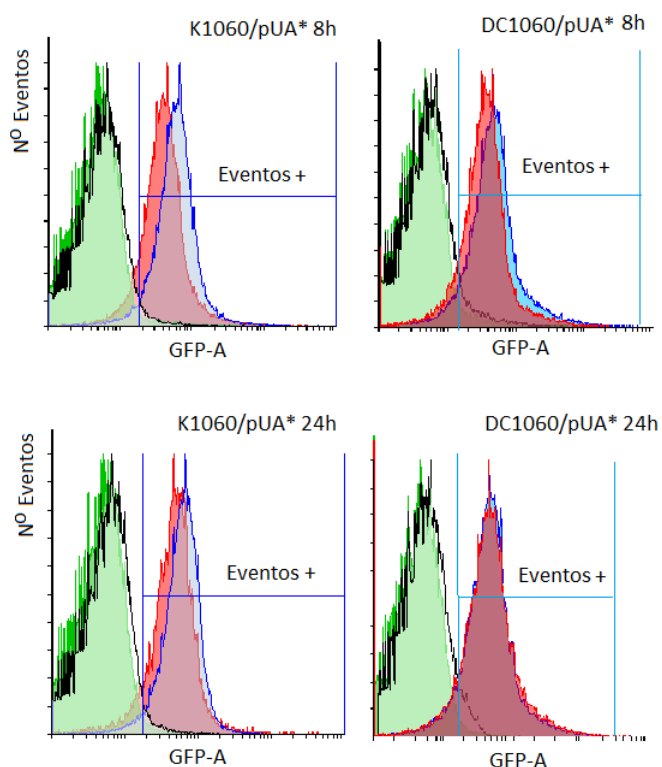


Gráfico 7 . Superposición de histogramas (número de eventos vs intensidad) de células que expresan o no *gfp* con los distintos promotores estudiados (*PackA*, *PfocA*, *PldhA*) o el vector vacío (pUA66). Por cada réplica se registraron 10.000 eventos. Los histogramas son representativos de cada juego de réplicas. Se consideraron como eventos celulares positivos, aquellas que quedaron ubicadas en la región delimitada por la barra azul en H. pUA66 vacío, blanco; pUA-*focA*, verde; pUA-*ackA*, roja; pUA-*ldhA*, azul.

Medición de la actividad reportera de *ackA* y *ldhA*.

Posteriormente se puso a prueba la hipótesis de que CreC estaría inhibiendo la expresión de *ackA* y activando la de *ldhA*, elaborada en base a los datos de actividad enzimática obtenidos en los experimentos anteriores. Si así fuera, la cepa mutante DC1060, en comparación con la salvaje, debería presentar mayor intensidad con la construcción pUA-*ackA* y menor con la construcción pUA-*ldhA*.

Se realizaron cultivos en las mismas condiciones descritas en la sección precedente (M9 glucosa, baja aerobiosis). Para obtener el **Gráfico 8**, se calculó la media geométrica de las distintas réplicas, de las que, a su vez, se consideró la media geométrica poblacional. Recordemos que los distintos parámetros que se obtienen del estudio por citometría son el porcentaje de células positivas, y estadísticos poblacionales (la media, la mediana y la media geométrica) de las intensidades medidas célula por célula, según el canal óptico que se esté analizando (para el caso del Gfp, es el FIT3). La correcta elección del parámetro a comparar es fundamental para arribar a resultados que sean representativos del fenómeno biológico a estudiar.

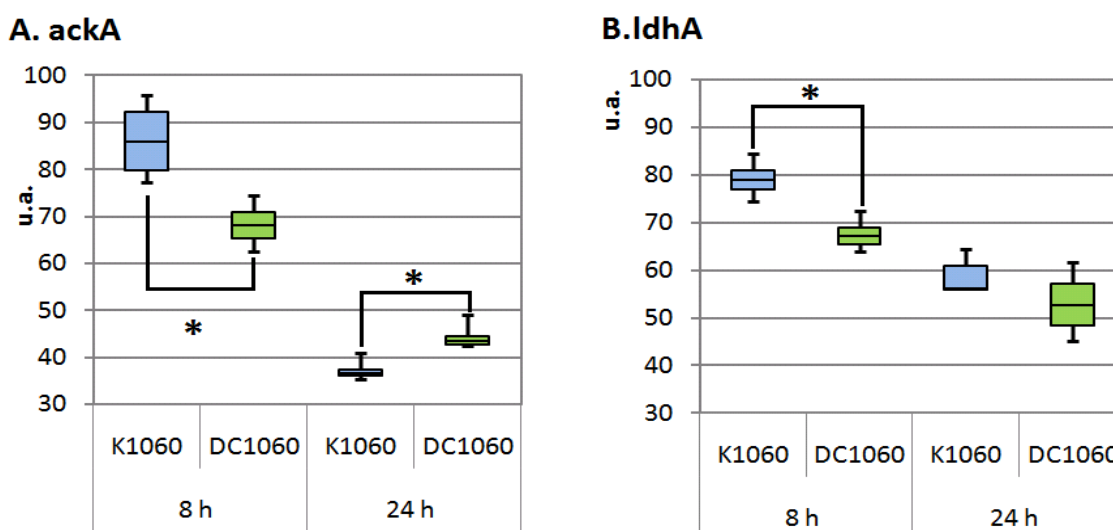


Gráfico 8. Experimentos de actividad reportera con fusiones transcripcionales de los promotores *ackA* (A), y *ldhA* (B) unidos a *gfp*, dentro del vector pUA66. Las cepas K1060 y DC1060 conteniendo las distintas construcciones y el vector vacío (control negativo) se crecieron en M9 glucosa y baja aerobiosis con kanamicina. Se tomaron muestras a las 8 h (fase exponencial) y 24 h (fase estacionaria). Los asteriscos denotan diferencias significativas. Las intensidades de fluorescencia se expresan en unidades arbitrarias. EL ensayo se realizó por cuadruplicado. Los valores de las medias geométricas se sometieron a un test-U de Mann Whitney para evaluar su significancia.

La actividad transcripcional del promotor de *ackA*, resultó ser leve pero significativamente menor en la cepa $\Delta creC$ a las 8 h. Esta situación se invirtió a las 24 h, cuando se reportó una actividad transcripcional *ackA-gfp* en la cepa mutante mayor a la de la salvaje. Para el caso de la expresión

ldhA-gfp, la cepa mutante en ambos tiempos tuvo una menor expresión del gen reportero, siendo esta diferencia significativa solo a 8 horas de iniciado el cultivo.

El resultado obtenido para el análisis de la actividad reportera del promotor de la *ackA*, no se corresponde con la hipótesis establecida en base a los resultados previos. En todos los experimentos realizados en condiciones de baja aireación y con glucosa vimos que en la fase exponencial había más acetato y mayor actividad ACK en la cepa mutante. Si bien la concentración de este ácido es baja para ambas cepas (ver Tabla 3), se vieron diferencias significativas. Sin embargo, la actividad promotora, medida a través de la fusión transcripcional a GFP, es menor en ausencia de CreC. Por otro lado, en los resultados obtenidos por Avison en la fase exponencial del cultivo ($DO_{600nm} = 0,8$) [15], la actividad transcripcional *ackA* (medida por RT-PCR) también es menor en la mutante (aunque en ésta es casi cero). Estos resultados sugieren que el efecto regulatorio de CreBC sobre la actividad de la ACK y la síntesis de acetato no se ejerce sólo a nivel de la transcripción de *ackA*, ya que de otro modo no se podría explicar este comportamiento tan peculiar.

En el caso de la *ldhA*, los resultados del análisis de control transcripcional coinciden con lo observado respecto de la concentración de lactato y la actividad LDH, ya que siempre se observaron valores menores en la cepa mutante respecto de la salvaje, indicando una correlación positiva entre estas variables.

Vale aclarar que lo observado en estos experimentos (sobre todo a las 24 h), debe ser analizado en el contexto del sistema empleado para reportar la actividad transcripcional. El tiempo de vida media de Gfp no es algo trivial. La fluorescencia que medimos a 24 h no está necesariamente reflejando lo que ocurre transcripcionalmente en ese momento, dada la diferencia entre las vidas medias del ARNm y la proteína Gfp, que es muy estable, con tiempos de vida media que llegan a las 24 horas. Hay variantes de esta proteína que se construyeron con el objetivo de disminuir su tiempo de vida media para poder medir cambios transitorios en ventanas de hasta 40 minutos [99]. El sistema que nosotros utilizamos, diseñado por Uri Alon [82] expresa un alelo mutante de la proteína salvaje Gfp denominada GFPmut2, con tres sustituciones aminoacídicas (S65A, V68L y S72A) que le confieren una mayor intensidad de fluorescencia. En este trabajo de Cormack [100], no hablan de su tiempo de vida media, pero a juzgar por sus resultados, la proteína mutante parecería ser bastante estable, tanto como la salvaje.

Esto nos hace suponer que las intensidades observadas a las 24 h son un reflejo de lo que ocurrió transcripcionalmente horas antes de que la muestra sea cosechada. Se suma a esto que, como se vio en experimentos que se van a mostrar en el último capítulo, las concentraciones de metabolitos producidos en medio mínimo y baja aerobiosis, se mantienen estables a partir de las 24 h (Tabla 19), indicando que a partir de cierto momento previo a las 24 h, el metabolismo fermentativo se detiene o se reduce al mínimo. Esta reportado que la actividad ACK y LDH disminuyen en cultivos aeróbicos conforme las células entran en la fase estacionaria [101]. Entonces, es probable que la actividad enzimática y la actividad transcripcional, copian el comportamiento observado en la síntesis de ácidos orgánicos, pero desfasados temporalmente.

Por todo esto, suponemos que lo más interesante sería poder hacer un estudio más profundo acerca de lo que ocurre en la fase exponencial del cultivo, donde creemos (por lo antes expuesto)

que se dan una serie de cambios regulatorios importantes, sobre todo para el gen *ackA*, con un efecto notable en el metabolismo central.

En conclusión, los resultados que arrojaron estos experimentos de citometría sugieren que la regulación de *ackA* es extremadamente compleja, y que, aparentemente, nuestros resultados no discreparían con lo publicado por otros grupos [15], [12].

Por otra parte, aunque no se haya reportado anteriormente un efecto regulatorio de CreBC sobre *ldhA*, y teniendo en cuenta que algunos de nuestros resultados deberían ser corroborados (a través de repeticiones del ensayo y mediante técnicas más directas como la RT-PCR) podemos concluir que CreC ejerce un efecto transcripcional sobre *ldhA*, directa o indirectamente, y que esto se traduce en distintos niveles de LDH y de lactato.

Sensibilidad al estrés oxidativo.

Crecimiento en medio sólido M9 con azul de toluidina

En 1979 Roeder y col. describieron la aparición espontánea de colonias anormalmente pequeñas de cultivos sembrados en placas con medio eosina-azul de metileno usualmente empleadas en la detección de mutantes *lac* [102]. A este fenotipo se lo denominó *dye* (colorante en inglés) el cual confería sensibilidad a colorantes como azul de metileno y azul de toluidina, y fue asociado posteriormente a esterilidad en cepas Hfr, F+ y F' [103]. Al gen que proveía la base genética para este fenotipo se lo rebautizó como *arcA* y se demostró que el azul de toluidina ocasiona el desvío de los electrones provenientes de la respiración aumentando la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Esto es crítico en mutantes *arcA* dado que en estas cepas la generación de equivalentes de reducción se encuentra desregulada, promoviendo un mayor flujo de electrones en la cadena respiratoria y concomitantemente, una mayor producción de ROS, generando un efecto negativo sobre el crecimiento [88]. Para evaluar si CreC está involucrado en el flujo de electrones de la cadena respiratoria se creció la cepa $\Delta creC$ y la cepa salvaje en placas con azul de toluidina. El medio comúnmente empleado para este ensayo es medio LB agar suplementado con 200 $\mu\text{g/ml}$ de azul de toluidina. En nuestro caso, dado que CreC no se encuentra activado en medios ricos, se probó, además de LB-agar (LBT), medio mínimo M9 con citrato férrico (M9T) suplementado con distintas fuentes de carbono (glucosa, glicerol y succinato).

En LBT, tal como suponíamos, no se observaron diferencias en el tamaño de las colonias. En las placas de medio mínimo suplementadas con glicerol o succinato tampoco se observaron diferencias significativas entre las cepas K1060 y DC1060, obteniéndose para ambas, colonias diminutas. Cuando la fuente de carbono fue glucosa, se obtuvo un crecimiento diferencial evidente a simple vista. A diferencia de la mutación *arcA*, la cual puede dar diferencias aún mayores en el tamaño de las colonias respecto de la cepa salvaje, la mutación en *creC* generó una diferencia de crecimiento no muy pronunciada pero significativa, llegando a ser 5 veces inferior el área de las colonias de la cepa mutante respecto a la salvaje (Gráfico 9).

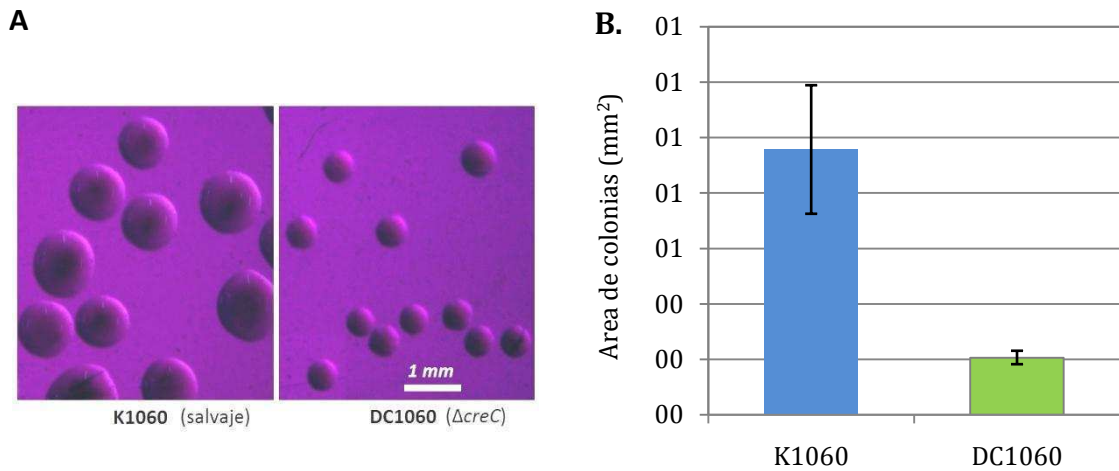


Gráfico 9: Fotografía de colonias de K1060 y DC1060 crecidas en placas de M9T glucosa (30 g/l) (A). Áreas de colonias de las respectivas cepas en mm² (B). Se midió el área de más de 50 colonias para cada cepa.

Estudio de la vulnerabilidad de las cepas K1060 y DC1060 a agentes oxidantes.

A la luz de lo mencionado en las líneas precedentes, esto podría estar indicando i) que existe un mayor flujo de electrones en la cepa mutante que deviene en un estrés oxidativo mayor por intervención del colorante, ii) que la diferencia de tamaños de las colonias no proviene de un flujo diferencial de electrones entre ambas cepas sino que es el resultado de una mayor sensibilidad al estrés oxidativo iii) una combinación de ambos factores.

Para evaluar el grado de resistencia al estrés oxidativo, se realizó un ensayo de inhibición del crecimiento en placa embebiendo discos de celulosa con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 8,8 M (LB y M9 glucosa) y a 4,4 M (M9 glucosa) y depositándolos en un césped de bacterias cosechadas en la misma etapa de la fase exponencial. Se hizo especial énfasis en que las condiciones experimentales fueran lo más similares posibles entre ambas cepas, dado que la técnica es cualitativa y susceptible a pequeñas variaciones en las condiciones de crecimiento. El área del halo de inhibición se tomó como un indicador del grado de estrés experimentado por las células (Gráfico 10). Como era de esperar, en LB no se observaron diferencias significativas entre ambas cepas. Los halos de inhibición tuvieron un tamaño aproximado de 6 cm² en ambas cepas. Estos, a su vez, fueron más pequeños que los obtenidos en medio mínimo. En este caso, cuando la concentración del peróxido de hidrógeno fue de 8,8 M, se observó una diferencia significativa entre ambas cepas, lo que no ocurrió con 4,4 M.

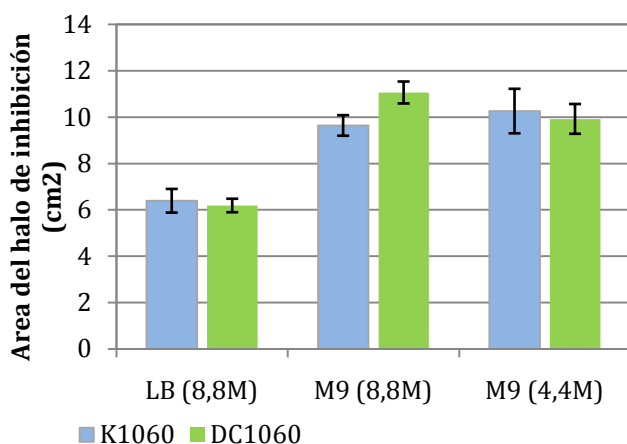


Gráfico 10. Efecto del peróxido de hidrogeno sobre el crecimiento celular en medio sólido (LB o M9 glucosa). Se agregaron 5µl de peróxido de hidrogeno sobre discos de celulosa de 5mm de diámetro sobre un césped de bacterias crecidas en M9-glucosa en fase exponencial. El área del halo de inhibición se cuantificó mediante el programa analizador de imágenes ImageJ

Impulsados por el hallazgo de una diferencia mínima pero significativa, decidimos realizar una serie de experimentos más robustos para evaluar la sensibilidad a agentes oxidantes. Agregamos al análisis el paraquat (dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo), otro agente oxidante altamente tóxico que, como fue mencionado en la introducción, reacciona con el O_2 dando O_2^- e induciendo la síntesis de superóxido dismutasas en *E. coli* [104]. En placas de 96 pocillos se colocaron diluciones seriadas de los compuestos a estudiar en medio mínimo M9 con hierro y con glucosa como fuente de carbono ($30\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$). Se inoculó cada pocillo con 4 µl de un cultivo de 18 h de las cepas K1060 y DC1060 y se lo agitó en una cámara húmeda a 125 rpm y 37°C. Como control positivo se inocularon pocillos sin el agente oxidante. A las 24 h se midió la DO a 600 nm.

La cepa K1060 pudo crecer hasta las concentraciones de peróxido de hidrógeno y paraquat de 50µM y 180µM respectivamente. En este último, ya con 150µM, el crecimiento fue un 40% menor al del control positivo. La cepa mutante, sin embargo, vio afectado su crecimiento a concentraciones menores de ambos compuestos: 25µM para el peróxido de hidrogeno y 80 µM para el paraquat.

Esto estaría indicando que CreC tiene un efecto protector frente a agentes oxidantes, lo cual explicaría en parte que la mutante $\Delta creC$ desarrolle colonias más pequeñas en presencia de azul de toluidina.

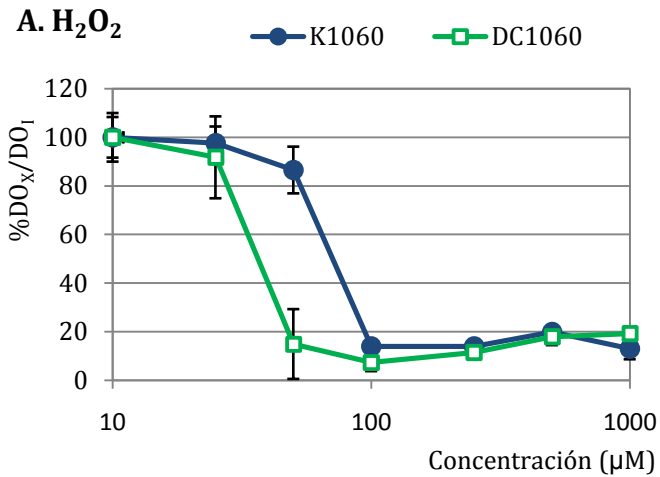
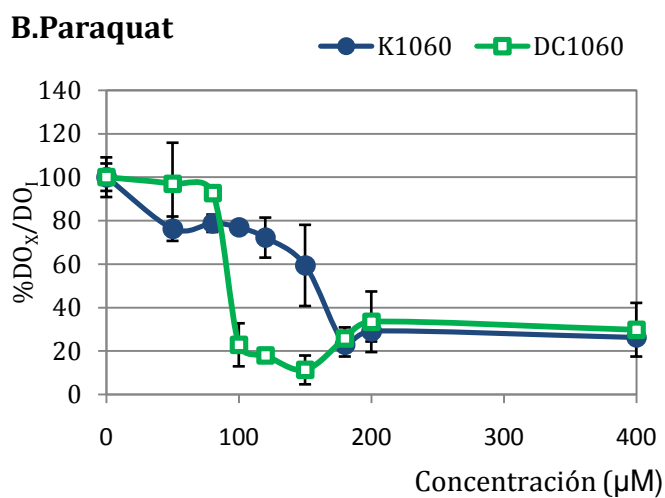


Gráfico 11. Curvas de inhibición de peróxido de hidrógeno (A) y paraquat (B). Estos ensayos se realizaron en microplacas de 96 pocillos, con M9 glucos y citrato férrico al que se le agregaron los compuestos oxidantes en distintas concentraciones. Los valores de DO están expresados como el porcentaje DO respecto al control sin oxidante. Las concentraciones de peróxido de hidrogeno están distribuidas logarítmicamente en el eje de las abscisas.



Estudio del estado redox intracelular.

Las cepas productoras de PHB son incapaces de crecer en M9T.

Los perfiles de ácidos mostrados en la primera parte de este capítulo indicaron que CreC define de forma directa o indirecta el estado redox intracelular. Concretamente, la relación [etanol]/[acetato] es un indicador de este aspecto fisiológico: la cepa salvaje produce menos acetato que la cepa mutante en las condiciones en las que CreC se encuentra activo, pero no varía la producción de etanol cuando es glucosa la fuente de carbono, lo cual nos lleva a tener un coeficiente [etanol]/[acetato] mayor en esta cepa comparado con la mutante. Por otro lado, los resultados obtenidos con azul de toluidina reflejan los cambios en el estado de oxidación debidos a CreC.

Para profundizar el estudio de los efectos de CreC sobre el estado redox intracelular se diseñaron varios experimentos. En principio, se evaluó si era posible revertir el fenotipo visto en las placas de M9T transformando ambas cepas con un plásmido que expresa los genes *phaCAB* de *Ralstonia eutropha* (pPHBKF). La idea surgió de un trabajo de nuestro grupo [88] en el cual se revertía el fenotipo *dye* (del que hablamos al iniciar la segunda parte de este capítulo) mediante la expresión de estos genes heterólogos. El fundamento reside en el fuerte requerimiento de NADPH que tiene la síntesis de PHB: si el fenotipo *dye* (sensibilidad al azul de toluidina) de las mutantes *arcA* se debe a que en estas células el flujo de electrones está desregulado (con el concomitante aumento de ROS), entonces desviar ese flujo de electrones desde la cadena respiratoria hacia la síntesis del polímero atenuaría la generación de ROS y las colonias crecerían mejor, alcanzando un tamaño similar al de la cepa salvaje (también transformada con el mismo plásmido). Eso fue exactamente lo que ocurrió en sus experimentos, confirmándose el mecanismo propuesto. Un dato que tuvimos en cuenta es que el fenotipo *dye* se ensaya en medios sólidos ricos, como el LB agar. Dado que nosotros sólo vemos diferencias entre las cepas salvaje y *creC* en medios mínimos, adaptamos el ensayo con M9 glucosa. Sorprendentemente, tras numerosos intentos, comprobamos que tanto la cepa salvaje (K1060/pPHBKF) como la cepa $\Delta creC$ (DC1060/pPHBKF) eran incapaces de crecer en este medio. Evidentemente, el salto nutricional que implica pasar de un medio rico a uno mineral, tornó inviable la presencia del colorante en combinación con las exigencias de precursores para la síntesis de PHB. Cabe destacar que si bien el mantenimiento del plásmido exigiría utilizar un antibiótico, este no se agregó a las placas para evitar interacciones inesperadas con el azul de toluidina.

Evaluación de la respuesta fisiológica a la diamida.

Sin haber podido extraer conclusiones respecto del experimento anterior, decidimos intentar otro ensayo, cualitativo también, utilizando el compuesto diamida (1,1-azobis-(N,N-dimetilformamida)). Este compuesto causa la formación de uniones disulfuro en tioles de bajo peso molecular y en proteínas [12]. Tal estrés oxidativo es neutralizado por el sistema dependiente de tioredoxina, el cual se vale de NADPH para reducir las uniones disulfuro espurias. Es así que la sensibilidad a diamida puede ser utilizada como un estimador de la disponibilidad de NADPH, como se demostró para *Streptomyces lividans* [106] y *E. coli* [84]. Estos ensayos se realizaron en placas de M9 glucosa con filtros de celulosa sobre los que agregó 5 μ l de diamida. Las áreas de los halos se compararon entre las cepas mutante $\Delta creC$ y la salvaje, pero no se observaron diferencias significativas.

Determinación del cociente NADH/NAD⁺

Si bien muchos de los experimentos anteriores indican que las cepas con mutaciones *cre* tienen un estado intracelular más oxidado, decidimos realizar una medición de las proporciones intracelulares de NADH/NAD⁺ y de NADPH/NADP⁺ de cultivos crecidos en M9 glucosa 30 g/l con citrato férrico, en microarobiosis, a fin de tener un indicador más directo de este aspecto fisiológico. Se incorporó a mutante K1060C dado que en experimentos anteriores, se vio que la mutación *creC510* aumentaba la disponibilidad de equivalentes de reducción en un contexto $\Delta arcA$. También se realizó este experimento en alta aerobiosis como control. En condiciones de

baja disponibilidad de oxígeno, el coeficiente NADH/NAD^+ fue mayor en la cepa K1060, la cual se encontró más de un 30% más reducida que la cepa $\Delta creC$ (

Gráfico 12). En alta aerobiosis, como esperábamos, no se observaron diferencias entre las tres cepas. Para el caso de los coeficientes $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ no se registraron diferencias significativas. La cepa K1060 mostró para ambos coeficientes el mismo valor que la cepa K1060, comprobándose que esta mutación no tiene un efecto significativo en el metabolismo central en un contexto genético salvaje para *arcA*.

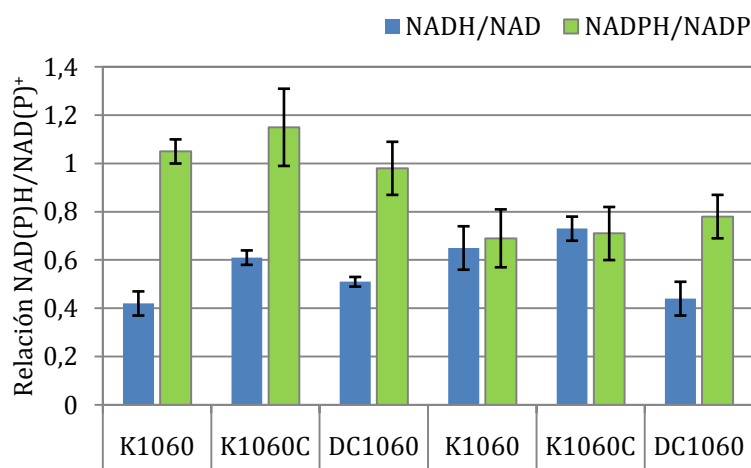


Gráfico 12. Determinación de la relación NADH/NAD^+ y $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ en cepas K1060 y DC1060, en cultivos crecidos en M9 glucosa en condiciones de baja y alta aerobiosis. Las cepas ensayadas fueron la K1060, K106C (*creC510*) y la DC1060 ($\Delta creC$).

Se demuestra así que la ausencia de CreC tiene un efecto positivo sobre el grado de reducción intracelular, corroborando lo observado en los perfiles de secreción (coeficiente $[\text{etanol}]/[\text{acetato}]$).

Consumo de oxígeno

En este punto vemos que hay dos aspectos emergentes de los resultados obtenidos que podrían sugerir hipótesis contradictorias. Cuando observamos que en azul de toluidina la ausencia de CreC llevaba a formar colonias más pequeñas, establecimos como una hipótesis plausible que en la cepa mutante podría haber un flujo de electrones mayor que era desviado por el colorante con el concomitante aumento del estrés oxidativo, tal como se observa en mutantes *arcA*.

Una mayor actividad respiratoria podría derivar en un aumento de la producción de ROS; tales como anión superóxido ($\text{O}_2 \cdot^-$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y radical oxhidrilo ($\text{OH} \cdot^-$), hecho que ha sido demostrado en bacterias y mitocondrias durante el crecimiento aeróbico [107]. La mayoría de los ROS derivan de la reducción de oxígeno molecular catalizada por enzimas de la cadena respiratoria. De esta manera, sería posible que en las mutantes *creC* el exceso de ROS generado excediera la capacidad limitada de los sistemas de detoxificación de estrés oxidativo, traducándose en una reducción de la viabilidad.

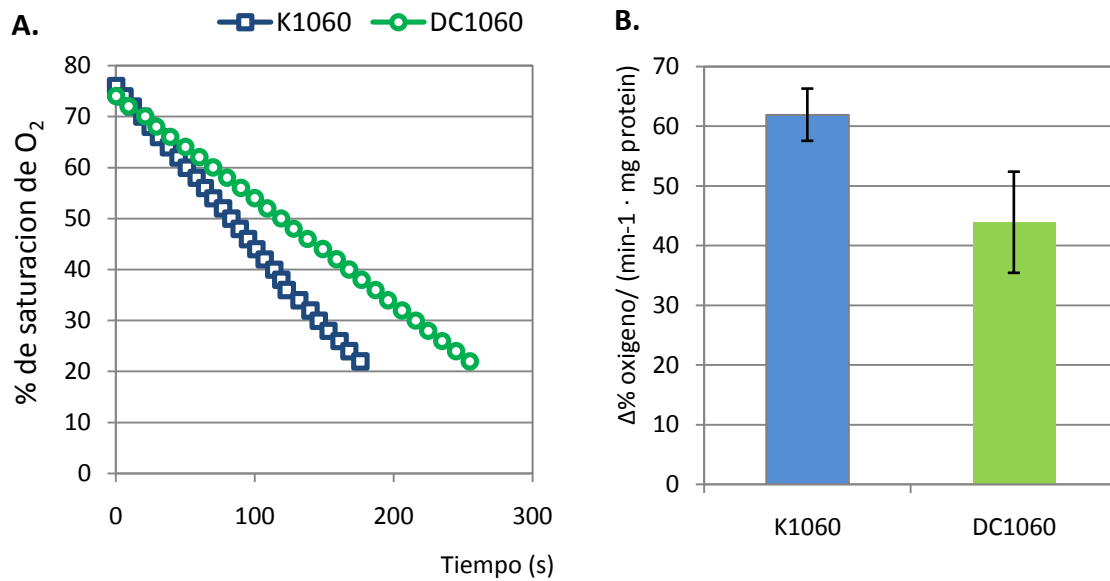


Gráfico 13. Consumo de oxígeno. Se estudió el consumo de oxígeno de las cepas K1060 y DC1060 en una solución saturada de este gas. Se grafica la caída del porcentaje de saturación de oxígeno en la solución en la cual se encuentran resuspendidas las células (NaCl 8,5 g/l, glucosa 2 g/L) (A) y la pendiente resultante es luego normalizada por la concentración de proteínas, para calcular la caída del porcentaje de saturación de oxígeno por minuto y mg de proteína (B).

Si bien los experimentos con peróxido de hidrógeno y paraquat reforzaron la hipótesis de la sensibilidad a agentes oxidantes en ausencia de *creC*, no descartaron que existiese un mayor flujo de electrones: ambas hipótesis no son mutuamente excluyentes. Sin embargo, el estado de reducción intracelular representado en el coeficiente NADH/NAD^+ nos estaría sugiriendo no sólo que esto no es así, sino que podría ser al revés, es decir, que la cepa mutante tendría un caudal menor en su flujo de electrones a través de la cadena respiratoria. Para indagar más profundamente en estas posibilidades, medimos el consumo de oxígeno en cultivos microaróxicos en medio mineral M9 con glucosa como fuente de carbono, con el propósito de determinar si las diferencias observadas en el estado redox intracelular se deben a una mayor actividad respiratoria.

Los cultivos crecidos en las condiciones descritas se cosecharon en la fase estacionaria ($\text{DO}_{600\text{nm}}$ 0,5 - 0,7), se lavaron con solución fisiológica y se incubaron en una solución isotónica conteniendo glucosa 11 mM (2 g/l) dentro de una cámara cerrada, dentro de la cual se colocó el electrodo polarográfico según se describe en la sección de materiales y métodos.

La cepa salvaje K1060 presentó un consumo de $62 \pm 4 \text{ \%} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, un 40% por encima de la cepa mutante ($44 \pm 8 \text{ \%} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) (Gráfico 13), lo cual estaría indicando que existe una alteración en la actividad respiratoria de la cepa $\Delta creC$ pero en el sentido contrario al que hipotetizamos tras los primeros ensayos en M9T.

En trabajos previos realizados en mutantes *arcA*, se observó que la presencia del alelo constitutivo *creC510*, provocaba un aumento significativo en el consumo de oxígeno, aún en presencia de la mutación *arcA*, que ya de por sí provoca un gran aumento en este parámetro. En

esos experimentos se determinó que la mutación *creC510* no afecta la composición de la cadena respiratoria (citocromos), sino que su efecto parece ser mediado a través de modificaciones en flujo de carbonos [81].

El conjunto de los resultados obtenidos indicaría entonces que la mayor sensibilidad al azul de toluidina de la mutante $\Delta creC$ no se debería a un aumento del flujo a través de la cadena de electrones, como se observó en el caso de las mutantes *arcA* [88], sino posiblemente a una disminución en la capacidad de responder al estrés oxidativo, que se observó al exponer a las células al agua oxigenada y al paraquat.

Búsqueda preliminar de posibles blancos de regulación de CreBC

En el trabajo publicado en 2001 por Avison *et al*, [15], se observó que CreBC activaba a los promotores de tres genes de *Aeromonas hydrophila*: *cepH*, *imiH* y *ampH*. Alineando las regiones situadas río arriba de las secuencias codificantes de estos genes, se definió una secuencia de reconocimiento: TTCACnnnnnnTTCAC, (en donde *n* representa cualquier nucleótido) localizada en posición -60 respecto del sitio de inicio de la transcripción [15]. Una búsqueda realizada sobre el genoma de *E. coli* MG1655 reveló 13 lugares del genoma en donde se encontraba esta secuencia, 8 de los cuales estaban ubicadas río arriba de unidades transcripcionales. Mediante ensayos de qPCR se cuantificó la cantidad de mensajero de estos genes en cepas salvajes y mutantes para el gen *creC*, llegando a la conclusión de que efectivamente estos genes son regulados por CreC (siete activados y uno reprimido). Como se mencionó anteriormente, estos genes son *ackA-pta*, *talA*, *yidS*, *radC*, *trgB(nudF)*, *yiel*, *creD* y *malE*.

Para averiguar si podrían encontrarse nuevos posibles sitios de unión para CreB, se utilizó la información de la secuencia consenso identificada río arriba de los 8 genes mencionados, se construyó un nuevo motivo consenso utilizando el programa MEME [108] (Gráfico 14).

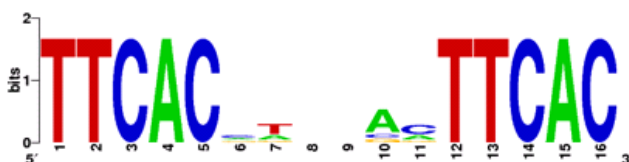


Gráfico 14. Secuencia consenso utilizada para realizar la búsqueda de motivos Cre en el genoma de *E. coli* a partir de los genes cuya transcripción es afectada por CreC. El programa utilizado fue MEME. La secuencia se muestra utilizando la herramienta *sequence logo*, que grafica el tamaño de las bases de acuerdo al grado de conservación de cada posición.

Los resultados obtenidos con este programa fueron luego utilizados para encontrar sitios blanco en el genoma de *E.coli* K12 cepa MG1655 (la misma cepa utilizada en el trabajo de Avison para la búsqueda informática, no así para realizar sus experimentos), mediante el programa FIMO [109]. En la Tabla 6 se muestran los resultados más relevantes, considerando especialmente los sitios en los que los 5 nucleótidos conservados están presentes exactamente como en el motivo consenso.

Como puede observarse, aun habiendo utilizado las mismas secuencias descritas por Avison, los resultados obtenidos en la búsqueda no son los mismos. Es más, en el caso de algunos de los genes descritos originalmente, el sitio de reconocimiento está en lugares diferentes a los detallados en el trabajo, probablemente debido a modificaciones en la anotación de los genomas introducidas desde 2001. Adicionalmente, pueden observarse nuevos sitios de reconocimiento en genes no identificados previamente.

Hay varios genes que contienen motivos de unión dentro de sus CDS (secuencias codificantes), entre ellos hay tres relacionados con el metabolismo del carbono que no fueron considerados como posibles blancos de la regulación por CreBC (*glpD*, *aceF*, *pck*) en el trabajo de Avison, posiblemente porque los probables sitios de reconocimiento se encuentran dentro de la secuencia codificante, aunque hay evidencia de transcripción a partir de promotores intragénicos en procariontes, muchas veces asociados a procesos regulatorios [110], [111].

Lo más llamativo, sin embargo, es que hay tres secuencias codificantes que estarían relacionadas con la respuesta a distintos tipos de estrés físicos, como rayos UV (*uspC*, *radC* y *loiP*), uno de ellos relacionado con la replicación del DNA (*radC*) al igual que *DnaC*. Esto es curioso, dados los resultados que obtuvimos nosotros en relación a la respuesta al estrés oxidativo. De hecho, se sabe que el paraquat induce la expresión de la endonucleasa IV [112], como respuesta al daño que este tóxico genera en el DNA.

Este análisis bioinformático preliminar indica que existen muchos genes que tienen sitios de reconocimiento para CreB, que los señalaría como blancos potenciales de regulación del sistema CreBC. Entre los genes descritos se destacan muchos involucrados en el metabolismo central, pero también otros ligados al metabolismo del fósforo, o a la síntesis y reparación de ácidos nucleicos, entre otras funciones. Estos datos sugieren que los blancos de regulación del sistema CreBC son mucho más diversos de lo que se pensó originalmente, y que serán necesarios más estudios para poder tener un panorama completo de todo el regulón *cre*.

CDS	Secuencia consenso	Ubc	Producto	Función
<i>ackA</i>	TTCACCTCAACTTCAC	335	Acetato quinasa	Metabolismo central.
<i>malE</i>	TTCACGAGCACTTCAC	19	MalE	Comp. del transp. de maltosa.
<i>yidR</i>	TTCACAAGGACTTCAC	6	CDS	Función desconocida.
<i>creD</i>	TTCACCGTCACTTCAC	77	CDS	Función desconocida.
<i>radC</i>	TTCACCTGAGATTTCAC	49	CDS	Rel. reparación del DNA.
<i>nudF</i>	TTCACATTTAATTTCAC	38	ADP ribosa pirofosfatasa	Rel. metabolismo del glucógeno.
<i>yeeR</i>	TTCACCGGTAATTTCAC	409	CDS	Función desconocida.
<i>talA</i>	TTCACGTAACGTTTCAC	276	Transaldolasa	Ciclo de las Pentosas Fosfato.
<i>pck</i>	TTCACCGGTCGTTTCAC	D	PEP carboxiquinasa	Metabolismo central.
<i>argI</i>	TTCACCTGATATTTCAC	D	Ornitina carbamoiltransferasa	Síntesis de arginina.
<i>cbrB</i>	TTCACACTCCCTTCAC	63	CDS	Función desconocida.
<i>glpD</i>	TTCAC <u>G</u> CAGCACTTCAC	D	Glicerol-3-P DH	Metabolismo central.
<i>cueO</i>	TTCACCAGCACTTC <u>G</u> C	D	Multicobre oxidasa	Homeostasis del cobre.
<i>yhil</i>	TTC <u>G</u> CCAGCACTTCAC	D	CDS	Rel. formación de biofilms.
<i>uspC</i>	<u>G</u> TACCTGAAGTTTCAC	33	UspD	Resistencia a radiación UV.
<i>aceF</i>	TTCACCATCACTTCAG <u>G</u>	D	Comp. de la piruvato DH	Metabolismo central.
<i>flhE</i>	TTCACAATCACTTCAT <u>I</u>	D	FlhE	Transp. de proteína flagelar
<i>smrB</i>	TTCACCGGCACTTC <u>G</u> C	D	CDS	Función desconocida.
<i>dnaC</i>	TTCAT <u>I</u> CTGCCCTTCAC	D	DnaC	Inicia la replicación del DNA.
<i>loiP</i>	TTCACCTGCGC <u>A</u> TCAC	D	Metaloproteasa	Rel. estrés a UV y choque térmico.
<i>mppA</i>	TTCACCAGACCTTCA <u>A</u>	D	Transp. de tripéptidos de mureína	Transp. de Membrana.

Tabla 6. La secuencia motivo Cre se buscó en el genoma de MG1655 para predecir los posibles blancos de regulación de CreBC. La ubicación (Ubc.) de los motivos indica la distancia (en nucleótidos) río arriba de la CDS o su ubicación dentro de la misma (D). Abreviaturas: CDS, Secuencia Codificante; D, dentro de la CDS; Comp., componente; Rel., relacionada a la/al; DH, deshidrogenasa; Transp., transportador; utilizada cuando el producto no está bien identificado. En negrita y subrayadas se muestran las bases que difieren del motivo original.

Capítulo II

Prefacio

Entre los inconvenientes más destacables que presentan los ensayos en frasco agitado es que los microorganismos se ven sometidos a una sucesión de estímulos cambiantes, lo que los lleva a pasar por sucesivos estados fisiológicos. Así por ejemplo, el crecimiento bacteriano se ve fuertemente limitado por la incapacidad para controlar el pH, lo cual redundará al cabo de unas horas, en un fuerte inhibición del crecimiento en especies fermentadoras como *E. coli*. Además, a medida que las células se replican en la fase exponencial de crecimiento, la demanda de oxígeno aumenta. Dado que la provisión de gas no aumenta concomitantemente, el microorganismo pasa de un estado de plena aerobiosis a un estado de creciente microaerofilia, y aún de hipoxia. Sin embargo, una ventaja de la utilización de frascos agitados es la posibilidad de analizar múltiples condiciones simultáneamente, y utilizar varias réplicas. Por lo tanto, el uso de frascos agitados está indicado en un primer nivel de identificación de las variables críticas de un proceso.

En una segunda etapa, una manera de solucionar las limitaciones inherentes al uso de frascos agitados, es la utilización de biorreactores. En efecto, éstos permiten controlar de forma precisa el oxígeno disuelto, el pH y la temperatura de crecimiento.

Con el objetivo de evaluar los efectos de CreC en condiciones controladas, se llevaron a cabo ensayos de biorreactor en M9 suplementado con glucosa $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ o glicerol $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Además, dichas fuentes de carbono fueron evaluadas bajo distintas condiciones de aireación. En principio, dado de que las mayores diferencias se observaron en cultivos con baja aireación, se decidió realizar un ensayo donde la agitación y el suministro de aire fuesen constantes a lo largo de todo el experimento. Para esto se tomó un flujo de aire de $1 \text{ l}/\text{min}$ y una agitación de 125 rpm . Estos experimentos fueron realizados en el fermentador (Bioengineering Lab Fermenter) con el que cuenta nuestro laboratorio.

Posteriormente, en el marco de una pasantía en el laboratorio de José Gregorio Cabrera Gomez (ICB2, Universidad de San Pablo), se llevó a cabo la segunda serie de ensayos en biorreactor. Lo primero que se investigó, en base a los resultados de las primeras fermentaciones, fue si lo observado en las curvas de crecimiento era resultado de alguna limitación nutricional. Para contestar esa pregunta se realizaron ensayos en condiciones de plena aerobiosis, en la que el porcentaje de oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 20%, de modo que el nivel de aireación no fuera limitante. En estos ensayos se observó que el crecimiento no seguía una cinética exponencial en la fase de crecimiento, y tras algunas pruebas se comprobó que ese comportamiento se revertía con el agregado de citrato férrico. Recién después de estos ajustes se evaluó el crecimiento en una situación intermedia de aerobiosis (5% OD). Las fuentes de carbono utilizadas en esta condición fueron glucosa y glicerol. En la Tabla 7 se resumen las distintas condiciones estudiadas y sus características más relevantes.

Condición	I		II		III	
	A	B	A	B	A	B
Medio	M9		M9	M9m	M9m	
F. de carbono	Glucosa	Glicerol	Glucosa		Glucosa	Glicerol
Agitación	Cte. (125 rpm)		Variable		Variable	
%O ₂ disuelto	0% (cte)		20% (min)		5% (Cte)	
Nivel de aireación	BAJO		ALTO		MEDIO	

Tabla 7. Resumen de condiciones testeadas en los ensayos de biorreactor. Las condiciones I, II, y III, hacen referencia al nivel de aireación resultante (bajo, medio o alto resp.), según el régimen de agitación y el flujo de aire suministrado mientras que las letras A y B distinguen la composición del medio o la fuente de carbono empleada (ya sea M9/M9m o glucosa/glicerol). En todas las condiciones el flujo de aire fue el mismo (1 l·min⁻¹).

Lo particularmente interesante de estos ensayos es que fue posible seguir la producción de dióxido de carbono y consumo de oxígeno gracias a un analizador de gases. De esta forma, se pudo seguir la evolución del cultivo a partir de los datos de biomasa, metabolitos extracelulares, dióxido de carbono liberado, oxígeno y glucosa consumidos.

Los objetivos de este capítulo son:

- Evaluar el desempeño de la cepa *ΔcreC* en distintos regímenes de aireación y fuentes de carbono con distinto grado de oxidación.
- Evaluar las condiciones que mejor se adaptan a los requerimientos nutricionales de las cepas en estudio.
- Caracterizar distintos parámetros biológicos de las cepas K1060 y DC1060 (perfil de secreción, consumo de sustrato, energías de mantenimiento, etc), de modo de establecer los efectos regulatorios de CreC sobre las variables medidas.

Fermentaciones preliminares en baja aerobiosis: condiciones I.A y I.B

Condición I.A (Baja aerobiosis – M9-Glucosa).

Cinética de crecimiento

Para esta condición, se estableció un régimen constante de aireación fijado en $1 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ mediante un flotámetro manual, y una velocidad de agitación constante de 125 rpm. El medio empleado fue medio mínimo M9 con glucosa como fuente de carbono en una concentración de $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Como inóculo se utilizó un cultivo crecido *ON* en un volumen tal que la absorbancia (DO) inicial del cultivo fuera de 0,10. Para cada punto se determinó la DO, biomasa, así como los ácidos orgánicos y glucosa remanente en el sobrenadante.

Al observar la curva de crecimiento de ambas cepas en M9 glucosa (

Gráfico 15), se pueden distinguir tres etapas diferentes: (i) de 0 a 4 hs: crecimiento exponencial (ii) de 4 a 10 hs: la velocidad de crecimiento disminuye y se pasa a un crecimiento lineal (iii) de 10 a 24hs: es la fase estacionaria con escasa división celular. Esta dinámica de crecimiento es similar en ambas cepas. Posiblemente la disminución observada en la velocidad de replicación sea consecuencia de un micronutriente que pasa a ser limitante en el medio a partir de la hora 4. El consumo de glucosa acompaña el crecimiento celular, siendo más pronunciada la caída de la glucosa remanente en la fase exponencial y más suave durante la fase estacionaria.

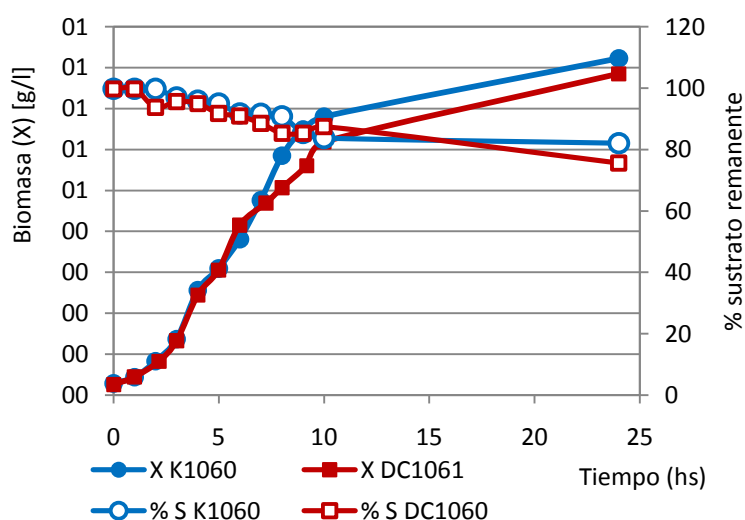


Gráfico 15. Curvas de crecimiento de K1060 y DC1060 cultivadas en biorreactor con medio M9 glucosa $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. La agitación (125 rpm) y el suministro de aire (1 l/h) fueron constantes a lo largo de todo el experimento. Los ensayos se realizaron como mínimo por duplicado.

A las 24hs de iniciado el cultivo, la biomasa formada por la cepa K1060 fue de $0,83 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Tabla 8), era apenas superior a la biomasa alcanzada por DC1060, pero no significativamente. El

rendimiento de la biomasa con respecto a la glucosa consumida ($Y_{x/s}$) indica que ambas cepas tuvieron un rendimiento casi idéntico ($0,10 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$) (Tabla 8). Por último, el coeficiente [etanol]/[acetato] del que ya hemos hablado en el capítulo anterior, es menor en la cepa mutante que en la salvaje ($0,96\pm 0,02$ versus $1,62\pm 0,38$, respectivamente), confirmando que la cepa $\Delta creC$ posee un ambiente intracelular más oxidado que la K1060.

Parámetros cinéticos	K1060		DC1060	
X_{24hs} ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\text{t}$)	0,83	(0,01)	0,79	(0,01)
μ_{max} (h^{-1})	0,46	(0,00)	0,45	(0,03)
$Y_{x/s}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	0,11	(0,01)	0,10	(0,01)
[et]/[ac]	1,62	(0,38)	0,96	(0,02)

Tabla 8. Parámetros cinéticos de K1060 y DC160 crecidas en biorreactor con medio M9 glucosa $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. La agitación (125 rpm) y el suministro de aire ($1 \text{ l}\cdot\text{h}^{-1}$) fueron constantes a lo largo de todo el experimento. Entre paréntesis se muestra el desvío estándar.

Producción de ácidos.

La producción de ácidos en M9-glucosa comenzó a ser detectable en la cepa K1060 a partir de la segunda hora de cultivo (Gráfico 16). Los productos mayoritarios fueron para esta cepa el acetato, el formiato, el lactato y el etanol. Durante las primeras horas de cultivo y durante todo el experimento el succinato apenas se detectó en el sobrenadante. A la hora 10 de comenzado el cultivo, la concentración de estos ácidos mayoritarios se encontraban en torno a los 10 mM (salvo para el lactato que duplicaba esta concentración). A partir de ese momento, en el que el crecimiento celular se desaceleró notablemente, la producción de metabolitos comenzó a divergir. A las 24h de cultivo, el lactato y el etanol fueron los principales productos de fermentación, con concentraciones que llegaron a los 61 mM y 22 mM respectivamente, mientras que el acetato y el formiato permanecieron prácticamente invariables.

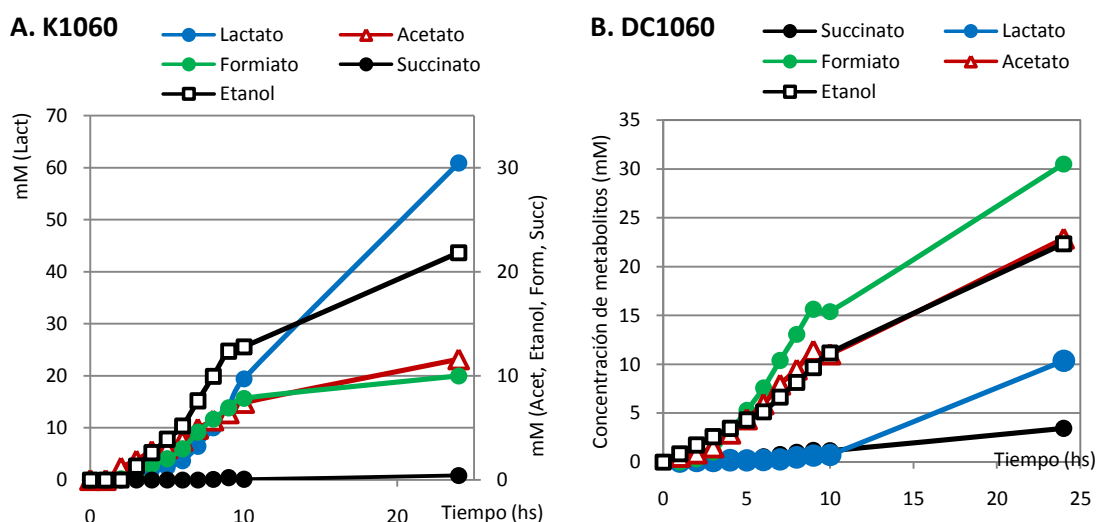


Gráfico 16. Curvas de producción de metabolitos liberados al medio extracelular en cultivos de biorreactor crecidos en medio M9 glucosa $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Cepa K1060 (A) y DC1060 (B). Abreviaturas: Acet, acetato; Form, formiato; Lact, lactato; Succ, succinato.

La cepa DC1060, tuvo en la primera fase de crecimiento una diferencia que resultaba notable con su contraparte: la síntesis de lactato (Gráfico 16). Este compuesto no sólo no era detectable durante las primeras 10hs de crecimiento, sino que permaneció en niveles muy bajos hasta las 24 hs, cuando logró alcanzar apenas la concentración de 10 mM, con lo cual fue el producto mayoritario en la K1060, pero no así en la DC1060. El succinato, sin embargo, aumentó su concentración en el sobrenadante (3mM) de la mutante. El etanol tuvo un desempeño similar en ambas cepas, y al finalizar el experimento alcanzó los 22 mM. El formiato, a diferencia de lo que sucedió con el lactato, triplicó su producción (30mM) en la cepa $\Delta creC$ con respecto a la cepa salvaje. El acetato fue otro metabolito que sufrió una variación diferencial importante entre las cepas. En la DC1060 su producción máxima fue a las 24 h (22mM) y fue en aumento inclusive luego de las 10hs, al igual que el formiato.

Dado que el crecimiento celular no se vio alterado significativamente por la mutación en el regulador global de estudio, los valores específicos de producción de metabolitos relativizados a la biomasa reflejan un panorama equivalente al de las cantidades absolutas (Tabla 9).

	Succinato		Lactato		Formiato		Acetato		Etanol	
Concentración 24h (mM)										
K1060	0,5	(0,1)	61	(8)	11	(1)	13	(2)	21	(2)
DC1060	2,6	(1,1)	8	(3)	32	(1)	24	(2)	23	(1)
Producción esp. (mmol/g)										
K1060	0,6	(0,1)	81	(9)	13	(2)	15	(2)	25	(2)
DC1060	3,3	(1,4)	10	(4)	40	(2)	30	(2)	29	(1)
Velocidad específica (mmol/g.h)										
K1060	ND		4,7	(1,0)	3,1	(0,2)	2,3	(0,5)	4,7	(0,8)
DC1060	ND		0,1	(0,1)	5,2	(1,6)	4,3	(0,1)	4,6	(0,8)

Tabla 9. Perfil de producción de ácidos orgánicos en ensayos de biorreactor (Baja aerobiosis, medio M9 glucosa). La producción específica considera la concentración de ácidos producidos por unidad de biomasa a las 24 h. La velocidad específica de producción, se calculó dentro de una ventana de tiempo dentro de la fase exponencial (3h a 9h). Entre paréntesis se muestra el desvío estándar. ND: no detectado.

Las velocidades específicas de producción de ácidos muestran lo que sucedió durante las primeras horas de crecimiento (de 2hs a 6hs). Entre ambas cepas, la diferencia más notable ocurrió entre el lactato y el acetato (Tabla 9). Mientras que para la K1060 las velocidades específicas de producción fueron de 4,7 mmol/g.h y 2,3 respect., la cepa DC1060 no produjo lactato y duplicó la velocidad de formación de acetato. El succinato, como ya mencionamos, no se detectó en esa etapa de crecimiento, con lo cual, su velocidad de formación resultó nula. El etanol, por su parte, se formó al mismo ritmo en ambas cepas.

Condición I.B (Baja aerobiosis - Glicerol).

Cinética de crecimiento

De la misma forma que se realizaron los ensayos en glucosa $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ previamente presentados, se decidió evaluar cuáles eran los efectos de utilizar glicerol como única fuente de carbono presente en el medio. El medio empleado fue nuevamente M9 con glicerol en una concentración de $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Como se muestra en el Gráfico 17, la biomasa evolucionó con un similar perfil cinético en ambas cepas como en el caso de la glucosa. Sumado a esto, la velocidad de consumo del sustrato tampoco sufrió un quiebre marcado como síntoma de un cambio en la fisiología de las bacterias en lo que debería ser la transición de una etapa de crecimiento a velocidad máxima a la fase en la cual el crecimiento se detiene.

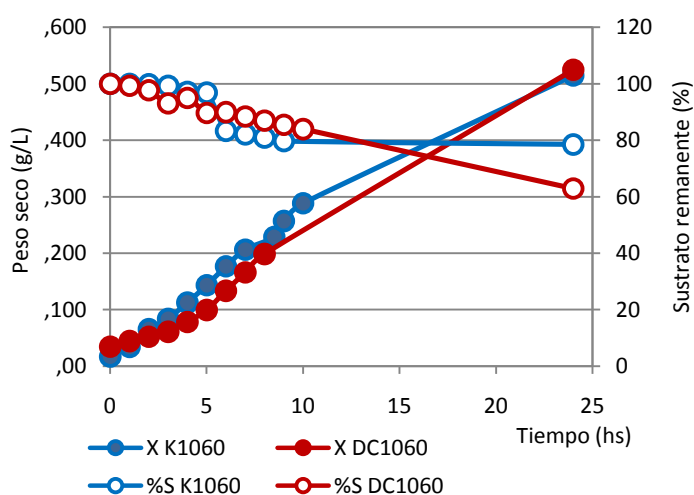


Gráfico 17. Curvas de crecimiento de K1060 y DC1060 crecidas en biorreactor utilizando M9 glicerol $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. La agitación (125 rpm) y el suministro de aire ($1 \text{ l}\cdot\text{h}^{-1}$) fueron constantes a lo largo de todo el experimento. Los ensayos se realizaron como mínimo por duplicado.

A las 24 hs, la biomasa de ambas cepas fue similar ($0,5\text{-}0,6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ aprox.). En cuanto a la velocidad de crecimiento, se registró una leve pero significativa diferencia entre K1060 y DC1060, siendo sutilmente mayor la μ_{max} de la primera en comparación a la última. El rendimiento de la biomasa con respecto a la glucosa ($Y_{x/s}$) fue mayor en la DC1060. El grado de oxidación intracelular (determinado por el coeficiente [et/ac]) fue superior en la cepa salvaje que en la mutante, tal como ocurrió con los cultivos en glucosa.

Parámetros cinéticos	K1060	DC1060
$X_{24\text{hs}}$ ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,56 (0,04)	0,47 (0,08)
μ_{max} (h^{-1})	0,32 (0,03)	0,24 (0,03)
$Y_{x/s}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	0,025 (0,00)	0,037 (0,006)
[Etanol]/[Acetato]	1,28 (0,13)	0,90 (0,02)

Tabla 10. Parámetros cinéticos K1060 y DC1060 crecidas en biorreactor con medio M9 glicerol $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. La agitación (125 rpm) y suministro de aire ($1 \text{ l}\cdot\text{h}^{-1}$) fue constantes a lo largo de todo el experimento. Entre paréntesis muestra el desvío estándar.

Producción de ácidos.

En comparación con los ensayos en medio M9 con glucosa como fuente de carbono, en glicerol la producción de metabolitos fue mucho menor. Las velocidades de producción también reflejan esta tendencia, adoptando valores similares entre ambas cepas. Tal es así que el formiato, el acetato y el etanol se produjeron a una velocidad en torno a los $3\text{-}4\text{ mmo}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. El succinato fue virtualmente indetectable, así como el lactato.

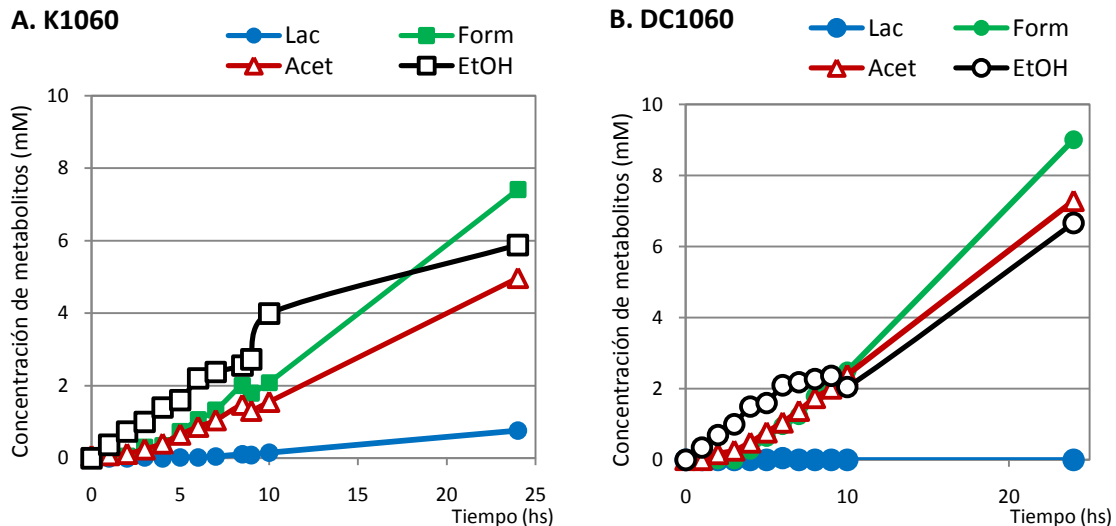


Gráfico 18. Curvas de producción de metabolitos liberados al medio extracelular. Cepa K1060 (A) y DC1060 (B), en M9-glicerol $30\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Dentro del rectángulo se muestra la concentración en mM del metabolito a las 24hs.

Al final del ensayo, se acumuló etanol, acetato y formiato. El lactato sólo se detectó a las 24 en la cepa K1060 (0,8 mM). Si bien las concentraciones no fueron iguales en este punto, ninguna de las dos cepas en estudio presentó un metabolito producido en abundancia con respecto al otro. La cepa salvaje produjo más formiato (7,4 mM) que acetato y etanol (ambos en torno a los 5mM). Con la cepa mutante sucedió algo similar, con valores apenas más elevados (formiato 9 mM, acetato 7,3 mM y etanol 6,7 mM).

	Succinato	Lactato	Formiato	Acetato	Etanol
Concentración 24h (mM)					
K1060	ND	0,76 (0,01)	6,9 (0,7)	4,9 (0,1)	6,2 (0,5)
DC1060	0,5 (0,2)	ND	10,0 (1,4)	7,3 (0,1)	6,5 (0,2)
Producción esp. (mmol/g)					
K1060	ND	1,4 (0,2)	12,5 (2,6)	8,8 (1,2)	8,8 (3,1)
DC1060	1,0 (0,3)	ND	21,5 (0,7)	15,8 (2,9)	14,2 (3,0)
Velocidad específica (mmol·g·h⁻¹)					
K1060	ND	0,02 (0,03)	3,5 (0,4)	3,1 (0,4)	4,3 (2,0)
DC1060	ND	0,05 (0,01)	3,2 (0,2)	2,5 (0,3)	3,9 (0,3)

Tabla 11. Producción específica (24hs) y velocidad específica de producción de los distintos ácidos secretados. Medio M9 glicerol 30 g·l⁻¹. Los datos están relativizados a la biomasa. Entre paréntesis se muestra el desvío estándar. ND: no detectado.

Comparación de la producción específica de ácidos relativa a la biomasa, el succinato y el lactato se produjeron en niveles apenas detectables, o directamente indetectables. El ácido fórmico, acético y el etanol en la DC1060 fueron sintetizados a concentraciones que duplican las de la K1060 por unidad de biomasa generada.

Las velocidades de producción, analizadas para las primeras horas de crecimiento, son similares entre ambas cepas, y entre los metabolitos principales (acetato, lactato, formiato), demostrando que las diferencias en las concentraciones finales debieron haber surgido tras cambios en las velocidades específicas entre las 10 y las 24 h.

Conclusiones de la condición I

Como conclusión de los experimentos realizados en la condición I, vemos que la tendencia de formación de los ácidos fue similar a la observada en los experimentos en frasco agitado. La cantidad de acetato y formiato fueron mayores en la cepa mutante, y el lactato fue siempre menor. No se observaron diferencias en el crecimiento, aunque se puso en evidencia un comportamiento respecto a la cinética de crecimiento que no había sido detectado en los ensayos en frasco agitado, que reflejaría algún tipo de limitación nutricional.

En glucosa se detectó más succinato que en glicerol, y en mayor cantidad en la cepa mutante. Esto también concuerda con lo observado en nuestros ensayos preliminares. Las concentraciones finales fueron también similarmente bajas.

En glicerol el lactato siguió produciéndose de forma marginal, hecho que ya fue descrito para *E. coli* en trabajos anteriores, en los que el principal producto de fermentación es el etanol, a

diferencia de lo que ocurre con glucosa y xilosa [113]. En nuestros experimentos, a las 24 h, la concentración de ácidos fue bastante similar para los tres metabolitos principales (ácido acético, fórmico y etanol), así como las velocidades de producción

Fermentaciones con provisión ilimitada de oxígeno: condiciones II A y B.

En los experimentos precedentes vimos que el crecimiento celular, tanto para glucosa como para glicerol, mostraba una cinética lineal en lugar de la típica curva exponencial, propia de *E. coli* [114]. Esto nos estaría sugiriendo que en las condiciones de estudio existe algún componente limitante. .

Bajo esta hipótesis desarrollamos un nuevo ensayo en biorreactor con M9 glucosa 30 g·l⁻¹ de la cepa K1060. Esta vez suministramos aire en exceso (flujo 1 l/min y agitación variable evitando que el oxígeno disuelto cayese por debajo del 20% de saturación) para que las células no tuviesen más restricciones de este gas y el crecimiento estuviese sólo limitado por factores nutricionales. A su vez, se conectaron analizadores de gases a la salida del fermentador (B. Braun Biostat) para registrar el consumo de oxígeno y el dióxido de carbono liberado. El cultivo fue seguido durante 24 h, tomando muestras cada hora hasta que el cultivo entró en fase estacionaria a las 16h, momento a partir del cual se tomaron muestras cada dos horas.

Condición II. A (Alta aerobiosis - M9-Glucosa)

Cinética de crecimiento

Tal como ocurrió con los cultivos crecidos a agitación constante descritos en la sección precedente, la cepa K1060 creció con una cinética lineal hasta entrar en fase estacionaria, como consecuencia del agotamiento de la fuente de nitrógeno, un componente indispensable para la formación de biomoléculas, ya que a las 16 horas el ion amonio presente en el sobrenadante pasó a ser cero (Gráfico 19). A partir de ese momento, las cantidades de sustrato siguieron cayendo pero a una velocidad levemente inferior. El acetato fue el principal ácido producido llegando a la concentración de 150mM aprox. al finalizar el cultivo.

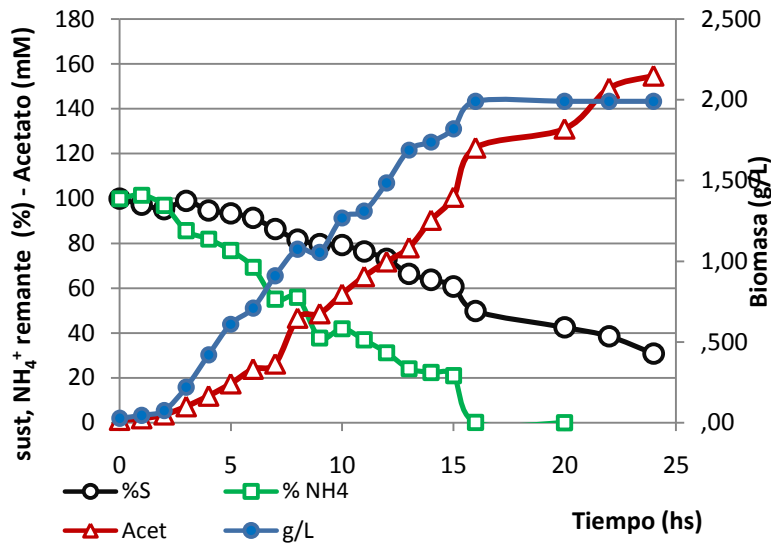


Gráfico 19. Curvas de consumo de sustrato (S) y nitrógeno (NH₄⁺), producción de ácido acético (Acet) y biomasa generada (X). Los valores de NH₄⁺ y S se muestran como % respecto del valor inicial. El medio empleado fue M9-glucosa 30 g·l⁻¹, en alta aerobiosis.

Acompañando esta dinámica, en el Gráfico 20A se puede ver como el NaOH empleado para neutralizar los ácidos producidos durante el cultivo, también siguió una evolución lineal. En este gráfico se representa el oxígeno disuelto en el medio, que como se mencionó antes, jamás se dejó caer por debajo del 20% de saturación, con lo cual, la agitación que comenzó siendo de 300rpm, se la debió aumentar a la hora 5 aprox. La agitación máxima se alcanzó a las 23hs con aproximadamente 650 rpm.

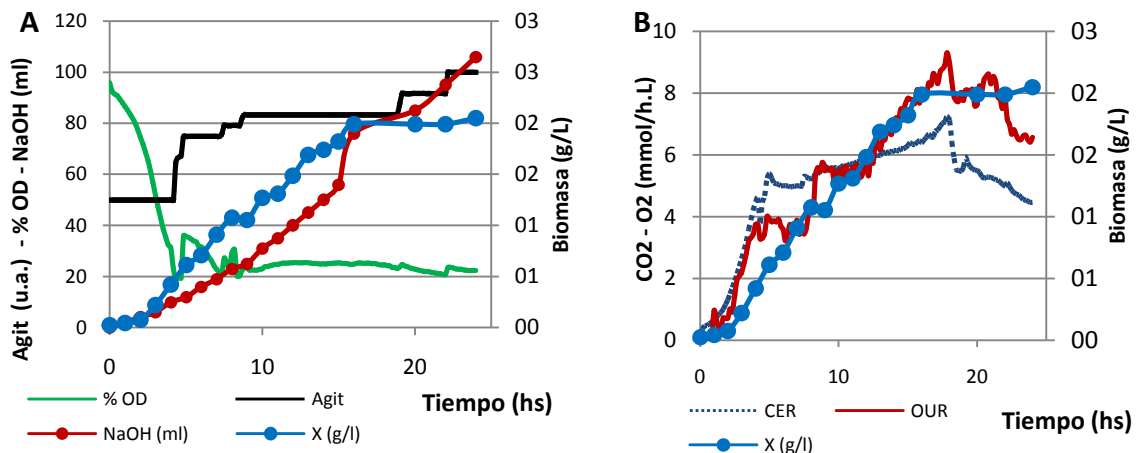


Gráfico 20. Cultivos en biorreactor de K1060 en M9 glucosa 30 g·l⁻¹, con alta aerobiosis (min 20% OD). A) Oxígeno disuelto porcentual (% OD), agitación (porcentual con respecto al máximo alcanzado) y volumen de NaOH 1M empleado para mantener el pH del cultivo. B) velocidad de producción de CO₂ (CER), y de consumo de O₂ (OUR). En ambos gráficos se representa a modo de referencia, la curva de biomasa para seguir el crecimiento (X, en g·l⁻¹).

La velocidad de consumo de oxígeno es el resultado de una ecuación que contempla la cantidad de aire ingresado al biorreactor, la presión parcial de oxígeno, y la salida del mismo al ambiente. Algo similar ocurre con la emisión de CO₂, para cuyo cálculo, entre otras cosas, se registra el CO₂

que sale del sistema y se le resta la concentración de este gas presente en el aire de entrada. De esta forma se pueden establecer las cantidades de ambos gases (CO_2 y O_2) que se transfieren desde o hacia el cultivo, calculándose así su velocidad de emisión y formación, según corresponda. Estas velocidades se denominan CER (*carbon emission rate*) y OUR (por *Oxygen uptake rate*) y están expresadas en unidades molares por unidad de tiempo y volumen ($\text{mmol/h}\cdot\text{l}$). El CER y el OUR son velocidades volumétricas, y por lo tanto no están referidas al nivel de biomasa, como las denominadas velocidades respiratorias específicas ($q\text{CO}_2$ y $q\text{O}_2$) que tienen unidades $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

La cepa K1060 crecida en alta aerobiosis presentó un consumo de oxígeno que fue acompañando la formación de biomasa de forma muy estrecha. Como se puede apreciar si comparamos los Gráfico 20A y Gráfico 20B, la liberación de CO_2 fue máxima durante las primeras cinco horas del cultivo mientras el %OD permaneció por sobre el 20% de saturación. Luego siguió aumentando pero con una pendiente menor al de formación de biomasa, indicando que por unidad de biomasa formada, la cantidad de CO_2 producido era menor. Apenas una hora de ingresado el cultivo a la fase estacionaria, las velocidades de consumo de oxígeno y producción de dióxido de carbono comenzaron a decrecer, señalando una menor actividad metabólica de las células.

Es fácil ver como casi todas las variables medidas a lo largo del ensayo poseen una cinética lineal, acompañando la formación de biomasa. La curva de NaOH reproduce el patrón seguido por acetato.

Modificaciones del medio M9 para mejorar el crecimiento.

Para encontrar el factor nutricional limitante del crecimiento bacteriano se llevaron adelante cultivos de la cepa K1060 en los cuales la composición del medio se varió incorporando distintos suplementos minerales (hierro o solución de trazas) u orgánico (tiamina). También se varió la fuente de nitrógeno NH_4Cl o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para cerciorarnos de que el azufre no fuese un elemento limitante. Es así que se hicieron dos series de cultivo en paralelo: una conteniendo como fuente de carbono NH_4Cl (A) y otra con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (B). Dentro de cada serie se probó suplementar el medio con tiamina ($0,005 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), citrato férrico ($0,06 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), solución trazas o una combinación de estas (Tabla 12). Al medio control no se le adicionó ninguno de estas sustancias. Los cultivos de 10ml cada uno, se realizaron en erlenmeyers de 100ml, con alta agitación a 37°C . Además se realizaron otras modificaciones al medio M9 para mejorar los valores máximos de biomasa alcanzados: 1) se duplicó la molaridad de la fuente de nitrógeno, 2) se disminuyó la concentración de fosfato de sodio monobásico y dibásico, manteniendo las proporciones para que el pH no varíe, se duplicó la molaridad de magnesio (pasando de 1mM a 2mM). A la nueva fórmula del M9 se la denominó M9 modificado (M9m). Es decir que las series A y B, con sus variantes, se realizaron en el medio M9m.

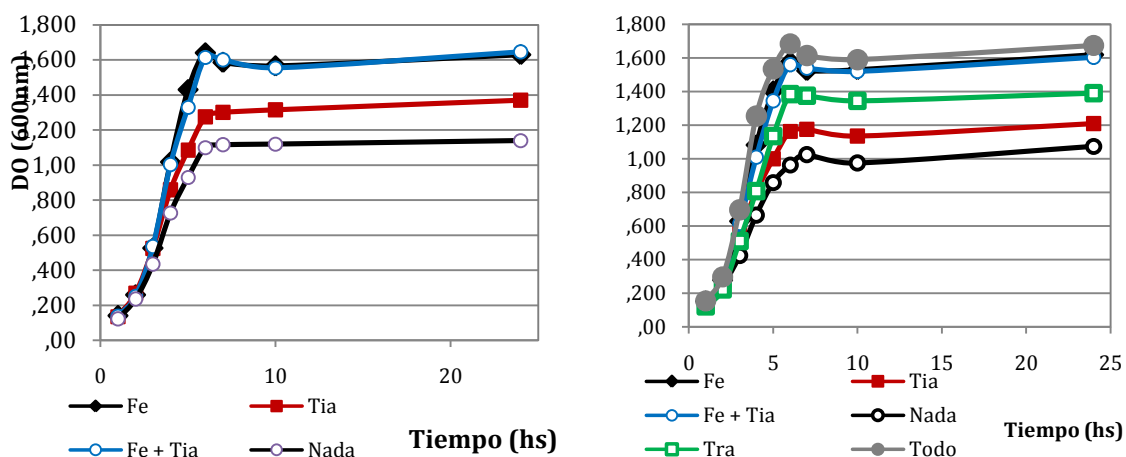


Gráfico 21. Curvas de crecimiento de la cepa K1060 en M9m, ya sea con NH_4Cl (izq.) o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (der.) como fuentes de carbono. Fe, citrato férrico; Tia, tiamina; tra, solución trazas; Nada, M9m sin aditivos; Todo, Tia + Tra + Fe.

De todas las combinaciones ensayadas, las que crecieron más rápido y alcanzaron una mayor biomasa (la cual correlaciona con la DO), fueron las que poseían citrato férrico, ya sea solo o con algún otro componente (Tabla 12. Velocidades de crecimiento durante la fase exponencial y densidades ópticas ($\lambda=600\text{nm}$) alcanzadas a las 24hs de cultivo. Ferr, citrato férrico; Tiam, tiamina; Tra, solución trazas. NE: no evaluado. La tiamina no afectó la velocidad de crecimiento, salvo apenas en la serie B ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), pero si aumentó la biomasa final.

En ausencia de aditivos, con ambas fuentes de carbono, la biomasa alcanzada a las 24 fue similar, solo se notó un mayor μ_{max} cuando el contraión de la sal de amonio fue Cl^- . Como se ve en el Gráfico 21, las curvas de los cultivos que poseen citrato férrico se superponen, y ni siquiera la condición con solución trazas, la cual posee una gran cantidad sales (ver materiales y métodos), pudo equiparar *per se* la condición de mayor crecimiento. Con estos resultados podríamos afirmar que el nutriente que resultó limitante en los cultivos de *E. coli* de las secciones anteriores fue el hierro.

	Velocidad de crecimiento - μ_{max} (h^{-1}) -		Densidad Óptica 24hs	
	NH_4Cl	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	NH_4Cl	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Sin agregados (control)	0,60 (0,02)	0,53 (0,03)	1,14 (0,10)	1,08 (0,09)
Ferr	0,67 (0,01)	0,67 (0,01)	1,63 (0,04)	1,65 (0,04)
Tiam	0,60 (0,12)	0,62 (0,02)	1,37 (0,41)	1,21 (0,10)
Ferr + Tiam	0,67 (0,01)	0,67 (0,00)	1,65 (0,05)	1,61 (0,02)
Tra	NE	0,65 (0,02)	NE	1,39 (0,01)
Ferr + Tia + Tra	NE	0,71 (0,01)	NE	1,68 (0,01)

Tabla 12. Velocidades de crecimiento durante la fase exponencial y densidades ópticas ($\lambda=600\text{nm}$) alcanzadas a las 24hs de cultivo. Ferr, citrato férrico; Tiam, tiamina; Tra, solución trazas. NE: no evaluado.

Condición II. B (Alta aerobiosis - M9m-glucosa)

Cinética de crecimiento y producción de ácido acético.

A partir de estos datos, se decidió volver a realizar el ensayo en biorreactor con un nivel alto de aerobiosis empleando el medio M9m suplementado con citrato férrico. Nuevamente la aireación se mantuvo fija en $1 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ de aire atmosférico, con una agitación inicial de 300rpm que se fue variando en el transcurso del cultivo para mantener el porcentaje de oxígeno disuelto por sobre el 20% de saturación. Esta vez se ensayaron ambas cepas (K1060 y DC1060). La fuente de carbono utilizada fue glucosa $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

En el Gráfico 22 se puede apreciar cómo el crecimiento celular puede dividirse en dos etapas bien distinguibles y características: una primera etapa de crecimiento exponencial que culmina a las 8 horas y luego la fase estacionaria, sin variaciones netas de biomasa hasta las 24hs. La entrada a la fase estacionaria estuvo dada por el agotamiento en la fuente de nitrógeno. Inmediatamente después, las células dejaron de replicarse y el consumo de glucosa se desaceleró.

El acetato fue el único ácido producido en concentraciones apreciables. En la fase estacionaria el aumento de este metabolito estuvo ligado al aumento en la biomasa describiendo una curva exponencial, hasta que la fuente de nitrógeno se agotó en la hora octava y su síntesis comenzó a aumentar de forma lineal. Eso se vio también muy claramente en el agregado de base externa (NaOH) (Gráfico 22B) para neutralizar el pH del medio, la cual pasó de ser una curva exponencial a una recta. La concentración máxima de acetato se alcanzó las 24 h cuando las cepas K1060 y DC1060 produjeron, respectivamente, 133mM y 148mM de este ácido (Tabla 13).

El nivel de oxígeno no fue limitante, ya que la velocidad de crecimiento durante la fase exponencial fue constante. La velocidad de producción de anhídrido carbónico y el consumo de oxígeno estuvieron equiparadas, aumentado con la biomasa y cayendo estrepitosamente al entrar a la fase estacionaria. A partir de este punto, tanto el CER como el OUR comenzaron un suave declive. Esto se explica con el cese en la síntesis de macromoléculas y metabolitos estructurales, que son el principal destino de la energía durante la fase exponencial.

Comparando ambas cepas, no se observaron diferencias notables, tal como ocurrió en los ensayos de frasco agitado descritos en el comienzo de este trabajo. Si se observaron algunas diferencias notables entre los cultivos realizados en M9 y aquellos en crecidos en su versión modificada, el M9m. En principio la biomasa producida fue mayor. Comparando siempre dentro de la misma cepa, con M9 la biomasa acumulada a las 24 hs fue de casi $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ mientras que con M9m, esta superó los $3,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, lo cual tiene un claro origen en el aumento del nitrógeno. La velocidad de crecimiento también fue mayor ($0,60 \text{ h}^{-1}$ vs. $0,73 \text{ h}^{-1}$ respect.).

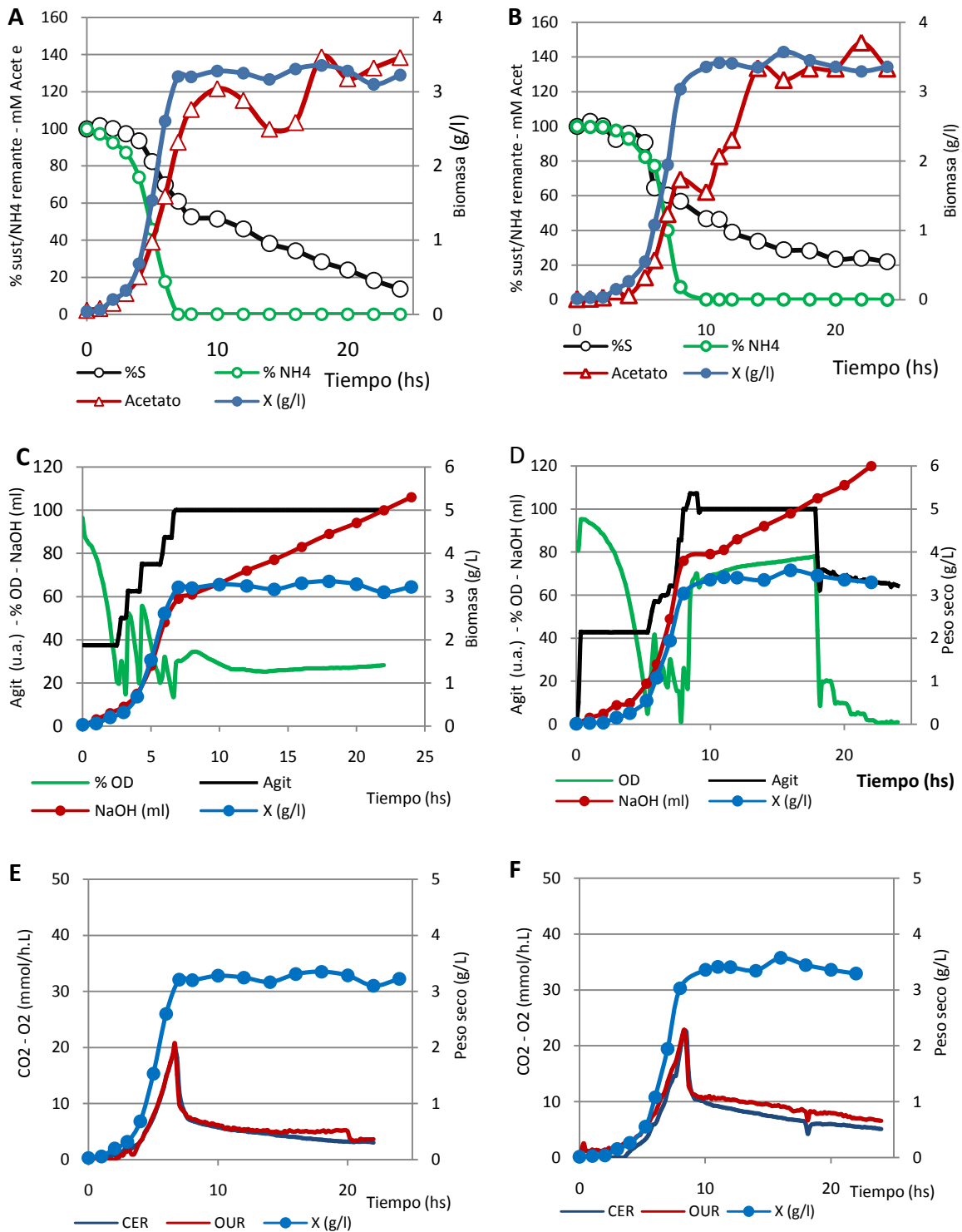


Gráfico 22. Ensayos en biorreactor en M9m glucosa 30 g·l⁻¹. Fuente de nitrógeno (%NH₄) y sustrato (%S) remanentes y acetato producido por K1060 (A) y DC106 (B). Porcentaje de oxígeno disuelto (%OD), intensidad de agitación del rotor (Agit) y volumen de NaOH 1M empleado para neutralizar el cultivo (NaOH) de K1060 (C) y DC1060 (D). Índice de oxígeno consumido (OUR) y dióxido de carbono liberado (CER) por K1060 (E) y DC1060 (D). En todos los gráficos se muestra la curva de biomasa respectiva a cada cultivo como referencia.

La velocidad de consumo específico de glucosa (q_S) casi se duplicó dejando a las 24hs, 30 mM de este azúcar, la mitad del remanente al finalizar el primer ensayo. La cantidad de acetato fue algo mayor en el M9, pero el rendimiento (Y) de este ácido en M9m terminó siendo el doble (4,3 mol/mol vs. 2,3 mol/mol). Si comparamos el rendimiento específico del acetato con respecto a la biomasa ($\Delta P/\Delta X$), cuando se utilizó M9, este parámetro fue de 75 mol por gramo de biomasa, mientras que en M9m sólo fue de poco más de la mitad (42,9 mol/g), diferencia atribuible más que nada a la diferencia en la biomasa formada y no tanto a la sutilmente mayor cantidad de acetato producido en el primer ensayo.

Parámetros relevantes	Sustrato	Biomasa			Acetato			
	q_S (mmol·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	X_{24hs} (g·l ⁻¹)	μ_{max} (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g·g ⁻¹)	24h (mM)	$\Delta P/\Delta X$ (mol·g ⁻¹)	$Y_{p/s}$ (mol·mol ⁻¹)	
Sin Fe ²⁺ K1060	8,4	1,99	0,60	0,11	149	75,0	2,3	
Con Fe ²⁺	K1060	15,1	3,10	0,73	0,12	133	42,9	4,3
	DC1060	19,1	3,30	0,71	0,14	148	45,0	3,7

Tabla 13. Parámetros relativos a la biomasa, consumo de sustrato y producción de acetato de ensayos en biorreactor con alta aireación (por sobre 20% de saturación de oxígeno disuelto en el medio). Estos experimentos se realizaron por simplificado.

Fermentaciones con aireación media: condiciones III.A y III.B.

Como mencionamos en la introducción, los datos bibliográficos indican que las condiciones en las cuales el regulador global se encuentra activo son básicamente dos: (i) Crecimiento aeróbico con fuentes de carbono gluconeogénicas y (ii) Fermentación (microaerobiosis) de la glucosa. Nosotros comprobamos en nuestros experimentos de frasco agitado, que en alta aerobiosis el efecto del alelo $\Delta creC$ sobre el metabolismo de *E. coli* es nulo con glucosa como fuente de carbono y muy poco notable con glicerol. Es por ello que planeamos ensayos en biorreactor en los cuales la cantidad de aire suministrado fuera lo suficientemente baja como para generar las condiciones en las que CreC se encuentra activo.

Para ello, establecimos una situación de compromiso entre una condición de baja aireación donde seguramente CreC se encontraría activo y otra donde la provisión de oxígeno no limitase el crecimiento de nuestras cepas. Decidimos entonces mantener el valor de OD en torno al 5%. Ajustamos un programa de agitación que nos permitió regular de forma automatizada las revoluciones de las aspas del agitador de forma tal de mantener el oxígeno disuelto en el valor deseado. La agitación inicial fue la misma que en la condición II de cultivo (300rpm y flujo de aire de 1 l·min⁻¹). Por la forma en que el equipo funciona, una vez que el valor de OD descendía por

debajo del 5%, el agitador se detenía súbitamente y comenzaba a acelerar las revoluciones hasta alcanzar el valor fijado, momento a partir del cual establecía pequeñas variaciones en la velocidad de agitación para conservar ese valor de OD.

De esta manera, se probaron las dos cepas hasta aquí estudiadas (K1060 y DC1060) utilizando M9m con glucosa o glicerol como fuente de carbono, ambas en una concentración de $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Condición III.A (Aireación media – M9m-glucosa)

Cinética de crecimiento

Lo primero que observamos es que los parámetros de crecimiento básicos de ambas cepas se mantuvieron similares a los obtenidos en la condición II.B (Tabla 14). El μ_{max} de la cepa K1060 ($0,71\pm 0,01 \text{ h}^{-1}$) fue ligeramente superior al de la cepa DC1060 ($0,63\pm 0,05 \text{ h}^{-1}$) aunque no significativo. La biomasa alcanzada a las 24hs de ubicó en torno a los $3,3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, un valor similar al que se obtuvo con alta aerobiosis. El nitrógeno se agotó a las 8hs de cultivo de la misma forma que con los cultivos crecidos en alta aerobiosis en M9m, dando inicio a la fase estacionaria (Gráfico 23). El consumo de glucosa, sin embargo, fue significativamente mayor en la cepa ΔcreC : promediando lo ocurrido a lo largo de la fase exponencial, a esta cepa ingresó glucosa a una velocidad de $2,10\pm 0,09 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, un 30% superior al de la cepa salvaje. Esto podría tener dos explicaciones diferentes aunque no excluyentes. Un ingreso de glucosa mayor se podría estar originando por (i) una regulación positiva sobre algún transportador de glucosa, (ii) un metabolismo más demandante que desplazara la glucosa hacia la glicólisis a una mayor velocidad, o (iii) una combinación de ambas.

Las células necesitan una cierta cantidad de energía para su mantenimiento. La energía de mantenimiento es, por ejemplo, necesaria para el mantenimiento de la fuerza motriz de protones que es la que se utiliza para mantener los gradientes iónicos a través de la membrana celular. Además, se necesita energía para la fabricación de proteínas, ARNm, para la reparación y para el movimiento celular. Los requisitos de energía de mantenimiento se pueden definir en términos de tasa de consumo de sustrato por unidad de biomasa para el mantenimiento: esto se conoce como el coeficiente de mantenimiento (m) [115], en contraposición a la energía de crecimiento, y se puede calcular durante la fase estacionaria, que es cuando ya no hay producción neta de biomasa. Para esta condición estudiada, el coeficiente m fue mayor para la cepa mutante, pero no de forma significativa, indicando que ambas cepas requerirían la misma energía para mantener sus funciones básicas de supervivencia.

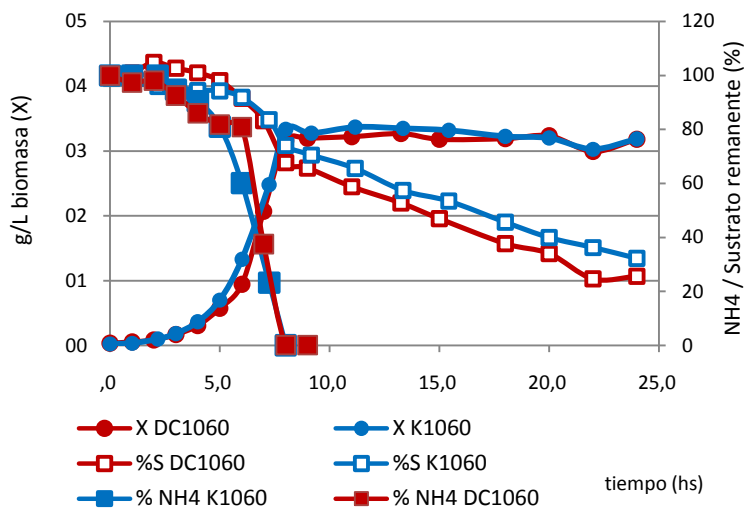


Gráfico 23. Curvas de consumo de sustrato (S) y nitrógeno (NH₄), producción de ácido acético (Acet) y biomasa generada (X) en ensayos de bioreactor en la condición III.A (M9m-glucosa 30 g·l⁻¹, OD 5%, cte.). Los cantidades de sustrato y nitrógeno se expresan en porcentaje para facilitar la lectura del gráfico.

En cuanto a la liberación de CO₂ y consumo de O₂, también vemos que ambas cepas se comportaron de forma similar entre sí y comparadas con los cultivos de la condición IIB. El mayor valor de CER y OUR lo consiguieron justo antes de entrar en fase estacionaria.

Estas similitudes entre los cultivos mantenidos por sobre un valor de OD del 20%, y los que se mantuvieron en un 5% de OD, nos permitirían concluir que aún en una condición de aireación menor, que representa ¼ del OD con el que se obtuvo un crecimiento ilimitado, ambas cepas pudieron crecer de forma irrestricta. Se cumplió así parte del objetivo de reducir la aireación sin sacrificar sustancialmente formación de biomasa.

Parámetros cinéticos	K1060	DC1060
X _{24hs} (g·l ⁻¹)	3,30 (0,20)	3,20 (0,09)
μ _{max} (h ⁻¹)	0,71 (0,01)	0,63 (0,05)
q _S (g·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	1,60 (0,09)	2,10 (0,09)
Y _{X/S} (g·g ⁻¹)	0,46 (0,02)	0,31 (0,01)
ΔX/ΔS (g·g ⁻¹)	0,16 (0,01)	0,15 (0,00)
Etanol/Acetato	0,05 (0,02)	0,01 (0,00)
m _(glucosa) (mmol·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	1,30 (0,14)	1,43 (0,14)

Tabla 14. Parámetros cinéticos de cultivos en bioreactor con baja aireación en M9m glucosa 30 g·l⁻¹.

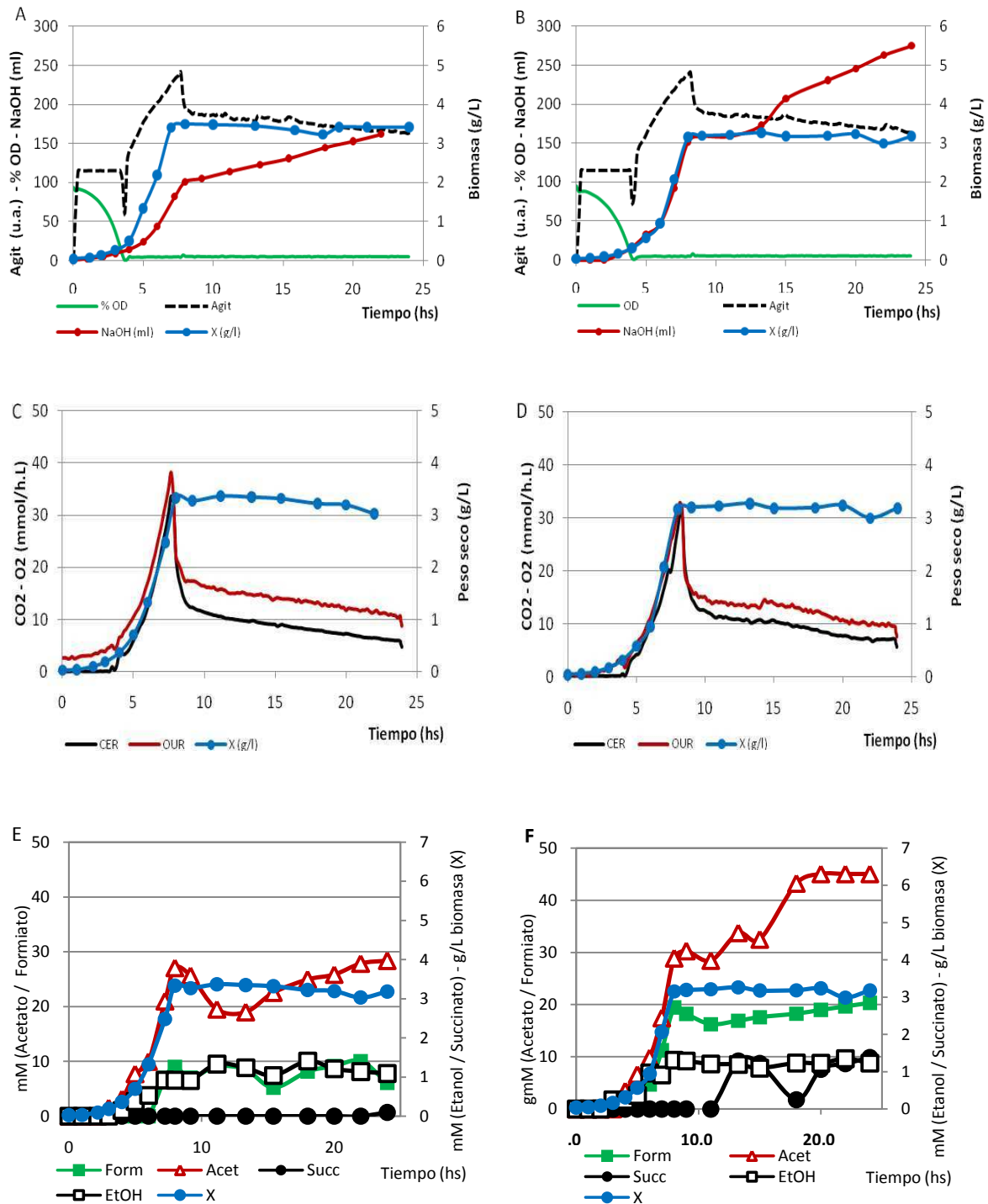


Gráfico 24. Ensayos en biorreactor en M9m glucosa. Porcentaje de oxígeno disuelto (%OD), intensidad de agitación de aspas (Agit) expresado en unidades arbitrarias, y volumen de NaOH 1M empleado para neutralizar el cultivo de K1060 (A) y DC1060 (B). Velocidades de oxígeno consumido (OUR) y dióxido de carbono liberado (CER) por K1060 (C) y DC1060 (D). Curva de producción de ácidos Acético (Acet), formico (Form), Succínico (Succ), Etanol (EtOH) de I K01060 (E) y DC1060 (F). En todos los gráficos se muestra la curva de biomasa respectiva a cada cultivo como referencia.

Perfil de ácidos.

A diferencia de los parámetros cinéticos recién mencionados, la producción de ácidos sufrió notables modificaciones con respecto a la condición aeróbica y entre ambas cepas.

En primer lugar la cantidad de metabolitos detectados fue considerablemente mayor (Gráfico 23). Los niveles de succinato, formiato y etanol fueron superiores, pero no se detectó lactato, salvo a las 24hs para la cepa K1060 (2mM). El acetato fue nuevamente el más afectado por la ausencia de CreC. A las 8hs de cultivo los valores del acetato eran similares entre ambas cepas (27mM aprox.), pero a partir de este momento, sus niveles comenzaron a incrementarse de forma más pronunciada en la DC1060, llegando a casi el doble de la concentración de K1060 a las 24hs ($45,0 \pm 0,1$ mM vs $23,4 \pm 7,1$ mM). En la cepa salvaje, los niveles de succinato producidos no superaron en todo el experimento los mínimos detectables, a diferencia de la cepa DC1060, que a la hora 13 aprox. ya produjo succinato en cantidades apreciables (en torno a los 3mM) y mantuvo este nivel hasta el final. El formiato mostró una cinética similar en ambas cepas pero con concentraciones inferiores en la cepa salvaje. A la hora 8 obtuvo su valor máximo ($\square 10$ mM en la K1060 y $\square 20$ mM en la DC1060) y se mantuvo en torno al mismo hasta las 24h. La síntesis de etanol evolucionó de forma muy similar entre ambas cepas con apenas 1mM al comienzo de la fase estacionaria y hasta que esta terminó.

El rendimiento del acetato fue de 0,37 moles por mol de glucosa en la cepa mutante y casi la mitad en la salvaje ($0,21 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$). El formiato también duplicó su rendimiento en la cepa $\Delta creC$.

	Succinato	Lactato	Formiato	Acetato	Etanol
Concentración 24h (mM)					
K1060	0,8 (1,0)	2,0 (0,5)	7,9 (2,5)	23,4 (7,1)	1,1 (0,1)
DC1060	3,6 (1,1)	ND	23,1 (4,0)	45,0 (0,1)	1,2 (0,1)
Rendimiento - $\Delta P/\Delta S$ ($\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$)					
K1060	0,01 (0,01)	0,02 (0,01)	0,07 (0,02)	0,21 (0,06)	0,01 (0,00)
DC1060	0,03 (0,01)	ND	0,19 (0,04)	0,37 (0,02)	0,01 (0,00)
Producción específica ($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$)					
K1060	0,6 (0,1)	0,2 (0,3)	2,4 (0,6)	7,1 (2,5)	0,34 (0,01)
DC1060	0,4 (0,6)	0,7 (0,9)	7,3 (1,5)	13,9 (0,4)	0,36 (0,04)

Tabla 15. Producción específica (24hs), rendimiento y concentración de los distintos ácidos secretados. Medio M9 glucosa $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Entre paréntesis se muestra el desvío estándar.

La información más valiosa que obtuvimos de estos resultados, es que en la fase estacionaria el consumo de glucosa fue considerablemente mayor para la cepa mutante. En los ácidos ocurrió algo similar a lo que venimos viendo, pero el análisis de gases no reflejó diferencias entre ambas cepas. Esto nos estaría sugiriendo que, o bien no hay diferencias promovidas por CreC en el

consumo de oxígeno y liberación de dióxido de carbono, o bien el nivel de aireación no fue lo suficientemente bajo como para inducir diferencias dependientes de CreC.

Condición III.B (Aireación media - M9m-glicerol).

Cinética de crecimiento

Los cultivos en biorreactor se repitieron utilizando glicerol como fuente de carbono. La velocidad de crecimiento en este medio fue ostensiblemente menor que con glucosa (-30%), aunque la biomasa alcanzada a las 24hs fue mayor en glicerol (+35%). Si bien estos parámetros fueron similares entre K1060 y DC1060, se pudo ver en ambas réplicas que la mutante atravesó un período *lag* de adaptación mayor que su progenitora: alcanzó la fase estacionaria una hora más tarde y agotó el nitrógeno presente en el medio también una hora más tarde. El consumo de glicerol en la fase exponencial fue similar entre ambas cepas ($\approx 1,04 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$). En este período la tasa de formación de biomasa por unidad de tiempo y glicerol consumido se ubicó para la cepa mutante y la salvaje en torno a los $0,27 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ y a las 24h (por cada gramo de glicerol consumido se formaron 0,02g (K1060) y 0,03g (DC1060) de biomasa). La energía de mantenimiento fue significativamente mayor en la cepa DC1060.

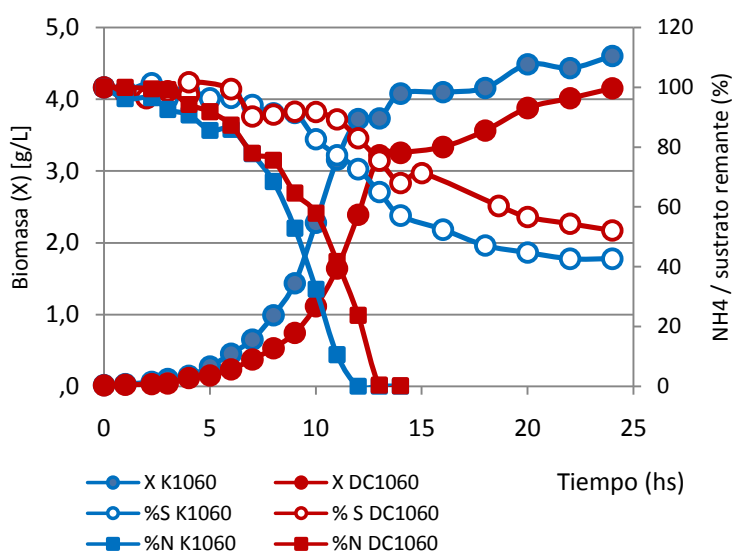


Gráfico 25. Curvas de consumo de sustrato (S) y nitrógeno (NH₄), producción de ácido acético (Acet) y biomasa generada (X) en ensayos de biorreactor en la condición III.B (M9m-glicerol 30 g·l⁻¹, OD 5%, cte.). Las cantidades de sustrato y nitrógeno se expresan en porcentaje para facilitar la lectura del gráfico.

En cuanto al CO₂ generado, vemos que la máxima velocidad se alcanzó a las 12hs (K1060) o a las 14 hs (DC1060) aprox. El consumo de oxígeno también sufrió una evolución similar. Posterior a esta abrupta caída, ambos índices (CER y OUR), comenzaron a descender más suavemente, cambio asociado a la entrada en la fase estacionaria. El valor máximo de OUR alcanzado por la

cepa salvaje fue de $27 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, mientras que la cepa $\Delta creC$ llegó a $22 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, esta diferencia no es significativa. Los valores máximos de CER fueron también distintos, aunque con una diferencia más baja: $17 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (K1060) y $14 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (DC1060).

La energía de mantenimiento en este caso fue significativamente mayor en la cepa DC1060 que en la cepa K1060 ($1,94\pm 0,10$ vs $1,37\pm 0,06$), indicando una mayor necesidad de sustrato para mantener las funciones vitales de la célula.

Parámetros cinéticos	K1060	DC1060
$X_{24\text{hs}}$ ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	4,30 (0,19)	4,19 (0,05)
μ_{max} (h^{-1})	0,45 (0,00)	0,40 (0,02)
qS ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	1,04 (0,04)	1,05 (0,07)
$Y_{x/s}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	0,26 (0,01)	0,28 (0,02)
$\Delta X/\Delta S$ ($\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$)	0,020 (0,001)	0,030 (0,001)
$m_{(\text{glicerol})}$ ($\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	1,37 (0,06)	1,94 (0,10)

Tabla 16. Parámetros cinéticos de cultivos en biorreactor con baja aireación en M9m glicerol.

Perfil de ácidos.

Nuevamente, como vimos que ocurría con los cultivos crecidos en frascos agitados, en medio mínimo con glicerol las cantidades de ácidos producidos fueron mucho menores que con glucosa. El acetato y el formiato fueron los principales productos a lo largo del ensayo, junto con el etanol. El punto máximo de producción de metabolitos no fue a las 24hs como en las otras condiciones, sino próximo al final de la fase exponencial. A partir de ese momento el formiato comenzó a descender en forma gradual, desde su máximo en torno a los 20 mM, hasta los $\approx 4\text{mM}$ a las 24hs, en ambas cepas.

La síntesis de acetato, en cambio, se detuvo dos horas antes que la de ácido fórmico, y de una forma mucho más súbita cayó hasta volverse nula su concentración en el sobrenadante a dos horas de comenzada la fase estacionaria. El etanol, a la inversa, se detectó a las seis o siete horas del inicio del cultivo, y tras llegar a su máxima concentración a las 14-15 hs, se mantuvo estable alcanzando a las 24 h los valores de $0,60\pm 0,01 \text{ mM}$ (K1060) y $0,69\pm 0,04$ (DC1060). De modo que el flujo de carbono lo estaría consumiendo para formar biomasa y liberar dióxido de carbono casi exclusivamente. La similitud entre ambos perfiles de secreción nos haría pensar que esta es una condición en la cual CreC no se encuentra activo.

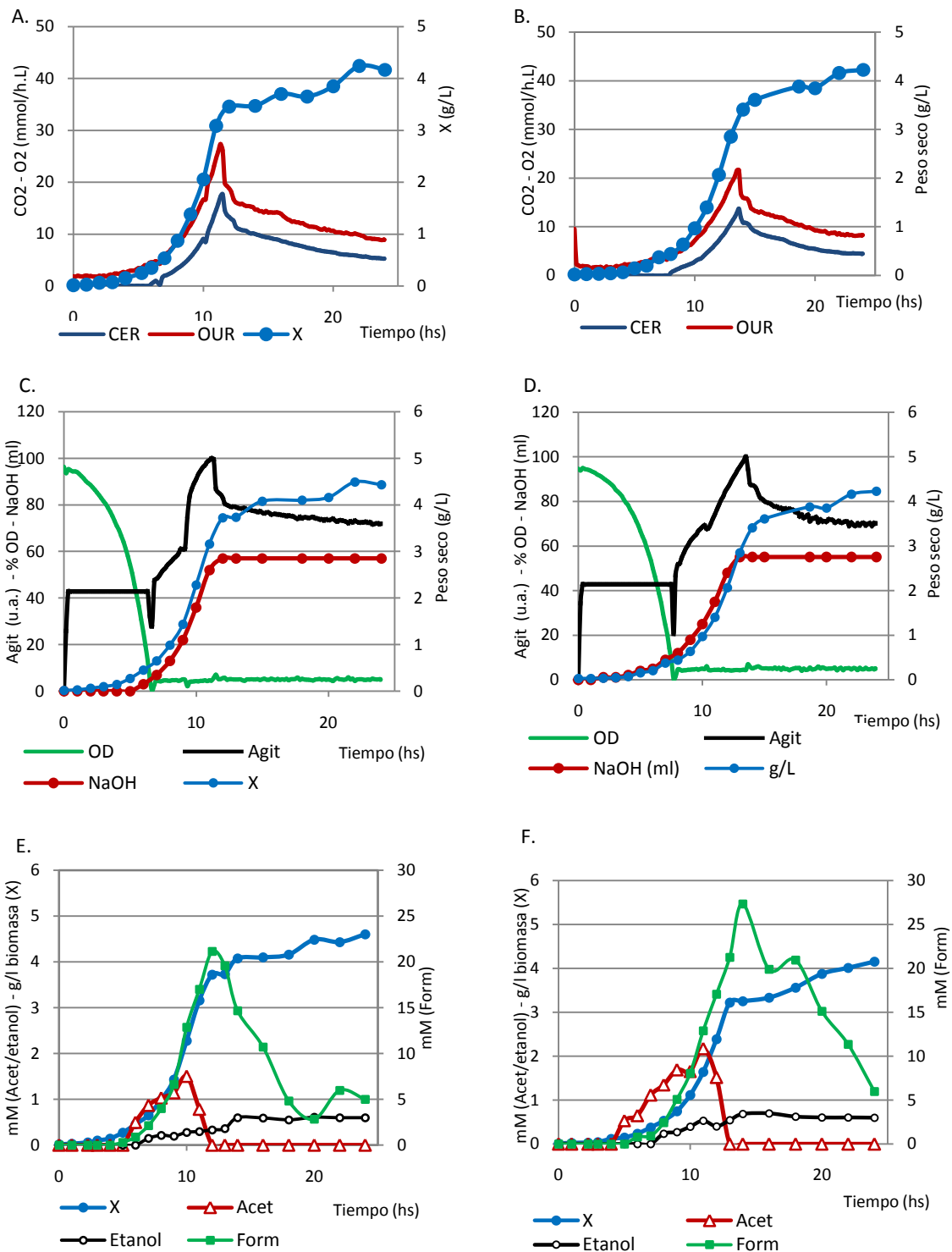


Gráfico 26. Ensayos en biorreactor en M9m glicerol. Porcentaje de oxígeno disuelto (%OD), intensidad de agitación de aspás (Agit) expresado en unidades arbitrarias, y volumen de NaOH 1M empleado para neutralizar el cultivo de K1060 (A) y DC1060 (B). Velocidades de oxígeno consumido (OUR) y dióxido de carbono liberado (CER) por K1060 (C) y DC1060 (D). Curva de producción de ácidos Acético (Acet), formico (Form), Succínico (Succ), Etanol (EtOH) de K1060 (E) y DC1060 (F). En todos los gráficos se muestra la curva de biomasa respectiva a cada cultivo como referencia.

	Formiato		Etanol	
Concentración 24h (mM)				
K1060	4,5	(0,7)	0,60	(0,01)
DC1060	3,0	(1,4)	0,69	(0,04)
Producción esp. (mmol/g)				
K1060	0,020	(0,001)	0,003	(0,001)
DC1060	0,030	(0,010)	0,004	(0,001)
Velocidad específica (mmol/g.h)				
K1060	1,03	(0,08)	0,14	(0,01)
DC1060	0,92	(0,10)	0,17	(0,01)

Tabla 17. Concentración, producción específica (24hs) y velocidad específica de producción de los distintos ácidos secretados. Medio M9 glicerol 30 g·l⁻¹. Entre paréntesis se muestra el desvío estándar.

Podemos concluir de esta condición que la combinación de glicerol y con nivel de aerobiosis empleado no permitió ver grandes diferencias en la producción de metabolitos. El succinato fue indetectable, con lo cual deberían modificarse las condiciones de crecimiento, como agregar bicarbonato de sodio al medio o gasarlo con CO₂, estrategias que han sido empleadas extensamente para la producción de succinato [45], [116]. Esto se discutirá en el próximo capítulo. La información interesante que podemos extraer de estos experimentos es que la cepa DC1060 se diferencia de la K1060 en que (i) posee una energía de mantenimiento mayor y (iii) el período de adaptación (*lag*) también es mayor. Mientras que lo primero haría pensar en una menor eficiencia energética durante la fase exponencial, la segunda nos estaría sugiriendo que la cepa DC1060 tiene una suerte de inercia metabólica mayor, por lo que le llevaría más tiempo adaptarse al nuevo ambiente que encuentra en el biorreactor, al provenir de una condición bastante distinta (el erlemeyer donde se creció el inóculo). Este punto volverá a mencionarse en la discusión final.

Capítulo III

Prefacio

En este capítulo de la tesis nos propusimos entablar distintas estrategias para mejorar la producción de dos metabolitos de interés industrial: el polihidroxibutirato (PHB) y el succinato. Sus aplicaciones fueron detalladas en la introducción, así como alguna de las estrategias utilizadas por distintos grupos para mejorar su producción.

A diferencia del succinato, el PHB no es un metabolito endógeno de *E. coli*. Esto tiene ventajas y desventajas. Una de las principales desventajas es que depende de la expresión de genes heterólogos para su producción. Esto, encarado a escala industrial y dependiendo del sistema de expresión utilizado, puede implicar el surgimiento de subpoblaciones no productivas que bajen la productividad del proceso. En nuestros trabajos hemos utilizado cepas recombinantes en las cuales los genes se encontraban en plásmidos, que pueden perderse en mayor o menor grado, especialmente en cultivos de alta densidad. Por consiguiente, buscamos insertar el operón *phaBAC* de *Azotobacter* sp. y el homólogo de *Ralstonia eutropha* (*phaCAB*) en el genoma de nuestra cepa de estudio K1060. De esa forma quedaría una cepa con los sistemas genéticos mencionados insertos en el cromosoma. Este tipo de construcción tendría varias ventajas, como eliminar la necesidad de usar una presión selectiva (antibióticos) y facilitar la introducción de modificaciones posteriores, incluyendo plásmidos de sobre-expresión (lo cual se hace difícil si la célula ya cuenta con un plásmido en su interior). También, como ya hemos hecho en otros capítulos con el succinato por tratarse de un metabolito endógeno de *E. coli*., evaluamos si las alteraciones que produce CreC en el metabolismo resultan favorables para la producción de este polímero, y analizamos los nuevos perfiles de ácidos que se generan en las cepas productoras utilizando como medio de cultivo M9 glucosa y glicerol como fuente de carbono.

Con respecto del succinato, alentados por los resultados favorables que vimos en la cepa mutante DC1060, quisimos seguir ajustando el sistema de producción agregando bicarbonato al medio. Este compuesto suele utilizarse en la producción de ácidos de cuatro carbonos porque provee de dióxido de carbono a las enzimas carboxilantes nativas de *E. coli*, las cuales fijan el carbono al fosfoenolpiruvato (PEP) para dar oxaloacetato el cual puede dar por modificaciones enzimáticas posteriores convertirse en succinato.

Para complementar estas estrategias, realizamos manipulaciones en vías metabólicas incluyendo la eliminación y/o sobreexpresión de genes de forma de encausar el flujo de carbono hacia el producto de interés, ya sea PHB o succinato. Jeong Wook Lee *et. al.* agrupa en dos categorías las estrategias posibles para mejorar la producción de un compuesto biológico [117]. Estas dos categorías son la (i) racional-intuitiva y la (ii) sistémica-razional-aleatoria. La primera puede ser aplicada a problemas bien definidos para los cuales ya se han establecido soluciones o puedan ser encontradas intuitivamente. La segunda categoría corresponde a aproximaciones que se llevan a cabo cuando la solución no es intuitivamente obvia. En nuestro caso decidimos aplicar una

estrategia racional-intuitiva dado que ya se han publicado números trabajos en los cuales se intenta mejorar la la producción de succinato y PHB mediante este tipo de estrategias. A su vez, este enfoque incluye distintos caminos posibles: (i) utilizar una fuente de carbono diferente o aumentar su uso; (ii) modificar los transportadores para bombear eficientemente el producto final, evitando que se acumulen en el espacio intracelular; (iii) eliminar o reducir la síntesis de subproducto y mejorar la vía de flujo de destino, y (iv) desviar vías para la conversión de precursores eficiente hacia un blanco deseado. Puntualmente nosotros hemos recurrido al camino (iii) para la producción de PHB y al (iii) y (iv) para aumentar la síntesis de succinato.

Como primer paso, en lo concerniente al camino (iii), decidimos generar una colección de cepas con una serie de mutaciones que eliminasen los caminos competitivos con la producción de estos compuestos. Esta parte de la estrategia es común a la producción de ambos compuestos. Los metabolitos que se buscó eliminar o disminuir fueron el acetato, lactato y etanol. También se seleccionó el gen *ptsG* el cual forma parte del sistema PTS encargado de transportar y fosforilar la glucosa una vez que ésta ha ingresado a la célula. Esta mutación era de especial interés para la producción de succinato dado que el PEP es un precursor en la síntesis de este compuesto, ya que actúa como el dador de grupo fosfato que recibe la glucosa cuando es transportada a través del PTS. En lo que hace al camino (iv) para la producción de ácido succínico, se decidió sobreexpresar una enzima heteróloga de *E. coli* (la formiato deshidrogenasa de *Candida Boidinii*) en combinación con una enzima carboxilante, la PEP carboxilasa (Ppc) y la PEP carboxiquinasa (Pck) ambas nativas de *E. coli*.

Los objetivos de este capítulo se resumen en los siguientes puntos:

- Contruir una cepa recombinante insertando en el cromosoma de *E. coli* los genes *phaBAC* (*Azotobacter sp.*) y *phaCAB* (*R. eutropha*).
- Evaluar el efecto de la mutación $\Delta creC$ en la producción de PHB en medio mineral con glucosa o glicerol como fuentes de carbono.
- Evaluar el efecto del bicarbonato de sodio en la producción de succinato en nuestras cepas de estudio.
- Mutar las vías que compiten con la síntesis de PHB y succinato (*ackA*, *adhE*, *ldhA*, y *ptsG*) y evaluar su efecto en la fisiología de las cepas K1060 y DC1060.
- Redireccionar el flujo de carbono hacia la producción de succinato mediante la sobreexpresión de las enzimas Fdh, Ppc y Pck.

Inserción de los operones *phaBAC* (*Azotobacter* sp.) y *phaCAB* (*R. eutropha*) en el cromosoma de *E. coli* para mejorar la producción de PHB.

Inserción de los genes *phaBAC* en el cromosoma.

En las fermentaciones donde el metabolito producido por el microorganismo se encuentra codificado en un plásmido, la inestabilidad del mismo es un problema importante, ya que estos cultivos atraviesan un gran número de divisiones celulares con el concomitante aumento en la probabilidad de que el material genético se segregue de manera desigual en las células hijas y se pierda. Los efectos resultantes son una menor productividad y un aumento de costo de producción, debido a la acumulación de células libres de plásmido (no productivas). La inestabilidad del plásmido se clasifica como inestabilidad segregacional o inestabilidad estructural. La inestabilidad segregacional es la pérdida de plásmido de una de las células hijas durante la división debido a la partición defectuosa. La inestabilidad estructural se atribuye a deleciones, inserciones y reordenamientos en la estructura del plásmido, que resultan en la pérdida de la función del gen deseado. El origen y el tamaño del DNA heterólogo afectan la estabilidad del plásmido, como también lo hacen parámetros fisiológicos que afectan a la tasa de crecimiento de la célula huésped, que incluyen el pH, la temperatura, la velocidad de aireación, los componentes del medio y la acumulación de proteínas heterólogas [118]. En un trabajo previo en nuestro laboratorio se demostró la caída de la productividad de PHB a causa de la inestabilidad del plásmido conteniendo la maquinaria enzimática para su síntesis (pJP24). De hecho, después de 24 hs sólo 65% de las células contenían el plásmido pJP24, y este número se redujo a 19% después de 36 h [119]. Esta baja eficiencia en el mantenimiento del plásmido fue atribuida a la naturaleza del antibiótico de selección (ampicilina) el cual es degradado extracelularmente por causa de las β -lactamasas que se secretan al medio, disminuyendo su concentración efectiva a lo largo del cultivo. Una solución que encontraron fue agregarle el gen de resistencia a un antibiótico más robusto (kanamicina) y así lograron sostener en un 96% a las 24hs de cultivo, la población de células productoras de PHB. Sin embargo, esta estrategia implicó el agregado de una resistencia extra en un plásmido con las consecuencias concomitantes que esto implica en los costos de producción y los riesgos sanitarios. Es por esto que en el presente trabajo, con el objetivo de conferir mayor estabilidad a los genes para la producción de este polímero sin recurrir a la utilización de antibióticos, se buscó insertar los genes *phaBAC* de *Azotobacter* sp. 8 en el cromosoma de *E. coli* K1060. De esta forma la permanencia de los mismos no estaría sujeta a una segregación exitosa del vector, ni mediarían antibióticos en su manutención ya que los genes *phaBAC* segregarían con el cromosoma.

La estrategia empleada se detalla en la sección de materiales y métodos. Brevemente, se utilizaron los genes de *Azotobacter* sp.8 contenidos en el plásmido pJP24 y se construyó con ellos un plásmido suicida conteniendo dos regiones de homología con el cromosoma de *E. coli* , un origen de replicación condicional (R6K) y un casete escindible de kanamicina. El plásmido construido no fue transformado directamente en la cepa K1060 si no que se lo linealizó a partir

de un sitio de corte único entre las dos regiones de homología, y se lo fusionó al cromosoma de la cepa K1060 mediante la técnica de Datsenko y Wanner [79]. La elección del sitio blanco para la inserción se basó en un trabajo previo de nuestro laboratorio en el cual se estudió el efecto de anular el gen *ldhA* (codifica la lactato deshidrogenasa A) en la producción de PHB [85]. Dado que esta modificación mejoró la producción del polímero, se eligió este gen como blanco para la inserción del fragmento lineal conteniendo los genes *phaBAC*.

La correcta inserción del fragmento se corroboró mediante estudios de PCR. Cuatro colonias obtenidas luego de la transformación se utilizaron para hacer PCR de colonia con primers que amplifican regiones internas del fragmento y también con primers que hibridan en las regiones flanqueantes del gen *ldhA*. En este último caso, dado el tamaño del amplicón (5,5 kb), esperaríamos que no hubiese producto de amplificación.

Evaluación de la producción de PHB en cepas PL1060-KF

A los cuatro clones de esta cepa, denominada PL1060-KF, se le extrajeron los casetes de kanamicina y se procedió a crecerlas en medio rico (LB) con glucosa $30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, alta agitación y una relación (volumen de medio)/(volumen de frasco) = 1/10, condición considerada en este trabajo como alta aerobiosis. Los cultivos se sometieron a análisis cualitativos (tinción con azul de Nilo) y analíticos (determinación de PHB por HPLC). Con ninguno de los métodos se pudo detectar la presencia del polímero en las células.

Este escenario nos hizo pensar que el sistema de expresión empleado podría no haber sido el adecuado. La construcción del plásmido pMSG1 respetó la región promotora existente en el plásmido pJP24 [119], aportada por el vector de expresión pQE31. Específicamente dicho vector posee un promotor quimera compuesto por el promotor del fago T5, dos operadores *lacO* (del operón *lac*). Luego viene un sitio EcoRI seguido por la región Shine-Dalgarno de unión al ribosoma. La cepa K1060 tiene una mutación *lacI60* por la cual es incapaz de reprimir el operón *lac* vía *LacI/lacO* o cualquier otro sistema equivalente. Esto hace innecesario la inducción con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Para chequear que el sistema no estuviese siendo reprimido fruto de una reversión en este alelo mutante, agregamos IPTG a un nuevo cultivo realizado en idénticas condiciones que el ensayo anterior. Los resultados fueron nuevamente negativos.

Hay varias posibles explicaciones para la falta de acumulación del polímero, que van desde una expresión insuficiente de los genes a posibles problemas en las inserciones.

Dado que nuestro laboratorio contaba con otro sistema génico conteniendo la maquinaria para la síntesis de PHB proveniente de *Ralstonia eutropha* (*phaCAB*) en el plásmido pTZ18U-PHB, decidimos aprovechar parte del plásmido pMSG1 para repetir la estrategia de inserción empleada con los genes *phaBAC* de *Azotobacter* sp. 8. Para ello se clonó el casete de kanamicina del plásmido pKD4 en el vector pTZ18U-PHB en un sitio *HindIII* tal como se hizo para construir el plásmido pJP24-KF. Al vector resultante de este clonado se lo denominó pPHB-KF. Los genes *phaCAB* y el casete de kanamicina se fusionaron al fragmento O12 a través por corte con *XhoI* y ligado, para dar el plásmido pMSG2. Dicho plásmido reunía las mismas características que el

pMSG1, la única diferencia es que fue necesario cortarlo a partir de un sitio *MulI* a pocos pares de bases del sitio *EcoRV* utilizado para linealizar el plásmido pMSG1. A continuación se procedió como ya fue descrito para la construcción de la cepa PL1060-KF. A la cepa K1060 transformada con los genes *phaCAB* de *R. eutropha* mediante el fragmento linealizado de pMSG2 se la denominó PL1060R-KF. La forma de corroborar la presencia del fragmento transformante fue la misma que para el caso de la cepa PL1060-KF. Tras utilizar los procedimientos cualitativos y cuantitativos de detección de PHB ya descritos para dos clones transformantes, tampoco se pudo observar la presencia del polímero.

En este último caso, los genes *phaCAB* venían acompañados por su promotor original, el cual permitía la correcta expresión de los genes tanto en el plásmido pTZ18U-PHB como en los derivados de este, pPHB-KF y pMSG2. Sin embargo, esto no fue así para la cepa PL1060R-KF.

En un trabajo de Prieto y col. de 1999 [120], generan una cepa recombinante de *E. coli* conteniendo el gen de la polimerasa *phaC1* de *Pseudomonas oleovorans* en copia única fusionado al cromosoma. Como resultado obtuvieron una cepa capaz de producir PHAs (PHA-cm) de cadena media hasta acumular el 10 % del peso seco total, bajo un régimen especial de crecimiento con glicerol como sustrato y ácido palmítico como precursor de los PHA-cm. En este caso el sustrato de la polimerasa (una molécula de 3-hidroxiacil-CoA) provenía del ciclo de β -oxidación de ácidos grasos y no de una vía heteróloga como en nuestro caso. Si bien esta cepa logró rendimientos similares a los obtenidos cuando el gen *phaC1* fue expresado en un plásmido multicopia, los autores indican que hace falta una muy baja concentración de esta enzima para ver sus efectos en la síntesis de PHAs.

Posteriormente a la realización de nuestros experimentos, Tyo *et. al.*, lograron generar una cepa recombinante de *E. coli* con un alto número de copias cromosómicas de los genes *phaAB* de *R. eutropha* y los genes *phaEC* (codificando las dos subunidades de la PHB polimerasa) de *Allochromatium vinosum*. Mediante una ingeniosa estrategia lograron generar una inserción en copia única del operón *phaECAB* en el cromosoma, promoviendo la selección de variantes multicopia mediante un aumento sostenido en la presión de selección con concentraciones crecientes de cloranfenicol. El gen *cat* ligado a dicho operón, en la medida que se multiplicaba por recombinaciones espontáneas, generaba por añadidura la multiplicación de los genes *phaECAB*. De esta forma se logró una cepa multicopia para estos genes con rendimientos de PHB similares a los de la cepa que porta el plásmido de expresión.

Debido a las dificultades encontradas y a la imposibilidad de obtener recombinantes productoras de PHB al intentar insertar los genes de dos organismos diferentes, decidimos abandonar la estrategia de insertar los genes *phaC*, *phaB* y *phaA* en el cromosoma de *E. coli*, y continuar de aquí en más con el sistema plasmídico de expresión heteróloga pPHBKF.

Estudio de los efectos de CreC en la producción de PHB y succinato.

Evaluación del efecto del bicarbonato en la fisiología de nuestras cepas de estudio.

Como mencionamos en la introducción, el succinato es uno de los productos de fermentación naturales de *E. coli*, pero su síntesis es muy pobre bajo condiciones normales de crecimiento. En particular nuestra cepa de trabajo, K1060, produce una cantidad apenas detectable de este producto. Si bien los valores absolutos de succinato secretado por la cepa mutante DC1060 son bajos comparados con otras cepas recombinantes de *E. coli* [48], la anulación del gen *creC* tuvo un efecto beneficioso en la producción de este compuesto. Esto fue más claro en la condición de baja aerobiosis, en la cual la producción de succinato aumentó un 350% en la mutante DC1060 respecto de la cepa salvaje.

Dado que la producción de succinato por la vía reductora requiere de la fijación de dióxido de carbono, una estrategia muy utilizada para mejorar su producción es agregar bicarbonato de sodio al medio de cultivo, o gasear CO₂. Con el fin de comprobar si el bicarbonato de sodio estimula la producción de succinato en nuestras cepas, realizamos cultivos en baja aerobiosis probando dos fuentes de carbono distintas: glucosa y glicerol (utilizando 30 g/l de en ambos casos y con el agregado de citrato férrico). Si bien la concentración de bicarbonato empleada en este tipo de ensayos varía en los distintos trabajos (de 60mM a 120 mM), nosotros decidimos partir de una concentración de 100 mM dado que es un valor intermedio con el que Ingram y col. han obtenido resultados que se encuentran entre los mejores en la literatura [68]. Se tomaron muestras a las 24h y también a las 48h y 72h para evaluar si la producción de metabolitos se mantenía constante. Como control se realizó un cultivo en paralelo sin bicarbonato, del cual se midieron los ácidos orgánicos únicamente a las 24h. Se probaron en todos los casos las cepas K1060, K1060C y DC1060.

Con glucosa como fuente de carbono la concentración de succinato aumentó sólo en la cepa $\Delta creC$ (Tabla 19A). Para las cepas salvaje y constitutiva los valores de este ácido fueron iguales al de sus respectivos cultivos sin bicarbonato y constantes en todos los tiempos medidos. El incremento en la cepa DC1060 fue de un 100%, pasando de 2mM a 4mM a las 24h y a 4,5 mM a las 48 y 72hs. Este incremento estuvo asociado a una mayor biomasa (Tabla 19): de 0,36 g/l sin bicarbonato, pasó a 0,49±0,07 g/l a las 24h, a 0,60±0,01 g/l a las 48h y 0,67±0,10 a las 72h. Las cepas K1060 y K1060C también vieron aumentados su biomasa, inclusive de forma levemente superior al de la mutante nula, pasando de 0,39±0,02 y 0,35±0,02 respectivamente, a un promedio de 0,73 g/l a partir de las 24h y hasta las 72h. Estos resultados indican que, si bien la adición de bicarbonato al medio de cultivo tuvo un efecto benéfico en el crecimiento celular de K1060 y K1060C aumentado la cantidad de biomasa producida, no arrojó diferencias sustanciales en la producción de succinato. La biomasa a las 24h ya era casi el doble en las cepas K1060 y K1060C respecto al control y se mantuvo en torno a este valor hasta las 72h. En la cepa DC1060, a las 24h registró un aumento del 40%, otro 30% a las 48hs y se equiparó a las otras cepas en el punto de 72h. Esto indicaría que con NaHCO₃ la cepa $\Delta creC$ ve afectada su tasa de división celular.

Con respecto de los otros ácidos producidos (Tabla 19A), el único que disminuyó respecto del control sin bicarbonato a las 24h fue el acetato, el cual disminuyó un 50% en todas las cepas y fue aumentando con el tiempo hasta alcanzar niveles similares al control. De forma opuesta, el formiato y el lactato se duplicaron en cada cepa ya en la medición de 24h respecto de los valores alcanzados sin NaHCO_3 en el mismo tiempo y se mantuvieron estables en los dos tiempos posteriores. Ahora bien, si comparamos la producción de estos ácidos respecto de la biomasa formada ($\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$), el incremento no fue significativo en las cepas salvaje y constitutiva, pero sí en la cepa DC1060.

Con glicerol (Tabla 19B). Muy por el contrario, con una concentración de 100mM de NaHCO_2 los cultivos tuvieron un escaso crecimiento (Tabla 18). Esto fue sorprendente dado la existencia de trabajos previos donde esta estrategia fue utilizada con muy buenos resultados [9], [10]. Dado este inconveniente, probamos crecer la cepa salvaje en distintas concentraciones de bicarbonato (0 mM, 20 mM, 50 mM y 100 mM) encontrando que las mejores condiciones para la acumulación de succinato y crecimiento se daban con una concentración de 20 mM de bicarbonato. Al medir el pH del sobrenadante a las 72h, vimos que cuanto mayor era la concentración de esta sal, más alto era el pH, llegando a estar en torno a un pH 9 con 100 mM, y a un pH levemente ácido (pH 6 aprox) con 20 mM de NaHCO_3 , sugiriendo que un pH demasiado alcalino podría ser la causa del magro crecimiento.

	Cepa	Sin NaHCO_3	Con NaHCO_3			
		24 h	24 h	48 h	72 h	
Glucosa	K1060	0,39 (0,02)	0,76 (0,02)	0,75 (0,02)	0,69 (0,06)	
	K1060C	0,35 (0,02)	0,77 (0,05)	0,74 (0,05)	0,70 (0,11)	
	DC1060	0,33 (0,01)	0,49 (0,07)	0,60 (0,01)	0,67 (0,10)	
Glicerol	K1060	0,35 (0,03)	0,37 (0,01)	0,54 (0,02)	0,76 (0,04)	
	K1060C	0,29 (0,00)	0,38 (0,02)	0,52 (0,01)	0,74 (0,01)	
	DC1060	0,37 (0,03)	0,42 (0,04)	0,59 (0,03)	0,55 (0,02)	

Tabla 18. Biomasa final a las 24 h de iniciado el cultivo ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). Las fuentes de carbono empleada fueron glucosa o glicerol, con el agregado o no de bicarbonato de sodio.

Repetimos el experimento con 20 mM de bicarbonato y tomamos muestras a las 24h, 48h y 72h. En este caso, a diferencia de lo observado con glucosa como fuente de carbono, las cepas K1060 y K1060C produjeron cantidades mayores de succinato que la cepa DC1060 a las 72h (+39%), aunque la producción máxima de esta última fue a las 48h, cuando la cantidad succinato fue del orden de los 1,5 mM, similar a la de K1060 y DC1060 a las 72h. La biomasa fue la misma entre las tres cepas para cada tiempo, pero fue incrementándose a las 48h y 72h respecto del control, llegando en este último tiempo a valores similares a los que se vieron con glucosa a las 24h para K1060 y K1060C y a las 48h para DC1060, indicando que el crecimiento fue más lento con glicerol.

A	Cepa	Succinato		Lactato		Formeato		Acetato		
		mM	mmol/g	mM	mmol/g	mM	mmol/g	mM	mmol/g	
S/NaHCO ₃	K1060	0,1 (0,0)	0,4 (0,1)	18 (2)	46 (8)	7 (1)	17 (3)	21 (2)	53 (5)	
	K1060C	0,2 (0,0)	0,5 (0,1)	17 (2)	48 (8)	8 (1)	22 (3)	19 (1)	54 (1)	
	DC1060	2,0 (0,2)	5,9 (0,5)	4 (2)	11 (4)	15 (1)	44 (3)	26 (2)	79 (7)	
(Con NaHCO ₃ (100 mM))	24hs									
	K1060	0,2 (0,0)	0,3 (0,0)	39 (2)	52 (4)	15 (6)	19 (8)	10 (0)	13 (1)	
	K1060C	0,2 (0,0)	0,3 (0,0)	39 (5)	51 (5)	19 (6)	26 (9)	11 (1)	14 (2)	
	DC1060	4,1 (0,0)	8,5 (1,7)	14 (0)	28 (3)	33 (1)	62 (3)	19 (0)	38 (5)	
	48hs									
	K1060	0,2 (0,0)	0,2 (0,1)	46 (1)	62 (3)	15 (1)	20 (1)	17 (1)	22 (1)	
	K1060C	0,2 (0,1)	0,2 (0,1)	45 (3)	60 (4)	15 (5)	20 (7)	16 (2)	21 (2)	
	DC1060	4,4 (0,2)	7,4 (0,2)	18 (1)	30 (1)	35 (5)	63 (4)	25 (1)	41 (2)	
	72hs									
	K1060	0,3 (0,0)	0,4 (0,0)	46 (2)	67 (8)	12 (0)	17 (1)	19 (1)	28 (2)	
	K1060C	0,3 (0,2)	0,5 (0,4)	42 (4)	61 (9)	12 (3)	18 (7)	18 (1)	27 (7)	
	DC1060	4,4 (0,2)	6,8 (1,3)	16 (1)	25 (5)	34 (6)	52 (5)	25 (4)	39 (11)	
B	Cepa	Succinato		Lactato		Formiato		Acetato		
		mM	mmol/g	mM	mmol/g	mM	mmol/g	mM	mmol/g	
S/NaHCO ₃	K1060	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,6 (0,2)	4,5 (0,7)	2,3 (0,1)	7 (1)	6,3 (0,3)	18 (2)	
	K1060C	0,1 (0,1)	0,2 (0,3)	1,5 (0,1)	5,0 (0,3)	2,1 (0,3)	7 (1)	5,3 (0,3)	18 (1)	
	DC1060	0,7 (0,1)	1,9 (0,2)	0,3 (0,1)	0,9 (0,4)	5,7 (1,8)	15 (5)	7,3 (0,4)	20 (2)	
Con NaHCO ₃ (20 mM)	24hs									
	K1060	ND	ND	1,2 (0,1)	3,2 (0,4)	4,1 (0,2)	11 (1)	5,5 (0,8)	15 (2)	
	K1060C	ND	ND	1,1 (0,3)	2,8 (0,8)	3,3 (0,5)	9 (1)	4,8 (0,3)	13 (2)	
	DC1060	ND	ND	0,2 (0,1)	0,6 (0,2)	13,1 (1,4)	31 (2)	5,6 (0,4)	13 (1)	
	48hs									
	K1060	0,4 (0,1)	0,8 (0,1)	4,7 (0,4)	8,7 (0,6)	8,2 (0,3)	15 (1)	9,6 (0,3)	22 (1)	
	K1060C	0,5 (0,3)	0,9 (0,5)	4,5 (0,8)	8,7 (1,4)	8,0 (0,5)	15 (1)	9,8 (0,3)	21 (2)	
	DC1060	1,1 (0,1)	1,9 (0,3)	0,5 (0,3)	0,8 (0,6)	25,4 (4,5)	43 (9)	11,1 (1,4)	41 (2)	
	72hs									
	K1060	1,7 (0,2)	2,2 (0,4)	10,4 (0,8)	13,8 (0,6)	14,9 (1,0)	20 (2)	16,1 (1,0)	21 (2)	
	K1060C	1,6 (0,2)	2,2 (0,3)	10,8 (1,2)	14,6 (1,8)	13,3 (0,1)	18 (1)	16,4 (0,9)	22 (7)	
	DC1060	0,6 (0,1)	1,1 (0,3)	0,6 (0,5)	1,1 (0,8)	30,1 (2,3)	54 (4)	21,8 (2,2)	39 (9)	

Tabla 19: Concentración de metabolitos en cultivos crecidos en M9 glucosa (A) o glicerol (B) con bicarbonato de sodio. s/ Sin NaHCO₃, sin bicarbonato de sodio a las 24 h.

En lo que hace a los otros ácidos de fermentación, con glicerol como fuente de carbono, no se observaron diferencias significativas por parte de las cepas K1060, K1060C y DC1060 a las 24h respecto del control sin NaHCO₃. El formiato fue la excepción, siendo a las 24h mayor con 20 mM de NaHCO₃ en términos de concentración volumétrica (mM) y específica (mmol·g⁻¹). En los sucesivos puntos medidos, estos ácidos fueron aumentando, a diferencia de lo ocurrido con glucosa donde solo el acetato se incrementó.

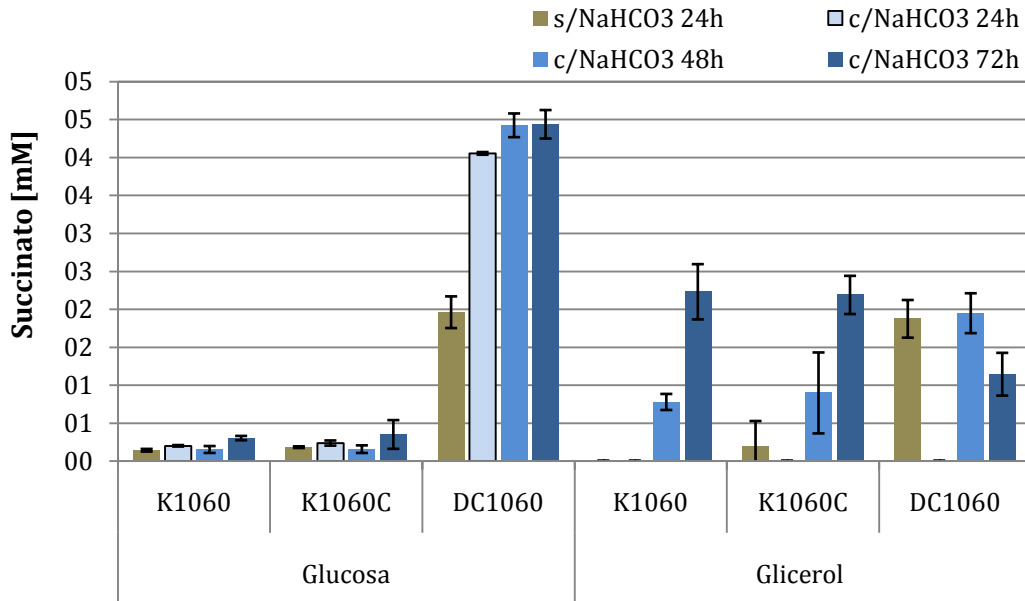


Gráfico 27: Concentración de ácido succínico producida por las cepas K1060, K1060C y DC1060 en M9 con glucosa o glicerol como fuentes de carbono y con el adiciónado (24h, 48h, 72h) o no (24h) de bicarbonato de sodio (100mM glucosa, 20mM glicerol).

Como conclusión de estas pruebas podemos decir que el bicarbonato tuvo un efecto generalizado en la distribución de ácidos en todas las cepas. Gran parte de este efecto, como hemos mencionado, fue a expensas de un incremento de la biomasa. Las formas en las que el bicarbonato estaría actuando son dos (i) ejerciendo el rol de tampón (ii) proveyendo CO_2 para la formación de ácidos de cuatro carbonos [121]. El succinato es un ejemplo de esto. En un trabajo de 2009, Wei Wang estudia la producción de succinato a partir de una cepa recombinante de *E. coli* ($\Delta pflB$ *ldhA*) [122]. Entre otras cosas ve que el efecto de sobre-expresar la enzima malato deshidrogenasa (*Mdh*) nativa de *E. coli* (la cual favorece la producción de ácidos C4 al reducir el oxaloacetato a malato) tiene un efecto similar en la producción de succinato al de simplemente agregar bicarbonato de sodio $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ (120 mM) al medio, en cultivos anaeróbicos. Este compuesto, *per se* es capaz de aumentar la actividad enzimática de enzimas clave para la producción de ácidos C4 como la fosfoenolpiruvato carboxilasa (*Ppc*) y la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (*Pck*). La comparación con nuestros experimentos es difícil por tratarse de cepas distintas y una condición de aerobiosis también distinta, pero en cualquier caso sirve para observar que el bicarbonato (o el CO_2 que libera) induce la activación de determinadas enzimas más allá de solo mejorar las condiciones de crecimiento balanceando el pH. Si bien vimos que con glucosa el succinato aumentó junto con la biomasa en la mutante DC1060, esto no fue así en las cepas salvaje y constitutiva, las cuales también vieron aumentado su crecimiento: las tres cepas aumentan su biomasa pero no necesariamente la síntesis de succinato. Es decir que no podemos establecer cuál de qué forma actuó el bicarbonato en nuestros experimentos para ocasionar este efecto sobre la producción de succinato con glucosa como fuente de carbono (si se produjo por un aumento en la biomasa, por un efecto sobre la regulación de genes, etc), pero sí que la

ausencia de CreC hizo posible ver un efecto del bicarbonato sobre la producción de ácido succínico. Con glicerol como fuente de carbono las diferencias se observaron principalmente en el lactato y el formiato y menos en el acetato, pero no hubo diferencias sustanciales en el succinato.

Efectos del regulador CreC en la producción de PHB y análisis del perfil de ácidos de las cepas productoras.

Las cepas K1060 y DC1060 se transformaron con el plásmido pPHBKF el cual fue construido en este trabajo a partir del plásmido pTZ18U-PHB. El plásmido pPHBKF confiere resistencia a kanamicina y ampicilina. El primero fue utilizado como antibiótico de mantenimiento dado a que no se degrada extracelularmente como la ampicilina. Para estos ensayos se realizaron cultivos en medio mineral M9 (con citrato férrico) y glucosa o glicerol como fuentes de carbono, en una concentración de 30 g/l. De ajustó el volumen del inóculo para que la DO inicial fuese de 0,1 y se cosechó a las 24h. El contenido de PHB fue analizado por la técnica de hidrólisis ácida y posterior cuantificación del ácido crotónico resultante, en HPLC según lo descrito en materiales y métodos. Los ácidos también se cuantificaron por HPLC.

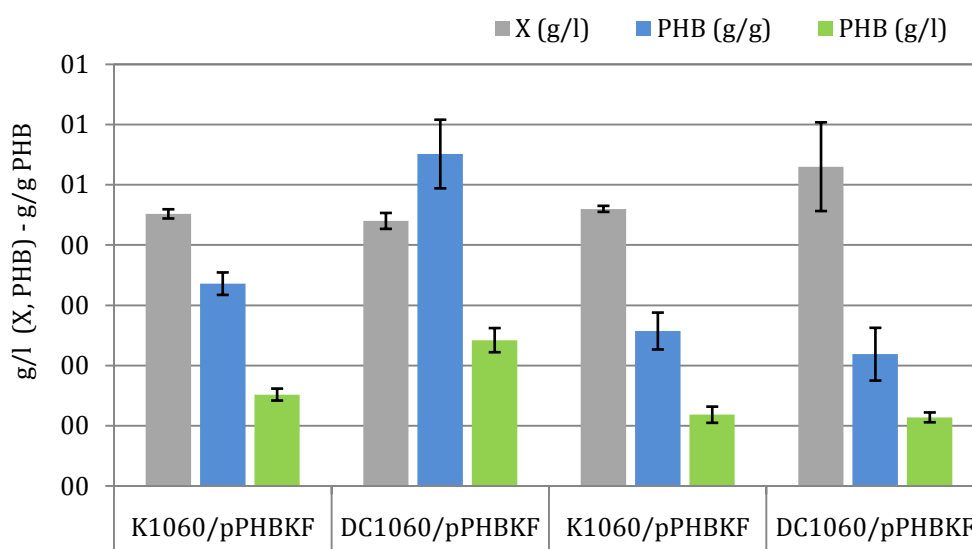


Gráfico 28: Producción de PHB en cepas K1060/pPHBKF y DC1060/pPHBKF. Los cultivos se crecieron en M9 con glucosa o glicerol como fuentes de carbono, en condiciones de baja aerobiosis. Se utilizó kanamicina para mantener el plásmido.

En glucosa como fuente de carbono, la cepa DC1060/pPHBKF produjo hasta un 60% más de PHB ($0,24 \pm 0,02$ g/l) que la cepa control ($0,15 \pm 0,01$ g/l) (Gráfico 28). Dado que ambas cepas generaron

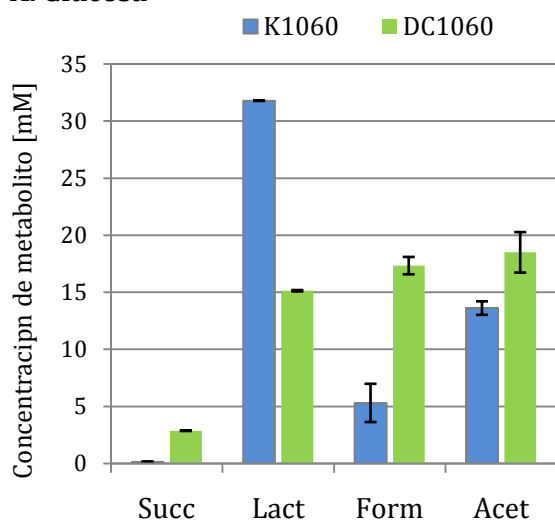
una biomasa total en torno a los 0,44 g/l, la producción específica también reflejó un aumento del 60% en la cepa mutante ($0,55 \pm 0,06$ g/g) respecto a la cepa salvaje ($0,34 \pm 0,02$ g/g).

Respecto al glicerol, la diferencia de PHB producida fue estadísticamente insignificante, en torno a los 0,25 g/l de polímero (0,12 g/g) para ambas cepas que también tuvieron una producción de biomasa similar, en torno a los 0,5 g/l (Gráfico 28).

En lo que hace a los perfiles de ácidos, las tendencias fueron las mismas que con glucosa. Lo destacable es la cantidad de formiato producido por la cepa DC1060/pPHBKF, la cual llega a los $10,5 \pm 1,2$ mM, casi ocho veces más que en la cepa control ($1,4 \pm 0,01$ mM). El succinato y el piruvato fueron prácticamente indetectables ($< 0,3$ mM). También hubo una baja producción de ácido láctico (control: $1,3 \pm 0,2$ mM; mutante: $0,4 \pm 0,2$) y el ácido acético fue mayor en la cepa DC1060/pPHBKF (Gráfico 29).

El incremento en la cantidad de PHB producida en las mutantes a partir de glucosa podría deberse a una mayor disponibilidad de acetyl-CoA. Como se describió en los experimentos anteriores, las mutantes producen menos lactato y mayor cantidad de formiato y acetato, indicando que el piruvato se transforma mayoritariamente en acetyl-CoA en lugar de reducirse a lactato. El acetyl-CoA luego es transformado en acetato y formiato y, en el caso de las cepas que tienen genes *pha*, también en PHB.

A. Glucosa



B. Glicerol

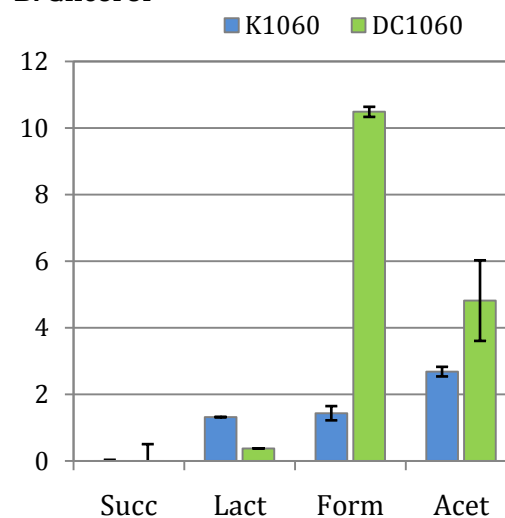


Gráfico 29: Perfil de ácidos de cepas productoras de PHB K1060/pPHBKF y DC1060/pPHBKF crecidas en M9 glucosa (A) o glicerol (B). Los cultivos fueron cosechados a las 24hs. Pir: Piruvato; Succ: succinato; Lact: lactato; Form: formiato; Acet: acetato.

Construcción de una colección de mutantes para la eliminación de vías competitivas de la producción de PHB y succinato.

Con el objetivo de alcanzar mejores títulos de estos compuestos se estudió la posibilidad de realizar distintas modificaciones genéticas en la cepa DC1060. El primer paso que dimos fue eliminar las vías metabólicas competitivas en términos de precursores carbonados y poder reductor. Ya hemos mencionado en la introducción buena parte de las modificaciones realizadas en distintos trabajos. En general, estas estrategias apuntan a disminuir la producción de metabolitos de fermentación, como el acetato, lactato, el etanol y el formiato. En nuestro caso, como vimos en los capítulos precedentes, la mutación en el gen *creC* provocó, en líneas generales, un aumento importante en la síntesis de acetato y formiato, y una disminución en la producción de lactato. El etanol se mantuvo virtualmente invariable en la mutante DC1060. A continuación explicamos el razonamiento utilizado para elegir cuáles de los genes involucrados en la síntesis de estos compuestos modificar.

Acetato: La vía de producción de acetato más importante es la codificada en el operón *pta-ackA*, por la cual una molécula de acetyl-CoA es transformada en acetilfosfato (mediante el producto de *pta*) y luego en acetato (*ackA*) con la concomitante fosforilación de una molécula de ADP. Dado que el acetilfosfato también es un dador de grupos fosfatos en cadenas de señalización [123], solamente eliminamos el gen *ackA*. En nuestras cepas mutantes vimos que una gran parte del flujo de carbono se desplazaba hacia acetato, como producto de una mayor actividad de la enzima acetato quinasa. Eliminar este metabolito es de vital importancia sobre todo para el PHB, el cual se requiere de Acetyl-CoA para su síntesis.

Etanol: Si bien no es uno de los principales metabolitos producidos por nuestra cepa, creemos que como resultado de eliminar otras vías fermentativas podría promoverse la síntesis de etanol para regenerar NAD^+ , en una suerte de salida de emergencia para la reoxidación de equivalentes de reducción en exceso. La eliminación del gen *adhE* dejaría disponible más poder reductor para llevar adelante la producción de succinato y PHB.

Lactato: Este compuesto es el único que disminuye claramente como resultado de una mutación en el gen *creC*. Esto indicaría que no sería deseable manipular su síntesis en una cepa productora de succinato. Sin embargo, cabe la posibilidad de que el aumento de succinato que vimos en la mutante DC1060 fuera a expensas de una disminución en la producción de lactato. Por eso quisimos poner a prueba esta hipótesis construyendo cepas mutantes que consideraran el gen *ldhA*. Por otro lado, en lo que hace al PHB, en trabajos previos de nuestro laboratorio se comprobó que la mutación de este gen causa un aumento en la producción de polímero [85].

PTS: Este transportador multimérico fue mencionado en la introducción. Tiene la función de transportar azúcares (entre ellos glucosa) al interior de la célula y de fosforilarlos, interviniendo también en la puesta en marcha de la represión catabólica mediada por CRP. Para fosforilar la glucosa a glucosa-6-fosfato, el sistema PTG utiliza PEP como dador del grupo fosfato,

transformando el PEP en piruvato. Dado que las enzimas carboxilantes que intervienen en la vía de síntesis del succinato tienen como sustrato al PEP, este transportador estaría compitiendo directamente por él. En un experimento de evolución metabólica Jantama y col. obtuvieron una cepa mutante superproductora de succinato, la cual se supo en un trabajo posterior, debía su capacidad productora de este compuesto a la mutación de tres genes: *pck* (codifica la PEP carboxiquinasa), *galP* (GalP es un simporte de protones que puede transportar glucosa) y *ptsI*, el cual codifica para uno de los componentes del PTS. En otros trabajos mutaron el gen *ptsG* (el cual codifica el componente EIIB) en combinación con otras mutaciones (*pfIB*, *ldhA*), obteniendo una mayor producción de succinato [124] [125]. Eliminar el gen *ptsG* o el gen *ptsI* debería ser, en teoría, equivalente en tanto que ambos son necesarios para que el PTS esté funcionalmente activo y por ende, se utilice PEP a expensas de otros procesos. Nosotros optamos por mutar el gen *ptsG*.

La secuencia de mutaciones realizadas se ilustra en la Ilustración 6. La técnica empleada para llevar a cabo las mutaciones es la misma descrita con anterioridad para construir la cepa DC1060. A todas las cepas se les extrajo el casete de kanamicina, salvo a las cepas CEL1060 y CEAL1060, las cuales fueron refractarias a la extracción del mismo por motivos desconocidos.

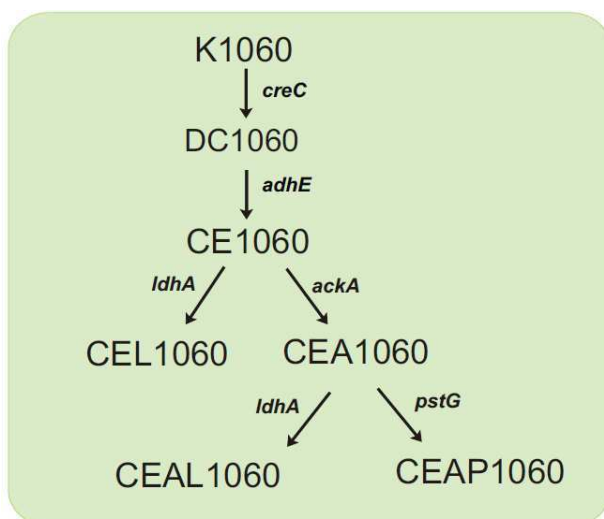


Ilustración 6. Esquema de la secuencia de mutaciones realizadas a partir de la cepa parental K1060 para obtener las distintas mutantes metabólicas. La técnica empleada para llevar adelante las modificaciones genéticas fue la de reemplazo alélico diseñada por Datsenko y Wanner (ver sección Materiales y Métodos).

Caracterización preliminar de las cepas mutantes.

Antes de continuar con la estrategia diseñada para mejorar la producción de PHB y succinato, se caracterizó metabólicamente a las distintas mutantes. Para ello se realizaron cultivos miniaturizados, en frascos de antibióticos de 10ml. Para mantener lo más posible las condiciones definidas en este trabajo como microarólicas o de baja aerobiosis, se llenaron los frascos con 5

ml de medio para mantener la relación (Volumen de medio)/(volumen del frasco) empleadas hasta ahora y se siguió agitando a 125 rpm. Los cultivos se realizaron por triplicado. Las cepas K1060 y DC1060 se utilizaron como referencia para entender los cambios generados al mutar cada gen.

Para ser ordenados en este análisis y no generar confusiones vamos a efectuar la comparación de cada cepa con su respectiva progenitora.

La eliminación del gen *adhE* fue común a todas las cepas construidas. Su anulación provocó una disminución en la producción de succinato (-40%), formiato (-40%) y acetato (-20%), mientras que la biomasa final a las 24h fue un 40% mayor (Gráfico 30).

Mutar el gen que codifica la lactato deshidrogenasa tuvo la consecuencia esperada de anular la síntesis de lactato de forma completa. Llamativamente no observaron diferencias en la síntesis de otros ácidos, salvo en el succinato, que pasó de 1,1 mM a 0,5 mM.

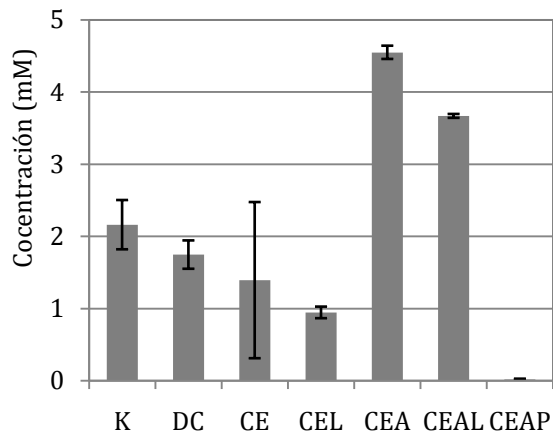
La cepa CEA1060 se obtuvo a partir de la cepa CE1060. La imposibilidad de sintetizar acetato por la vía *pta-ackA* disminuyó a la mitad la síntesis de este compuesto. La producción de succinato aumentó a 3,5 mM (+200% que la parental), la síntesis de piruvato se cuadruplicó y la de formiato cayó un 70%.

Al anular el locus *ldhA* a la cepa CEA1060 para construir la cepa CEAL1060, la producción de lactato se derrumbó a casi cero (-97%), el piruvato registró una leve merma (-20%) y el succinato volvió a los niveles de la cepa DC1060. El formiato disminuyó significativamente (-48%) y la biomasa repuntó de forma sutil llegando a valores de peso seco similares al de la cepa DC1060.

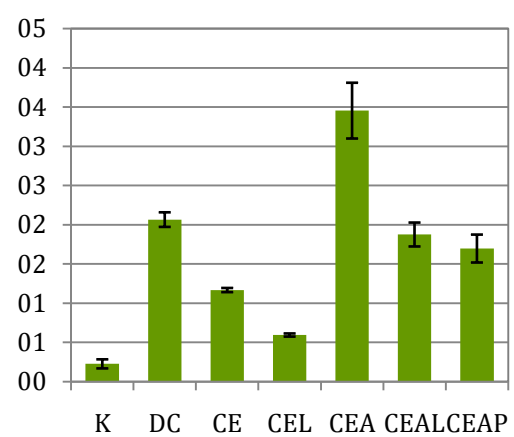
Mutar el gen *pstG* en lugar del *ldhA* no tuvo efectos muy disimiles. Inclusive la síntesis de lactato cayó a 1,75 mM (-0,998% respecto de la cepa parental, CEA1060). La producción de acetato disminuyó aun más (-40%) llegando a 2,8 mM. El resultado más contundente fue respecto al piruvato: fue indetectable en todas las replicas analizadas. Teniendo en cuenta que el sistema PTS utiliza al PEP como donador de fosfato, produciendo piruvato, podemos pensar que su ausencia reduce el nivel de este ácido.

De estos experimentos podemos concluir que las distintas mutaciones ocasionaron modificaciones en prácticamente todo el perfil de ácidos, y que dentro de estas modificaciones se encuentra la disminución parcial o completa del metabolito producido por la vía metabólica eliminada. Dentro de estas cepas, la que más ácido succínico produjo fue la CEA1060 (3,5 mM).

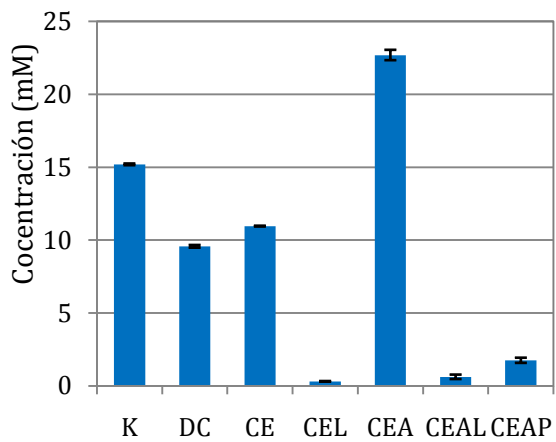
A. Piruvato



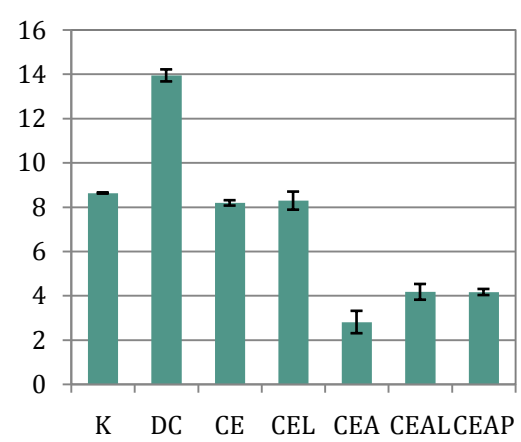
B. Succinato



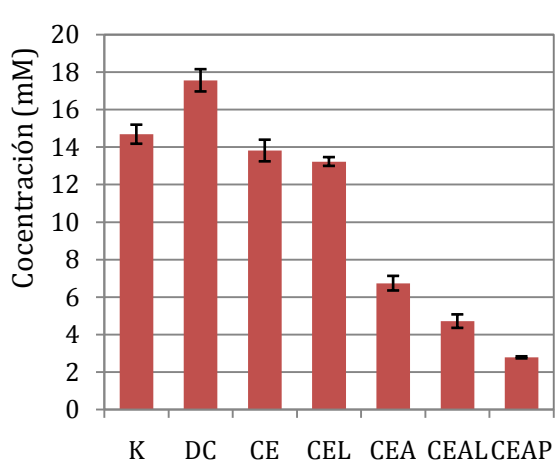
C. Lactato



D. Formiato



E. Acetato



F. Biomasa

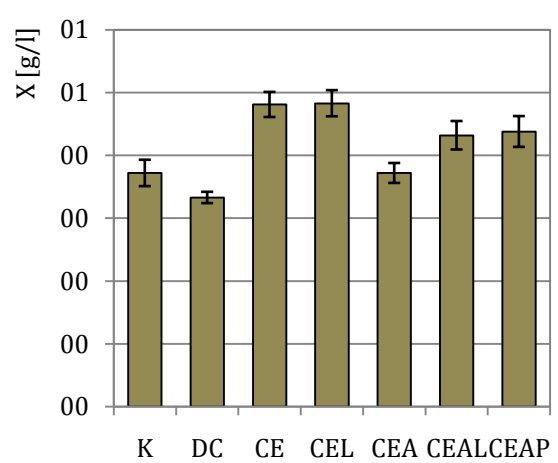


Gráfico 30. Perfiles de ácidos de cepas mutantes crecidas en M9 glucosa 30 g/l, con citrato férrico en condiciones de baja aerobiosis. K, K10; DC, DC1060; CE, CE1060; CEL, CEL1060; CEAL, CEAL1060, CEAP, CEAP1060

Producción de PHB en mutantes metabólicos.

La idea planteada originalmente suponía la utilización de las cepas CE1060, CEL1060, CEA1060 y CEAL1060 para llevar a cabo estos experimentos. Dado que a las cepas CEL1060 y CEAL1060 no se les pudo extraer el *cassette* de selección, su análisis quedó fuera del presente trabajo. Al quedar fuera esas dos cepas, se decidió incluir a la cepa $\Delta ptsG$ en este análisis pese a no tener ninguna hipótesis previa elaborada, con el simple fin de ver qué efecto podía conllevar esta mutación en la síntesis de PHB.

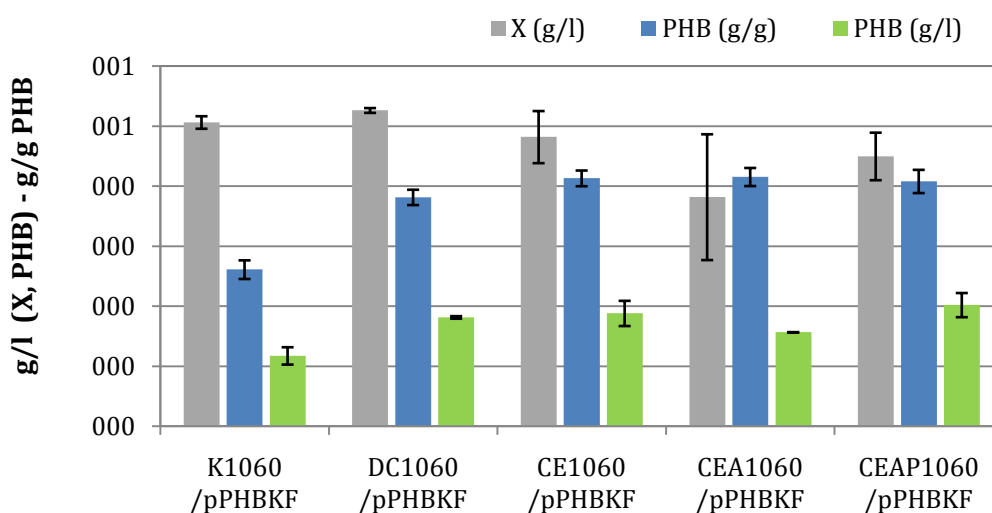


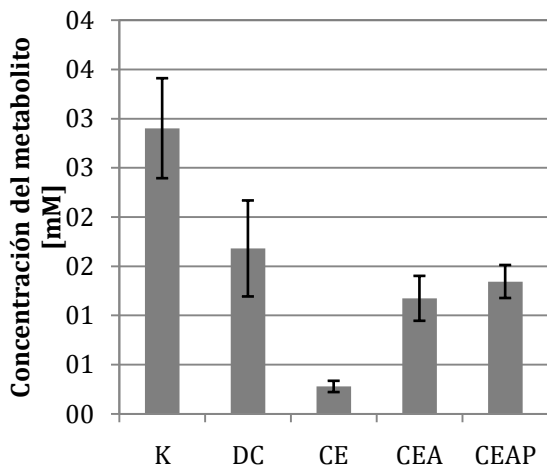
Gráfico 31. Producción de PHB en las distintas cepas mutantes transformadas con el plásmido pPHBKF, conteniendo los genes *phaCAB* de *R. eutropha*. Los cultivos se crecieron en M9 con glucosa como fuentes de carbono, en condiciones de baja aerobiosis. El PHB se cuantificó por el método de hidrólisis ácida.

Se llevaron adelante cultivos miniaturizados como los descritos en la sección anterior, utilizando M9-glucosa 30g/l. El contenido de PHB intracelular y los ácidos secretados se analizaron por HPLC.

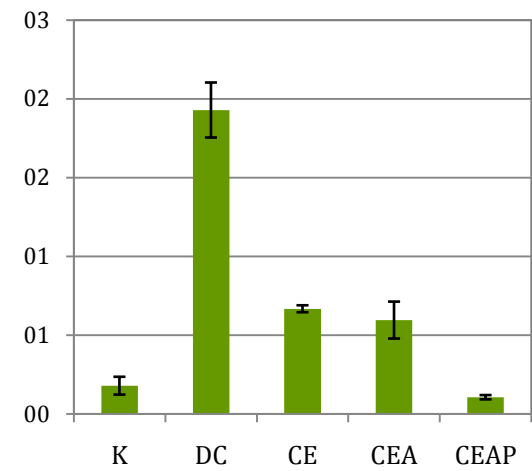
El contenido de PHB de las distintas mutantes fue similar al de la cepa DC1060 (Gráfico 31). La biomasa producida también fue similar, incluso para la cepa salvaje K1060, ubicándose en torno a los 0,5 g/l. La CEAP1060 arrojó una leve pero significativa diferencia respecto a la DC1060 y a la salvaje, pero no al resto.

Los ácidos orgánicos reflejaron la nueva demanda de precursores exigida para la síntesis del polímero (Gráfico 32). El acetato disminuyó en todas las cepas y dividió las cepas en dos: aquellas que produjeron acetato (K1060, DC1060 y CE1060) y aquellas que prácticamente no produjeron acetato (CEA1060 y CEAP1060). Lógicamente estas últimas estaban destinadas a disminuir la producción de este ácido. El primer grupo, a diferencia de lo que ocurrió cuando fueron crecidas sin plásmido, no presentó diferencias entre ellas en este ácido, quedando en un valor en torno a los 9 mM.

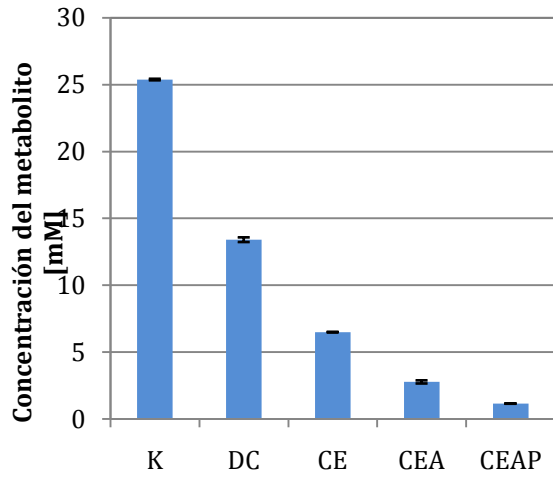
A. Piruvato



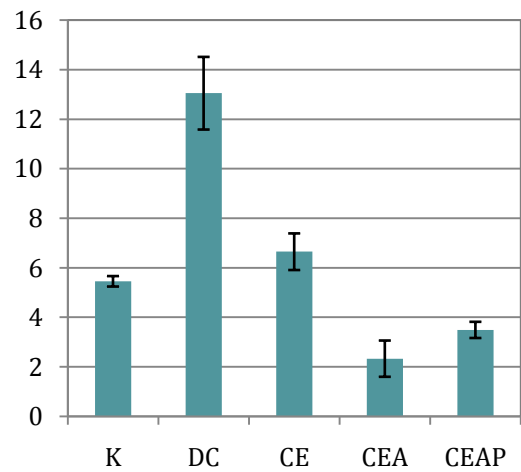
B. Succinato



C. Lactato



D. Formiato



E. Acetato

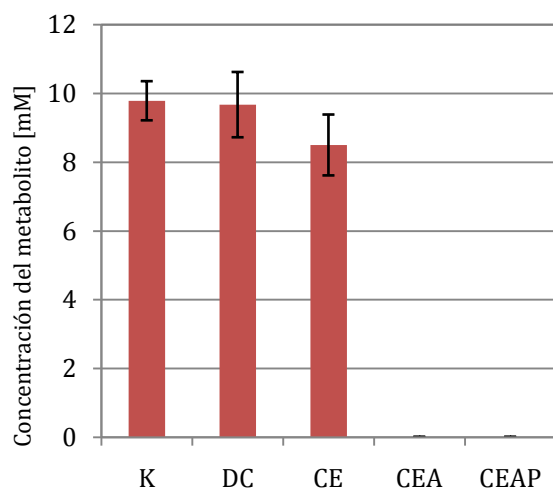


Gráfico 32: Perfiles de ácidos de cepas productoras de PHB crecidas en M9 glucosa 30 g/l con citrato férrico en condiciones de baja aerobiosis. K1060/pPHBKF (K), DC1060/pPHBKF (DC), CE1060/pPHBKF (CE), CEA1060/pPHBKF (CEA) y CEAP1060/pPHBKF (CEAP).

El lactato fue decreciendo con el número de mutaciones acumuladas. La CEA1060 que anteriormente había producido más de 20mM de este ácido, bajó su producción a una décima de ese valor ($2,77 \pm 1,01$ mM).

El formiato fue quizás uno de los ácidos que menos varió con respecto a las cepas sin los genes *phaCAB*. La única cepa que registró cambios significativos ($p < 0,05$) para este ácido fue la cepa K1060 (-40%).

Con el succinato ocurrió algo similar. Su síntesis no se alteró por la producción de PHB salvo en las cepas CEA1060 y CEAP1060. La primera dejó de ser la mejor productora de este ácido y se colocó al mismo nivel que su cepa parental, en torno a los 0,6 mM. Anular el gen *pstG* contribuyó a disminuir aun más la síntesis de succinato a valores casi indetectables.

Por último, la síntesis de piruvato cayó drásticamente de la cepa CE1060 respecto de la misma cepa sin el plásmido pPHBKF, pero aumentó para el caso de la cepa CEAP1060, la cual produjo una cantidad detectable de este ácido (en un nivel similar al de su progenitora con los genes *phaCAB*). La cepa con la menor producción de piruvato fue la doble mutante $\Delta creC$, $\Delta adhE$.

Estos experimentos mostraron diferencias en el perfil de ácidos similares a las observadas sin los genes *pha*, pero poca influencia sobre la síntesis del polímero si se las compara con la cepa *creC*.

Redireccionamiento de vías metabólicas y sobre-expresión de genes endógenos de *E. coli* para mejorar la producción de succinato.

Fundamentos de la estrategia

Como fue mencionado en la introducción, la mayor parte de los trabajos que buscan mejorar la producción de succinato se valen de la sobreexpresión de enzimas carboxilantes. Este paso es el limitante en la producción de succinato: pasar de un compuesto de 3 carbonos a uno de 4. La otra estrategia, también discutida en secciones precedentes, es la de aumentar la disponibilidad del precursor carbonado para esta reacción clave (bicarbonato o directamente CO_2). En algunos trabajos se recicla el CO_2 producido durante la respiración nuevamente hacia el cultivo para aumentar la disponibilidad de este gas [126]. Cuando realizábamos la caracterización de la cepa DC1060 y veíamos que aumentaba la producción de succinato, pero también la de acetato y formiato, nos preguntamos de qué forma aprovechar este hecho para seguir mejorando la *performance* de la cepa. El acetato podía ser fácilmente disminuido mutando *ackA*. Por otro lado, eliminar el gen *pfIB* con el objetivo de anular la producción de formiato, genera una auxotrofia para el acetato (cuya producción también se afecta por esta mutación) en condiciones de anaerobiosis [124]. Nos planteamos así si sería posible aprovechar este metabolito a nuestro favor.

E. coli sintetiza tres formiato liasas (Fdh) las cuales catalizan la descomposición del formiato en hidrógeno molecular y dióxido de carbono (codificadas en los loci *fdnGHI*, *fdhF* y *fdoGHI*) [127]. Es decir que existe la posibilidad de aprovechar este exceso de formiato para obtener una contribución extra de CO₂. Si además conseguimos aprovechar el poder reductor generado tras la liberación de H₂, estaríamos obteniendo más poder reductor para la síntesis de succinato. Barrior-Rivera y col. clonaron el gen de la Fdh1 de *Candida boidinii* y estudiaron su efecto en la disponibilidad de NADH y redistribución metabólica en cepas de *E. coli* expresando este gen [128]. Esta enzima tiene la ventaja sobre las enzimas nativas de *E. coli* de aprovechar el poder reductor de la descomposición del formiato en la obtención de NADH.

Como fue mencionado en a la introducción, existe cierta controversia en cuanto a la conveniencia de utilizar la Ppc o Pck. Recordemos que la segunda tiene de ventaja sobre la primera que es capaz de aprovechar la energía liberada en la reacción para fosforilar una molécula de ADP, dando un rendimiento energético mayor. Siendo incapaces de resolver esta cuestión decidimos probar ambas enzimas en combinación con la Fdh1 de *C. boidinii*. Para esto utilizamos los plásmidos pEcPpc y pEcPck (conteniendo la Ppc y la Pck de *E. coli*, el gen *bla* de resistencia a ampicilina y el gen *lacI* para reprimir su expresión en ausencia de inductor) y el plásmido pSBF2 (el cual expresa la enzima Fdh1 de *C. Boidinii* y el gen de resistencia a kanamicina). Ambos plásmido se rigen por la regulación del promotor de *lacZ*. Un esquema de la estrategia se ilustra en la Ilustración 7.

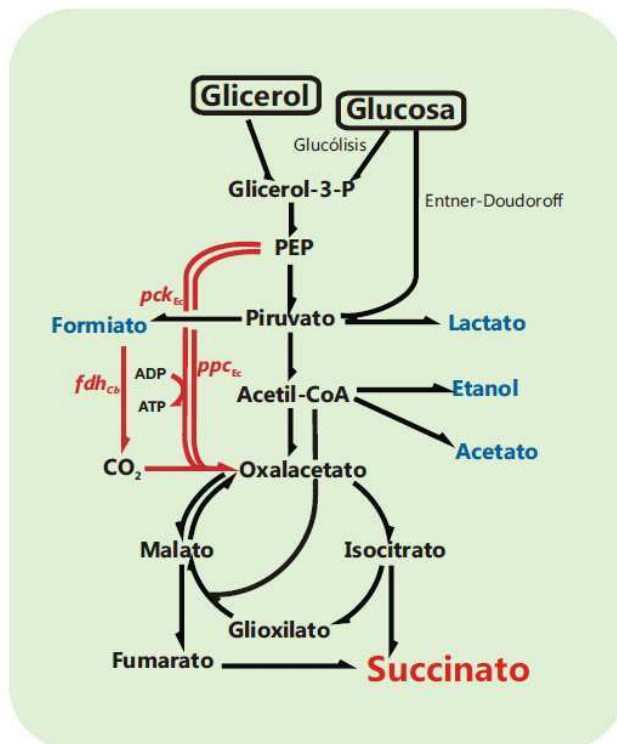


Ilustración 7: Esquema del metabolismo de *E. coli*. Los productos de fermentación se encuentran escritos en azul. Las vías metabólicas sobreexpresadas se encuentran señaladas en rojo. Abreviatura de genes: *fdh_{cb}* formiato deshidrogenasa de *C. boidinii*; *ppc_{Ec}* fosfoenol piruvato carboxiquinasa de *E. coli*; *pck_{Ec}* fosfoenol piruvato carboxilasa de *E. coli*.

Evaluación de la estrategia planteada

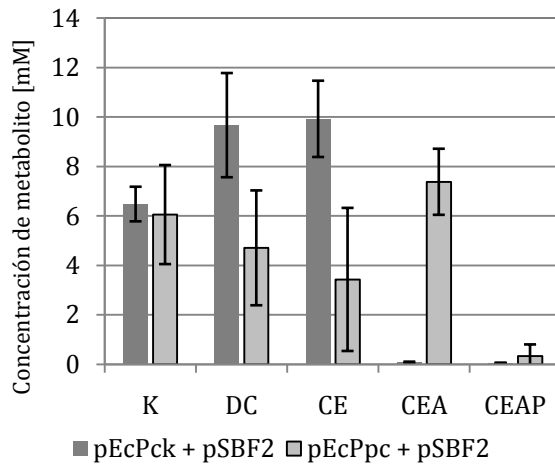
Las cepas K1060, DC1060, CE1060, CEA1060 y CEAP1060 fueron transformadas con ambos juegos de plásmidos (pEcPpc + pSBF2 o pEcPck + pSBF2). Las cepas doble transformantes se estudiaron en cultivos miniaturizados, como en los casos anteriores, con M9 glucosa 30 g/l y citrato férrico. Los cultivos se cosecharon al cabo de unas 60h, dado que el crecimiento de estas cepas fue especialmente lento, quizás por efecto de los dos antibióticos utilizados para mantener los dos plásmidos. Se analizó la biomasa y los metabolitos presentes en el sobrenadante. Para economizar notación, las cepas transformantes se nombrarán de aquí en adelante con las letras correspondiente a la cepa receptora (K, DC, CE, CEA, CEAP) más dos letras correspondientes a la combinación de plásmidos que portan (PS: pEcPpc + pSBF2; KS: pEcPck + pSBF2) separados por una barra.

Las cepas de la serie PS crecieron levemente más que las de la serie KS, aunque no significativamente, salvo para el caso de las cepas CE/PS y CEAP/PS ($0,56 \pm 0,01$ g/l y $0,53 \pm 0,4$ g/l) cuya producción de biomasa fue significativamente mayor (Gráfico 32F).

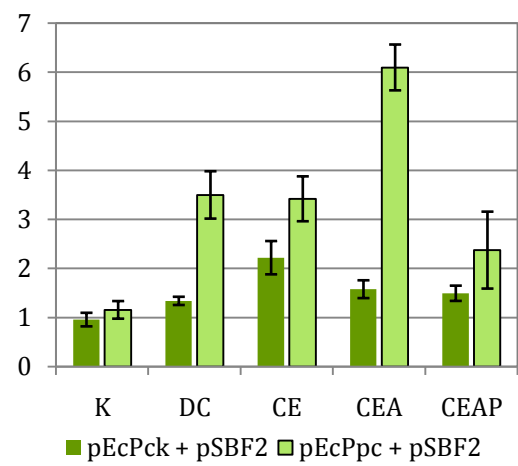
Al determinarse la producción de piruvato se observaron grandes variaciones entre replicas (Gráfico 32 A), dando lugar a una gran dispersión en torno a las medias. Las cepas K/PS, K/KS, DC/KS, CE/KS y CEA/KS sintetizaron una cantidad similar de este ácido (en torno a los 6 mM), mientras que las cepas DC/PS y CE/PS alcanzaron concentraciones de piruvato en torno a los 10 mM. En los sobrenadantes de las cepas CEA/KS, CEAP/KS y CEAP/PS no se detectó este ácido o se detectó en cantidades que son virtualmente nulas.

Estas tres cepas mencionadas anteriormente tuvieron un comportamiento similar para el lactato, del cual produjeron apenas 2 mM. Para el resto de las cepas en estudio el lactato fue el metabolito principal junto con el acetato. Es interesante que el ácido láctico se haya producido en la misma o en mayor concentración en estas cepas (CEA/PS, DC/KS y DC/PS), que las que no expresan los sistemas KS o PS. Al recuperarse el poder reductor del formiato mediante la FDH1, y frente a la necesidad de regenerar NAD^+ , el destino preferido por el metabolismo de estas cepas, fue el lactato, que en el caso de la K1060 aumentó un 50% y un 87% gracias a los sistemas KS y PS respectivamente. Las cepas DC/KS y DC/PS en cambio se mantuvieron en torno a los 15 mM, por causa de la ausencia de CreC, lo cual ha demostrado consistentemente tener un efecto inhibitorio sobre la síntesis de éste ácido. Las cepas CE/KS y CE/PS, al ser $\Delta adhE$ tuvieron menos opciones que las cepas mencionadas recién, en el sentido de que contaban con una vía menos para la reoxidación de los cofactores reducidos, presionando más sobre la vía fermentativa del lactato. Cuesta entender porqué la cepa CEA/KS no produjo casi ácido láctico, sobre todo viendo que la cepa CEA/PS sí lo hizo.

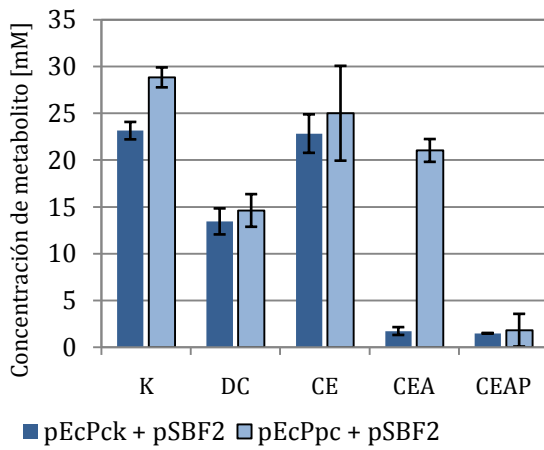
A. Piruvato



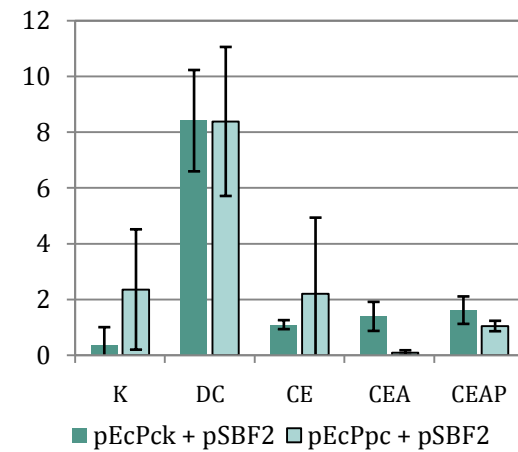
B. Succinato



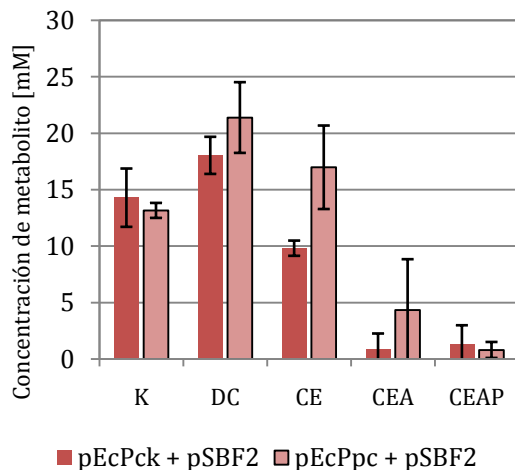
C. Lactato



D. Formiato



E. Acetato



F. Biomasa

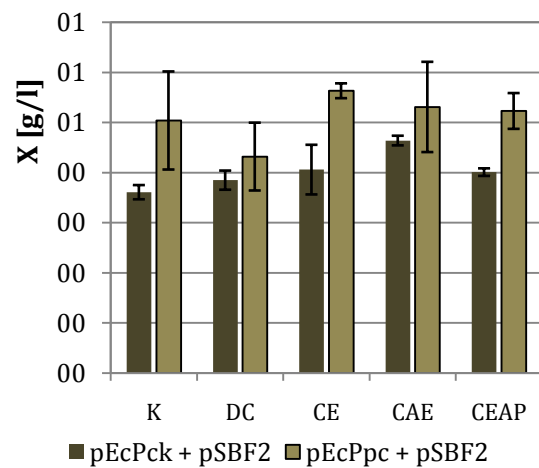


Gráfico 33. . Perfiles de ácidos de cepas mutantes crecidas en M9 glucosa 30 g/l, en condiciones de baja aerobiosis. En el eje de las abscisas se señala la cepa recipiente (K, K10; DC, DC1060; CE, CE1060; CEA, CEA1060; CEAP, CEAP1060) ya sea con el sistema KS (pEcPck+pSBF2) o PS (pEcPpc+pSBF2).

El acetato no se produjo en niveles detectables en ninguna de las cepas $\Delta ackA$, salvo quizás en la CEA/KS, la cual produjo más piruvato, sugiriendo que el acetato se generó vía piruvato oxidasa (codificada en *poxB*), por un aumento en el sustrato de esta enzima. La única cepa que demostró una diferencia significativa entre un sistema y el otro para el acetato, fue la CE1060. La Pck permite conservar la energía liberada en la carboxilación del PEP, al transferir el fosfato de éste a una molécula de ATP, generando menos dependencia de la trasfosforilación del acetilfosfato al ADP para generar al acetato.

Podríamos atribuirle al plásmido pSBF2 (con el gen *fdh* de *C. Boidinii*) la merma generalizada en la producción de formiato. Para este ácido las mediciones también tuvieron un error experimental grande.

En lo que hace a nuestro metabolito de mayor interés, el succinato, la cepa que nuevamente demostró una mayor producción fue la cepa CEA1060 de la serie PS ($6,9 \pm 0,47$ mM), que lleva las mutaciones $\Delta creC$, $\Delta adhE$, $\Delta ackA$ y sobreexpresa los genes *fdh1* y *ppc*, lo cual implicó un aumento del 97% respecto a lo producido en ausencia de plásmido a las 24h. Todas las cepas de esta serie tuvieron una mayor producción de succinato respecto a sus pares de la serie KS, salvo la cepa K1060, la cual no superó el 1 mM de succinato con ningún juego de plásmidos, lo cual estaría en concordancia con el trabajo de Donnelly citado anteriormente, en el cual se vía una mayor producción de succinato con la sobreexpresión de *ppc* que con la de *pck* [53]. El grupo del Dr. Kim, el cual gentilmente nos facilitó los plásmidos pEcPck y pEcPpc, vio que entre ellos, el que más succinato permitía sintetizar era el pEcPck. Obviamente sus estudios no se llevaron a cabo en combinación con el pSBF2, lo cual no es un hecho menor.

Aunque la cepa CEA1060/PS fue, de todas las ensayadas, la que produjo las mayores cantidades de succinato, las cantidades que produce son bajas en comparación con otras cepas. Sin embargo, los resultados que hemos presentado no permiten optimizar la producción de succinato en todos los aspectos posibles, ya que la reformulación de los flujos de carbono es sólo un primer paso. Nuestros estudios se enfocaron más que nada en la caracterización del desempeño de una serie de cepas recombinantes en medio mineral. Todavía quedan muchos aspectos que se deben considerar para lograr la optimización. Uno de ellos es la estabilidad del sistema genético que se está sobreexpresando. Esto es especialmente importante para los genes *ppc* y *pck* que en nuestro caso se expresaron en un vector mantenido a partir de su gen *bla*, el cual confiere resistencia a la ampicilina. Este antibiótico es inestable en el tiempo y a pH ácidos, dos factores a los cuales nuestras cepas recombinantes están expuestas en cultivos como los que hemos realizado. Se suma a esto que el crecimiento de las cepas conteniendo los plásmidos era muy bajo, generando una gran ventaja a aquellas células que se deshicieran del mismo. Una posible solución para esto, sin modificar las construcciones, sería reemplazar la ampicilina por algún antibiótico más estable a bajos pH como la carbenicilina [129].

A la estabilidad del plásmido se le deben sumar estrategias de cultivo más complejas, con segmentación en las condiciones de crecimiento en, por ejemplo, dos fases (una aeróbica para facilitar el crecimiento y otra anaeróbica para favorecer la producción de metabolitos fermentativos). En un trabajo se estableció una ventana de tiempo óptima para la transición de una fase a la otra de modo de mejorar la producción de succinato en *E. coli* recombinantes [130].

Queda pendiente realizar sobre estos experimentos la cuantificación de etanol y glucosa remanente para tener mejor caracterizados estos sistemas. También sería interesante poder estudiar el efecto por separado de los sistemas de sobreexpresión empleados (pSBF2, pEcPck, y pEcPpc) para poder establecer la contribución que realiza cada uno de ellos en el metabolismo de las dobles transformantes.

Discusión y conclusiones finales.

Los que se sabía de CreC.

Los trabajos realizados por nuestro grupo [81] fueron los primeros en describir la contribución de CreC a los rasgos fenotípicos de *E. coli* relacionados con el control redox, en base a observaciones en cepas mutantes *ArcA*. Las mutaciones en *arcA* se caracterizan por una desinhibición de las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y del citocromo *O*, provocando un aumento de los equivalentes de reducción y un aumento en el consumo de oxígeno. En dicho trabajo, se observó que CreC estimula el catabolismo del carbono, hecho que se evidencia en un mayor consumo de glucosa, y se concluyó que parte del exceso de equivalentes de reducción generado por causa de la mutación en *arcA* es consumido por la mayor cantidad de intermediarios debido a *creC510*, aumentando de esa forma aun más la cantidad de etanol y otros productos de fermentación.

En esta tesis, cuando analizamos los efectos de CreC en cepas sin mutaciones *arc*, comprobamos que los efectos de CreC sobre el metabolismo central de *E. coli* dependen mucho de las tensiones de oxígeno disuelto en el medio. Esto no es algo sorprendente, dado que Cariss y col. [12] demostraron que el ligando que activa a CreC debería ser una molécula presente en el citoplasma durante la fermentación de fuentes de carbono glicolíticas (como la glucosa) o durante el crecimiento aeróbico en presencia de fuentes de carbono gluconeogénicas de bajo peso molecular como piruvato, acetato o lactato. Otro hallazgo muy interesante de este grupo de investigación fue la secuencia blanco (denominada Cre-tag), a la que se une CreB. Dicha secuencia se encuentra en un número acotado de regiones regulatorias de genes con funciones múltiples, no siempre relacionadas con el metabolismo del carbono o del fósforo, los cuales suelen ser asociadas con este regulador. Los genes de este grupo más vinculados al metabolismo del carbono son los genes *malE*, *ackA* y *talA*, descritos en trabajos anteriores, aunque mediante un nuevo análisis bioinformático hemos detectado otros genes que tienen probables sitios de unión para CreB, relacionados con diferentes procesos celulares.

En cuanto a los resultados observados en los trabajos previos realizados en nuestro laboratorio o en el presente trabajo, no queda muy clara la contribución de *malE* (el cual codifica un transportador de maltosa y de otros oligómeros de glucosa) [131], a los fenotipos observados. En cuanto al locus *talA*, este codifica la enzima transaldolasa A, la cual cumple un rol importante en el balance de metabolitos en el ciclo de las pentosas fosfato al interconvertir sedoheptulosa-7-P y D-gliceraldehído-3-P en D-erytrrosa-4-P y D-fructosa-6-P [132]. La expresión de este gen es menor en la fase exponencial y luego sube al entrar en la fase estacionaria [101]. En su análisis de flujo en cultivo continuo, Nikel ve menos actividad de esta enzima en la mutante $\Delta creB$, hecho que redundaría en una velocidad de formación de biomasa mayor [87].

Queda por analizar lo que ocurre con *ackA*. En el trabajo de Avison [15] este gen incrementa su expresión por causa de CreC cuando este último se encuentra activado. En nuestros experimentos, las cantidades de acetato producido siempre fueron mayores en las mutantes de delección que en la cepa salvaje, ya sea para las cepas $\Delta creC$, $\Delta creB$ o $\Delta creBC$.

Estas discrepancias hicieron que analizáramos exhaustivamente una serie de condiciones y modificaciones, dado que los primeros datos que obtuvimos de los efectos de CreC en el metabolismo del carbono, o bien no podían justificarse a través de los genes que presentan una secuencia regulatoria *cre*, o bien parecían contradecir lo esperable para la secreción de acetato en base a los trabajos previos.

En nuestra primera aproximación a los efectos regulatorios de CreC en *E. coli* vimos un efecto pleiotrópico en el metabolismo central: todos los metabolitos analizados demostraron en alguna condición un comportamiento distinto entre la cepa salvaje y la mutante, hecho que se vio también reflejado en la baja correlación de las variables medidas durante la fermentación en la condición III.A (M9m glucosa, aireación media) de la cepa DC1060. Como regla general vimos que la cepa mutante produce acetato y formiato en condiciones limitantes de oxígeno, en la misma o mayor cantidad que la cepa K1060. Con el succinato sucedió algo similar, si bien la cantidad generada fue baja. El etanol en cantidades absolutas sólo se demostró afectado por la ausencia de CreC en cultivos de baja aerobiosis con glicerol como fuente de carbono. Relativizado a la biomasa, en anaerobiosis se produjo más etanol en la cepa salvaje, pero en términos absolutos no hubo diferencias significativas. En microaerobiosis las cepas K1060 y K1060C triplicaron la cantidad de este ácido con respecto a la cepa DC1060, ya sea en glucosa o en glicerol como fuentes de carbono. En la condición de anaerobiosis, sin embargo, esta diferencia se anuló. La cantidad de lactato producido por gramo de biomasa fue mayor en la cepa DC1060 ($\Delta creC$) que en la salvaje o la mutante constitutiva.

Estos datos se correspondieron con la actividad LDH medida en cada condición. Del mismo modo, la actividad ACK fue medida en los tres niveles de disponibilidad de oxígeno. Esta actividad también acompañó las diferencias observadas en el perfil de secreción del acetato.

Ahora bien, la pregunta que nos hicimos fue cómo podían explicarse estas diferencias fenotípicas entre las cepas si los genes que poseen una *cre-box* (es decir, a los que se supone que se une CreB para regular su transcripción) son tan pocos y solamente el gen de *ackA*, de entre ellos, tendría algo que ver con los aspectos fisiológicos estudiados. Como ya hemos mencionado numerosas veces, CreC es una molécula sensora que puede transfosforilar al menos dos efectores de la respuesta: PhoB y CreB, pero no es posible descartar la posibilidad de que CreC transfiera la señal de activación a otro u otros RR para dar el fenotipo que nosotros observamos. En un intento de evaluar esa posibilidad es que decidimos construir las cepas DB1060 y DBC1060, en las cuales se mutó también *creB*, que codifica el RR del sistema CreBC, y someterlas a los mismos estudios a los que habíamos sometido a las cepas K1060 y DC1060. De encontrar diferencias entre las cepas mutantes, habríamos concluido que las interacciones de señalización, cuanto menos, no se estarían dando de forma exclusiva entre CreC y CreB, sino que estarían participando otros factores de transcripción. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las cepas DB1060, DC1060 ni DCB1060. No queda otra alternativa, por lo tanto, que concluir que las diferencias observadas son mediadas por la regulación que ejerce CreBC sobre el metabolismo de *E. coli*.

Nuevamente, los resultados obtenidos dejan varios interrogantes: i) ¿Por qué en nuestros resultados vemos que el acetato se produce en mayor cantidad en ausencia de CreC si el sistema

CreBC, según la literatura, es un activador del gen *ackA*? ii) mediante qué vía CreC puede estar ejerciendo un efecto sobre tantos genes (entre ellos *ldhA*) siendo que estos no poseen una secuencia regulatoria *cre*?

Es difícil imaginarse un escenario donde la regulación transcripcional sea opuesta a algún tipo de regulación postranscripcional. Lo más probable es que las diferencias observadas a nivel metabólico y actividad enzimática tengan un correlato a nivel transcripcional. Las diferencias con los resultados de Avison y Bennett, entonces, deberían deberse a los diferentes contextos genéticos de los microorganismos. La cepa utilizada en los estudios de Avison y Bennett es la DH5 α , la cual, entre otras mutaciones, cuenta con una delección en el gen *phoA*, el cual es parte del regulón Pho y codifica la enzima fosfatasa alcalina (recordar que CreC interviene de forma cruzada en el regulón *pho* en ausencia de *phoR*). Otro problema se relaciona con la naturaleza misma del regulador CreC: responde indirectamente al nivel de oxígeno. En los experimentos del trabajo del año 2001 no se explicaban detalladamente cuáles habían sido las condiciones de aireación, solo se mencionaba que la agitación de los cultivos era alta. En un trabajo posterior, publicado en 2008, los autores se dieron cuenta en el transcurso de sus experimentos que la aireación era fundamental para determinar el estado metabólico, ya que de este dependía que se formase la molécula ligando de CreC. Por ese motivo revisaron la forma en la que habían realizado sus experimentos previos y cambiaron las condiciones. ¿En qué consistía este cambio?, en usar un tapón de goma en lugar de uno de algodón. Así limitaron la aireación del cultivo y volvieron a ver los efectos de CreC. En definitiva, las condiciones eran de menor disponibilidad de oxígeno, cercano a la anaerobiosis. Así y todo, seguía habiendo discrepancias en el primer trabajo respecto del segundo. Los frascos volvían a estar sellados con tapones de goma, pero ya no se agitaban vigorosamente: se crecían en un incubador estático. El nombre de este segundo trabajo (“**Defining** the Growth Conditions [...] for Activation of Gene Expression by CreBC in *Escherichia coli*”) no era un simple título, sino que parecía ser todo un desafío personal.

En nuestros experimentos nos encontramos con una dificultad a la hora de crecer la cepa salvaje y la constitutiva (*creC510*) en anaerobiosis y medio mínimo (no así en LB): estas crecían muy lento y poco, a diferencia de la cepa mutante, que lo hacía con mayor velocidad. Si bien esto planteó nuevas preguntas, la comparación entre cultivos que crecen tan desfasados es muy compleja, por varios motivos, el principal es que si bien los resultados pueden normalizarse a la biomasa, al tener tasas de crecimiento tan disímiles, no es tan fácil estar seguros de que se están comparando estados metabólicos equivalentes. Por esto preferimos seguir caracterizando a CreC en un contexto de baja aerobiosis, donde se veían efectos metabólicos claros, y en tal caso volver a la condición de anaerobiosis una vez que tuviésemos más certezas sobre el funcionamiento del sistema.

La actividad transcripcional de *ldhA* y *ackA* y la cuestión del piruvato.

Luego de la caracterización de productos metabólicos, se realizaron determinaciones de actividad enzimática, y por último se realizaron análisis transcripcionales. Para ello construimos las fusiones

transcripcionales con un vector suministrado por el laboratorio de Uri Alon (Weizmann Institute of Science, Israel) [82], respetando la extensión de la región promotora que este mismo autor usó en sus estudios. Si bien no pudimos analizar las muestras mediante un fluorímetro, lo cual era nuestra idea original por su simpleza operativa e interpretativa, logramos corroborar la correcta expresión de la proteína *gfp* y estudiar su expresión diferencial por la técnica de citometría. Los promotores que nos habíamos propuesto estudiar, en base a los datos obtenidos en los experimentos previos, eran tres: el promotor de la *ackA*, el de *focA* y el de *ldhA*. Desafortunadamente no pudimos obtener resultados satisfactorios con el promotor de *focA*, el cual quedó excluido de nuestros experimentos.

Si bien en los trabajos previos de otros autores no se identificaba a la vía de síntesis de lactato como blanco regulatorio del sistema CreBC, los resultados obtenidos al analizar la expresión del gen *ldhA* fueron los esperados de acuerdo a nuestros resultados previos: la mutante $\Delta creC$ mostró una menor transcripción de la fusión *ldhA-gfp*, por lo menos en el intervalo de tiempo analizado, dentro de la fase exponencial. Las condiciones en las que normalmente se expresa este gen son de anaerobiosis y a pH ácidos [133], y suele estar regulado negativamente por Mlc (regula genes del PTS), y CsrA (controla el balance entre la síntesis de glucógeno y la glicolisis) y positivamente por ArcAB y CsrB (este último antagoniza a CsrA) [97]. No posee en su secuencia regulatoria el motivo regulatorio Cre. También sabemos que el piruvato (sustrato de la Ldh) la activa alostéricamente. Cabe destacar que el enlace metabólico entre la glucólisis/gluconeogénesis y el ciclo del TCA está representado por el nodo de PEP-**piruvato**-oxaloacetato, también conocido como el nodo anaplerótico. Este nodo comprende un conjunto de reacciones que dirigen el flujo de carbono en las direcciones apropiadas y, por lo tanto, actúa como un punto de distribución de gran relevancia para la distribución de los flujos de carbono en el metabolismo central [134]. Dado que la anulación de *creC* aparentemente aumenta el flujo hacia formiato y acetato, es factible pensar que una mayor demanda de piruvato por la piruvato-formiato liasa (transforma al piruvato en formiato y acetil-CoA) podría disminuir los niveles de ácido pirúvico, y esto podría tener como consecuencia un menor flujo desde éste hacia el lactato.

En este punto surge otra disyuntiva. En el trabajo de Jiang [97] se observa que al agregar exógenamente piruvato al medio, aumenta la actividad transcripcional de *ldhA*. Tras varios experimentos, los autores asocian este hecho a la regulación positiva que ejerce CsrB sobre la movilización de glucógeno intracelular: ven una correlación entre la regulación de *ldhA* y los efectos de CsrB en el metabolismo, haciéndoles suponer que *ldhA* responde al entorno metabólico que CsrB genera, es decir, situaciones en las que hay una alta disponibilidad de hexosas (en baja aerobiosis o anaerobiosis) y/o intermedios glicolíticos derivados tales como el **piruvato**. Por otro lado, Avison vio que el piruvato induce fuertemente a CreC aún en aerobiosis. Si esta conexión lactato-piruvato-CreC es cierta, podríamos pensar que los efectos del piruvato sobre la transcripción de *ldhA* que Jiang ve en su trabajo, estarían produciéndose vía CreC. En contra de esta hipótesis está el hecho de que Jiang no vio efectos sobre la transcripción de *ldhA* cuando agregó acetato o lactato, fuentes de carbono que según Avison activan a CreC. Un detalle nada menor es que en los experimentos de Jiang, el medio empleado es un medio rico con glucosa además del ácido agregado, y en el trabajo de Avison, los efectos descritos se ven en medio mineral, pero no en medio rico. Paradójicamente, este hecho podría ser también una confirmación de la regla, y brindar aún más información: (i) Avison ve que en medio rico y

anaerobiosis no hay efectos de CreC pero sí en alta aerobiosis y medio mínimo con piruvato, acetato, lactato, formiato o malato. (ii) Jiang ve efectos en medio rico en anaerobiosis con piruvato, pero no con acetato, lactato o succinato, aunque estos ácidos no son la fuente de carbono principal sino la glucosa (agrega cada uno de estos ácidos en combinación con la glucosa, de a pares). (iii) si nos arriesgamos en combinar las observaciones de ambos trabajos, se pueden establecer paralelismos con nuestros resultados, en los que vemos que hay una mayor actividad LDH y una mayor transcripción del gen *ldhA*, en condiciones en las que CreC está activo (medio mínimo con glucosa en baja aerobiosis), y que esto cambia cuando se muta *creC*. (iv) No sabemos qué sucede con respecto a CreC en anaerobiosis si al medio rico se le agrega glucosa y piruvato. ¿Será esta una pista para suponer que el piruvato es la molécula ligando de CreC? Para contestar esta pregunta deberían hacerse más experimentos.

Cuando se analizaron los resultados transcripcionales obtenidos con *ackA*, la aparente disminución transcripcional de *ackA* en mutantes $\Delta creC$ parecía ir en sentido opuesto a los otros resultados. Este gen se presentaba como un blanco de estudio interesante porque era la conexión más directa entre lo observado para CreC en trabajos previos y nuestros datos. Además, posee un motivo Cre en su promotor. Sin embargo, a la luz de lo que observamos en los perfiles metabólicos y enzimáticos, y relacionando éstos con lo visto por citometría de flujo, los efectos regulatorios de CreBC sobre *ackA* parecen variar mucho según las condiciones de cultivo y en las diferentes etapas del crecimiento, sugiriendo que son mucho más complejos de lo que indicaron los primeros trabajos. Por otro lado, las diferencias entre los efectos transcripcionales y la actividad enzimática de ACK sugieren efectos regulatorios posteriores a la transcripción, que podrían involucrar otros sistemas regulatorios.

Contribución de los ensayos de biorreactor.

Los ensayos en biorreactores fueron diseñados para cubrir un rango de condiciones de aireación determinadas principalmente por el régimen de agitación. Esto se tradujo en cada caso en un porcentaje distinto de oxígeno disuelto (0%, 5% y 20%). También evaluamos el efecto de utilizar dos fuentes de carbono con grados distintos de oxidación (glucosa y glicerol). Durante este proceso observamos que el crecimiento celular en la escala de biorreactor, era limitado por alguna carencia nutricional que se compensó al agregar una fuente de hierro al medio (citrato férrico). De esta forma se optimizó la velocidad de crecimiento. De las condiciones estudiadas en biorreactor, a juzgar por el grado de divergencia entre el desempeño de cepa K1060 y de la DC1060, las condiciones de baja aerobiosis con agitación constante (tanto con glucosa como con glicerol), y la de aerobiosis media con %OD constante en glucosa, fueron las que más información aportaron sobre el regulador global en estudio. Un problema es que, si bien se pudo extraer información respecto del comportamiento de *E. coli* en escalas de cultivo superiores, el nivel de oxígeno en el cual fijamos la aireación en la condición III.A y III.B (aireación media y glucosa o glicerol como fuentes de carbono) no nos permitieron generar un ambiente óptimo para evaluar los efectos de CreC. Por ejemplo, en la condición III con glucosa no vimos diferencias en la energía de mantenimiento entre ambas cepas, lo que si ocurrió con glicerol (III.B). Quizás, con una menor

concentración de oxígeno, en presencia de glucosa se hubiese observado un fenómeno similar al observado con glicerol en cuanto a la energía de mantenimiento, y las diferencias entre una cepa y otra habrían sido más evidentes. Otro hecho que nos da la pauta de que se podrían haber contrastado más los efectos de CreC es que en las fermentaciones de aireación media con glucosa, casi no se produjo lactato (a diferencia de lo que ocurrió en las fermentaciones de baja aerobiosis) y la tasa de crecimiento fue similar a la de la condición II.B (alta aerobiosis, M9m glucosa), demostrando que el oxígeno se suministró en menor cantidad pero que no fue nunca limitante. También contribuyó a esto la dispersión de datos como producto del error experimental que tuvieron las mediciones. De cualquier modo, logramos distinguir parámetros fisiológicos diferenciales entre ambas cepas. Que la cepa DC1060 tenga una energía de mantenimiento mayor, nos estaría indicando que la mutación $\Delta creC$ torna más ineficiente a la célula en el aprovechamiento de la energía en la fase estacionaria. Esto fue así para el glicerol, con el cual la cepa DC1060 mostró tener un coeficiente m más elevado que la salvaje. Si bien en glucosa no vimos lo mismo en relación a la energía de mantenimiento, en la fase de equilibrio pseudoestacionario, la mutante consumió glucosa a una tasa mucho mayor ($q_{S_{control}} < q_{S_{mutante}}$), pero fue menos eficiente en términos de formación de biomasa ($y_{X/S_{control}} < y_{X/S_{mutante}}$). Un hecho relacionado, y que hace a la manipulación cotidiana de estas cepas, es que en reiteradas ocasiones, al repicar ambas cepas desde punciones o placas viejas, la cepa $\Delta creC$ tardaba más en crecer, reflejado esto en que la cantidad de colonias que crecían al día siguiente eran menos que para el caso de la cepa mutante. Por supuesto que no podemos considerar esta observación como si proviniese de un experimento metódico y riguroso, pero sería un indicio más en el mismo sentido. De algún modo CreC contribuye a que la célula sea más eficiente a la hora de administrar sus recursos.

Otra observación interesante es que la cepa DC1060 mostró tener un período *lag* mayor en la condición III.B (aireación media, glicerol). Sería difícil que el motivo de ese *lag* fuese una regulación diferencial activada en ese momento, ya que ese es el momento de mayor aireación de todo el cultivo, con valores de %OD elevados. En cambio, es posible que ese período de adaptación mayor que experimentó la cepa DC1060 se debiese a que arrastraba un estado fisiológico desfavorable desde el inóculo (crecido ON en condiciones de baja aerobiosis) para el cambio que significaba pasar de un erlenmeyer a un fermentador (que podría ser baja eficiencia respiratoria, por ejemplo, o un flujo de carbono calibrado para otra situación fisiológica). Esto, que sería en parte cierto para ambas cepas, podría tener consecuencias más notables para la cepa mutante.

Un efecto inesperado de CreC: interviene en la respuesta al el estrés oxidativo.

Dado que se sabe que las mutaciones *arc* afectan la respuesta al estrés oxidativo, y que habíamos observado muchos indicios sugiriendo una estrecha relación entre CreBC y el estado redox intracelular, analizamos la respuesta al estrés oxidativo en nuestras cepas. Aunque son

químicamente muy similares, los cofactores redox NADH y NADPH tienen interacciones específicas distintas y participan en más de 100 reacciones enzimáticas. Los electrones del NADH, el principal cofactor de la respiración, se transfieren al oxígeno en la cadena respiratoria, generando la fuerza motriz para fosforilar ADP a ATP. Por el contrario, el NADPH participa principalmente en reacciones de reducción anabólicas. La formación de NADPH se da fundamentalmente por dos vías: (I) la rama oxidativa del ciclo de las pentosas fosfato y (II) la reacción de isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADPH en el ciclo de Krebs. Las piridinanucleótido transhidrogenasas son enzimas que catalizan reversiblemente la transferencia de equivalentes de reducción entre los reservorios de NAD y NADP. La reacción de transhidrogenación ($[NADPH] + [NAD^+] + [H^+_{int}] \leftrightarrow [NADP^+] + [NADH] + [H^+_{ext}]$) se puede llevar a cabo mediante una enzima de membrana translocadora de protones, o por una enzima soluble no dependiente de energía [135]. Los microorganismos generalmente contienen una de las dos isoformas o ninguna, siendo Enterobacteriaceae la única excepción al contener ambas isoformas, codificadas en los genes *pntAB* y *udhA* respectivamente. Hasta hace poco se creía que sus roles eran intercambiables, pero trabajos recientes han demostrado que las dos isoformas poseen funciones divergentes en *E. coli*, desacoplando eficazmente la producción de NADPH catabólico del consumo de NADPH anabólico. Mientras que la transhidrogenasa unida a la membrana (PntAB) cataliza la transferencia de poder reductor dependiente de energía desde el NADH al NADP, la transhidrogenasa soluble (UdhA) cataliza la reacción inversa no dependiente de energía [136].

Sabemos que el estrés oxidativo es atenuado en la célula directa o indirectamente gracias al estado redox intracelular. Como mencionamos en la introducción, algunas moléculas están constitutivamente presentes y ayudan a mantener un entorno intracelular equilibrado al reducir o a eliminar el oxígeno químicamente reactivo. Estas moléculas son antioxidantes no enzimáticos tales como el NADPH y NADH.

Si bien en nuestros experimentos no observamos diferencias significativas en los niveles de NADPH/NADP⁺, el cual es el principal cofactor de muchas enzimas (alquil-hidroperóxido reductasa, tioredoxina reductasa) y proteínas no enzimáticas (glutatión reductasa), la relación de cofactores NADH/NAD⁺ fue un 30% menor en la cepa mutante. Es probable que en presencia de agentes oxidantes, el equilibrio mantenido por las transhidrogenasas busque compensar la disminución de NADPH como resultado de la mayor demanda de poder reductor frente al estrés oxidativo, transfiriendo poder reductor desde el reservorio de NADH al de NADP⁺. En el caso de nuestra mutante $\Delta creC$, el desequilibrio NADH/NADPH estaría desbalanceado por la menor disponibilidad de NADH. De este modo la cepa $\Delta creC$ crecería menos en presencia de peróxido de hidrógeno y paraquat. En base a estas hipótesis, el estrés oxidativo no sería en principio un efecto directo de CreC como regulador transcripcional, sino que podría ser una consecuencia de sus efectos en el metabolismo del carbono. Hay que tener en cuenta que en nuestros experimentos no medimos el estrés oxidativo endógeno, sino la respuesta generada al agregar externamente agentes oxidantes (ya sea peróxido de hidrógeno, paraquat o azul de toluidina). Con respecto a la formación de ROS, no se esperaría que fuera demasiado alta en baja aerobiosis, sino en alta aerobiosis, condición en la cual CreC en teoría no estaría activo si la fuente de carbono fuese la glucosa. Para analizar más profundamente esto, en una próxima etapa se puede estudiar la generación de ROS en ambas cepas, en presencia y en ausencia de agentes oxidantes, tanto en

baja aerobiosis (con M9 glucosa), como en alta aerobiosis con M9 piruvato o acetato, para ver posibles efectos inducidos por CreC en condiciones “naturalmente” oxidativas.

¿Un problema de eficiencia?

La tasa respiratoria también fue menor en la cepa mutante. ¿Se podría relacionar este hecho con la disponibilidad del cofactor NADH? Quizás sí, pero de forma indirecta. Esta relación podría deberse a una situación de equilibrio a la que la célula podría llegar tras sensor una concentración de equivalentes de reducción menor, para cuya reoxidación no es indispensable tener una cadena respiratoria tan activa. Si esto fuese así, podría entenderse que el flujo de carbono se desviase hacia la formación de acetato: la célula buscaría compensar la merma en los niveles de ATP provenientes de la cadena respiratoria fosforilando ADP a partir del acetilfosfato. Sería interesante saber qué sucede con el reservorio de ATP en baja aerobiosis y qué efectos tiene la falta de CreC en el consumo de oxígeno cuando se crecen los cultivos en alta aerobiosis con fuentes gluconeogénicas de bajo peso molecular (activan CreC aún en aerobiosis) en los que es de esperar que la cadena respiratoria funcione de forma óptima.

Siguiendo con la idea de la ineficiencia, se podría pensar que el aumento en el consumo específico de glucosa por parte de la cepa $\Delta creC$, podría deberse a un esfuerzo por aumentar el flujo de carbono hacia la formación de acetato y obtener más ATP. Si esto fuese cierto, sería una buena estrategia, ya que el crecimiento de las mutantes logra ser tan bueno como el de la cepa salvaje.

La producción de PHB.

Además de realizar el análisis de los efectos genéticos y metabólicos de CreC, se estudiaron sus efectos sobre la síntesis de metabolitos interesantes desde el punto de vista comercial, entre ellos el PHB. Generalmente las estrategias empleadas para aumentar la producción de PHB buscan aumentar la disponibilidad de NADPH y acetyl-CoA, precursores de la vía de síntesis de este polímero [85], [119], [137]. En nuestro trabajo vimos que la producción de PHB aumentaba aproximadamente un 50% gracias a la mutación $\Delta creC$. En base a nuestros resultados, este aumento podría deberse al mayor flujo desde el nodo piruvato hacia acetylCoA, que luego es convertido en acetato, formiato y/o PHB. Con respecto del otro precursor de la síntesis de PHB, el NADPH, si bien vimos que la mutación $\Delta creC$ no estaría afectando la concentración de esta coenzima, sus niveles están vinculados a los niveles de NADH, vía transhidrogenasas como ya hemos explicado.

Por otro lado la cepa $\Delta creC$ produce menos lactato, y en trabajos previos de nuestro laboratorio [85] vimos que anular la vía de síntesis de lactato aumentaba la síntesis del polímero. En glicerol, en cambio, la cantidad de PHB sintetizada fue la misma en ambas cepas. En estos cultivos el acetato no fue el principal metabolito, sino el formiato. Como ya hemos mencionado, el glicerol es preferiblemente fermentado hacia etanol, con lo cual podríamos suponer que en esta fuente de carbono, si bien hay un mayor flujo de carbono desde el nodo piruvato hacia acetyl-CoA y

formiato, el acetyl-CoA podría estar dirigiéndose mayoritariamente hacia la síntesis de etanol y no hacia la de PHB. Desafortunadamente debido a limitaciones de tiempo no fue posible medir las cantidades de este compuesto así como el sustrato consumido de los experimentos experimentos presentados en el tercer capítulo. Se espera que cuando se puedan conocer estos datos se tengan elementos para responder estos interrogantes.

Las mutaciones en genes metabólicos tuvieron para el caso del PHB consecuencias en el perfil de ácidos, pero no en la síntesis del polímero. Quizás en este punto, podamos pensar que empiezan a cobrar relevancia otros fenómenos relacionados con el estrés ocasionado por la presencia de un agente completamente extraño en el interior celular, que le imponen un límite empírico al mejoramiento de la producción de PHB. En trabajos previos de nuestro laboratorio se vio que la expresión heteróloga de proteínas chaperonas permitían aumentar la biomasa y la producción de PHB en comparación con cepas que solo producían PHB en cepas de *E. coli* [60].

La producción de succinato.

Con respecto del succinato, lo primero que vimos es que la cepa $\Delta creC$ produce más de este ácido con respecto a la cepa salvaje, en glucosa y en glicerol. Esto no fue un dato menor, ya que la cepa K1060 es una mala productora de succinato, tanto así que este ácido es prácticamente indetectable en sus cultivos. Así y todo quedaba mucho por hacer para transformar nuestra cepa $\Delta creC$ en una cepa productora de succinato.

El primer paso fue mejorar la producción simplemente cambiando las condiciones de cultivo. Para ello se utilizó una estrategia ya conocida: agregar bicarbonato al medio [116], [121], [130], [138], [139]. Si bien se observaron mejoras en la producción en la cepa DC1060, no fueron tan importantes como se esperaba. Por ese motivo se intentó una segunda estrategia común, que es la sobreexpresión de enzimas carboxilantes [140], [141]. Esta estrategia se combinó con otras modificaciones. A fin de disminuir la síntesis de otros metabolitos no deseados (acetato y formiato), decidimos coexpresar la enzima carboxilante con la Fdh1 de *Candida Boidinii*, que libera hidrógeno y dióxido de carbono a partir de formiato, reduciendo NADH.

Al analizar la literatura se observó que existía cierta discrepancia entre distintos autores respecto a qué enzima convenía sobre-expresar (si la PEP carboxilasa o la PEP carboxiquinasa) para obtener mejores rendimientos de succinato, por la que se probaron ambas, combinando cada una con la Fdh1, y ensayando las combinaciones con las cuatro mutantes construidas (DC1060, CE1060, CEA1060 y CEAP1060) más la cepa salvaje (K1060).

Desafortunadamente los resultados no fueron tan buenos como los esperados. Si bien una de estas combinaciones (CEA/PS) sextuplicó la producción de succinato respecto de la cepa salvaje, y lo duplicó respecto de la DC1060, los valores absolutos de este ácido no fueron realmente competitivos (6 mM).

¿Qué podemos decir a la luz de los resultados que arrojaron nuestros experimentos respecto de cuál es el mejor sistema para fijar dióxido de carbono con miras a mejorar la síntesis de succinato? La respuesta puede resultar extremadamente ambigua, pero no por ello es menos cierta: la complejidad regulatoria de los microorganismos, en todos sus niveles, sumado a las variaciones en las condiciones bajo las que se estudia su desempeño como productores de metabolitos, hace que sea realmente difícil llegar un veredicto único y definitivo. Si tuviéramos un microorganismo A y uno B cuyas principales enzimas carboxilantes tienen una constante de afinidad por el CO₂ de $K_m=0,15$ mM y $K_m=13$ mM respect. y debiéramos decir cuál es, a priori, aquel que produce más succinato, diríamos sin dudar que es el microorganismo A (cuya carboxilasa tiene una afinidad por el CO₂ 90 veces mayor al de su competidor). Saber que el microorganismo triunfador A es *E. coli* y que el perdedor de nuestro concurso es *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, nos daría una pauta de lo equivocados que estuvimos [53] (recordemos que *A. succiniproducens* se caracteriza, como su nombre lo indica, por su alta producción de succinato).

Esto quiere decir que las propiedades de cada componente observadas individualmente, fuera del contexto celular y ambiental, pueden no ser suficientes para predecir el comportamiento de todo un sistema. En nuestro caso, resultó contribuir más a la producción de succinato la enzima Ppc (PEP carboxilasa), pese a que es más ineficiente energéticamente que la Pck (libera el Pi del PEP en vez de fosforilar ADP, a diferencia de la Pck que genera una molécula de ATP)[53]. Como mencionamos en la correspondiente sección del Capítulo III, sería interesante realizar distintos experimentos que den cuenta de cuánto contribuye cada enzima en estudio a mejorar la producción de succinato.

Conclusiones finales

Podemos resumir las conclusiones a las que llegamos en este trabajo en los siguientes puntos:

- CreC tiene efectos pleiotrópicos en el metabolismo central del carbono en condiciones de baja aerobiosis y anaerobiosis, siendo el acetato, el formiato, el lactato y el succinato, los metabolitos cuya síntesis se ve más afectada.
- Los efectos de CreC están mediados por CreB, y no por otros reguladores de la respuesta. CreB actuaría directa o indirectamente en la transcripción de distintos genes (entre ellos *ldhA* y *ackA*), redundando en una dinámica regulatoria más (*ackA*) o menos (*ldhA*) compleja. En estos efectos regulatorios podrían intervenir otros genes de función desconocida, ubicados cerca de motivos Cre.
- El estado redox intracelular se ve afectado por este regulador global, como lo demuestran el coeficiente [etanol]/[acetato] y la relación de cofactores NADH/NAD⁺. También se registraron efectos sobre el consumo de oxígeno (en frasco agitado) y el consumo de glucosa (en biorreactor).

- La mutación $\Delta creC$ mejora la producción de PHB en M9 glucosa, aunque su producción no pudo mejorarse con subsiguientes mutaciones en vías competitivas. Esto podría deberse a un aumento en la disponibilidad de precursores para la síntesis del polímero (acetil-CoA) y a un mayor consumo de glucosa.
- La producción de succinato es mayor en presencia de la mutación $\Delta creC$. Su producción se pudo mejorar a mediante distintas estrategias: (i) agregando bicarbonato de sodio al medio; (ii) anulando vías metabólicas competitivas, entre las cuales la mejor combinación resultó ser $\Delta creC$, $\Delta adhE$, $\Delta ackA$. (iii) sobrepresando las enzimas Pck o Ppc en combinación con la Fdh1 de *C. boidinii*, siendo la mejor productora la cepa CEA/PS.

Bibliografía.

- [1] M. Kivisaar, "Stationary phase mutagenesis: mechanisms that accelerate adaptation of microbial populations under environmental stress," *Environmental Microbiology*, vol. 5, no. 10, pp. 814–827, Oct. 2003.
- [2] L. Snyder, J. E. Peters, T. M. Henkin, and W. Champness, *Molecular genetics of bacteria*, 4th ed. Washington D. C: ASM Press, 2013, p. 539.
- [3] a M. Stock, V. L. Robinson, and P. N. Goudreau, "Two-component signal transduction.," *Annual review of biochemistry*, vol. 69, pp. 183–215, Jan. 2000.
- [4] K. Wuichet, B. Cantwell, and I. Zhulin, "Evolution and phyletic distribution of two-component signal transduction systems," *Current opinion in microbiology*, vol. 13, no. 2, pp. 219–225, 2010.
- [5] B. L. Wanner, "Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology Microbiology," in *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology Microbiology.*, H. E. Neidhardt, F. C., Curtiss, R., III, Ingram, J. L Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M., and Umbarger, Ed. Washington D. C: American Society for Microbiology, 1996, pp. 1357–1381.
- [6] K. Makino, M. Amemura, T. Kawamoto, S. Kimura, H. Shinagawa, a Nakata, and M. Suzuki, "DNA binding of PhoB and its interaction with RNA polymerase.," *Journal of molecular biology*, vol. 259, no. 1, pp. 15–26, May 1996.
- [7] M. R. Wilmes-Riesenberg and B. L. Wanner, "TnphoA and TnphoA' elements for making and switching fusions for study of transcription, translation, and cell surface localization.," *Journal of bacteriology*, vol. 174, no. 14, pp. 4558–75, Jul. 1992.
- [8] M. Amemura, K. Makino, H. Shinagawa, and A. Nakata, "Nucleotide sequence of the phoM region of Escherichia coli : four open reading frames may Nucleotide Sequence of the phoM Region of Escherichia coli : Four Open Reading Frames May Constitute an Operon," vol. 168, no. 1, 1986.
- [9] E. Cascales, S. K. Buchanan, D. Duché, C. Kleanthous, R. Lloubès, K. Postle, M. Riley, S. Slatin, and D. Cavard, "Colicin biology.," *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR*, vol. 71, no. 1, pp. 158–229, Mar. 2007.
- [10] and R. S. B. Drury, L. S., "Identification and sequencing of the Escherichia coli cet gene which codes for an inner membrane-protein, mutation of which causes tolerance to colicin-E2.," *Molecular microbiology*, pp. 109–119, 1988.
- [11] S. J. L. Cariss, C. Constantinidou, M. D. Patel, Y. Takebayashi, J. L. Hobman, C. W. Penn, and M. B. Avison, "YieJ (CbrC) mediates CreBC-dependent colicin E2 tolerance in Escherichia coli.," *Journal of bacteriology*, vol. 192, no. 13, pp. 3329–36, Jul. 2010.

- [12] S. J. L. Cariss, A. E. Tayler, and M. B. Avison, "Defining the growth conditions and promoter-proximal DNA sequences required for activation of gene expression by CreBC in *Escherichia coli*," *Journal of bacteriology*, vol. 190, no. 11, pp. 3930–9, Jun. 2008.
- [13] B. L. Wanner and M. R. Wilmes-Riesenberg, "Involvement of phosphotransacetylase, acetate kinase, and acetyl phosphate synthesis in control of the phosphate regulon in *Escherichia coli*," *Journal of bacteriology*, vol. 174, no. 7, pp. 2124–30, Apr. 1992.
- [14] B. L. Wanner, "Gene regulation by phosphate in enteric bacteria," *Journal of cellular biochemistry*, vol. 51, no. 1, pp. 47–54, Jan. 1993.
- [15] M. B. Avison, R. E. Horton, T. R. Walsh, and P. M. Bennett, "*Escherichia coli* CreBC is a global regulator of gene expression that responds to growth in minimal media," *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, no. 29, pp. 26955–61, Jul. 2001.
- [16] R. Brückner and F. Titgemeyer, "Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization," *FEMS microbiology letters*, vol. 209, no. 2, pp. 141–8, Apr. 2002.
- [17] T. Inada, K. Kimata, and H. Aiba, "Mechanism responsible for glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*: challenge to the cAMP model," *Genes Cells*, vol. 1, no. 3, pp. 293–301.
- [18] P. T. C. Van Den Bogaard, M. Kleerebezem, P. Kuipers, and W. M. De Vos, "Control of Lactose Transport, β -Galactosidase Activity, and Glycolysis by CcpA in *Streptococcus thermophilus*: Evidence for Carbon Catabolite Repression by a Non Phosphoenolpyruvate-Dependent Phosphotransferase System Sugar Control of Lactose Transport," 2000.
- [19] P. W. Postma, J. W. Lengeler, and G. R. Jacobson, "Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria," *Microbiological reviews*, vol. 57, no. 3, pp. 543–94, Sep. 1993.
- [20] S. Busby and R. H. Ebright, "Transcription activation by catabolite activator protein (CAP)," *Journal of molecular biology*, vol. 293, no. 2, pp. 199–213.
- [21] T. M. Henkin, "The role of CcpA transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis*," *FEMS microbiology letters*, vol. 135, no. 1, pp. 9–15.
- [22] M. H. Saier and T. O. M. M. Ramseier, "of enteric bacteria . MINIREVIEW The Catabolite Repressor / Activator (Cra) Protein of Enteric Bacteria," vol. 178, no. 12, 1996.
- [23] J. Plumbridge, "Regulation of PTS gene expression by the homologous transcriptional regulators, Mlc and NagC, in *Escherichia coli* (or how two similar repressors can behave differently)," *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, vol. 3, no. 3, pp. 371–80, Jul. 2001.

- [24] T. Romeo, "Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB.," *Molecular microbiology*, vol. 29, no. 6, pp. 1321–30, Sep. 1998.
- [25] E. Cabiscol and J. Ros, "Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species," pp. 3–8, 2000.
- [26] K. M. Humphries and Szweda, L.I., "Selective inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal.," *Biochemistry*, vol. 37, no. 45, pp. 15835–41., 1998.
- [27] H. Sies and C. F. M. Menckb, "Singlet oxygen induced DNA damage," *Mutation Research/DNAging*, vol. Volume 275, no. 3–6, pp. 367–375, 1992.
- [28] E. R. Stadtman, "Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 9, no. 4, pp. 315–325, 1990.
- [29] S. M. Chiang and H. E. Schellhorn, "Regulators of oxidative stress response genes in Escherichia coli and their functional conservation in bacteria.," *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 525, no. 2, pp. 161–9, Sep. 2012.
- [30] K. W. Jair, R. G. Martin, J. L. Rosner, N. Fujita, a Ishihama, and R. E. Wolf, "Purification and regulatory properties of MarA protein, a transcriptional activator of Escherichia coli multiple antibiotic and superoxide resistance promoters.," *Journal of bacteriology*, vol. 177, no. 24, pp. 7100–4, Dec. 1995.
- [31] M. Gu and J. A. Imlay, "The SoxRS response of Escherichia coli is directly activated by redox-cycling drugs rather than by superoxide," *Mol Microbiol.*, vol. 79, no. 5, pp. 1136–1150, 2012.
- [32] S. I. Liochev and I. Fridovich, "Effects of overproduction of superoxide dismutase on the toxicity of paraquat toward Escherichia coli.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 266, no. 14, pp. 8747–50, May 1991.
- [33] K. G. Harding, J. S. Dennis, H. von Blottnitz, and S. T. L. Harrison, "Environmental analysis of plastic production processes: comparing petroleum-based polypropylene and polyethylene with biologically-based poly-beta-hydroxybutyric acid using life cycle analysis.," *Journal of biotechnology*, vol. 130, no. 1, pp. 57–66, May 2007.
- [34] P. Collet, A. Hélias, L. Lardon, M. Ras, R.-A. Goy, and J.-P. Steyer, "Life-cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production.," *Bioresource technology*, vol. 102, no. 1, pp. 207–14, Jan. 2011.

- [35] T. Patschkowski, D. N. Bates, and P. J. Kiley, "Mechanisms for sensing and responding to oxygen deprivation," in *Bacterial stress responses.*, G. Storz and R. Hengge-Aronis, Eds. Washington, D.C.: ASM Press, 2000.
- [36] S. Iuchi and E. C. C. Lin, "areA (dye), a global regulatory gene in Escherichia coli mediating repression of enzymes in aerobic pathways," vol. 85, no. March, pp. 1888–1892, 1988.
- [37] J. G. Zeikus, M. K. Jain, and P. Elankovan, "Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 51, no. 5, pp. 545–552, May 1999.
- [38] I. Ahmed, D. Morris, and D. J. Morris, *Replacing Petrochemicals With Biochemicals: A Pollution Prevention Strategy for the Great Lakes Region*. Inst for Local Self Reliance, 1994.
- [39] M. Paster, J. L. Pellegrino, and T. M. Carole, "The Bioproducts Industry : Today and Tomorrow," no. March 2004, 2006.
- [40] Y. Deng, K. Wang, and J. Chen, "Clean synthesis of adipic acid by direct oxidation of cyclohexene with H₂O₂ over peroxytungstate – organic complex catalysts," no. December, pp. 275–276, 1999.
- [41] R. A. Gross and B. Kalra, "Biodegradable Polymers for the Environment," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 297, pp. 803–807, 2002.
- [42] S. M. O'Herrin and W. R. Kenealy, "Glucose and carbon dioxide metabolism by *Succinivibrio dextrinosolvens.*," *Applied and environmental microbiology*, vol. 59, no. 3, pp. 748–755, 1993.
- [43] M. J. Van der Werf, M. V. Guettler, J. K. Mahendra, and J. G. Zeikus, "Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus* sp.," *Archives of Microbiology*, vol. 167, no. 6, pp. 332–342.
- [44] C. P. Davis, D. Cleven, J. Brown, and E. Balish, "Anaerobiospirillum, a New Genus of Spiral-Shaped Bacteria.," *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 26, no. 4, pp. 498–504, 1976.
- [45] N. S. Samuelov, R. Lamed, S. Lowe, and J. G. Zeikus, "Influence of CO₂-HCO₃ Levels and pH on Growth, Succinate Production, and Enzyme Activities of *Anaerobiospirillum succiniciproducens.*," *Applied and environmental microbiology*, vol. 57, no. 10, pp. 3013–9, Oct. 1991.
- [46] D. Clark, "The fermentation pathways of *Escherichia coli.*," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 63, no. 3, pp. 223–234, 1989.

- [47] S. J. Lee, D. Lee, T. Y. Kim, B. H. Kim, J. Lee, and S. Y. Lee, "Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Enhanced Production of Succinic Acid , Based on Genome Comparison and In Silico Gene Knockout Simulation," vol. 71, no. 12, pp. 7880–7887, 2005.
- [48] K. Jantama, M. J. Haupt, S. a Svoronos, X. Zhang, J. C. Moore, K. T. Shanmugam, and L. O. Ingram, "Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate.," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 99, no. 5, pp. 1140–53, Apr. 2008.
- [49] S. Berríos-Rivera, "Metabolic Engineering of *Escherichia coli*: Increase of NADH Availability by Overexpressing an NAD⁺-Dependent Formate Dehydrogenase," *Metabolic Engineering*, vol. 4, no. 3, pp. 217–229, Jul. 2002.
- [50] X. Zhang, K. Jantama, J. C. Moore, L. R. Jarboe, K. T. Shanmugam, and L. O. Ingram, "Metabolic evolution of energy-conserving pathways for succinate production in *Escherichia coli*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 48, pp. 20180–5, Dec. 2009.
- [51] K. C. Kao, L. M. Tran, and J. C. Liao, "A global regulatory role of gluconeogenic genes in *Escherichia coli* revealed by transcriptome network analysis.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 280, no. 43, pp. 36079–87, Oct. 2005.
- [52] L. Stols and M. I. Donnelly, "Production of succinic acid through overexpression of NAD (+) -dependent malic enzyme in an *Escherichia coli* mutant . Production of Succinic Acid through Overexpression of NAD ² - Dependent Malic Enzyme in an *Escherichia coli* Mutant," vol. 63, no. 7, 1997.
- [53] C. S. Millard, Y. P. Chao, J. C. Liao, and M. I. Donnelly, "Enhanced production of succinic acid by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Escherichia coli*," *Applied and environmental microbiology*, vol. 62, no. 5, pp. 1808–10, May 1996.
- [54] Y.-D. Kwon, S. Y. Lee, and P. Kim, "A Physiology Study of *Escherichia coli* Overexpressing Phosphoenolpyruvate Carboxykinase," *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, vol. 72, no. 4, pp. 1138–1141, 2008.
- [55] R. a J. Verlinden, D. J. Hill, M. a Kenward, C. D. Williams, and I. Radecka, "Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates.," *Journal of applied microbiology*, vol. 102, no. 6, pp. 1437–49, Jun. 2007.
- [56] J. M. Luengo, B. García, A. Sandoval, G. Naharro, and E. R. Olivera, "Bioplastics from microorganisms," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 6, no. 3, pp. 251–260, Jun. 2003.
- [57] Q. Liu, G. Luo, X. R. Zhou, and G.-Q. Chen, "Biosynthesis of poly(3-hydroxydecanoate) and 3-hydroxydodecanoate dominating polyhydroxyalkanoates by β -oxidation pathway inhibited *Pseudomonas putida*," *Metabolic engineering*, vol. 13, no. 1, pp. 11–7, Jan. 2011.

- [58] M. Zinn, B. Witholt, and T. Egli, "Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate.," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 53, no. 1, pp. 5–21, Dec. 2001.
- [59] L. L. Madison and G. W. Huisman, "Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic.," *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR*, vol. 63, no. 1, pp. 21–53, Mar. 1999.
- [60] A. de Almeida, P. I. Nikel, A. M. Giordano, and M. J. Pettinari, "Effects of granule-associated protein PhaP on glycerol-dependent growth and polymer production in poly(3-hydroxybutyrate)-producing *Escherichia coli*," *Applied and environmental microbiology*, vol. 73, no. 24, pp. 7912–6, Dec. 2007.
- [61] T. G. Volova, G. S. Kalacheva, O. V Gorbunova, and N. O. Zhila, "[Dynamics of activity of the key enzymes of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Ralstonia eutropha*].," *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia*, vol. 40, no. 2, pp. 201–9, 2004.
- [62] M. Pötter, H. Müller, F. Reinecke, R. Wieczorek, F. Fricke, B. Bowien, B. Friedrich, and A. Steinbüchel, "The complex structure of polyhydroxybutyrate (PHB) granules: four orthologous and paralogous phasins occur in *Ralstonia eutropha*," *Microbiology (Reading, England)*, vol. 150, no. Pt 7, pp. 2301–11, Jul. 2004.
- [63] a Mena, E. E. Smith, J. L. Burns, D. P. Speert, S. M. Moskowitz, J. L. Perez, and a Oliver, "Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation.," *Journal of bacteriology*, vol. 190, no. 24, pp. 7910–7, Dec. 2008.
- [64] A. Steinb, "Bacterial and other biological systems for polyester production," vol. 16, no. October, pp. 419–427, 1998.
- [65] R. Li, H. Zhang, and Q. Qi, "The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*," *Bioresource technology*, vol. 98, no. 12, pp. 2313–20, Sep. 2007.
- [66] J. Choi and S. Y. Lee, "Efficient and Economical Recovery of Poly (3-Hydroxybutyrate) from Recombinant *Escherichia coli* by Simple," 1999.
- [67] A. By-products, P. I. Nikel, A. De Almeida, E. C. Melillo, M. A. Galvagno, and M. J. Pettinari, "New Recombinant *Escherichia coli* Strain Tailored for the Production of Poly (3-Hydroxybutyrate) from New Recombinant *Escherichia coli* Strain Tailored for the Production of Poly (3-Hydroxybutyrate) from Agroindustrial By-Products," 2006.
- [68] K. Jantama, X. Zhang, J. C. Moore, K. T. Shanmugam, S. a Svoronos, and L. O. Ingram, "Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C.," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 101, no. 5, pp. 881–93, Dec. 2008.

- [69] P. I. Nickel, A. de Almeida, E. C. Melillo, M. a Galvagno, and M. J. Pettinari, "New recombinant *Escherichia coli* strain tailored for the production of poly(3-hydroxybutyrate) from agroindustrial by-products.," *Applied and environmental microbiology*, vol. 72, no. 6, pp. 3949–54, Jun. 2006.
- [70] S. Y. Lee, K. S. Yima, H. N. Chang, and Y. K. Chang, "Construction of plasmids, estimation of plasmid stability, and use of stable plasmids for the production of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli*," *Journal of biotechnology*, vol. 32, no. 2, pp. 203–211.
- [71] M. Miyake, C. Miyamoto, J. Schnackenberg, R. Kurane, and Y. Asada, "Phosphotransacetylase as a Key Factor in Biological Production of Polyhydroxybutyrate," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, pp. 1039–1044, 2000.
- [72] M. M. Kabir and K. Shimizu, "Fermentation characteristics and protein expression patterns in a recombinant *Escherichia coli* mutant lacking phosphoglucose isomerase for poly(3-hydroxybutyrate) production.," *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 62, no. 2–3, pp. 244–55, Aug. 2003.
- [73] B. J. Bachmann, "Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12.," *Bacteriological reviews*, vol. 36, no. 4, pp. 525–57, Dec. 1972.
- [74] P. Overath, H. U. Schairer, and W. Stoffel, "Correlation of in vivo and in vitro phase transitions of membrane lipids in *Escherichia coli*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 67, no. 2, pp. 606–12, Oct. 1970.
- [75] T. Baba, T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. a Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner, and H. Mori, "Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection.," *Molecular systems biology*, vol. 2, p. 2006.0008, Jan. 2006.
- [76] M. Meselson and R. Yuan, "DNA restriction enzyme from *E. coli*," *Nature*, vol. 217, no. 5134, pp. 1110–1114.
- [77] M. Guyer, R. R, S. J, and K. B. Low, "Identification of a sex-factor-affinity site in *E. coli* as gamma delta.," *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, vol. 45, no. 1, pp. 135–140, 1981.
- [78] L. Ferrières, G. Hémerly, T. Nham, A. M. Guérout, D. Mazel, C. Beloin, and J. M. Ghigo, "Silent Mischief: Bacteriophage Mu Insertions Contaminate Products of *Escherichia coli* Random Mutagenesis Performed Using Suicidal Transposon Delivery Plasmids Mobilized by Broad-Host-Range RP4 Conjugative Machinery," vol. 192, pp. 6418–6427.

- [79] K. a Datsenko and B. L. Wanner, "One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 12, pp. 6640–5, Jun. 2000.
- [80] Y.-D. Kwon, O.-H. Kwon, H.-S. Lee, and P. Kim, "The effect of NADP-dependent malic enzyme expression and anaerobic C4 metabolism in Escherichia coli compared with other anaerobic enzymes.," *Journal of applied microbiology*, vol. 103, no. 6, pp. 2340–5, Dec. 2007.
- [81] P. I. Nikel, A. de Almeida, M. J. Pettinari, and B. S. Méndez, "The legacy of HfrH: mutations in the two-component system CreBC are responsible for the unusual phenotype of an Escherichia coli arcA mutant.," *Journal of bacteriology*, vol. 190, no. 9, pp. 3404–7, May 2008.
- [82] A. Zaslaver, A. E. Mayo, R. Rosenberg, P. Bashkin, H. Sberro, M. Tsalyuk, M. G. Surette, and U. Alon, "Just-in-time transcription program in metabolic pathways.," *Nature genetics*, vol. 36, no. 5, pp. 486–91, May 2004.
- [83] A. G. Ostle and J. G. Holt, "Nile blue A as a fluorescent stain for Fluorescent Stain for Poly-3-Hydroxybutyrate," 1982.
- [84] P. I. Nikel, M. J. Pettinari, M. A. Galvagno, and B. S. Me, "Poly (3-Hydroxybutyrate) Synthesis by Recombinant Escherichia coli arcA Mutants in Microaerobiosis.," vol. 72, no. 4, pp. 2614–2620, 2006.
- [85] P. I. Nikel, A. M. Giordano, A. de Almeida, M. S. Godoy, and M. J. Pettinari, "Elimination of D-lactate synthesis increases poly(3-hydroxybutyrate) and ethanol synthesis from glycerol and affects cofactor distribution in recombinant Escherichia coli.," *Applied and environmental microbiology*, vol. 76, no. 22, pp. 7400–6, Nov. 2010.
- [86] S. Fa, D. Silberschmidt, B. Rehm, M. J. Pettinari, G. J. Va, B. S. Me, D. De Qui, and D.- Mu, "Poly (3-Hydroxybutyrate) Synthesis Genes in Azotobacter sp .," vol. 67, no. 11, pp. 5331–5334, 2001.
- [87] P. I. Nikel, J. Zhu, K.-Y. San, B. S. Méndez, and G. N. Bennett, "Metabolic flux analysis of Escherichia coli creB and arcA mutants reveals shared control of carbon catabolism under microaerobic growth conditions.," *Journal of bacteriology*, vol. 191, no. 17, pp. 5538–48, Sep. 2009.
- [88] J. a Ruiz, R. O. Fernández, P. I. Nikel, B. S. Méndez, and M. J. Pettinari, "dye (arc) Mutants: insights into an unexplained phenotype and its suppression by the synthesis of poly (3-hydroxybutyrate) in Escherichia coli recombinants.," *FEMS microbiology letters*, vol. 258, no. 1, pp. 55–60, May 2006.

- [89] M. B. Avison, R. E. Horton, T. R. Walsh, and P. M. Bennett, "Escherichia coli CreBC is a global regulator of gene expression that responds to growth in minimal media.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, no. 29, pp. 26955–61, Jul. 2001.
- [90] S. J. L. Cariss, A. E. Tayler, and M. B. Avison, "Defining the growth conditions and promoter-proximal DNA sequences required for activation of gene expression by CreBC in Escherichia coli.," *Journal of bacteriology*, vol. 190, no. 11, pp. 3930–9, Jun. 2008.
- [91] P. I. Nikel, M. J. Pettinari, M. C. Ramírez, M. a Galvagno, and B. S. Méndez, "Escherichia coli arcA mutants: metabolic profile characterization of microaerobic cultures using glycerol as a carbon source.," *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, vol. 15, no. 1, pp. 48–54, Jan. 2008.
- [92] D. E. Chang, S. Shin, J. S. Rhee, and J. G. Pan, "Acetate metabolism in a pta mutant of Escherichia coli W3110: importance of maintaining acetyl coenzyme A flux for growth and survival.," *Journal of bacteriology*, vol. 181, no. 21, pp. 6656–63, Nov. 1999.
- [93] T. King, A. Ishihama, A. Kori, and T. Ferenci, "A Regulatory Trade-Off as a Source of Strain Variation in the Species Escherichia coli A Regulatory Trade-Off as a Source of Strain Variation in the Species Escherichia coli †," vol. 186, no. 17, 2004.
- [94] T. Ferenci, H. F. Galbiati, T. Betteridge, K. Phan, and B. Spira, "The constancy of global regulation across a species: the concentrations of ppGpp and RpoS are strain-specific in Escherichia coli.," *BMC microbiology*, vol. 11, p. 62, Jan. 2011.
- [95] B. Kreikemeyer, S. Beckert, A. Braun-kiewnick, and A. Podbielski, "Group A streptococcal RofA-type global regulators exhibit a strain-specific genomic presence and regulation pattern," pp. 1501–1511, 2002.
- [96] F. Luo, S. Lizano, and D. E. Bessen, "Heterogeneity in the polarity of Nra regulatory effects on streptococcal pilus gene transcription and virulence.," *Infection and immunity*, vol. 76, no. 6, pp. 2490–7, Jun. 2008.
- [97] G. R. Jiang, S. Nikolova, and D. P. Clark, "Regulation of the ldhA gene, encoding the fermentative lactate dehydrogenase of Escherichia coli.," *Microbiology (Reading, England)*, vol. 147, no. Pt 9, pp. 2437–46, Sep. 2001.
- [98] C. Kirkpatrick, L. M. Maurer, N. E. Oyelakin, Y. N. Yoncheva, R. Maurer, L. Joan, and J. L. Slonczewski, "Acetate and Formate Stress : Opposite Responses in the Proteome of Escherichia coli Acetate and Formate Stress : Opposite Responses in the Proteome of Escherichia coli," vol. 183, no. 21, pp. 6466–6477, 2001.
- [99] W. G. Miller, J. H. Leveau, and S. E. Lindow, "Improved gfp and inaZ broad-host-range promoter-probe vectors.," *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI vol. 13, no. 11, pp. 1243–50, Nov. 2000.

- [100] B. P. Cormack, R. H. Valdivia, and S. Falkow, "FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)," *Gene*, vol. 173, no. 1 Spec No, pp. 33–8, Jan. 1996.
- [101] M. Rahman, M. R. Hasan, and K. Shimizu, "Growth phase-dependent changes in the expression of global regulatory genes and associated metabolic pathways in *Escherichia coli*," *Biotechnology letters*, vol. 30, no. 5, pp. 853–60, May 2008.
- [102] W. Roeder and R. Somerville, "Cloning the *trpR* gene," *Molecular and General Genetics MGG*, vol. 176, no. 3, pp. 361–368, 1979.
- [103] R. S. Buxton and L. S. Drury, "Cloning and insertional inactivation of the dye (*sfrA*) gene, mutation of which affects sex factor F expression and dye sensitivity of *Escherichia coli* K-12," *Journal of bacteriology*, vol. 154, no. 3, pp. 1309–14, Jun. 1983.
- [104] H. M. Hassan, I. Fridovich, and J. B. Chem, "Superoxide radical and the oxygen enhancement of the toxicity of paraquat in *Escherichia coli* . Superoxide Paraquat Radical and the Oxygen in *Escherichia coli* * Enhancement of the Toxicity of," 1978.
- [105] O. Carmel-harel and G. Storz, "ROLES OF THE GLUTATHIONE - AND THIOREDOXIN -DEPENDENT REDUCTION SYSTEMS IN THE *ESCHERICHIA COLI* AND *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* RESPONSES TO OXIDATIVE STRESS," 2000.
- [106] M. J. Butler, P. Bruheim, S. Jovetic, F. Marinelli, P. W. Postma, and M. J. Bibb, "Engineering of Primary Carbon Metabolism for Improved Antibiotic Production in *Streptomyces lividans* †," vol. 68, no. 10, pp. 4731–4739, 2002.
- [107] M. Ballesteros, a Fredriksson, J. Henriksson, and T. Nyström, "Bacterial senescence: protein oxidation in non-proliferating cells is dictated by the accuracy of the ribosomes.," *The EMBO journal*, vol. 20, no. 18, pp. 5280–9, Sep. 2001.
- [108] T. L. Bailey and C. Elkan, "FITTING A MIXTURE MODEL BY EXPECTATION MAXIMIZATION TO DISCOVER MOTIFS IN BIOPOLYMERS UCSD Technical Report CS94-351."
- [109] C. E. Grant, T. L. Bailey, and W. S. Noble, "FIMO: scanning for occurrences of a given motif.," *Bioinformatics (Oxford, England)*, vol. 27, no. 7, pp. 1017–8, Apr. 2011.
- [110] J. M. Peters, R. a Mooney, J. a Grass, E. D. Jessen, F. Tran, and R. Landick, "Rho and NusG suppress pervasive antisense transcription in *Escherichia coli*," *Genes & development*, vol. 26, no. 23, pp. 2621–33, Dec. 2012.
- [111] S. S. Singh, N. Singh, R. P. Bonocora, D. M. Fitzgerald, J. T. Wade, and D. C. Grainger, "Widespread suppression of intragenic transcription initiation by H-NS.," *Genes & development*, vol. 28, no. 3, pp. 214–9, Feb. 2014.

- [112] E. Chan and B. Weiss, "Endonuclease IV of *Escherichia coli* is induced by paraquat," vol. 84, no. May, pp. 3189–3193, 1987.
- [113] G. Durnin, J. Clomburg, Z. Yeates, P. J. J. Alvarez, K. Zygourakis, P. Campbell, and R. Gonzalez, "Understanding and harnessing the microaerobic metabolism of glycerol in *Escherichia coli*," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 103, no. 1, pp. 148–61, May 2009.
- [114] M. H. Zwietering, I. Jongenburger, F. M. Rombouts, and K. van 't Riet, "Modeling of the bacterial growth curve.," *Applied and environmental microbiology*, vol. 56, no. 6, pp. 1875–81, Jun. 1990.
- [115] S. J. Pirt, "The Maintenance Energy of Bacteria in Growing Cultures," *Proceedings of the Royal Society of London.*, vol. 163, no. 991, pp. 224–231, 1965.
- [116] X. Zhang, K. T. Shanmugam, and L. O. Ingram, "Fermentation of glycerol to succinate by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*," *Applied and environmental microbiology*, vol. 76, no. 8, pp. 2397–401, Apr. 2010.
- [117] J. W. Lee, D. Na, J. M. Park, J. Lee, S. Choi, and S. Y. Lee, "for natural and non-natural chemicals," *Nature Chemical Biology*, vol. 8, no. 6, pp. 536–546, 2012.
- [118] M. Rai and H. Padh, "Expression systems for production of heterologous proteins," vol. 80, no. 9, 2001.
- [119] P. I. Nikel, A. de Almeida, E. C. Melillo, M. a Galvagno, and M. J. Pettinari, "New recombinant *Escherichia coli* strain tailored for the production of poly(3-hydroxybutyrate) from agroindustrial by-products.," *Applied and environmental microbiology*, vol. 72, no. 6, pp. 3949–54, Jun. 2006.
- [120] M. a Prieto, M. B. Kellerhals, G. B. Bozzato, D. Radnovic, B. Witholt, and B. Kessler, "Engineering of stable recombinant bacteria for production of chiral medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoates.," *Applied and environmental microbiology*, vol. 65, no. 8, pp. 3265–71, Aug. 1999.
- [121] M. D. Blankschien, J. M. Clomburg, and R. Gonzalez, "Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of succinate from glycerol.," *Metabolic engineering*, vol. 12, no. 5, pp. 409–19, Sep. 2010.
- [122] W. Wang, Z. Li, J. Xie, and Q. Ye, "Production of succinate by a pflB ldhA double mutant of *Escherichia coli* overexpressing malate dehydrogenase.," *Bioprocess and biosystems engineering*, vol. 32, no. 6, pp. 737–45, Oct. 2009.
- [123] A. H. Klein, A. Shulla, S. a Reimann, D. H. Keating, and A. J. Wolfe, "The intracellular concentration of acetyl phosphate in *Escherichia coli* is sufficient for direct

phosphorylation of two-component response regulators.," *Journal of bacteriology*, vol. 189, no. 15, pp. 5574–81, Aug. 2007.

- [124] A. Singh, K. Cher Soh, V. Hatzimanikatis, and R. T. Gill, "Manipulating redox and ATP balancing for improved production of succinate in *E. coli*," *Metabolic engineering*, vol. 13, no. 1, pp. 76–81, Jan. 2011.
- [125] G. N. Vemuri, M. A. Eiteman, and E. Altman, "Effects of Growth Mode and Pyruvate Carboxylase on Succinic Acid Production by Metabolically Engineered Strains of *Escherichia coli* Effects of Growth Mode and Pyruvate Carboxylase on Succinic Acid Production by Metabolically Engineered Strains of *Escherichia coli*," 2002.
- [126] H. Wu, Q. Li, Z. Li, and Q. Ye, "Succinic acid production and CO₂ fixation using a metabolically engineered *Escherichia coli* in a bioreactor equipped with a self-inducing agitator.," *Bioresource technology*, vol. 107, pp. 376–84, Mar. 2012.
- [127] H. Wang and R. P. Gunsalus, "Coordinate Regulation of the *Escherichia coli* Formate Dehydrogenase *fdnGHI* and *fdhF* Genes in Response to Nitrate , Nitrite , and Formate : Roles for NarL and NarP Coordinate Regulation of the *Escherichia coli* Formate Dehydrogenase *fdnGHI* and *fdhF* Genes in," 2003.
- [128] S. Berríos-Rivera, "The Effect of Increasing NADH Availability on the Redistribution of Metabolic Fluxes in *Escherichia coli* Chemostat Cultures," *Metabolic Engineering*, vol. 4, no. 3, pp. 230–237, Jul. 2002.
- [129] A. Tsuji, E. Miyamoto, T. Terasaki, and T. Yamana, "Carbenicillin prodrugs: stability kinetics of alpha-phenyl and alpha-indanyl esters in aqueous solution.," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 68, no. 10, pp. 1259–1263.
- [130] G. N. Vemuri, M. a Eiteman, and E. Altman, "Succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations depends on the time of transition from aerobic to anaerobic conditions.," *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, vol. 28, no. 6, pp. 325–32, Jun. 2002.
- [131] H. Nikaido, "Maltose transport," vol. 346, pp. 55–58, 1994.
- [132] B.-G. Song, T.-K. Kim, Y.-M. Jung, and Y.-H. Lee, "Modulation of *talA* gene in pentose phosphate pathway for overproduction of poly-beta-hydroxybutyrate in transformant *Escherichia coli* harboring *phbCAB* operon.," *Journal of bioscience and bioengineering*, vol. 102, no. 3, pp. 237–40, Sep. 2006.
- [133] F. Mat-Jan, K. Y. Alam, and D. P. Clark, "Mutants of *Escherichia coli* deficient in the fermentative lactate dehydrogenase.," *Journal of bacteriology*, vol. 171, no. 1, pp. 342–8, Jan. 1989.

- [134] U. Sauer and B. J. Eikmanns, "The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria.," *FEMS microbiology reviews*, vol. 29, no. 4, pp. 765–94, Sep. 2005.
- [135] J. B. Hoek and J. Rydström, "Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase.," *The Biochemical journal*, vol. 254, no. 1, pp. 1–10, Aug. 1988.
- [136] U. Sauer, F. Canonaco, S. Heri, A. Perrenoud, and E. Fischer, "The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 279, no. 8, pp. 6613–9, Feb. 2004.
- [137] B.-G. Song, T.-K. Kim, Y.-M. Jung, and Y.-H. Lee, "Modulation of talA gene in pentose phosphate pathway for overproduction of poly-beta-hydroxybutyrate in transformant *Escherichia coli* harboring phbCAB operon.," *Journal of bioscience and bioengineering*, vol. 102, no. 3, pp. 237–40, Sep-2006.
- [138] A. M. Sánchez, G. N. Bennett, and K.-Y. San, "Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* to increase succinate yield and productivity.," *Metabolic engineering*, vol. 7, no. 3, pp. 229–39, May 2005.
- [139] N. S. Samuelov, R. Lamed, S. Lowe, and J. G. Zeikus, "Influence of CO₂-HCO₃ Levels and pH on Growth, Succinate Production, and Enzyme Activities of *Anaerobiospirillum succiniciproducens*.," *Applied and environmental microbiology*, vol. 57, no. 10, pp. 3013–9, Oct. 1991.
- [140] D. Wang, Q. Li, Y. Mao, J. Xing, and Z. Su, "High-level succinic acid production and yield by lactose-induced expression of phosphoenolpyruvate carboxylase in ptsG mutant *Escherichia coli*.," *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 87, no. 6, pp. 2025–35, Aug. 2010.
- [141] "P-Influence of PCK expression on succinic acid.pdf." .