



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Uso de proteínas con actividad de chaperona para optimizar la síntesis de productos de interés biotecnológico en *Escherichia coli*

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires
en el área de Química Biológica

Lic. Daniela Soledad Alvarez

Directora de tesis: Dra. María Julia Pettinari

Consejera de Estudios: Dra. Sandra Ruzal

Lugar de trabajo: Laboratorio de Genética y Fisiología de Bacterias de Interés Biotecnológico, IQIBICEN-CONICET, Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA.

Buenos Aires, 2022

Parte de los resultados que se describen en esta Tesis han sido publicados en los siguientes artículos científicos:

Mezzina MP*, **Alvarez DS***, Egoburo DE, Díaz Peña R, Nickel PI, Pettinari MJ (2017). A new player in the biorefineries field: phasin PhaP enhances tolerance to solvents and boosts ethanol and 1,3-propanediol synthesis in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(14), e00662-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00662-17>

*Las dos autoras marcadas con * comparten la primera autoría de este trabajo.*

Mezzina MP, **Alvarez DS**, Pettinari MJ. “PHA granule-associated proteins and their diverse functions” in Koller, M. (Ed.). (2021). *The Handbook of Polyhydroxyalkanoates*. Boca Raton: CRC Press. doi: 10.1201/9780429296611.

Agradecimientos

Comienzo estas páginas dando gracias a la Universidad pública y gratuita, que me permitió estar hoy escribiendo estas palabras. A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, mi casa de estudios y mi segundo hogar. A CONICET por haber hecho posible mi dedicación exclusiva a este proyecto. Al Departamento de Química Biológica, al IQIBICEN y a todos sus integrantes, que me brindaron la infraestructura y el apoyo necesario para realizar esta tesis.

A la Dra. Julia Pettinari, mi directora, a quien le debo gran parte de mi formación académica y profesional. Me acuerdo como si fuera ayer aquellos momentos cuando todavía era estudiante y trabaja en la oficina, pero quería probar qué significaba ser científica. Y parece que pasó una vida desde aquel diciembre de 2014 en el que vi tu búsqueda de estudiantes y te escribí. Gracias Juli por darme un lugar en tu laboratorio y desde entonces enseñarme, aconsejarme, valorar mis opiniones y ayudarme a superar dificultades. Gracias por todo el apoyo y la confianza brindados durante estos años y por tus palabras de calma en mis momentos de desesperación y de dudas. Sos una gran persona y estoy muy agradecida de tener el privilegio de trabajar en tu laboratorio.

A la Dra. Mariela Mezzina, mi codirectora durante los primeros años de esta tesis. Gracias Marie por todas tus enseñanzas, por tu ayuda, tus ideas y tu increíble generosidad. Como te dije hace unos días, esta tesis tiene pedacitos tuyos por todos lados. Fue un placer para mí trabajar con vos y poder aprender de vos. Te admiro mucho y, aunque ahora nos separen muchos kilómetros, espero que pronto nos volvamos a juntar.

A mis compañeros del labo, los que están y los que ya se fueron. Gracias por hacer de este trabajo un lugar al que quiero ir todos los días. Gracias por las risas, los llantos, las alegrías, las quejas. Gracias por las incontables meriendas y el apoyo ante los momentos de frustración. A Rochi, la mejor amiga del mundo mundial. Amo trabajar con vos y que tengamos los mismos problemitas, jaja. Gracias por los chequeos de puertas, del gas, del apagado de los equipos, gracias por enseñarme y responder mis dudas con el GC y el HPLC. Gracias por el apoyo incondicional, por tus palabras de aliento, por tu alegría y tu generosidad. Soy muy feliz de poder llamarte amiga y saber que, sin importar donde estemos, siempre vamos a poder contar una con la otra. Te quiero y te admiro con todo el corazón. A Diego, la persona que más veces tuve que despedir en este trabajo, jaja. Gracias por ser un amigo incondicional, por la infinidad de charlas, por tu apoyo y tus enseñanzas. Todavía no volví al labo y ya te extraño. Me encantó trabajar con vos en este último tiempo. Fueron meses complicados y tu ayuda fue fundamental. Gracias por quedarte conmigo hasta las 10 pm esperando que el GC corra las muestras para poder cargar más, gracias por medirme en el HPLC las cosas que me faltaban, gracias por tus ideas y tus correcciones del manuscrito. Te quiero mucho y te prometo ver los Simpsons en

algún momento de la vida. Gon, sos un ser entrañable y se nota mucho tu ausencia en el labo. Gracias por el legado del estireno y por tus playlists locas, no es lo mismo trabajar sin que el opening de Inuyasha te sorprenda pipeteando. A los que ya no están: Esme, Tucu, José, Manu. Los extraño horrores y extraño mucho esas épocas de old QB, los almuerzos en las mesitas, las meriendas en el viejo comedor, los mates, las charlas filosóficas y las risas. Estoy segura que todos la están rompiendo en sus nuevos trabajos, y les agradezco mucho haber formado parte de esta etapa de mi vida. Sin duda pensar en el doctorado es pensar en ustedes. A los nuevos, y no tan nuevos, compañeros: Ruby, Belu, Carmi, Stefa, Mateo, Lu y Flor. A muchos de ustedes los conocí después de la cuarentena, y con otros ya venimos hace años trabajando. Gracias por su compañerismo, por entender mi desesperación de los últimos meses y darme prioridad con los equipos. Gracias por los mates (individuales), las meriendas, las charlas, los libros y los viernes de descargas. Son muy bellas personas y les agradezco mucho el apoyo y la alegría que me brindaron en los últimos meses.

A Nancy, Lau, Pau y Bea. Gracias a todas por abrirme las puertas de sus labos, por los consejos, las enseñanzas, tanto como docentes como en la vida académica. Las admiro mucho y sin su ayuda hubiese sido imposible llegar hasta acá. A Maria Elisa, quién también forma parte del labo, gracias por tu confianza y por ser un ejemplo a seguir, tanto profesional como personalmente. Realmente es un gusto trabajar con vos.

A Bedelía, en especial a Eva y Pato, sin las cuales no existiría QB ni esta tesis. Gracias por todos los medios y material autoclavado a último momento, por sacarnos las papas del fuego tantísimas veces. Gracias por hacerme un lugar en compras y por aguantarme en estos meses de escritura. Es un placer poder aprender de ustedes cada día.

A mis amigas de la facu, Tati, Juli, Naza y Ceci, que siempre creyeron en mí y me dieron ánimos en los momentos más difíciles. Gracias a todos por los mates, meriendas, birras, viajes y noches compartidas.

A mis amigos de siempre, Carla, Nacho, Guido y Mele, que aguantan mi locura y mi cuelgue, y me acompañan en cada etapa de la vida. Gracias por su apoyo estos últimos meses de escritura, donde todo parecía negro, pero supieron sacarme una sonrisa.

A mis primas Bren, Barbi, Ceci y Flor, por la paciencia infinita y el aguante durante todo este tiempo. Gracias por estar siempre, son una parte muy importante de mi vida y las amo con todo el corazón.

A Rochi, mi hermana, mi amiga, la persona más incondicional. Gracias por todo el apoyo durante todos estos años, especialmente en los últimos meses. Gracias por la comidita, los mates, el preguntar si necesitaba algo, el decirme que ya es momento de descansar. Sin tu ayuda no hubiera podido sobrevivir y lo sabés. Sos la mejor hermana que se podría pedir y estoy muy orgullosa de la relación

que tenemos. Gracias por permitirme formar parte de tu vida y ser testigo de la increíble persona que sos. Te amo para siempre y no me va a alcanzar la vida para agradecerte todo lo que haces por mí.

A mi mamá y mi papá, gracias por acompañarme en todas mis aventuras y por confiar en mí. Gracias por bancarme estos meses de locura, por enseñarme, aconsejarme, cuidarme, estar pendiente siempre de mí y de Ro. Gracias infinitas por su esfuerzo, sacrificio, amor y generosidad. Son mi mayor inspiración y mi mayor tesoro. Gracias por hacer de mí la persona que soy hoy y por definir día a día la persona en la que me quiero convertir. Esta tesis, como todos los logros de mi vida están dedicados a ustedes. Los amo con toda mi alma.

Índice

Abreviaturas.....	7
Resumen	9
Abstract.....	10
Introducción.....	11
Primera parte: La respuesta a estrés en <i>E. coli</i>	12
Respuesta general a estrés	12
Estrés térmico	12
Estrés osmótico.....	14
Segunda parte: Compuestos de interés biotecnológico.....	16
Proteínas recombinantes.....	16
Biorrefinerías.....	18
Solventes.....	19
Estireno	24
Tercera parte: Phasinas	28
Polihidroxicanoatos y GAPs.....	28
Funciones de las phasinas.....	30
Familias de phasinas	32
Estructura de las phasinas	34
Aplicaciones de las phasinas.....	34
Cuarta parte: La phasina PhaP de <i>Azotobacter</i> sp. FA8.....	35
Caracterización de los genes de síntesis de PHB en <i>Azotobacter</i> sp. FA8.....	35
Efecto de PhaP de <i>Azotobacter</i> sp. FA8 en <i>E. coli</i> recombinante.....	36
Caracterización de la estructura de PhaP de <i>Azotobacter</i> sp. FA8.....	41
Determinación de la actividad chaperona de PhaP de <i>Azotobacter</i> sp. FA8.....	41
Hipótesis y Objetivos.....	44
Materiales y Métodos.....	46
Microorganismos, plásmidos y condiciones de cultivo	47
Cepas bacterianas y plásmidos utilizados.....	47
Medios de cultivo.....	48
Antibióticos e inductores	49
Ensayos de tolerancia	49
Ensayos de producción	51
Técnicas de biología molecular.....	54
Construcciones de plásmidos.....	54

Extracción de DNA plasmídico	55
Reacciones de restricción y ligado	56
Purificación y cuantificación de DNA	56
Electroforesis en geles de agarosa.....	56
Preparación de células competentes.....	57
Transformación de células competentes.....	57
Técnicas para el estudio de proteínas	58
Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	58
Western blot	59
Métodos analíticos.....	60
Determinación de etanol, 1,3-PDO y glicerol.....	60
Determinación de glucosa	61
Determinación de estireno	61
Determinación de fenilalanina.....	62
Determinación de ácidos orgánicos.....	62
Análisis estadísticos	63
Resultados.....	64
Capítulo I: Protección brindada por PhaP ante diferentes tipos de estrés.....	65
Efecto de PhaP ante el estrés osmótico.....	66
Efecto de PhaP ante el estrés por solventes.....	70
Análisis de la tolerancia en la cepa mutante <i>groEL</i>	75
Discusión	82
Capítulo II: Síntesis de productos de interés biotecnológico.....	89
Efecto de PhaP en la producción de proteínas heterólogas	90
Efecto de PhaP en la producción de etanol	92
Efecto de PhaP en la producción de 1,3-PDO	95
Efecto de PhaP en la producción de estireno	98
Discusión	107
Conclusiones y Perspectivas	118
Conclusiones	119
Perspectivas	121
Bibliografía	124

Abreviaturas

% (m/v)	% masa en volumen
% (v/v)	% volumen en volumen
°C	Grados Celsius
1,3-PDO	1,3-propanodiol
β-gal	β-galactosidasa
μ_{max}	Velocidad específica (máxima) de crecimiento
μg	Microgramos
μl	Microlitros
μm	Micrones
Adh	Alcohol-acetaldehído deshidrogenasa
Amp/Amp^r	Ampicilina/resistencia a ampicilina
ATP	Adenosina trifosfato
BEHP	Ftalato de bis(2-etilhexilo) (<i>bis(2-ethylhexyl)phthalate</i>)
BSA	Albúmina cristalina de suero bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
ButOH	Butanol
CHPA	Ácido 3-cloro-4-hidroxifenilacético (<i>3-chloro-4-hydroxyphenyl acetic acid</i>)
cm	Centímetros
Cm/Cm^r	Cloranfenicol/resistencia a cloranfenicol
CS	Citrato Sintasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO/DO₆₀₀	Densidad óptica/densidad óptica medida a λ = 600 nm
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EtOH	Etanol
FID	Detector de ionización de llama (<i>Flame ionization detector</i>)
g	Gramos
GC	Cromatografía gaseosa (<i>Gas Chromatography</i>)
GDHt	Glicerol deshidratasa
g/l	gramos/litro
h	Horas
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HSPs	Proteínas de choque térmico (<i>Heat Shock Proteins</i>)
IB	Cuerpos de inclusión (<i>Inclusion Bodies</i>)
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
Km/Km^r	Kanamicina/resistencia a kanamicina
l	Litros
L-Phe	L-fenilalanina
log P	Logaritmo del coeficiente de partición en una mezcla definida de octanol y agua
m	Metros
M	Molar
mA	Miliampere

min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
NADH	Nicotidamida-Adenina-Dinucleótido reducida
NADPH	Nicotidamida-Adenina-Dinucleótido-fosfato reducida
ng	Nanogramos
ON	Toda la noche (<i>Overnight</i>)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PD	Dominio insoluble de la proteína TolR de <i>Azoarcus</i> sp. CIB
PDOR	1,3-propanodiol oxidoreductasa
GAPs	Proteínas asociadas a gránulo
PHA	Polihidroxialcanoatos
PhaA	β -cetotiolasa
PhaB	Acetoacetyl-CoA reductasa
PhaC	PHA sintasa, también llamada PHA polimerasa
PHAmcl	PHA de cadena media
PhaP	Phasina PhaP de <i>Azotobacter</i> sp. FA8
PHAscl	PHA de cadena corta
PhaZ	PHA depolimerasa
PHB	Poli(3-hidroxi-butirato)
PVDF	Fluoruro de polivinilideno (Polyvinylidene fluoride)
qRT-PCR	PCR en transcripción reversa cuantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT(%)	Porcentaje de tolerancia relativa
s	Coeficiente de <i>fitness</i> relativo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliácridamida con SDS
seg	Segundos
TBS	Buffer Tris Salino (<i>Tris Buffered Saline</i>)
tCA	ácido trans-cinámico (<i>trans-cinnamic acid</i>)
TEMED	Tetrametiletilendiamina
T_m	Temperatura de <i>melting</i> o fusión
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-aminometano
UV	Ultravioleta
Vc:Vf	relación volumen de cultivo:volumen del frasco

Resumen

Las phasinas son proteínas asociadas a gránulos intracelulares de polihidroxialcanoatos (PHA), polímeros biodegradables acumulados por muchas bacterias como material de reserva. Además de su función estructural en la cubierta de los gránulos, se ha demostrado que las phasinas tienen funciones regulatorias, y se han desarrollado numerosas aplicaciones biotecnológicas utilizándolas en fusiones proteicas.

En nuestro laboratorio hemos estudiado la phasina PhaP de *Azotobacter* sp. FA8, un productor natural de poli(3-hidroxiбутirato) (PHB), el PHA más conocido. En estudios previos en cepas de *E. coli* recombinante productoras de PHB, hemos observado que la sobreexpresión de *phaP* permite un mayor crecimiento y una mayor acumulación de polímero, lo que sugiere que PhaP ejerce un efecto promotor del crecimiento. Se observó también que la expresión de *phaP* tiene un efecto protector inesperado en cepas de *E. coli* no productoras de PHB, tanto en condiciones normales como en condiciones de estrés, permitiendo un mayor crecimiento y mayor resistencia a estrés oxidativo y estrés térmico. En vista de estos resultados, se caracterizó a esta phasina estructural y funcionalmente, demostrando que actúa como chaperona *in vitro*, ayudando al plegado de la proteína modelo citrato sintasa, y también *in vivo*, siendo capaz de reducir el número y tamaño de cuerpos de inclusión formados por una proteína recombinante en *E. coli*.

El objetivo de este trabajo de tesis fue profundizar el análisis de los efectos beneficiosos de la phasina PhaP de *Azotobacter* sp. FA8 y evaluar su uso para el mejoramiento de cepas de interés biotecnológico. Para ello, se analizó su efecto sobre la tolerancia a diferentes factores de estrés, con especial hincapié en condiciones de estrés que podrían encontrarse en procesos de síntesis de diferentes productos. Se observó que la expresión heteróloga de *phaP* en *E. coli* aumenta la tolerancia a biocombustibles como etanol y butanol, y a sustancias químicas como el 1,3- propanodiol. También se observó que la expresión de *phaP* produce un incremento en la tolerancia de las células al estrés osmótico iónico producido por NaCl, y al no iónico producido por sacarosa. Estos resultados demuestran que la phasina es capaz de proteger a las células del estrés provocado por solventes y condiciones de estrés osmótico, apoyando aún más el rol protector general ejercido por PhaP en *E. coli*.

En función de estos resultados, se evaluó la capacidad de esta phasina de mejorar la obtención de bioproductos en *E. coli*, particularmente solventes y precursores químicos de interés industrial como etanol, 1,3-propanodiol y estireno. Para ello, se construyeron cepas recombinantes productoras de los distintos compuestos. En todos los casos, en las cepas que sobreexpresan *phaP* se observó un aumento del crecimiento y del título del producto final, en comparación con la cepa control. Estos resultados demuestran que la expresión de *phaP* puede mejorar la síntesis de bioproductos de interés industrial en *E. coli*, y abren el camino para el uso de esta proteína en el desarrollo de nuevas aplicaciones biotecnológicas.

Palabras clave: phasina, etanol, 1,3-propanodiol, estireno

Abstract

Use of proteins with chaperone activity to optimize the synthesis of biotechnologically relevant compounds in *Escherichia coli*

Phasins are proteins associated with intracellular granules of polyhydroxyalkanoates (PHA), biodegradable polymers accumulated by many bacteria as reserve material. In addition to their structural function in the granule coat, phasins have been shown to have regulatory functions, and numerous biotechnological applications have been developed using them in protein fusions.

One of the main working lines in our laboratory is focused on the study of phasin PhaP from *Azotobacter* sp. FA8, a natural producer of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), the best known PHA. Previous studies performed on PHB-producing recombinant *E. coli* strains have shown that overexpression of *phaP* causes increased growth and greater polymer accumulation, suggesting that PhaP exerts a growth-promoting effect. It was also observed that *phaP* expression has an unexpected protective effect on non-PHB-producing *E. coli* strains under both normal and stress conditions, allowing for increased growth and greater resistance to oxidative and heat stress. In view of these results, this phasin was structurally and functionally characterized. The results showed that PhaP acts as a chaperone *in vitro*, assisting the folding of the model protein citrate synthase, and also *in vivo*, being able to reduce the number and size of inclusion bodies formed by a recombinant protein in *E. coli*.

The aim of this work was to further analyze the beneficial effects of phasin PhaP from *Azotobacter* sp. FA8 and to evaluate its use in strain improvement. For this purpose, we analyzed the effect of PhaP on tolerance to different stress factors, with special emphasis on stress conditions that could be encountered in bioprocesses. It was observed that heterologous expression of *phaP* in *E. coli* increases tolerance to biofuels such as ethanol and butanol, and to added-value chemicals such as 1,3-propanediol. It was also observed that *phaP* expression results in increased tolerance to ionic osmotic stress produced by NaCl and non-ionic osmotic stress produced by sucrose. These results demonstrate that PhaP is able to protect cells from solvent stress and osmotic stress conditions, further supporting the general protective role exerted by this phasin in *E. coli*.

Based on these results, we evaluated the capacity of PhaP to improve the synthesis of bioproducts in *E. coli*, particularly solvents and added-value chemicals. For this purpose, we constructed recombinant strains producing ethanol, 1,3-propanediol and styrene. In all cases, the strains that overexpressed *phaP* showed increased growth and higher titers of the final product, compared to the control strain. These results show that *phaP* expression is able to improve the synthesis of bioproducts in *E. coli*, opening the road for its use in the development of new biotechnological applications.

Key terms: phasin, ethanol, 1,3-propanediol, styrene

Introducción

Primera parte: La respuesta a estrés en *E. coli*

Respuesta general a estrés

Las bacterias están constantemente sometidas a cambios en su ambiente, que pueden ir desde la escasez de nutrientes a variaciones en la temperatura, osmolaridad o pH. Para adaptarse o resistir a estos cambios en las condiciones de crecimiento han desarrollado varios tipos de respuesta. Por un lado, existen vías de respuesta específicas, que involucran a un regulador particular y a un conjunto selecto de genes, necesarios para reparar el daño y volver a las condiciones de homeostasis. Por otro lado, las bacterias también pueden desplegar respuestas más generales que involucran cambios globales en el metabolismo y la expresión génica, y proveen protección ante diversos tipos de estrés. Tal es el caso de la respuesta general a estrés dependiente del factor sigma alternativo RpoS en *Escherichia coli* (Battesti et al., 2011).

La concentración intracelular de RpoS aumenta marcadamente durante el ingreso en la fase estacionaria y/o en otras condiciones de estrés, tales como estrés ácido, inanición, alta osmolaridad y alta o baja temperatura. Además de regular a los genes directamente implicados en hacer frente a los efectos perjudiciales de cada estrés, RpoS también afecta a los genes correspondientes a 3 grandes grupos funcionales de proteínas: (i) factores regulatorios, (ii) sistemas de transporte u otras proteínas intrínsecas de membrana, y (iii) enzimas metabólicas, muchas de las cuales pertenecen al metabolismo central de energía. Cuando las células entran en fase estacionaria o se encuentran sometidas a estrés, el tráfico general de la membrana celular se altera significativamente. El control de RpoS contribuye a la captación de nutrientes en condiciones de escasez, así como a una mayor resistencia contra varios compuestos tóxicos, mediante la inducción de bombas de eflujo. Además, RpoS influye sobre el metabolismo energético, favoreciendo la transición del metabolismo de crecimiento al de mantenimiento. La cantidad de genes que RpoS controla es muy grande, dado que se calcula que regula directa o indirectamente el 10% del genoma de *E. coli* (H. Weber et al., 2005).

Estrés térmico

La respuesta a estrés térmico permite a las células adaptarse a cambios ambientales y metabólicos, y sobrevivir ante condiciones de estrés. Esta respuesta es mediada por el factor sigma alternativo σ_{32} , codificado por el gen *rpoH*, y es inducida por varios tipos de estrés, incluyendo factores físico-químicos como la temperatura, compuestos perjudiciales para la célula y procesos metabólicos complejos (Arsène et al., 2000).

Un aumento de la temperatura desencadena un aumento transitorio en la concentración de RpoH. Esto produce una inducción rápida de la síntesis de más de 20 proteínas, conocidas en conjunto como proteínas de choque térmico o HSPs (por sus siglas en inglés: *heat shock proteins*). En estas condiciones, la síntesis de las HSPs aumenta hasta 15 veces y luego disminuye, hasta alcanzar un nuevo estado de equilibrio (Bukau, 1993; Georgopoulos & Welch, 1993). Estas proteínas codifican principalmente chaperonas moleculares cuya función es unirse a los polipéptidos no nativos que se generan durante la síntesis de proteínas o por desnaturalización térmica de proteínas existentes y estabilizarlos, modular las vías de plegado proteico para evitar el mal plegado o la agregación de proteínas, y promover su re-plegado y ensamblaje adecuado. Además, algunas HSPs son proteasas ATP-dependientes y cumplen un rol en la digestión y remoción de polipéptidos irreversiblemente dañados por el calor (Chung et al., 2006). Las HSPs más importantes en *E. coli* son los sistemas de chaperonas compuestos por DnaK-DnaJ-GrpE y GroEL-GroES, los cuales pueden llegar a representar hasta un 20% de las proteínas totales a 46°C (Arsène et al., 2000; Georgopoulos & Welch, 1993).

Si bien son denominadas proteínas de choque térmico, las HSPs son expresadas en todas las células bajo condiciones normales de crecimiento, y son esenciales para el crecimiento celular a todas las temperaturas. Esto se debe a que una parte de las proteínas celulares necesita de la asistencia de chaperonas para su plegado *de novo* o el mantenimiento de su conformación biológicamente activa en condiciones óptimas de crecimiento. Ante condiciones de estrés térmico, en cambio, el aumento en la expresión de las HSPs tiene como objetivo hacer frente al incremento de proteínas mal plegadas, propensas a la agregación. La defensa celular ante esta situación de estrés comprende varias estrategias. Por un lado, las chaperonas de soporte, como IbpA e IbpB, se unen a proteínas mal plegadas y evitan su agregación, estabilizándolas para luego transferirlas a sistemas de chaperonas ATP-dependientes. Por otro lado, las chaperonas de plegado, como los sistemas DnaK y GroEL, interactúan con proteínas desplegadas y median su re-plegado en un proceso dependiente de ATP. Además, las proteínas agregadas pueden rescatarse por desagregación y posterior replegado mediante el sistema DnaK y ClpB, y las proteínas mal plegadas pueden eliminarse mediante proteólisis dependiente de ClpXP y Lon (Figura 1) (Schlieker et al., 2002; Veinger et al., 1998).

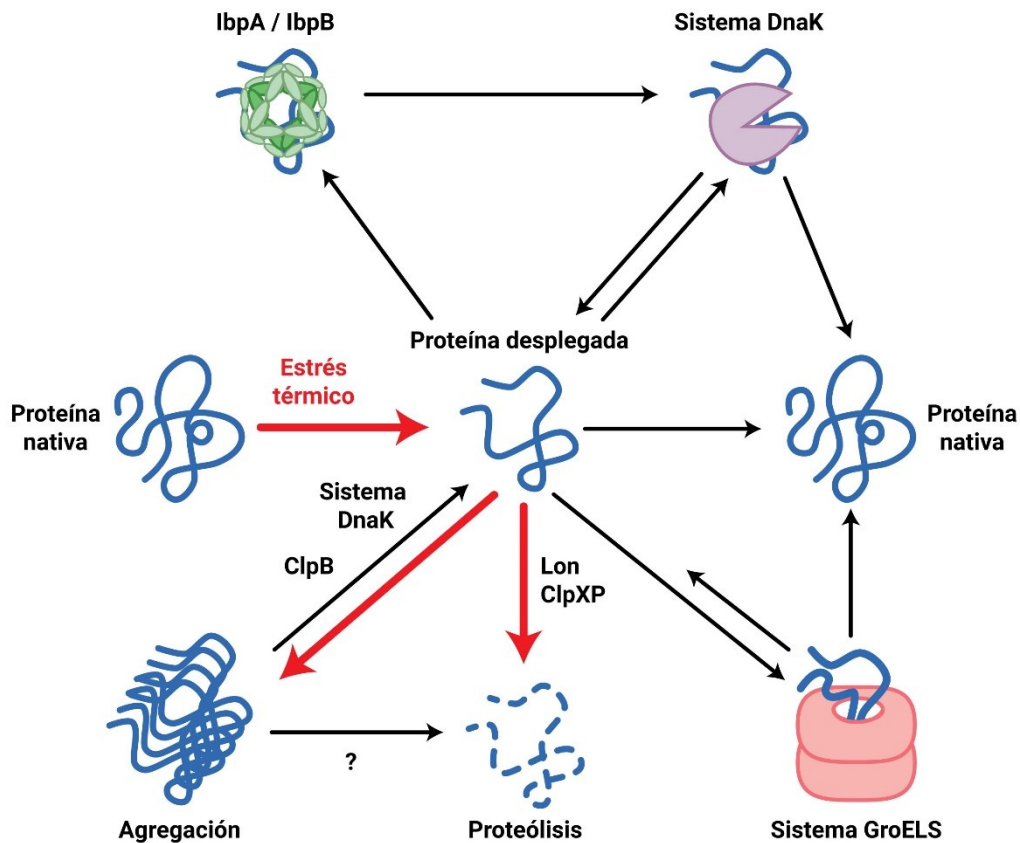


Figura 1. Acción de las HSPs durante el estrés térmico. Bajo condiciones de estrés térmico se produce un aumento de la desnaturalización y la agregación de proteínas (flechas rojas). Por un lado, las chaperonas IbpA e IbpB se unen a las proteínas mal plegadas, las estabilizan, y luego las transfieren al sistema DnaK. Por otro lado, los sistemas de chaperonas ATP-dependientes como el sistema DnaK y el sistema GroELS, interactúan con proteínas desplegadas y median su re-plegado. Las especies agregadas que escaparon de la maquinaria de protección celular pueden ser rescatadas por el sistema de ClpB/DnaK. Las especies no nativas que no lograron plegarse correctamente también pueden continuar por la vía de la proteólisis, mediada por las proteasas ClpXP y Lon. Adaptado de Schlieker et al., 2002.

Estrés osmótico

La naturaleza semipermeable de la membrana citoplasmática hace que las células sean vulnerables a las variaciones en la osmolaridad del ambiente, uno de los factores de estrés que los microorganismos encuentran más frecuentemente en sus hábitats (Bremer & Krämer, 2019). El aumento en la osmolaridad externa causa la pérdida de agua, provocando un encogimiento de las células y un freno en la división celular. Para responder ante estos efectos, *E. coli* despliega un conjunto de mecanismos que le permiten evitar la deshidratación. Esto incluye la absorción de iones potasio, la acumulación de otros solutos osmoprotectores a través de la biosíntesis *de novo* (por ejemplo, trehalosa) o su absorción del medio ambiente (por ejemplo, glicina betaína) y un mayor control del flujo a través de

la membrana plasmática (Record et al., 1998). Para ello, las bacterias expresan un amplio grupo de genes cuya transcripción depende de RpoS (Hengge-Aronis, 1996; A. Weber et al., 2006).

En un estudio de proteómica en *E. coli* sometida a un aumento de la osmolaridad externa realizado por Weber y colaboradores, se encontró que, entre las proteínas cuya producción se había incrementado, además de aquellas con una función osmoadaptativa específica (por ejemplo, transportadores), había una gran proporción de proteínas con un rol general en la protección de la célula ante diversas condiciones de estrés, como por ejemplo proteínas implicadas en la respuesta a estrés oxidativo o la proteína de choque térmico Hsp31 (A. Weber et al., 2006). Además, existen numerosos trabajos en los que se observan fenómenos de protección cruzada, en los cuales la exposición de las células a un tipo de estrés condiciona su respuesta ante otros tipos de estrés, aparentemente no relacionados. Por ejemplo, se ha observado que desafiar a *Salmonella typhimurium* y *E. coli* con alta osmolaridad incrementa su resistencia a altas temperaturas (Hengge-Aronis et al., 1993) y estrés oxidativo (Fletcher & Csonka, 1998). Lo contrario se ha observado en *Bacillus subtilis*, en tanto un pretratamiento de estrés térmico leve brindó a estas bacterias mayor protección contra el estrés salino letal (Volker et al., 1992).

Con el objetivo de entender las bases genéticas de este fenómeno de regulación cruzada, Gunasekera y colaboradores realizaron análisis de transcriptómica en cepas de *E. coli* sometidas a estrés osmótico y térmico prolongados. Por un lado, los autores observaron que tanto el estrés osmótico como el estrés térmico, individualmente o en combinación, inducían genes del regulón de estrés oxidativo. Por otro lado, no encontraron genes con una función reconociblemente termoprotectora que fueran inducidos durante el estrés osmótico prolongado (Gunasekera et al., 2008). No obstante, lo contrario fue reportado en otros trabajos realizados en *E. coli* (Bianchi & Baneyx, 1999; Meury & Kohiyama, 1991), bacterias lácticas (Fukuda et al., 2002; Kilstrup et al., 1997), y bacterias que viven en el suelo (Domínguez-Ferreras et al., 2006), en los cuales se observó una inducción de genes de HSPs bajo condiciones de estrés osmótico. Por otra parte, también ha sido propuesto que el aumento de la termotolerancia en bacterias sometidas a estrés osmótico se debe a que los osmolitos acumulados en las células funcionan como “chaperonas químicas”, aumentando la estabilidad de proteínas en estado nativo y asistiendo al re-plegado de polipéptidos desnaturalizados (Diamant et al., 2001). Como se puede ver, estos fenómenos de regulación cruzada son complejos y la literatura no ha llegado a un consenso acerca de sus bases moleculares.

Segunda parte: Compuestos de interés biotecnológico

Proteínas recombinantes

Importancia biotecnológica

Las proteínas y los péptidos son el pilar del sector biofarmacéutico, con cientos de productos farmacéuticos proteicos actualmente en el mercado y más que se encuentran en ensayos preclínicos y clínicos. La bacteria más utilizada para la producción de proteínas recombinantes es *E. coli* debido a su rápido crecimiento, fácil manipulación y rentabilidad. Además, está bien caracterizada fisiológica y metabólicamente, su genoma está secuenciado, y existe una gran variedad de herramientas de biología molecular diseñadas para la síntesis de proteínas recombinantes usándola como hospedador de clonado (Overton, 2014; Rosano et al., 2019).

Estrés inducido por la síntesis de proteínas recombinantes

La expresión de productos recombinantes puede desafiar a las células con diferentes niveles de toxicidad y carga metabólica que, en última instancia, pueden conducir a la disminución del rendimiento de biomasa, la productividad y la viabilidad celular (Carneiro et al., 2013).

La presencia de plásmidos, y aún más la expresión de los genes codificados en ellos, interfieren con la fisiología de la célula hospedadora, forzando la reorientación de las actividades metabólicas y la adaptación de la regulación génica. Entre los cambios más notables en la fisiología de los productores recombinantes se han reportado la disminución de la velocidad específica de crecimiento, modificaciones en el catabolismo como resultado del aumento de la demanda energética, y la disminución en la concentración de proteínas relacionadas con la síntesis proteica, tales como factores de elongación o subunidades proteicas ribosomales (Hoffmann & Rinas, 2004).

La síntesis de proteínas heterólogas en *E. coli* puede disparar distintos tipos de respuestas a estrés, entre ellos la respuesta a estrés térmico, la cual se induce como resultado de un aumento en la concentración de proteínas mal plegadas en la célula. Son varios los trabajos que han reportado un aumento en la transcripción, síntesis y acumulación de varias HSPs, tales como DnaK, GroELS y ClpB, en respuesta a la producción de proteínas heterólogas (H. Dong et al., 1995; Gill et al., 2000; Hoffmann & Rinas, 2000; Jürgen et al., 2000; Rinas, 1996). Además, estos sistemas de expresión frecuentemente dan como resultado una acumulación de proteínas recombinantes en forma de cuerpos de inclusión (*Inclusion Bodies* o IB, por sus siglas en inglés). Los IB son agregados intracelulares formados principalmente por proteínas mal plegadas resistentes a proteasas. Estas estructuras son dinámicas y

ocurren por un desbalance entre la agregación y la liberación de proteínas, principalmente en condiciones de alta expresión de genes recombinantes (Carrió & Villaverde, 2001).

Otras respuestas involucradas en la producción de material recombinante son la respuesta astringente, inducida por limitaciones en la concentración de aminoácidos intracelulares, y la respuesta general de estrés mediada por RpoS. Ambos mecanismos conducen a una disminución del crecimiento y la producción de proteínas recombinantes (Hoffmann & Rinas, 2004; Overton, 2014).

Estrategias para mejorar la producción de proteínas recombinantes

Varios grupos han trabajado en el desarrollo de estrategias para superar las limitaciones en la producción impuestas por la carga metabólica y el estrés provocado por la síntesis de proteínas recombinantes. En general, los vectores de expresión son la herramienta principal para controlar la producción proteica. Estos vectores a menudo se basan en plásmidos naturales que se pueden modificar fácilmente para ensamblar partes de diferentes fuentes genéticas, como elementos de control (promotores, terminadores y secuencias de iniciación de la transcripción/traducción) y elementos de propagación (marcadores de selección, orígenes de replicación). La ingeniería genética del hospedador con el objetivo de mejorar la síntesis recombinante aliviando la carga metabólica del proceso también es una estrategia muy difundida. Por último, otro método utilizado para optimizar la producción consiste en modificar las condiciones de crecimiento, tales como la temperatura, inducción, y medios de cultivo, para minimizar el estrés durante la producción recombinante. Estas modificaciones buscan generar los polipéptidos recombinantes más lentamente, de modo que puedan plegarse a una velocidad acorde con la capacidad del mecanismo de plegamiento bacteriano evitando sobrecargar a las chaperonas. Por último, también ha habido un gran interés en mejorar el plegado de proteínas recombinantes mediante la manipulación de la respuesta al choque térmico (Carneiro et al., 2013; Overton, 2014; Rosano et al., 2019).

Varios trabajos han reportado que las chaperonas reducen la agregación y se utilizan para aumentar la producción de la forma activa de las proteínas *in vivo*. Por ejemplo, la sobreexpresión de las chaperonas *dnaK*, *dnaJ*, *grpE*, y *groELS* junto con proteínas recombinantes ha permitido la producción exitosa de una serie de proteínas que de otro modo se acumularían principalmente en IB, como el fragmento de anticuerpo monocatenario scFv, las tirosina quinasas humanas Csk, Fyn y Lck, un alérgeno de polen de cedro, la lisozima humana, entre muchas otras (Kolaj et al., 2009). También se ha aplicado esta estrategia utilizando *lbpA/B* en *E. coli* y se observó en cepas sobreproductoras de estas HSPs una mayor acumulación de proteínas recombinantes gracias a que *lbpA/B* evitan que sean degradadas por proteasas citoplasmáticas (Han et al., 2004). No obstante, a pesar de su éxito

comprobado como moduladores del plegado en los procesos de producción de un gran número de proteínas, las chaperonas bacterianas (principalmente DnaK y GroEL y sus cofactores asociados) también han mostrado efectos secundarios no deseados tales como bajos rendimientos, inhibición del crecimiento y promoción de la proteólisis de las proteínas recombinantes (Martínez-Alonso et al., 2010). Estos resultados demuestran que ninguna de las chaperonas debe ser considerada capaz de plegar correctamente cualquier proteína, dado que algunas chaperonas funcionan bien para un sustrato, pero no para otros. Esto depende de la afinidad relativa entre la chaperona y los intermediarios de plegado del sustrato, así como también de la cinética de agregado. Estos parámetros son difíciles de predecir, por lo que el uso de chaperonas en aplicaciones biotecnológicas depende de pruebas empíricas (Mogk et al., 2002).

Biorrefinerías

Si bien la humanidad ha utilizado petróleo por cientos de años, desde mediados del siglo XX el número y variedad de aplicaciones para este producto aumentaron marcadamente, de forma tal que hoy en día encontramos derivados de este sustrato no renovable en casi todos los aspectos de la vida moderna (Tambo, 2006). Usamos derivados del petróleo como fuente principal de energía y también como punto de partida para la síntesis de precursores químicos que son luego convertidos en una gran variedad de compuestos y materiales (Jang et al., 2012). En los últimos años, el hecho de que el petróleo es un recurso finito y no renovable, así como un aumento en la conciencia global por el impacto de su consumo, dieron pie al desarrollo de alternativas sustentables y amigables con el medio ambiente, tales como el uso de microorganismos para la producción de biocombustibles y precursores químicos a partir de sustratos renovables (Cho et al., 2015; Koutinas et al., 2014; Navarrete et al., 2020). De manera análoga al término “refinería de petróleo”, este tipo de estrategias biotecnológicas acuñaron el concepto de “biorrefinería”, en tanto se utiliza biomasa (en lugar de petróleo) para obtener diferentes productos a través de procesos biológicos (Cherubini, 2010; Scholey et al., 2016).

No obstante, para que las biorrefinerías puedan competir con los procesos petroquímicos existentes, se requiere de biocatalizadores que puedan hacer uso rápido y eficiente del sustrato, y del uso de sustratos renovables, económicos, que no compitan con la industria alimentaria. Dentro de este grupo de sustratos está la biomasa lignocelulósica y diversos residuos agroindustriales, como por ejemplo el glicerol. En cuanto a los biocatalizadores, se buscan microorganismos capaces de crecer a partir de los sustratos antes indicados, especialmente que puedan utilizar hexosas y pentosas, de modo que todo el azúcar que compone la biomasa lignocelulósica se pueda convertir en el producto deseado. Además, deben ser organismos robustos, con facilidad para la manipulación genética, resistentes a los

inhibidores producidos durante el proceso de pretratamiento de biomasa, y con tolerancia a altas concentraciones de sustrato y producto para obtener altos títulos del compuesto objetivo (Jarboe et al., 2010).

Solventes

Etanol

Actualmente, el etanol es biológicamente producido a gran escala en varios países, siendo los mayores productores Estados Unidos, Brasil y China. Mundialmente, el 60% del bioetanol es producido a partir de maíz, el 25% a partir de caña de azúcar y el resto a partir de melazas, trigo, y otros granos (OECD/Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2021). El bioetanol es mayormente utilizado como biocombustible y como precursor químico para la producción de etileno y etilenglicol por catálisis química (Jang et al., 2012).

Históricamente, *Saccharomyces cerevisiae* ha sido utilizado como el principal biocatalizador para la producción comercial de etanol. Esto se debe a que este microorganismo ha demostrado una gran robustez en procesos industriales, ya que es capaz de tolerar amplios rangos de pH y altas concentraciones de etanol (Tesfaw & Assefa, 2014). Además, se conocen sus características fisiológicas y genéticas, y es considerado un microorganismo seguro. Entre las bacterias, la más utilizada es *Zymomonas mobilis*, un productor natural que puede utilizar glucosa, sacarosa y fructosa como fuentes de carbono (Aditiya et al., 2016).

Si bien *S. cerevisiae* y *Z. mobilis* son buenos candidatos para la producción de etanol, ambos organismos carecen de la capacidad nativa de utilizar pentosas, el componente mayoritario de la fracción de hemicelulosa de la biomasa que se utiliza como sustrato. En contraste, *E. coli* puede utilizar todos los azúcares componentes de la biomasa lignocelulósica, y puede fermentar sustratos como el glicerol. Si bien *E. coli* produce etanol naturalmente a partir de acetil-CoA, en dos pasos catalizados por la enzima alcohol-acetaldehído deshidrogenasa (Adh) (Figura 2), lo hace en bajas concentraciones, siendo los ácidos orgánicos los que se acumulan como producto principal de la fermentación (Jarboe et al., 2010). Por esta razón, se han utilizado diferentes estrategias de ingeniería metabólica para desarrollar bacterias capaces de producir etanol como producto principal de fermentación a partir de hexosas y pentosas (Jarboe et al., 2007; Olson et al., 2015).

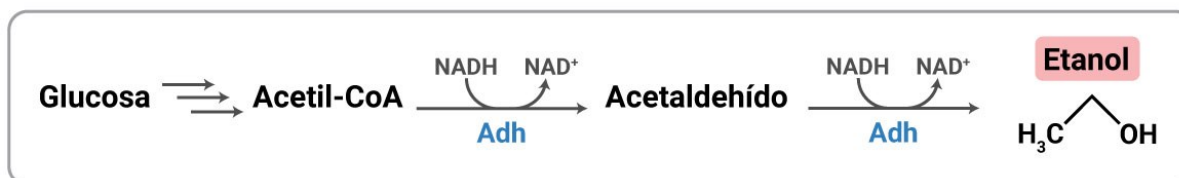


Figura 2. Camino metabólico para la síntesis de etanol. El producto final está resaltado con una caja rosa y se muestra su estructura química. La enzima involucrada en la reacción se muestra con letra azul. Flechas múltiples indican reacciones de varios pasos. Adh: Alcohol-aldehído deshidrogenasa.

Butanol

El butanol es ampliamente utilizado como solvente industrial y materia prima para la síntesis química. Además, ofrece varias ventajas como sustituto de la gasolina comparado con el etanol, dado que presenta menor presión de vapor y mayor densidad de energía, y es poco soluble en agua (Atsumi et al., 2008; Moon et al., 2016).

Si bien el butanol es mayormente producido por síntesis química a partir de derivados de la industria del petróleo, también puede ser eficientemente producido por bacterias del género *Clostridium* a través de la fermentación ABE (Acetona – Butanol – Etanol), siendo *Clostridium acetobutylicum* una de las productoras más utilizadas. No obstante, en los últimos años también se han puesto interés en el estudio de otros productores naturales, especialmente bacterias termófilas. Entre ellas, en nuestro laboratorio hemos estudiado al anaerobio *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* GSU5, que es capaz de producir butanol a partir de una amplia variedad de sustratos (Díaz Peña et al., 2020). Además de hexosas, pentosas, y los disacáridos sacarosa y celobiosa, *T. thermosaccharolyticum* GSU5 también produce butanol a partir de xilosa y residuo agrícola de caña, un tipo de biomasa lignocelulósica no tratada.

La producción de butanol mediante fermentaciones industriales ha cobrado cada vez más relevancia como potencial solución a la creciente preocupación por el cambio climático y los esfuerzos por reemplazar el consumo de combustibles fósiles por fuentes renovables. Sin embargo, la producción industrial de butanol todavía debe superar varios desafíos, como la competitividad de costos y el desarrollo de cepas con mejor rendimiento y una mayor tolerancia a butanol (Green, 2011; Schiel-Bengelsdorf et al., 2013).

1,3-propanodiol

El 1,3-propanodiol (1,3-PDO) es un precursor químico de alto valor agregado, utilizado en una gran variedad de aplicaciones. Por un lado, se usa para la producción de una gama diversa de polímeros,

incluyendo poliésteres y poliuretanos. Por otro lado, es utilizado directamente como componente anticongelante en barnices, adhesivos y resinas, y también tiene aplicaciones en la industria médica, cosmética y alimenticia (Sabra et al., 2015; Saxena et al., 2009).

Actualmente, el 1,3-PDO es sintetizado a partir de sustancias químicas derivadas del petróleo como el óxido de etileno o la acroleína, pero también puede ser obtenido mediante fermentación bacteriana, a partir de recursos renovables como glicerol o glucosa (Nakamura & Whited, 2003; Sabra et al., 2015; Saxena et al., 2009).

Entre los productores naturales, el 1,3-PDO sólo puede ser obtenido a partir de glicerol por bacterias de los géneros *Klebsiella*, *Clostridium*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Lactobacillus*. De entre ellos, quienes son considerados los mejores productores naturales son *Clostridium butyricum* y *Klebsiella pneumoniae*, dadas su mayor tolerancia al sustrato y su alto rendimiento y productividad (Saxena et al., 2009). Sin embargo, dado que *C. butyricum* es un anaerobio estricto y *K. pneumoniae* es un patógeno oportunista, se han realizado esfuerzos para desarrollar nuevas cepas capaces de producir 1,3-PDO industrialmente (Sabra et al., 2015). Tal es el caso de la firma DuPont and Genencor International Inc. que desarrolló una cepa de *E. coli* capaz de producir 1,3-PDO a partir de glucosa (Nakamura & Whited, 2003). En la actualidad, la empresa DuPont Tate and Lyle BioProducts produce este compuesto utilizando glucosa obtenida por hidrólisis de maíz, y lo comercializa bajo los nombres de Susterra y Zemea. Según los datos publicados en su página de internet (<https://duponttateandlyle.com/sustainability/>), el 1,3-PDO obtenido mediante este proceso produce 47% menos emisiones de gases de efecto invernadero y consume un 49% menos de energía no renovable cuando se compara con la obtención a partir de derivados del petróleo.

La reacción de síntesis de 1,3-PDO a partir de glicerol involucra dos pasos enzimáticos. El primer paso es la deshidratación del glicerol en 3-hidroxi propionaldehído, llevada a cabo por la enzima glicerol deshidratasa (GDHt), dependiente de vitamina B12. El segundo paso es la reducción del aldehído a 1,3-PDO en una reacción dependiente de NADH, catalizada por la enzima 1,3-propanodiol oxidoreductasa (PDOR) (Figura 3). Los múltiples genes que codifican estas y otras actividades funcionalmente relacionadas se encuentran físicamente organizados en un *cluster* conocido como regulón *dha*. En *K. pneumoniae*, la GDHt se encuentra codificada en *dhaB* mientras que PDOR está codificada en *dhaT* (Jiang et al., 2016; Nakamura & Whited, 2003).



Figura 3. Camino metabólico para la síntesis de 1,3-propanodiol. Los intermediarios metabólicos principales se muestran en negro. El producto final está resaltado con una caja rosa y se muestra su estructura química. Las enzimas involucradas en las reacciones se muestran con letra azul. GDHt: Glicerol deshidratasa. PDOR: 1,3-propanodiol oxidoreductasa.

Estrés por solventes

El daño provocado por los solventes ha sido extensamente estudiado en varios microorganismos. En general, la toxicidad de estos compuestos está altamente correlacionada con su hidrofobicidad, ya que ésta determina la medida en se acumulan en la membrana citoplasmática. La acumulación de solventes en la membrana provoca el aumento de la permeabilidad y la fluidez de la bicapa, lo cual puede conducir a la liberación de ATP, iones, fosfolípidos, ARN y proteínas. Esto interfiere con la función de las proteínas embebidas en ella, interrumpiendo procesos clave como el transporte y la transducción de energía (Dunlop, 2011). En consecuencia, especies reactivas de oxígeno y radicales tóxicos tienden a acumularse y generar daños en biomoléculas tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Esto afecta la estabilidad del genoma, inhibe el progreso del ciclo celular, y perturba el plegado y la síntesis proteica (Schalck et al., 2021). Dado que el mal funcionamiento de las proteínas, debido a un mal plegamiento o agregación, es uno de los efectos más severos de los solventes, las bacterias inducen chaperonas asociadas a la respuesta al choque térmico. El aumento en la expresión y abundancia de HSPs ha sido ampliamente reportado en *E. coli* y otras bacterias ante el etanol (Horinouchi et al., 2010; Soufi et al., 2015), butanol (Alsaker et al., 2010; Brynildsen & Liao, 2009; Rutherford et al., 2010) y 1,3-PDO (Szymanowska-Powalowska & Kubiak, 2015). Por otra parte, en estas condiciones también se reprimen los genes relacionados con la respiración aeróbica y se inducen los sistemas de respuesta a estrés oxidativo y la respuesta SOS (Schalck et al., 2021). Además, se ponen en marcha mecanismos de detoxificación, tales como el procesamiento metabólico de las sustancias tóxicas en otras menos tóxicas, la utilización de transportadores y bombas moleculares para expulsarlas, o la activación de programas de biosíntesis de metabolitos como aminoácidos y azúcares que contrarrestan los efectos tóxicos. También se ha observado el desarrollo de respuestas adaptativas a largo plazo para superar la toxicidad producida por los solventes, por ejemplo mediante la alteración de la composición de la membrana y/o pared celular (Nicolaou et al., 2010).

Estrategias para mejorar la tolerancia y la producción de solventes

Se han puesto muchos esfuerzos en el desarrollo de microorganismos más tolerantes a solventes mediante manipulación genética racional. Uno de los enfoques utilizados es la expresión de bombas de eflujo, lo cual es una opción prometedora para muchos biocombustibles, pero se ha demostrado que no es efectiva para algunos alcoholes como el butanol (Dunlop, 2011). Otra opción es la expresión de proteínas que cambian la composición de la membrana celular. Por ejemplo, una isomerasa que catalice el cambio *cis* a *trans* de los fosfolípidos, para bloquear la entrada de solventes. El problema con esta estrategia es que, si bien puede ser útil para aumentar la tolerancia a solventes exógenos, no lo es para mejorar la producción de dichos solventes. Por último, otro enfoque es la expresión de genes que reduzcan el estrés producido por las altas concentraciones de este tipo de sustancias, tales como aquellos que codifican HSPs, enzimas redox y reguladores (Dunlop, 2011; Mukhopadhyay, 2015).

Varios estudios han demostrado que la sobreproducción de HSPs y chaperonas puede aliviar los efectos inhibitorios de varios biocombustibles y otras sustancias químicas en diversas cepas bacterianas. El efecto protector que ejercen probablemente se deba a la estabilización o replegado de proteínas que son cruciales para el metabolismo celular y la supervivencia, y que son sensibles al estrés producido por estos solventes (Nicolaou et al., 2010).

Por ejemplo, estudios realizados en los productores naturales *C. acetobutylicum* y en una cepa tolerante a solventes de *Clostridium beijerinckii* mostraron una correlación entre la abundancia de la chaperona GroEL y el aumento en la tolerancia a butanol y su rendimiento (Isar & Rangaswamy, 2012; Mao et al., 2010). Por otro lado, en un trabajo realizado por Zingaro y Papoutsakis, se analizó el impacto de la sobreexpresión del sistema autólogo de chaperonas GroELS en la tolerancia de *E. coli* a diversos alcoholes, tales como etanol, isobutanol, n-butanol y 1,2,4-butanotriol. Los autores demostraron que GroELS era capaz de aumentar la viabilidad celular frente a todos los alcoholes ensayados (Zingaro & Papoutsakis, 2013). A partir de estos resultados, los autores se propusieron mejorar aún más la tolerancia mediante el diseño de una respuesta a estrés semi-sintética en *E. coli*, manipulando la expresión de las HSPs de la bacteria. Para ello, probaron diferentes combinaciones de GrpE, GroELS y ClpB y diferentes métodos para coexpresarlas, logrando desarrollar una cepa capaz de tolerar altos niveles de etanol, n-butanol y 1,2,4-butanotriol (Zingaro & Papoutsakis, 2012).

La sobreexpresión de chaperonas de otros organismos también produjo un aumento en la tolerancia a solventes. En un estudio realizado por Abdelaal y colaboradores, se observó que la expresión heteróloga de *groELS* de *C. acetobutylicum* en *E. coli* generó un aumento del crecimiento de la cepa frente al butanol, isobutanol y etanol (Abdelaal et al., 2015). Además de GroELS, otras HSPs se han

expresado en forma heteróloga en *E. coli* para aumentar la tolerancia a diversos solventes orgánicos (Kang et al., 2007; Okochi et al., 2008). Más aún, se expidió una patente que describe cómo la expresión en *C. acetobutylicum*, *E. coli* y *Z. mobilis* de chaperonas de microorganismos termófilos permite aumentar la tolerancia a etanol, butanol y otros alcoholes de cadena corta (Clark et al., 2014). Por su parte, en especies de bacterias lácticas también se ha observado una correlación entre la expresión de HSPs y el aumento de la tolerancia a solventes (Desmond et al., 2004; Xia et al., 2016).

Como vimos, la manipulación genética racional es una estrategia eficaz para mejorar la tolerancia microbiana a solventes. Sin embargo, la aplicación de este tipo de estrategias puede verse limitada a menos que haya una comprensión clara de los mecanismos de toxicidad y tolerancia. Alternativamente, estrategias como la evolución adaptativa y la ingeniería de la maquinaria de transcripción global también han demostrado ser efectivas para el desarrollo de microorganismos más tolerantes a estos compuestos químicos (Ling et al., 2014; Schalck et al., 2021).

La toxicidad de los solventes constituye una de las mayores limitaciones para la producción microbiana de estos compuestos, dado que impide su acumulación en altas concentraciones (Blanch, 2012; Jarboe et al., 2010). La coexpresión de chaperonas junto con las vías de producción homólogas o heterólogas para la producción de biocombustibles y sustancias químicas de alto valor agregado parece ser una estrategia prometedora para aumentar la productividad de las cepas (Xia et al., 2016). Uno de los primeros trabajos en explorar este enfoque fue el de Tomas y colaboradores, en el cual observaron que la sobreexpresión de *groELS* en *C. acetobutylicum* permitió obtener una mejor tolerancia a butanol y un aumento del 32% en la producción de este solvente (Tomas et al., 2003).

Estireno

Importancia industrial

El estireno es un producto químico utilizado como materia prima para la producción de numerosos polímeros y co-polímeros de importancia industrial. La mayor parte del estireno producido se destina a la fabricación de poliestireno, uno de los plásticos más utilizados en la vida cotidiana (James & Castor, 2011).

Actualmente, el estireno se produce casi totalmente a partir de combustibles fósiles a través de la deshidrogenación de etilbenceno, reacción que requiere más de 3 toneladas métricas de vapor por tonelada métrica de estireno producido. Este requisito exorbitante hace que la producción de estireno sea la de mayor gasto de energía entre las rutas de producción de productos químicos básicos (McKenna & Nielsen, 2011).

Producción microbiana de estireno

Si bien se ha observado producción natural de estireno en varios organismos, incluyendo microorganismos como *Penicillium camemberti* y ciertas especies de plantas, las productividades obtenidas con ellos son extremadamente bajas y no se han identificado hasta la fecha las enzimas ni los genes asociados a dicha vías (McKenna & Nielsen, 2011).

Hace aproximadamente 10 años, McKenna y colaboradores diseñaron una vía biosintética para la producción de estireno a partir de azúcares. Esta vía heteróloga consta de dos pasos enzimáticos y utiliza L-fenilalanina (L-Phe) como precursor de síntesis. En primer lugar, la L-Phe se convierte en ácido trans-cinámico (tCA), en una conversión catalizada por la enzima fenilalanina amoníaco liasa (PAL) de *Arabidopsis thaliana*. Posteriormente, la transformación de tCA en estireno es catalizada por la enzima ácido ferúlico descarboxilasa (FDC) de *S. cerevisiae* (Figura 4). Esta vía se expresó por primera vez en *E. coli* NST74 (desarrollada previamente para la sobreproducir L-Phe a partir de glucosa) y la cepa resultante fue capaz de producir 260 mg/l de estireno a partir de 15 g/l de glucosa (McKenna & Nielsen, 2011). El título obtenido por los investigadores fue muy cercano al umbral de toxicidad de 300 mg/l que ellos mismos determinaron para su cepa, al cual observaron una inhibición completa del crecimiento. Esto puso de manifiesto la necesidad de desarrollar estrategias para preservar el crecimiento celular y la producción, sorteando los efectos tóxicos del estireno para obtener rendimientos económicamente viables.

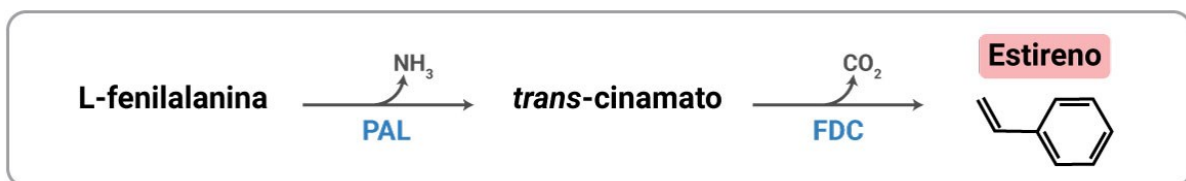


Figura 4. Camino metabólico para la síntesis de estireno desarrollado por McKenna y Nielsen. Los intermediarios metabólicos principales se muestran en negro. El producto final está resaltado con una caja rosa y se muestra su estructura química. Las enzimas involucradas en las reacciones se muestran con letra azul. PAL: Fenilalanina amoníaco liasa. FDC: Ácido ferúlico descarboxilasa.

Toxicidad del estireno

Se ha demostrado que el estireno es un compuesto tóxico para *E. coli* en concentraciones que van desde 110 a 300 mg/l (Liang et al., 2020; Liu et al., 2018; McKenna & Nielsen, 2011; Mingardon et al., 2015). La toxicidad de los compuestos hidrofóbicos como el estireno ($\log P = 2,95$) se debe a que se

acumulan en la membrana celular, alterando su integridad (Ramos et al., 2002). Mingardon y colaboradores fueron unos de los primeros en investigar los mecanismos moleculares necesarios para el crecimiento de *E. coli* en presencia de estireno. Los autores determinaron que la eliminación de la bomba de eflujo AcrAB-TolC tenía un fuerte impacto negativo tanto en el crecimiento como en la producción de estireno, y propusieron que dicha bomba juega un papel fundamental en la tolerancia a este compuesto (Mingardon et al., 2015).

Lian y colaboradores caracterizaron el daño a la membrana producido por este compuesto, y sugirieron que existen diferencias en la respuesta de *E. coli* al estireno cuando se agrega directamente a los cultivos en comparación con el producido en forma endógena. Específicamente, los autores encontraron que menos del 10% de las células expuestas al estireno exógeno vieron afectada la integridad de su membrana, mientras que más del 50% de las células productoras mostraron membranas dañadas (Lian et al., 2016). Estudios de transcriptómica realizados a tiempos cortos de exposición (2 a 6 h) coinciden con Lian y colaboradores en que las respuestas varían dependiendo si la exposición a estireno es exógena o endógena (Webb et al., 2022). No obstante, al analizar los cambios en el transcriptoma en tiempos largos de exposición (27 h), la respuesta de *E. coli* es similar para los dos modos de exposición. El estireno causa daños tanto en la envoltura celular como en el DNA, a lo que las células responden reprimiendo la expresión de vías involucradas en la replicación del DNA, la producción de proteínas y la biogénesis de la pared celular. Entre los genes cuya expresión aumenta más significativamente se encontraron genes relacionados con la respuesta de choque de fagos (*pspABCDE/G*), reguladores generales de estrés (*rpoH* y *marA*), y genes que alteran la membrana celular (*bhsA*, *ompR* y *ldtC*) (Machas et al., 2021). También se vieron inducidos los genes *ibpA* e *ibpB*, sobre todo en respuesta al estireno exógeno. Sorprendentemente, los transportadores de eflujo no se vieron afectados, ni siquiera AcrAB-TolC, que en trabajos previos se había demostrado que estaba implicado en la tolerancia a estireno (Mingardon et al., 2015).

Estudios de tolerancia en cepas mutantes puntuales demostraron que la delección de genes involucrados en el control de la composición, osmorregulación y constricción de la membrana externa (*ompR*, *tolQ*, *tolA* o *tolR*) genera una reducción del crecimiento respecto de la cepa salvaje. Por el contrario, la sobreexpresión de *plsX*, que participa en la biosíntesis de fosfolípidos, condujo a un mayor crecimiento en presencia de estireno (Machas et al., 2021). Otros trabajos que evaluaron el impacto que las modificaciones en la composición de la membrana tienen en la tolerancia al estireno fueron los de Tan y colaboradores. En ellos se observó que la sobreexpresión de *pssA* y del gen heterólogo *cti* de *Pseudomonas aeruginosa* en *E. coli* aumentó la tolerancia al estireno en un 16% y 17%, respectivamente (Tan et al., 2016, 2017).

Estrategias para mejorar la producción de estireno

A pesar de que el diseño de la vía sintética de producción de estireno es relativamente reciente, son varios los estudios que se han enfocado en tratar de mejorar la productividad del proceso de síntesis. Uno de los primeros trabajos, llevado a cabo por McKenna y colaboradores, se enfocó en la remoción *in situ* del producto final. Por un lado, los autores llevaron a cabo una estrategia de extracción con solventes, tales como n-dodecano, n-hexadecano y ftalato de bis(2-etilhexilo) (BEHP). Dichos solventes fueron añadidos al medio de cultivo en una fracción de volumen de 0,2 con el objetivo de extraer selectivamente el estireno del cultivo a medida que se produce, eliminando así su potencial acumulación hasta niveles inhibitorios. De los tres solventes ensayados, el que resultó más eficiente fue el BEHP, con el cual lograron producir 836 mg/l de estireno. Por otro lado, los autores también exploraron otra estrategia de remoción *in situ*: la extracción de gases. En este caso, utilizaron un protocolo de extracción intermitente y, cuantificando el estireno en los gases de escape, obtuvieron un título de 561 mg/l en cultivos en biorreactor (McKenna et al., 2015).

Uno de los enfoques más tradicionales para mejorar la producción de un compuesto es aumentar la disponibilidad de sus precursores. En el caso de la vía diseñada para el estireno, los precursores de síntesis son la L-Phe y el tCA (Figura 4). Por un lado, Liu y colaboradores sobreexpresaron varios genes del metabolismo central para aumentar el flujo de carbono hacia L-Phe en la cepa *E. coli* BL21(DE3). Además de estas modificaciones, los autores desplegaron una serie de estrategias para optimizar la biosíntesis de estireno tales como el *screening* de diferentes enzimas PAL, la optimización de codones, plásmidos y tiempos de cultivo, y la remoción *in situ* con miristrato de isopropilo. La cepa resultante produjo 350 mg/l de estireno en cultivos en frasco agitado (Liu et al., 2018). Por otro lado, Lee y colaboradores se valieron de la cepa *E. coli* YHP05, que habían previamente desarrollado para sobreproducir tCA, y la utilizaron como hospedador para la síntesis de estireno. Los autores optimizaron los sistemas de expresión de PAL y FDC, así como los medios y tiempos de cultivo, y lograron producir 1,7 g/l de estireno en cultivos de frasco agitado, utilizando n-dodecano para la recuperación *in situ* del producto. Además, hicieron cultivos en lote alimentado en un biorreactor a escala de laboratorio, conectado a la salida de aire con tres botellas consecutivas con n-dodecano para minimizar la pérdida de estireno. En estas condiciones, obtuvieron un título total de estireno de 5,3 g/l, con una productividad de 88 mg/l-h, lo cual representa el mayor título y productividad informados hasta la fecha (K. Lee et al., 2019). Por su parte, McKenna y colaboradores utilizaron estrategias combinadas de evolución e ingeniería metabólica para desarrollar una cepa de *S. cerevisiae* sobreproductora de L-Phe. Dado que *S. cerevisiae* porta de manera nativa el gen *fdc*, los autores sólo tuvieron que incorporar un plásmido que exprese PAL para obtener una cepa productora de estireno

(McKenna et al., 2014). No obstante, la productividad obtenida en este hospedador fue mucho menor a las alcanzadas con *E. coli*.

El desarrollo de cepas más tolerantes al estireno es otro método que puede conducir a un aumento de la producción. Por ejemplo, Liang y colaboradores construyeron una biblioteca de 85.420 mutaciones de reguladores transcripcionales dirigida a 54 genes con el fin de buscar mutantes con mayor resistencia a estireno capaces de producir mayores títulos de este compuesto. La mejor candidata obtenida por los autores fue una cepa mutante *lexA*, que afecta al represor transcripcional de la respuesta SOS, con la cual lograron producir 330 mg/l de estireno en cultivos en frasco agitado, y 3,15 g/l en fermentaciones de lote alimentado usando extracción de gas (Liang et al., 2020). Otra estrategia utilizada consiste en independizarse de la toxicidad del estireno mediante la biosíntesis libre de células. Los autores de este trabajo sintetizaron las enzimas PAL y FDC en extractos crudos de *E. coli* y luego los combinaron con una solución de L-Phe para producir 4,2 g/l de estireno *in vitro* (Grubbe et al., 2020).

Por último, en un trabajo publicado hace unos meses, se utilizaron herramientas multiómicas para mejorar el rendimiento de una cepa productora de estireno. Los investigadores llevaron a cabo análisis de transcriptómica, proteómica, metabolómica y lipidómica a diferentes tiempos de fermentación, y con la información recabada en ellos hicieron modificaciones genéticas a la cepa productora. Luego de identificar a los candidatos más prometedores, combinaron sus modificaciones puntuales para mejorar aún más la productividad. De esta forma obtuvieron una cepa mutante *aaeA* que sobreexpresa *cpxP* con la cual obtuvieron 1,85 g de estireno, con una productividad de aproximadamente 70 mg/l·h. Los autores sugieren que la mutación *aaeA* mejora la productividad de estireno por la interrupción de la bomba de eflujo AaeXAB, lo cual aumenta la concentración intracelular de tCA. Por su parte, CpxP es una chaperona periplásmica que está involucrada en la resistencia a estreses extra-citoplasmáticos (Webb et al., 2022).

Tercera parte: Phasinas

Polihidroxicanoatos y GAPs

Los polihidroxicanoatos (PHA) son poliésteres naturales producidos y acumulados por diversas especies de bacterias y arqueas como compuestos de almacenamiento de carbono y energía bajo condiciones limitantes de nutrientes (como nitrógeno, oxígeno o fósforo) y/o condiciones de estrés ambiental. En particular, su producción se ve favorecida cuando hay un exceso de fuente de carbono

y una deficiencia en nitrógeno (es decir cuando la relación carbono/nitrógeno es alta). Estos polímeros han adquirido relevancia en las últimas décadas porque muestran propiedades similares a los plásticos derivados del petróleo. Pero, a diferencia de ellos, son biodegradables y biocompatibles, lo cual los convierte en una alternativa versátil y ecológica (Madison & Huisman, 1999).

La función fisiológica de los PHA acumulados en bacterias es proporcionar nutrientes para la energía y el metabolismo del carbono durante las fases de inanición o bajo distintas condiciones de estrés (Jendrossek, 2009). Más aún, se observó en bacterias de varios géneros, como *Cupriavidus* y *Pseudomonas*, que la capacidad de acumular y utilizar PHA otorga a las células una mayor capacidad de supervivencia a estrés oxidativo, térmico, frío y a congelación (Anderson & Dawes, 1990; Ayub et al., 2004, 2009; López et al., 1995; Ruiz et al., 1999, 2001).

Según la longitud del monómero, estos polímeros se clasifican como PHA de cadena corta (PHAscl por sus siglas en inglés) cuando contienen monómeros de 3 a 5 C, o cadena media (PHAmcl por sus siglas en inglés) cuando contienen monómeros de 6 a 16 C (Figura 5A). El PHA más conocido y más abundante es el poli(3-hidroxiobutirato) (PHB), compuesto por monómeros de β -3-hidroxiobutirato (4 C, un PHAscl) (Anderson & Dawes, 1990). La biosíntesis de PHB ha sido estudiada en detalle en *Cupriavidus necator* (este microorganismo antes era denominado *Ralstonia eutropha*, pero en el resto de la tesis será referido por su nueva denominación). En esta bacteria, así como en la mayoría de los microorganismos productores de PHB, una β -cetotilasa condensa dos moléculas de acetil-CoA formando una molécula de acetoacetil-CoA. En el segundo paso, el acetoacetil-CoA se reduce a 3-hidroxiobutiril-CoA por la acción de una acetoacetil-CoA reductasa dependiente de NADPH. Finalmente, el PHB es sintetizado gracias a la polimerización del 3-hidroxiobutiril-CoA, catalizada por la PHB sintasa. Estas enzimas son codificadas por los genes *phbA*, *phbB* y *phbC*, respectivamente (también denominados *phaA*, *phaB* y *phaC*) (Madison & Huisman, 1999) (Figura 5B y C).

Los PHA se acumulan en cuerpos de inclusión intracelulares, llamados gránulos, que pueden ocupar hasta el 90% del volumen celular y están rodeados por una capa proteica bien organizada, compuesta por varias proteínas asociadas al gránulo (GAPs por sus siglas en inglés). Las GAPs incluyen algunas proteínas con funciones enzimáticas, como polimerasas (PhaC) y depolimerasas (PhaZ), proteínas con actividades regulatorias (PhaR) y una variedad de proteínas pequeñas con diferentes funciones, conocidas colectivamente como phasinas, los componentes más abundantes de la capa proteica que rodea los gránulos (Merrick & Doudoroff, 1961; Mezzina et al., 2020; Pieper-Fürst et al., 1994).

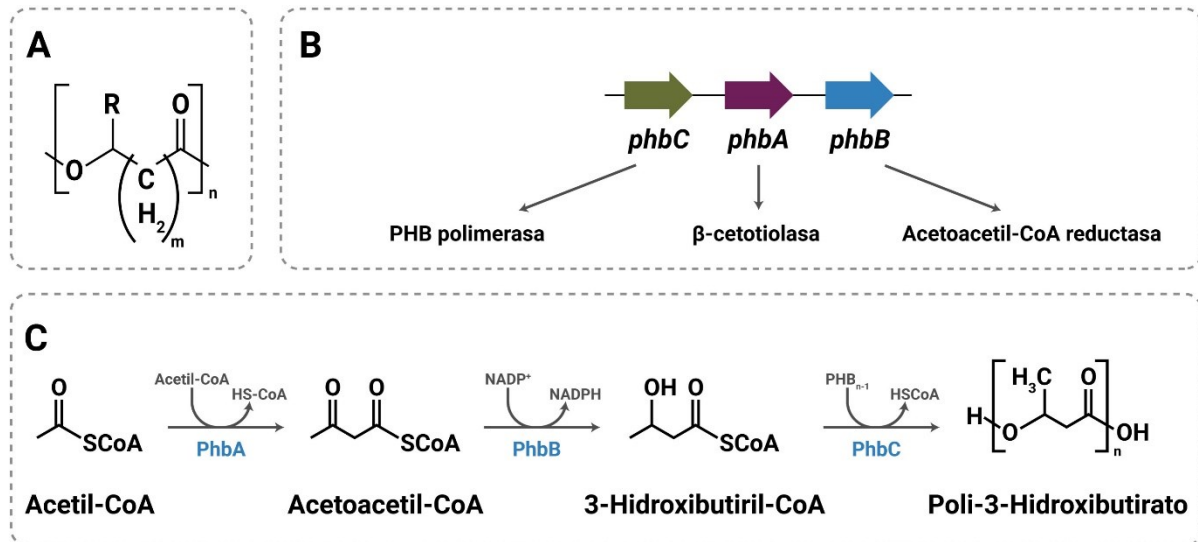


Figura 5. Metabolismo de los PHA. A) Estructura general de los polihidroxicanoatos. El subíndice m indica la extensión del monómero; n puede variar en la mayoría de los casos entre 100 y 30.000; R representa la cadena alquílica lateral. B) Genes de síntesis de PHB. Los genes *phbA*, *phbB*, y *phbC*, forman parte de un operón, y codifican una β -cetotilasa, una acetoacetyl-CoA-reductasa, y una PHB sintasa, respectivamente. C) Reacciones involucradas en la síntesis de PHB.

Las phasinas fueron descritas por primera vez en 1994 por Pieper-Fürst y colaboradores, quienes identificaron una proteína de bajo peso molecular, GA14, asociada a los gránulos de PHA en *Rhodococcus ruber*. Dado que estas proteínas forman una capa en la superficie de los gránulos de PHA, se denominaron phasinas (PhaP) en analogía con las oleosinas, unas proteínas que forman una capa en la superficie de las inclusiones de triacilglicerol en las plantas oleaginosas (Pieper-Fürst et al., 1994). El análisis de otras bacterias productoras de PHA reveló que todas presentaban phasinas como los principales componentes proteicos de los gránulos de PHA. Estas proteínas anfipáticas de bajo peso molecular desempeñan una importante función estructural, formando una interfase entre el contenido hidrofóbico de los gránulos de PHA y el contenido hidrofílico del citoplasma. Además, se ha descrito que las phasinas promueven el crecimiento bacteriano y la síntesis de PHA y afectan el número, el tamaño y la distribución de los gránulos (de Almeida et al., 2007; Wieczorek et al., 1995; York, Junker, et al., 2001).

Funciones de las phasinas

Basados principalmente en observaciones de las phasinas de *C. necator* y *Pseudomonas*, los primeros estudios que analizaron el rol de estas proteínas propusieron tres mecanismos para explicar su capacidad de promover la síntesis de PHA. En el primero, las phasinas incrementarían la producción del polímero uniéndose a los gránulos, aumentando de esta manera su relación superficie/volumen,

estabilizándolos y evitando que se unan entre sí. Esta hipótesis está respaldada por varios estudios que demostraron que cepas mutantes incapaces de producir phasinas tienen menor cantidad de gránulos y, a su vez, éstos son más grandes, en comparación con las cepas que producen PhaP (Pieper-Fürst et al., 1994; Wieczorek et al., 1995). El segundo mecanismo sostiene que las phasinas podrían interactuar directamente con la PHA sintasa, activando la síntesis del polímero. Esto se basa en uno de los primeros estudios de Wieczorek y colaboradores en el cual mostraron que PhaC tenía menor actividad en mutantes *phaP* de *C. necator* (Wieczorek et al., 1995). Años más tarde se demostró que la phasina de *C. necator* es capaz de aumentar la actividad *in vitro* de PhaC de *Aeromonas caviae* y de PhaC1 y PhaC2 de *P. aeruginosa* (Ushimaru et al., 2014). Estudios realizados con las phasinas PhaM de *C. necator* y PhaP de *Synechocystis* sp. PCC 6803 también reforzaron esta hipótesis (Hauf et al., 2015; Pfeiffer & Jendrossek, 2014). Por último, el tercer mecanismo propone que las phasinas promueven la producción de PHA indirectamente, evitando que otras proteínas inespecíficas se unan a los gránulos (Maehara et al., 1999). Por ejemplo, en experimentos realizados en *E. coli* recombinante productora de PHA se observó que, en ausencia de phasinas, disminuyó la síntesis del polímero y se sintetizaron grandes cantidades de la proteína de choque térmico HspA, la cual se encontró unida a la superficie del gránulo (Tessmer et al., 2007).

A medida que continuaron los estudios de phasinas, se describieron más funciones para estas proteínas (Figura 6). Por un lado, se describió que actúan como activadores de PHA depolimerasas, favoreciendo la utilización del polímero, como en el caso de ApdA de *Rhodospirillum rubrum* y Mms16 de *Magnetospirillum gryphiswaldense* (Handrick et al., 2004; Schultheiss et al., 2005). Por otro lado, se ha observado que funcionan como reguladores positivos y negativos de la transcripción de *phaC*, como en el caso de PhaF de *Pseudomonas putida* y PhaP de *Aeromonas hydrophila* (Prieto et al., 1999; Tian et al., 2005). Además, se ha demostrado que algunas phasinas tienen un rol fundamental en el control de la localización celular de los gránulos y en su segregación durante la división celular, asegurando una distribución equitativa de los mismos en las células hijas (Galán et al., 2011; Pfeiffer et al., 2011).

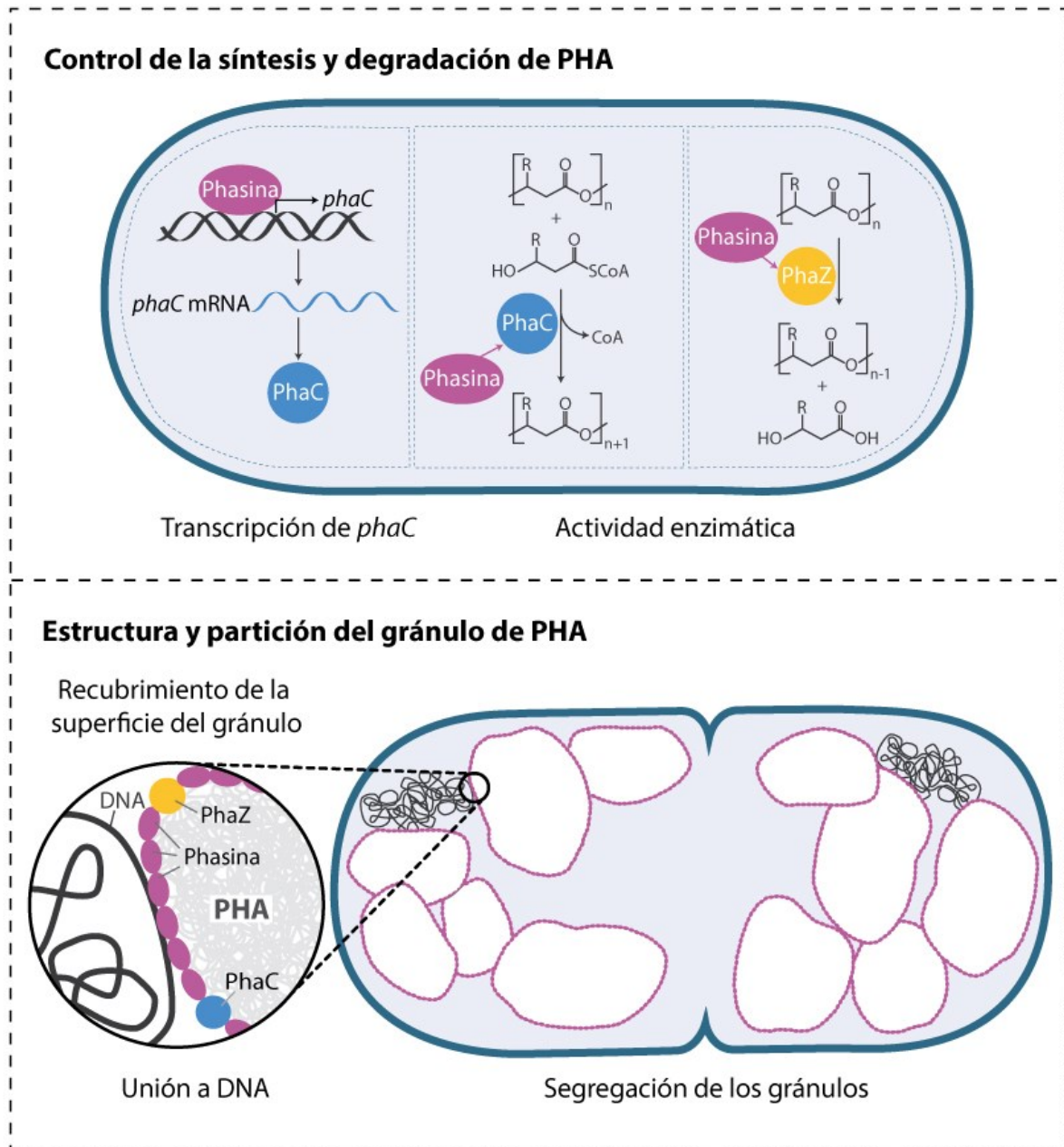


Figura 6. Funciones de las phasinas relacionadas con el metabolismo de PHA. Panel superior: Algunas phasinas regulan la transcripción de los genes de síntesis de PHA, mientras que otras activan la función de PhaC o PhaZ. Panel inferior: las phasinas son los componentes principales de la superficie de los gránulos de PHA y algunas pueden unirse al DNA y/o participar en la segregación de los gránulos durante la división celular.

Familias de phasinas

A pesar de que las phasinas no constituyen un grupo altamente conservado, se han definido varios motivos proteicos comparando el gran número de phasinas encontradas en bacterias pertenecientes a diferentes grupos taxonómicos. Según la base de datos de Pfam (<http://pfam.xfam.org/>), hay cuatro familias de phasinas, cada una de las cuales contiene un dominio característico (Tabla 1).

Tabla 1: Familias de phasinas

Familia Pfam	Dominio	Taxón representativo	Phasina representativa
PF09361	Phasin_2	<i>Cupriavidus, Azotobacter</i>	PhaP de <i>C. necator</i>
PF09602	PhaP_Bmeg	<i>Bacillus</i>	PhaP de <i>Bacillus megaterium</i>
PF09650	PHA_gran_rgn	Diversas <i>Proteobacteria</i>	-
PF05597	Phasin	<i>Pseudomonas</i>	PhaF de <i>P. putida</i>

La primera familia (PF09361) es la más grande e incluye secuencias encontradas en bacterias pertenecientes a Alpha-, Beta- y Gammaproteobacteria, como la phasina más estudiada, PhaP1 de *C. necator*. El segundo (PF09602) corresponde a phasinas encontradas en especies de *Bacillus*, y el tercero (PF09650) contiene un grupo diverso de proteínas, en su mayoría no caracterizadas, pertenecientes a diferentes Proteobacterias. La última familia (PF05597) contiene proteínas de diferentes Proteobacterias, la mayoría de las cuales se encuentran relacionadas con *Pseudomonas*, entre ellas PhaF de *P. putida*.

Aunque la mayoría de las phasinas conocidas se pueden clasificar en uno de estos cuatro grupos, hay algunas que no contienen ninguno de los dominios relacionados con las phasinas, como GA14 de *R. ruber*, la primera phasina identificada (Pieper-Fürst et al., 1995). Este es también el caso de las phasinas de cianobacterias, como PhaP de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Hauf et al., 2015), y las phasinas de arqueas.

Las diferentes familias en las que pueden clasificarse las phasinas parecen reflejar tanto su origen filogenético como el tipo de PHA al que se unen. La mayoría de las phasinas caracterizadas hasta la fecha pertenecen al phylum Proteobacteria. Entre ellos, las phasinas del grupo PF09650 y PF09361 están relacionadas con los PHAscl, mientras que las phasinas relacionadas con PHAmcl, en su mayoría pertenecientes a especies de *Pseudomonas*, constituyen un grupo separado (familia PF05597). A su vez, aunque la mayoría de las especies de *Pseudomonas* acumulan solo PHAmcl, se ha observado que varias cepas acumulan tanto PHAmcl como PHB (Ayub et al., 2007; Hokamura et al., 2015). Estas bacterias contienen grupos de genes de biosíntesis separados para cada polímero y phasinas pertenecientes a distintas familias (Mezzina & Pettinari, 2016).

Estructura de las phasinas

Existen relativamente pocos trabajos que investiguen la estructura de las phasinas. En particular, se han realizado análisis estructurales de baja resolución y predicciones *in silico* para dilucidar la estructura de phasinas como PhaP de *C. necator*, PhaP de *Azotobacter* sp. FA8, PhaF de *P. putida*, PhaP de *A. hydrophila* y PhaP de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Hauf et al., 2015; Maestro et al., 2013; Mezzina et al., 2014; Neumann et al., 2008; Zhao et al., 2016). En ellos, se encontró que una característica general de las phasinas es tener un alto porcentaje (cerca del 90%) de aminoácidos en una conformación de α -hélice. Sin embargo, en algunos de estos trabajos también se observó que la proporción de residuos en una conformación de hélice α cambia según el entorno, siendo mayor en presencia de solventes estabilizadores de estructura o con la adición de oleato de sodio, que crea un ambiente hidrofóbico que imita al PHB. Otra característica estructural que se ha reconocido recientemente en las phasinas es la presencia de regiones desordenadas, es decir, regiones que no se pliegan en una estructura tridimensional determinada, sino que forman ensamblados dinámicos que les dan flexibilidad. Se ha propuesto que la presencia de este tipo de regiones desestructuradas en las phasinas podría contribuir a la diversidad funcional observada en estas proteínas (Maestro et al., 2013; Mezzina et al., 2014; Mezzina & Pettinari, 2016).

Además, todas las phasinas forman oligómeros y la mayoría de los estudios indican que estas proteínas son normalmente tetrámeros en solución (Hauf et al., 2015; Maestro et al., 2013; Mezzina et al., 2014; Zhao et al., 2016). Sin embargo, se ha descrito que algunas forman otros tipos de oligómeros, como dímeros, trímeros y dodecámeros (Neumann et al., 2008; Pfeiffer & Jendrossek, 2013). La presencia de motivos *coiled-coil* es otra característica estructural común. Se ha propuesto que estas regiones están involucradas en la oligomerización y/o interacción con otras proteínas. Aunque se ha demostrado que todas las phasinas tienen mediana o alta probabilidad de contener regiones *coiled-coil*, la ubicación y extensión de estas regiones difiere mucho, incluso entre phasinas pertenecientes a la misma familia. Esto sugiere que la interacción entre los monómeros, con los gránulos de PHA, con otras phasinas u otras proteínas, puede diferir para las distintas phasinas (Maestro et al., 2013; Mezzina et al., 2014).

Aplicaciones de las phasinas

Se han descrito diversas aplicaciones biotecnológicas para las phasinas, que van desde la optimización de la producción de bioplásticos, proteínas y biocatalizadores, hasta el desarrollo de herramientas para uso biomédico y remediación ambiental (Brown et al., 2022).

Como las proteínas mayoritarias en la superficie de los gránulos, las phasinas han sido empleadas para mejorar la producción de PHA en múltiples aspectos, como aumentar la acumulación del polímero (York, Stubbe, et al., 2001), alterar su composición (Kawashima et al., 2015) y mejorar el procesamiento post cosecha (Rahman et al., 2013).

Por otro lado, aprovechando su afinidad por los gránulos de PHA, se ha fusionado una gran variedad de proteínas a diversas phasinas con el objetivo de inmovilizarlas uniéndolas a los gránulos de polímero. Esta estrategia se utilizó para facilitar la purificación de proteínas recombinantes (Banki et al., 2005; Moldes et al., 2004), para mejorar la estabilidad de biocatalizadores (J. H. Lee et al., 2016; R. Li et al., 2019; H.-M. Seo et al., 2016), y para optimizar la clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) (Bäckström et al., 2007). También se han utilizado fusiones de proteínas a phasinas para desarrollar sistemas de *delivery* de drogas mediados por receptores utilizando nanopartículas de PHA (Fan et al., 2018; Yao et al., 2008) y para la ingeniería de tejidos (Y. Dong et al., 2010; X. Li et al., 2015). Por último, la naturaleza anfipática de las phasinas se ha utilizado para su aplicación como biosurfactantes (Mato et al., 2019; Wei et al., 2011).

Cuarta parte: La phasina PhaP de *Azotobacter* sp. FA8

Caracterización de los genes de síntesis de PHB en *Azotobacter* sp. FA8

Azotobacter sp. FA8 es una bacteria aeróbica, fijadora de nitrógeno, aislada del suelo, que es capaz de acumular PHB hasta un 70% de su peso seco cuando se cultiva en diversas fuentes de carbono como glucosa, gluconato y sacarosa (Quagliano et al., 1994). En estudios previos de nuestro laboratorio se identificaron y clonaron los genes implicados en el metabolismo de PHB de esta bacteria. Se caracterizaron 3 genes responsables de la síntesis de PHB: *phaB*, *phaA* y *phaC*, los cuales codifican una acetoacetyl-CoA reductasa, una β -cetotiolasa y una PHB sintasa, respectivamente (Pettinari et al., 2001). Además, se hallaron 3 genes con posible función regulatoria, *phaR*, *phaP* y *phaF*, los cuales están ubicados río arriba de los genes estructurales, flanqueados por dos secuencias de inserción (Figura 7) (Pettinari et al., 2003).

Las funciones regulatorias de PhaF y PhaR se dedujeron por homología de secuencia. Estas proteínas actuarían como regulador de la expresión de phasinas y activador de la transcripción de los genes de síntesis de PHB, respectivamente. Por su parte, cuando se buscaron secuencias homólogas a la del producto del gen *phaP*, se encontró un 91% de identidad con la phasina PhbP de *Azotobacter vinelandii* y un 37% con la correspondiente a *C. necator*. Además, se pudo verificar experimentalmente

que PhaP tiene función de phasina, ya que se detectó su presencia como una de las proteínas mayoritarias en la superficie de los gránulos de PHB (Pettinari et al., 2003).

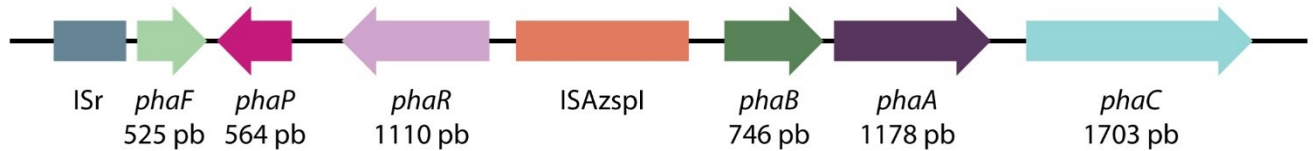


Figura 7. Organización de la región del genoma de *Azotobacter* sp. FA8 que contiene los genes *pha*. El gen *phaB* codifica una acetoacetyl-coA reductasa, *phaA* codifica una β -cetotiolasa, y *phaC*, una PHA sintasa. Los genes *phaF* y *phaR* codifican probables reguladores de la síntesis de PHB, mientras que *phaP* codifica una proteína de unión a gránulos de PHB.

Efecto de PhaP de *Azotobacter* sp. FA8 en *E. coli* recombinante

Efecto de PhaP sobre la producción de PHB

Los genes de síntesis de PHB de *Azotobacter* sp. FA8 (*phaBAC*) fueron clonados en plásmidos de expresión y se utilizaron para la construcción de cepas de *E. coli* recombinante que acumulan polímero a partir de diferentes fuentes de carbono (Nikel et al., 2006).

Si bien *E. coli* presenta varias ventajas frente a los productores naturales para la acumulación de PHA a bajo costo y con alta productividad, se ha observado que la síntesis recombinante del polímero afecta el metabolismo y la fisiología de esta bacteria. En un estudio de proteómica se observó que la acumulación de PHB en *E. coli* recombinante provocaba una disminución del 30% en la concentración de proteínas solubles totales y un aumento de la síntesis de proteínas como YfiD, que se expresa en respuesta a estrés ácido, y GroEL, GroES y DnaK, que se expresan en respuesta a estrés térmico (Han et al., 2001). Estos resultados sugerían que la acumulación de PHB en *E. coli* genera estrés en las células, reduciendo su capacidad de sintetizar proteínas e induciendo la expresión de varias proteínas protectoras. En base al aumento observado en la expresión de las HSPs, se ha propuesto que la acumulación de polímero induce una respuesta de choque térmico, fenómeno que se ve intensificado en productores no naturales por la ausencia de phasinas. Sin estas proteínas, que participan en la formación de los gránulos del polímero y que los recubren eficientemente, el PHB hidrofóbico podría entrar en contacto directo con otros componentes celulares, como DNA, RNA y proteínas, provocando su desnaturalización en la superficie de los gránulos (Han et al., 2001).

En línea con estos resultados, en nuestro laboratorio se estudió el efecto de la phasina PhaP de *Azotobacter* sp. FA8 en la acumulación de PHB y el crecimiento bacteriano. Para ello se construyó una

cepa recombinante de *E. coli* que expresa los genes *phaBAC* de *Azotobacter* sp. FA8, y luego fue transformada con un plásmido que expresa *phaP* de *Azotobacter* sp. FA8, o el mismo plásmido vacío. Cuando las cepas fueron crecidas en cultivos en frasco agitado y en biorreactor se observó que las cepas que expresaban *phaP* crecían más y contenían más polímero (Figura 8) (de Almeida et al., 2007).

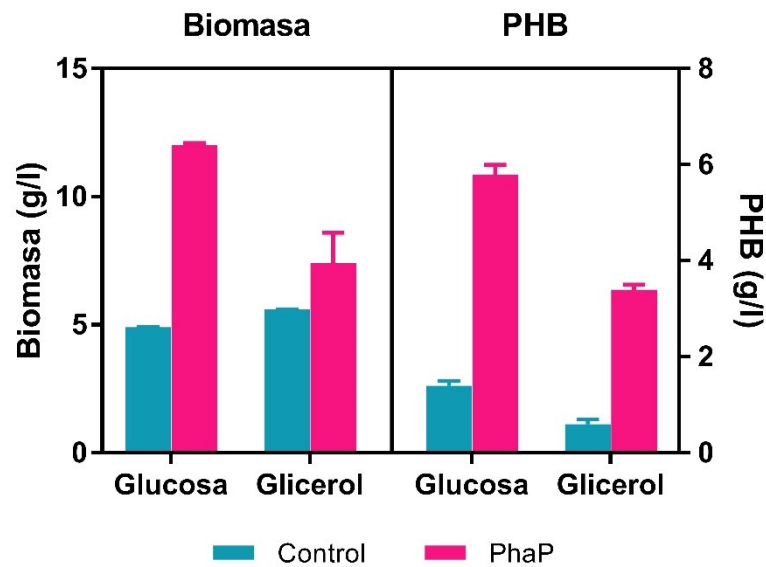


Figura 8. Efecto de la expresión de PhaP sobre la acumulación de biomasa y PHB en *E. coli* recombinante. Las cepas son derivadas de *E. coli* K1060 portando los genes *phaBAC* de *Azotobacter* sp. FA8 (control) o los genes *phaBAC* y *phaP* de *Azotobacter* sp. FA8 (PhaP). Los cultivos fueron crecidos por 48 h en medio MYA suplementado con 30 g/l de glucosa o glicerol en condiciones de aerobiosis. Construido a partir de datos publicados en de Almeida et al., 2007.

Estos resultados sugieren que PhaP ejerce un efecto promotor del crecimiento en los recombinantes que sintetizan PHB, probablemente actuando como una barrera entre el polímero y los componentes citoplasmáticos. Otros grupos de investigación obtuvieron resultados similares cuando expresaron phasinas provenientes de distintas fuentes junto con los genes de biosíntesis del polímero en *E. coli* recombinante. En estos trabajos también se observó que las phasinas se unían a los gránulos de polímero, aumentando el crecimiento y la producción de PHB de los recombinantes (Maehara et al., 1999; M. C. Seo et al., 2003; Tessmer et al., 2007; York et al., 2002).

A continuación, en nuestro laboratorio se realizaron estudios para analizar el estrés generado por la síntesis de PHB en *E. coli* e investigar la posibilidad de que la phasina PhaP de *Azotobacter* sp. FA8 pudiera aliviar dicho estrés. Para ello se trabajó con las mismas cepas recombinantes antes descritas y se estudió, mediante qRT-PCR, el efecto de la acumulación de PHB sobre la expresión de diferentes genes relacionados con la respuesta a estrés. En estos experimentos se observó en la cepa productora

de polímero un aumento en la expresión de varios de estos genes, particularmente los de las chaperonas DnaK e IbpA, al comparar su expresión contra la cepa control no productora de PHB (Figura 9A a C, barras blancas). Estos resultados ponen de manifiesto que la síntesis del polímero ejerce un estrés en las células, similar al producido por choque térmico, y coinciden con los obtenidos por Han y colaboradores, quienes también habían observado un aumento de la expresión de HSPs como DnaK, GroEL y GroES en cepas de *E. coli* productoras de PHB (Han et al., 2001).

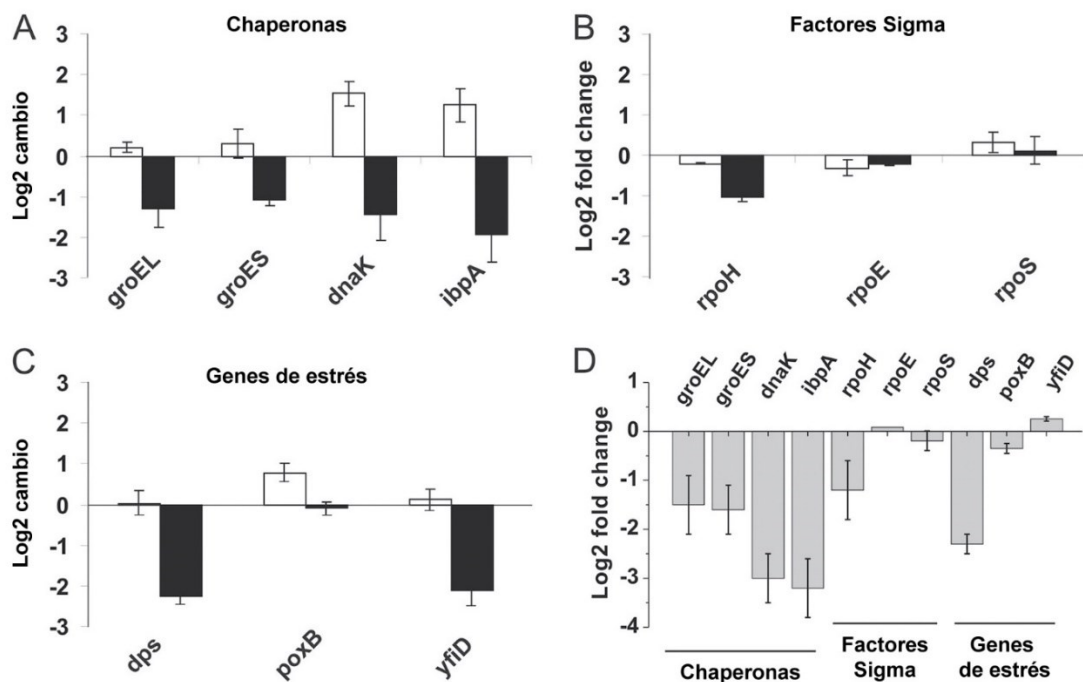


Figura 9. Efectos del PHB y PhaP en la expresión de genes involucrados en la respuesta a estrés por qRT-PCR. La expresión de chaperonas (A), factores sigma (B), y genes relacionados a estrés (C) de una cepa productora de PHB (barras blancas) y cepa una productora de PHB y PhaP de *Azotobacter* sp. FA8 (barras negras) fue comparada con la expresión de estos mismos genes en una cepa control no productora de polímero. D) La expresión de los genes en la cepa productora de PHB y PhaP fue comparada con su expresión en la cepa productora de PHB que no expresa la phasina. Tomado de de Almeida et al., 2007.

No obstante, este efecto no se observó en la cepa productora de PHB que expresa *phaP*, en la cual los niveles de expresión de los genes relacionados al estrés térmico fueron incluso más bajos que en las cepas control sin PHB (Figura 9) (de Almeida et al., 2011). Estos resultados indican claramente que la presencia de PhaP disminuye el estrés producido por la presencia del polímero.

En base a estos resultados surgió la hipótesis de que la producción de PHB induce la respuesta al choque térmico debido a una disminución de chaperonas citoplasmáticas disponibles por captura de las mismas sobre la superficie de los gránulos de PHB. Dado que las chaperonas libres se unen e

inactivan a las moléculas de RpoH disponibles, la unión de estas proteínas a los gránulos de PHB liberaría a RpoH, induciendo la expresión de genes de choque térmico. Esta hipótesis se ve reforzada por los trabajos que describen la unión de HSPs como IbpA/B, DnaK y GroEL a los gránulos de PHB en productores naturales y recombinantes que no producen phasinas (Han et al., 2006; Pötter et al., 2004; Tessmer et al., 2007). En presencia de las phasinas, son estas proteínas las que se unen a los gránulos de polímero, previniendo la unión de las chaperonas a los mismos. De esta forma, se incrementarían los niveles de chaperonas libres en citoplasma, que podrían unirse e inactivar a RpoH, disminuyendo consecuentemente la respuesta a choque térmico y la expresión de las chaperonas por él inducidas (Figura 10) (de Almeida et al., 2011).

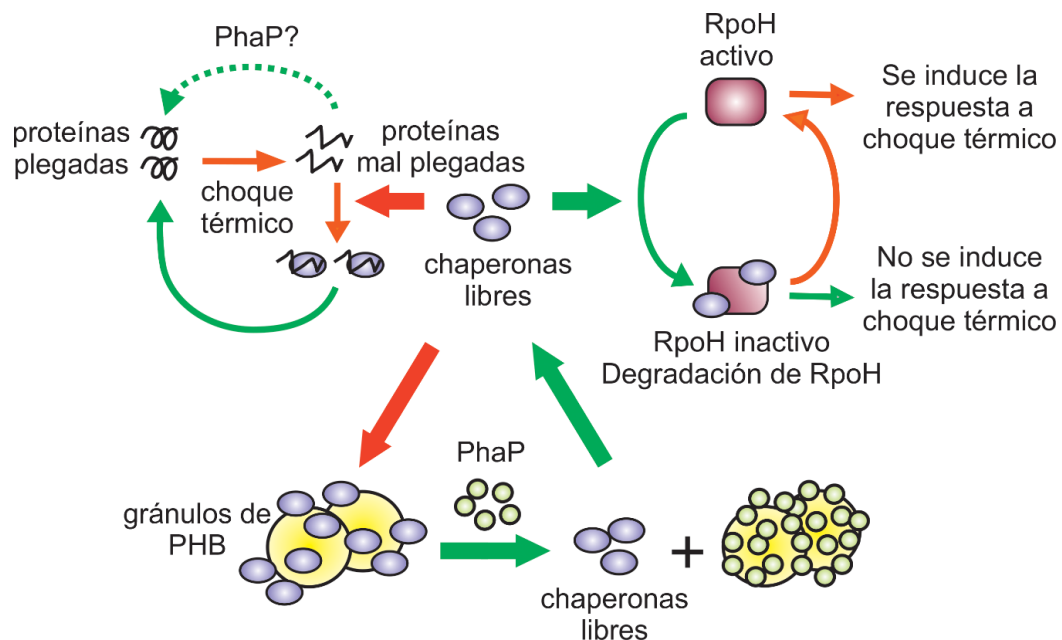


Figura 10. Modelo hipotético del efecto de PhaP en células que producen PHB. Adaptado de Mezzina, et al., 2017.

Efecto de PhaP en cepas no productoras de PHB

En los experimentos antes descritos se observó que la expresión de *phaP* de *Azotobacter* sp. FA8 en las cepas productoras de PHB disminuye la expresión de los genes de chaperonas *ibpA*, *groEL*, *groES* y *dnaK* a niveles por debajo de los observados en células no productoras de polímero (Figura 9). Esto indicó que la expresión de *phaP* disminuye significativamente el estrés celular durante el crecimiento, y que su efecto va más allá de la protección frente al estrés provocado por el PHB. Este fue un resultado imprevisto, ya que se sabe que la expresión de proteínas heterólogas induce la respuesta a choque térmico en vez de reducirla. A la luz de estos hallazgos, se decidió analizar más profundamente

el efecto de PhaP en cepas no productoras de polímero. Dado que la transcripción de *ibpA* fue la más afectada por la expresión de *phaP*, se trabajó con una cepa de *E. coli* que posee una fusión del promotor de *ibpA* con el gen reportero *lacZ* (Bianchi & Baneyx, 1999). De esta forma, se analizó el efecto de PhaP en la viabilidad celular y la expresión de *ibpA* tanto en condiciones normales como de estrés. Los resultados mostraron que la expresión de *phaP* en cepas no productoras de PHB mejoró el crecimiento de la cepa en condiciones normales y aumentó la viabilidad celular tanto frente a estrés térmico como a estrés oxidativo por paraquat (Figura 11). Además, la cepa productora de PhaP redujo los niveles de expresión de *ibpA* tanto durante el crecimiento normal a 37° como en respuesta al choque térmico, y los niveles de RpoH durante el estrés térmico (de Almeida et al., 2011).

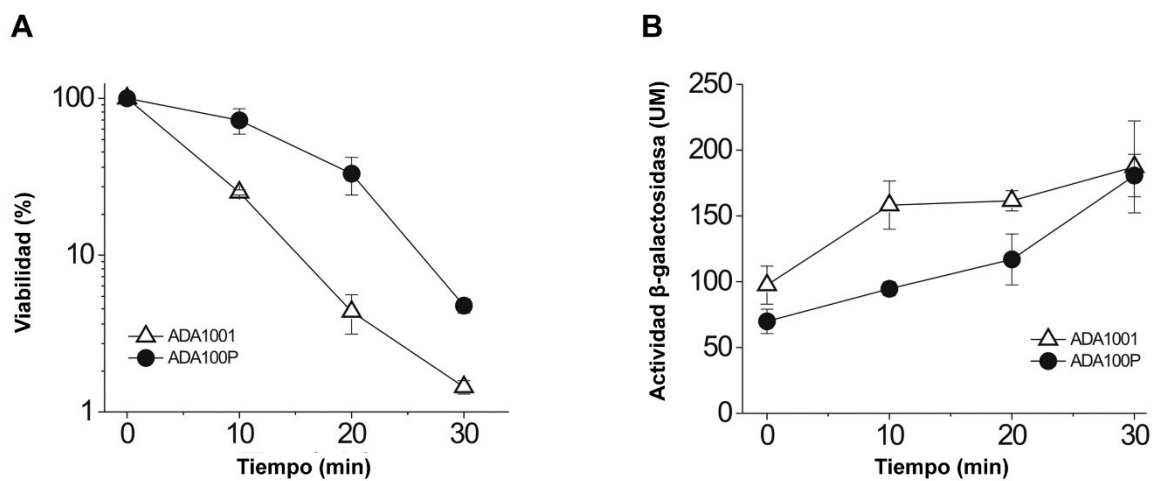


Figura 11. Resistencia a estrés térmico en presencia y ausencia de PhaP. La viabilidad (A) y la expresión de *ibpA* (B) se midieron en las cepas ADA1001 (cepa control) y ADA100P (expresa *phaP* de *Azotobacter* sp. FA8) después del choque térmico. Las células se cultivaron a 30 °C hasta una DO_{600} de 0,5 y luego se transfirieron a 52°C durante 30 min. Tomado de de Almeida et al., 2011.

El efecto protector observado con PhaP es similar al observado en cepas de *E. coli* que sobreexpresan *ibpA* e *ibpB* (Kitagawa et al., 2000). Esto sugirió que PhaP podría afectar el plegado proteico en forma similar a IbpA, hipótesis que se vio reforzada por la reducción en la expresión de *ibpA* en cepas que expresan *phaP*, tanto durante el crecimiento normal como en respuesta al choque térmico, y en los niveles de RpoH durante el choque térmico. Los trabajos que describen la unión de IbpA/B a los gránulos de PHB en ausencia de phasinas (Han et al., 2006; Tessmer et al., 2007) también aportan evidencia a favor de la hipótesis de una superposición de funciones entre IbpA y PhaP.

Caracterización de la estructura de PhaP de *Azotobacter* sp. FA8

Con el objetivo de poner a prueba la hipótesis de que PhaP de *Azotobacter* sp FA8 podría afectar el plegado proteico en forma similar a IbpA, se compararon sus estructuras primarias, pero no se encontraron similitudes significativas entre estas proteínas, ni tampoco entre PhaP y otras chaperonas o proteínas de *E. coli*. En consecuencia, se estudiaron distintos aspectos de la estructura de esta phasina para analizar la relación entre su estructura y su función.

El análisis de la estructura primaria de PhaP reveló que, a pesar de su capacidad de unión a gránulos lipídicos, esta proteína de 20 kDa no posee claros dominios hidrofóbicos. La predicción de su estructura secundaria estableció que PhaP presenta cuatro α -hélices de naturaleza anfipática, combinadas con regiones desestructuradas que confieren una notable flexibilidad dependiente del entorno. A partir de predicciones *in silico* se estimó que alrededor del 40/45% de la phasina puede ser desordenada cuando la misma no está unida a ningún blanco y este porcentaje podría llegar a descender a 23/30% al interactuar con otras moléculas. Con respecto a su estructura cuaternaria, los datos experimentales obtenidos revelaron que PhaP es un tetrámero formado por interacciones de tipo *coiled-coil* entre los monómeros. Todas estas características estructurales también fueron encontradas en otras phasinas y podrían estar relacionadas con su diversidad funcional (Mezzina et al., 2014).

Determinación de la actividad chaperona de PhaP de *Azotobacter* sp. FA8

A continuación, en nuestro laboratorio se realizaron varios experimentos para determinar si PhaP podría afectar el plegamiento de proteínas de manera similar a IbpA. En primer lugar, se buscó determinar si PhaP tenía actividad chaperona *in vitro*. Para ello se realizaron experimentos de desnaturalización térmica y química utilizando la enzima citrato sintasa dimérica (CS) como proteína modelo, en presencia de PhaP. Por un lado, el agregado de PhaP previo al tratamiento térmico de la muestra de CS no sólo frenó el proceso de agregación, sino que también disminuyó la cantidad de agregados formados (Figura 12A). Por otro lado, se observó que PhaP fue capaz de evitar la agregación espontánea que ocurre al diluir la CS previamente desnaturalizada mediante agentes químicos, en una condición de replegado (Figura 12B). Ambos efectos fueron aún más evidentes al ir aumentando la relación molar PhaP:CS. A partir de estos resultados se pudo concluir que PhaP tiene actividad chaperona *in vitro* (Mezzina et al., 2015).

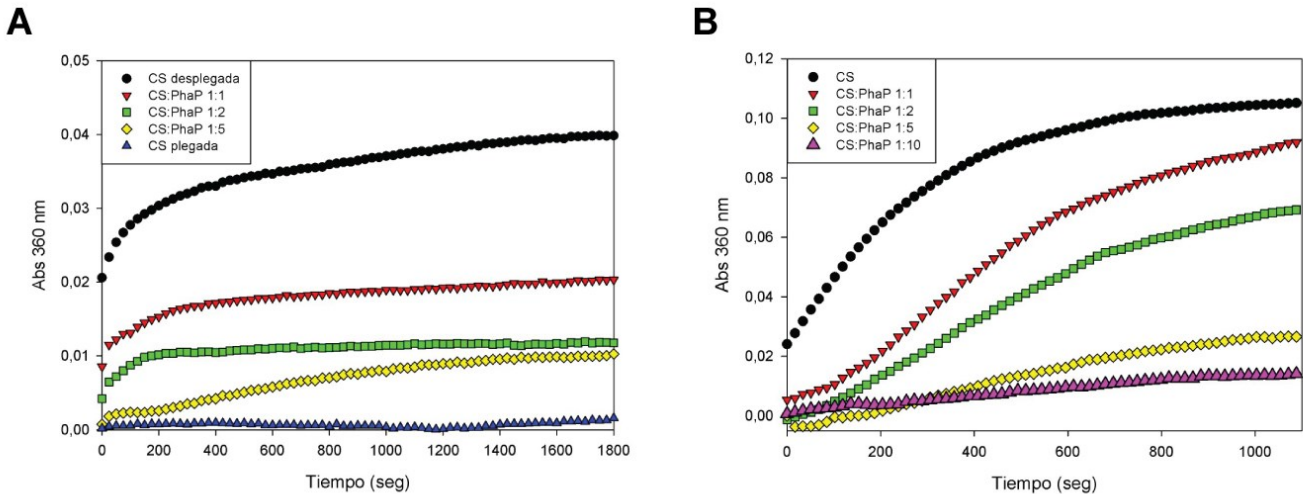


Figura 12. Actividad chaperona *in vitro* de PhaP de *Azotobacter* sp. FA8. A) Curvas de agregación térmica de la enzima citrato sintasa (CS) en presencia de distintas relaciones molares de PhaP. B) Curvas de agregación de la CS previamente desplegada mediante tratamiento con cloruro de guanidinio en presencia de distintas concentraciones de PhaP. Tomado de Mezzina et al., 2015.

Para estudiar si PhaP era capaz de evitar el plegado incorrecto de proteínas y la formación de cuerpos de inclusión (IB) *in vivo*, se construyó una cepa de *E. coli* recombinante que coproduce PhaP y PD, un dominio insoluble de la proteína TolR de *Azoarcus* sp. CIB que forma cuerpos de inclusión de gran tamaño al ser sobreexpresada en *E. coli*. El tamaño y la cantidad de IB fueron monitoreados mediante microscopía de transmisión. Cuando la proteína recombinante PD fue coexpresada con PhaP, se observó que el número de IB disminuyó sensiblemente luego de 24 h de cultivo. Estos resultados fueron similares a los obtenidos cuando PD fue coexpresada con la chaperona GroELS (Figura 13). Además, se observó mediante microscopía de fluorescencia que PhaP colocaliza con los cuerpos de inclusión *in vivo*, demostrando que la phasina tiene una interacción efectiva con las proteínas mal plegadas dentro de las células. Estos resultados demostraron que PhaP también presenta actividad chaperona *in vivo* en *E. coli* recombinante (Mezzina et al., 2015).

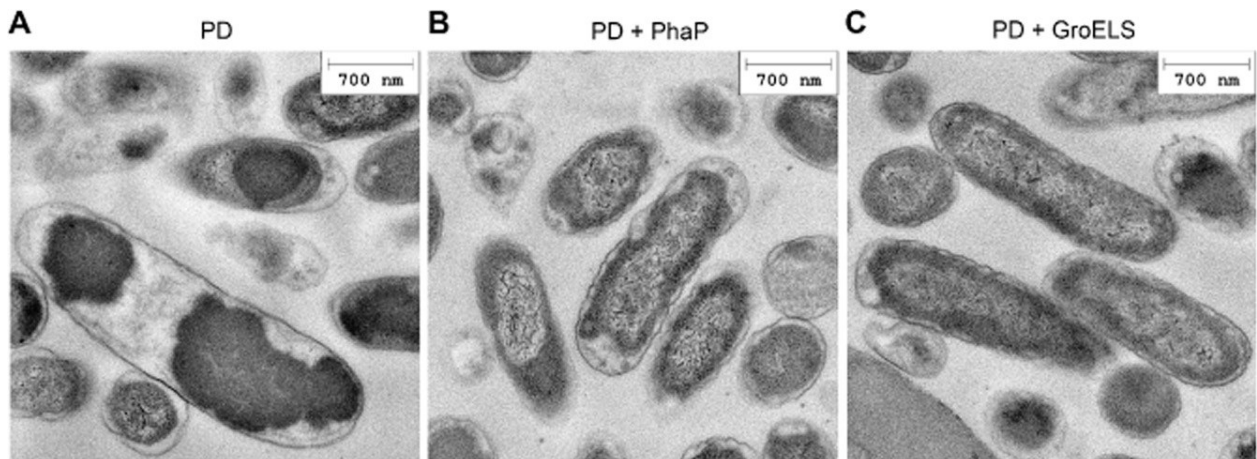


Figura 13. Actividad chaperona *in vivo* de PhaP de *Azotobacter* sp. FA8. Imágenes TEM de células de *E. coli* BL21 (DE3) que producen (A) PD, (B) PD y PhaP, (C) PD y GroELS. Tomado de Mezzina et al., 2015.

Si bien PhaP de *Azotobacter* sp. FA8 es la única phasina para la cual se ha demostrado la actividad de chaperona a través de evidencia directa tanto *in vitro* como *in vivo*, un trabajo de Ushimaru y colaboradores aporta evidencia al respecto de funciones similares a chaperonas en otras phasinas. Los investigadores analizaron la interacción de PhaP de *A. caviae* y PhaP de *C. necator* con diferentes PHA polimerasas y observaron que ambas phasinas aumentan la actividad de PhaC de *A. caviae*. Más aun, la presencia de PhaP de *A. caviae* no sólo aumenta la actividad de la PHA sintasa sino también su solubilidad en ensayos *in vitro*. Esto pone de manifiesto que PhaP de *A. caviae* afecta el plegado de la sintasa, por lo cual se le atribuyó un papel similar al de chaperona (Ushimaru et al., 2014).

Hipótesis y Objetivos

Esta tesis doctoral se enmarca dentro de una línea del laboratorio que investiga diferentes modificaciones en cepas bacterianas para mejorar la síntesis de productos de interés industrial. La producción microbiana de este tipo de compuestos conlleva varias limitaciones y desafíos, tales como la toxicidad del producto final y las condiciones de estrés propias de los procesos fermentativos, que afectan adversamente las tasas de crecimiento y reducen la viabilidad celular, limitando la capacidad productiva de las cepas. En nuestro laboratorio, hemos estudiado la phasina PhaP de *Azotobacter* sp. FA8, una proteína asociada a gránulos de polihidroxialcanoatos que posee actividad de chaperona. Dado que hemos demostrado que esta proteína tiene un efecto protector ante diferentes tipos de estrés en *E. coli*, planteamos la hipótesis de que los efectos beneficiosos de PhaP potenciarán la síntesis de diferentes compuestos de interés biotecnológico en *E. coli* y protegerán a las bacterias de los efectos adversos que surjan durante su producción. En particular, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Profundizar el análisis de los efectos beneficiosos de la phasina PhaP de *Azotobacter* sp. FA8. Analizar su efecto sobre la tolerancia a diferentes factores de estrés, con especial hincapié en posibles bioproductos y condiciones de estrés que podrían encontrarse en bioprocesos.
- Evaluar el uso de PhaP para mejorar la obtención de bioproductos. Analizar su efecto sobre la síntesis de proteínas recombinantes y la producción de solventes y precursores químicos tales como etanol, 1,3-propanodiol y estireno en *E. coli*.

Materiales y Métodos

Microorganismos, plásmidos y condiciones de cultivo

Cepas bacterianas y plásmidos utilizados

Las cepas de *E. coli* utilizadas se detallan en la Tabla 2, junto con los plásmidos utilizados en este trabajo. Las cepas fueron mantenidas a 4°C en placas de medio LB a través de pasajes sucesivos, con el agregado de antibióticos según el requerimiento de cada cepa. Para mantenimiento a largo plazo, se adicionó glicerol a cultivos de 18 h en medio LB hasta una concentración de 20% (m/v), y los glicerolados se guardaron a -70°C.

Tabla 2: Cepas de *E. coli* y plásmidos utilizados en este estudio

Cepas o plásmidos	Características relevantes ^a	Fuente
Cepas de <i>E. coli</i>		
ADA100	<i>araD139 Δ(argF-lac)U19 rpsL150 relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR λφ(ibp::lacZ)</i>	Bianchi & Baneyx, 1999
T850	<i>F- fhuA2::IS2 proA44 lacY1 glnX44(AS) gal λ hisG1 malT1(λR) xyl-7 mtIA2 ΔargH1 rplL9(L?) thiE1 groE1</i>	Takano & Kakefuda, 1972
T7 Express	<i>fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--TetS)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--TetS) endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10</i>	New England BioLabs
BL21(DE3)	<i>F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gen 1 ind1 sam7 nin5])</i>	Novagen
BL21 sty	BL21(DE3) conteniendo los plásmidos pS4412palRt y pS2311fdcSc	Este trabajo
Plásmidos		
pBBR1MCS-1	Vector de amplio rango de huésped; <i>lacPOZ' mob(RP4)</i> ; Cm ^r	Kovach et al., 1995
pSEVA328	Vector de amplio rango de huésped; <i>oriRK2, oriT; xylS-Pm</i> ; Cm ^r	Silva-Rocha et al., 2013
pADP	Derivado del vector pBBR1MCS-1 portando <i>phaP</i> de <i>Azotobacter</i> sp. FA8; Cm ^r	de Almeida et al., 2007
pGroELS1	Derivado del vector pBBR1MCS-1 portando <i>groELS</i> de <i>E. coli</i> ; Cm ^r	Este trabajo
pET _{Lm}	Derivado del vector pBluescript II KS(-) portando <i>adhE</i> de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ; Amp ^r	Nikel, Ramirez, Pettinari, Méndez, & Galvagno, 2010
pS221·PDO	Derivado del vector pSEVA221 portando <i>dhaR, dhaG, dhaT, dhaB, dhaC, dhaE, y dhaF</i> de <i>Klebsiella pneumoniae</i> GLC29; <i>oriRK2, oriT</i> ; Km ^r	Mezzina et al., 2017
pPhaP328	Derivado del vector pSEVA328 portando <i>phaP</i> de <i>Azotobacter</i> sp. FA8; Cm ^r	Este trabajo
pBbBG1	Derivado del vector pET-21a(+) portando <i>lacZ</i> (β-gal I, NCBI Ref. No. EFE90149.1) de <i>Bifidobacterium breve</i> DSM 20213; <i>ori f1</i> ; <i>ori pBR322</i> ; Amp ^r	Arreola et al., 2014
pBbBG2	Derivado del vector pET-21a(+) portando <i>lacZ</i> (β-gal II, NCBI Ref. No. EFE88654.1) de <i>Bifidobacterium breve</i> DSM 20213; <i>ori f1</i> ; <i>ori pBR322</i> ; Amp ^r	Arreola et al., 2014

pS4412palRt	Derivado del vector pSEVA4412 portando <i>pal</i> de <i>Rhodospiridium toruloides</i> ; pRO1600/colE1, <i>oriT</i> ; CprK/PDB3; Sm ^r	Donado por el Dr. Pablo Nickel
pS2311fdcSc	Derivado del vector pSEVA2311 portando <i>fdc1</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; pBBR1, <i>oriT</i> ; chnR-PchnB; Km ^r	Donado por el Dr. Pablo Nickel

^a Los marcadores de resistencia a antibióticos se identifican como se muestra a continuación: Amp, ampicilina; Cm, cloranfenicol, Km, kanamicina, y Sm, estreptomina.

Medios de cultivo

Para el mantenimiento rutinario y cultivo de las cepas, así como la mayor parte de los protocolos se utilizó medio LB. Para los experimentos de estireno también se utilizó el medio semi-definido M9 TE. En algunas técnicas de biología molecular se utilizó también el medio SOC.

Medio LB (por litro):

Triptona	_____	10 g
NaCl	_____	10 g
Extracto de levadura	_____	5 g
Agar (para medios sólidos)	_____	15 g

Medio mínimo M9 (por litro):

Na ₂ HPO ₄	_____	6 g
KH ₂ PO ₄	_____	3 g
NH ₄ Cl	_____	1 g
NaCl	_____	0,5 g
Citrato férrico de amonio*	_____	0,06 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O*	_____	0,04 g
CaCl ₂	_____	0,01 g

(*) Estas soluciones se autoclavan por separado y se agregan al medio antes de ser inoculado

Medio M9 TE (por litro):

Al medio mínimo M9 antes descrito se le adicionan:

Extracto de levadura	_____	0,5 g
Tiamina	_____	5 µg
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	_____	2,78 µg
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	_____	1,98 µg
CoSO ₄ ·7 H ₂ O	_____	2,81 µg
CuCl ₂ ·2 H ₂ O	_____	20,17 µg
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	_____	0,29 µg

SOC (por litro):

Triptona	_____	20 g
NaCl	_____	0,5 g
Extracto de levadura	_____	5 g
KCl 250mM*	_____	10 ml
MgCl ₂ 2 M*	_____	5 ml
Glucosa 1M*	_____	20 ml

(*) Estas soluciones se autoclavan por separado y se agregan al medio antes de ser inoculado

Antibióticos e inductores

Los antibióticos utilizados y sus concentraciones finales fueron: kanamicina (Km) 50 µg/ml, cloranfenicol (Cm) 20 µg/ml, estreptomina (Sm) 80 µg/ml y ampicilina (Amp) 100 µg/ml. Los inductores utilizados y sus concentraciones finales fueron: isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,5 mM o 1 mM, ácido m-toluico 1 mM o 2 mM, ciclohexanona 1 mM, y ácido 3-cloro-4-hidroxifenil acético (CHPA) 0,5 mM. En todos los casos, las soluciones se esterilizaron por filtración con una membrana de acetato de celulosa de 0,22 µm de poro.

Ensayos de tolerancia

Tolerancia a estrés osmótico

Para estos ensayos se utilizaron las cepas de *E. coli* ADA100, transformada con los plásmidos pADP (PhaP) o pBBR1MCS-1 (control), y la cepa de *E. coli* T850, transformada con los plásmidos pADP (PhaP), pGroELS1 (GroELS), o pBBR1MCS-1 (control). Se realizaron precultivos de las cepas dispersando una colonia fresca en 5 ml de medio LB suplementado con cloranfenicol, y se incubaron en un agitador orbital a 37°C y 200 rpm por 18 h. A partir de esos precultivos, se prepararon cultivos en botellas de vidrio de 50 ml conteniendo 20 ml de medio LB suplementado con cloranfenicol. Los mismos fueron inoculados a una densidad óptica (DO₆₀₀) inicial de 0,1 e incubados a 37°C con 200 rpm de agitación.

A los cultivos de la cepa T850 se les agregó 1mM de IPTG a los 30 min de crecimiento, con el objetivo de inducir la expresión de *phaP* y *groELS*. Las soluciones de NaCl o sacarosa fueron añadidas a los cultivos al cabo de otros 30 min post-inducción. En el caso de ADA100, al ser una cepa *lact*, no fue necesario inducir la expresión de *phaP* con IPTG y las soluciones estresoras se agregaron directamente al cabo de 1 h de crecimiento. En ambos casos, se añadieron 5 ml de las soluciones de NaCl o sacarosa en medio LB, obteniéndose así un volumen de 25 ml con la concentración final a ser utilizada en cada ensayo. Los cultivos control sin agentes estresores se realizaron añadiendo 5 ml de medio LB. Todos los cultivos fueron repetidos en triplicados biológicos independientes y la DO₆₀₀ de los mismos fue monitoreada por un periodo de 24 h.

Tolerancia a solventes

Para estos ensayos se utilizaron la cepa de *E. coli* ADA100, transformada con los plásmidos pADP (PhaP) o pBBR1MCS-1 (control), y la cepa de *E. coli* T850, transformada con los plásmidos pADP (PhaP),

pGroELS1 (GroELS), o pBBR1MCS-1 (control). Se realizaron precultivos de las cepas dispersando una colonia fresca en 5 ml de medio LB suplementado con cloranfenicol, e incubando en un agitador orbital a 37°C y 200 rpm por 18 h. A partir de esos precultivos, se prepararon cultivos en tubos Falcon de 50 ml conteniendo 20 ml de medio LB suplementado con cloranfenicol. Los mismos fueron inoculados a una DO_{600} inicial de 0,1 e incubados a 37°C con 200 rpm de agitación.

A los 30 min de crecimiento se añadió IPTG 1mM a los cultivos de la cepa T850 con el objetivo de inducir la expresión de *phaP* y *groELS*. Los solventes fueron añadidos a los cultivos al cabo de otros 30 min post-inducción. Como dijimos previamente, en el caso de ADA100, por ser una cepa *lacI*, no fue necesario inducir la expresión de *phaP* con IPTG y los estresores se agregaron directamente al cabo de 1 h de crecimiento. En ambos casos se añadió una solución de 5 ml del solvente (etanol, butanol o 1,3-PDO) diluido en medio LB, obteniéndose así un volumen de 25 ml con la concentración final de cada ensayo. Los cultivos control sin solventes se realizaron añadiendo 5 ml de LB. Todos los cultivos fueron repetidos en triplicados biológicos independientes y la DO_{600} de los mismos fue monitoreada por un periodo de 24 h.

Parámetros cinéticos de crecimiento

Con el objetivo de analizar el desempeño de las distintas cepas ante las distintas condiciones de estrés se calcularon diversos parámetros cinéticos de crecimiento. Los porcentajes de tolerancia (T) y de tolerancia relativa (RT) fueron calculado usando las ecuaciones 1 y 2 (Abdelaal et al., 2015; Borden & Papoutsakis, 2007), a partir de las medidas de DO_{600} a 6 y 24 h. Además, se calcularon el porcentaje de inhibición (I) y el coeficiente de *fitness* relativo (s) utilizando las ecuaciones 3 y 4, respectivamente (Reyes et al., 2013). Estos parámetros se calcularon usando la velocidad específica (máxima) de crecimiento (μ_{max}) de cada cepa, la cual fue determinada durante la fase de crecimiento exponencial temprano, de acuerdo con la ecuación 3.

$$\text{Tolerancia (T)(\%)} = \frac{DO_{600 \text{ estrés,t}} - DO_{600 \text{ estrés,to}}}{DO_{600 \text{ sin estrés,t}} - DO_{600 \text{ sin estrés,to}}} \times 100 \quad \text{Ec. (1)}$$

$$\text{Tolerancia relativa (RT)(\%)} = \left[\left(\frac{\text{Tolerancia}_{\text{PhaP estrés}}}{\text{Tolerancia}_{\text{control estrés}}} \right) - 1 \right] \times 100 \quad \text{Ec. (2)}$$

$$\mu_{max} = \ln\left(\frac{DO_{600}}{DO_{600i}}\right) \times \frac{1}{\Delta \text{tiempo}} \quad \text{Ec. (3)}$$

$$\text{Inhibición (I)(\%)} = \left[1 - \left(\frac{\mu_{\text{estrés}}}{\mu_{\text{sin estrés}}} \right) \right] \times 100 \quad \text{Ec. (4)}$$

$$\text{Coeficiente de Fitness relativo (s)(\%)} = \left[\left(\frac{\mu_{\text{PhaP estrés}}}{\mu_{\text{control estrés}}} \right) - 1 \right] \times 100 \quad \text{Ec. (5)}$$

Ensayos de producción

Producción de β -galactosidasas y determinación de su actividad

Los experimentos de síntesis de β -galactosidasas se llevaron a cabo utilizando la cepa T7 Express transformada con los plásmidos pBbBG1 y pBbBG2, que portan las secuencias codificantes de las proteínas β -gal I (NCBI Ref. No. EFE90149.1) y β -gal II (NCBI Ref. No. EFE88654.1) de la bacteria *B. breve* DSM 20213, respectivamente (Tabla 2). Estas cepas fueron a su vez transformadas con los plásmidos pPhaP328 (que expresa *phaP* de *Azotobacter* sp. FA8) y pSEVA328 (vector vacío). La utilización de la cepa T7 Express es fundamental para nuestro sistema de expresión dado que la misma posee una delección en su gen *lacZ* endógeno. Esto nos permite asegurar que la actividad β -galactosidasa que detectemos en los ensayos se debe únicamente a la expresión de las proteínas heterólogas.

Los precultivos se realizaron dispersando una colonia fresca en 5 ml de medio LB suplementado con cloranfenicol y ampicilina, y se incubaron en un agitador orbital a 37°C y 200 rpm por 18 h. Los cultivos fueron preparados en botellas de vidrio de 50 ml conteniendo 6 ml de medio LB suplementado con los antibióticos antes indicados. Los mismos fueron inoculados a una DO_{600} inicial de 0,1 e incubados a 30°C con 200 rpm de agitación. Al cabo de 1 h de crecimiento, se indujo la síntesis de las proteínas heterólogas como se indica a continuación: β -gal I con IPTG 0,5 mM, β -gal II con IPTG 1 mM y PhaP con ácido m-toluico 2mM. La inducción de las β -gal se realizó utilizando concentraciones de IPTG que habían sido previamente determinadas para un mayor rendimiento en este mismo sistema de expresión (Arreola et al., 2014).

Se tomaron muestras de 1 ml de los cultivos a las 6 y 24 h de crecimiento. Se determinó la DO_{600} de los mismos y luego se procedió a centrifugarlos a 13.000 rpm durante 10 min a 4°C. Los pellets se guardaron congelados a -20 °C hasta el momento de la medición.

Para determinar de la actividad β -galactosidasa se resuspendieron los pellets en 1 ml de Buffer Z, se agregaron 100 μ l de cloroformo y 50 μ l de SDS 0,1% para permeabilizar las células y se homogeneizó utilizando un agitador tipo vortex. A continuación, se incubó la mezcla durante 5 minutos a 30°C. Se agregaron 200 μ l de una solución preparada en el momento de oNPG (orto-nitrofenilgalactopiranosido) 4 mg/ml en Buffer Z. Luego de observar coloración, se detuvo la reacción agregando 500 μ l de Na_2CO_3 1M, tomando nota del tiempo transcurrido, y se midió la absorbancia de las muestras a 420 nm. La actividad enzimática se expresó en unidades de Miller, las cuales fueron calculadas de acuerdo con la ecuación 6.

$$Actividad (UM) = \frac{Abs_{420nm} \times 1.000}{vol(ml) \times tiempo(min) \times Abs_{600nm}} \quad Ec. (6)$$

Buffer Z (pH 7):

Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O	_____	60 mM
NaH ₂ PO ₄	_____	40 mM
KCl	_____	10 mM
MgSO ₄	_____	1 mM
β-mercaptoetanol	_____	50 mM (agregado en el momento)
pH	7	

Producción de etanol

Los experimentos de producción de etanol se llevaron a cabo utilizando la cepa ADA100 transformada con los plásmidos pET_{Lm} (que porta el gen *adhE* de *L. mesenteroides*) y pADP (PhaP). La misma cepa transformada con pET_{Lm} y pBBR1MCS-1 fue utilizada como control (Tabla 2). Los precultivos se realizaron dispersando una colonia fresca en 5 ml de medio LB suplementado con cloranfenicol y ampicilina, y se incubaron en un agitador orbital a 37°C y 150 rpm por 18 h (condiciones de microaerobiosis). Los cultivos fueron preparados en tubos Falcon de 15 ml conteniendo 10 ml de medio LB suplementado con los antibióticos antes indicados y 10 g/l de glucosa. Los mismos fueron inoculados a una DO₆₀₀ inicial de 0,1 e incubados a 37°C con 150 rpm de agitación. Dado que la expresión de *adhE* a partir de pET_{Lm} así como de *phaP* a partir de pADP están bajo el control de promotor *lac* y ADA100 es una cepa *lacI*⁻, no fue necesario necesario inducir con IPTG. La DO₆₀₀ y la producción de etanol de los cultivos fue monitoreada por un periodo de 24 h. Como se indica más adelante, las concentraciones de etanol y glucosa remanente fueron determinadas por cromatografía gaseosa (GC) y mediante un kit comercial, respectivamente.

Producción de 1,3-PDO

Los experimentos de producción de 1,3-PDO se llevaron a cabo utilizando la cepa ADA100 transformada con los plásmidos pS221·PDO y pADP. La misma cepa transformada con pS221·PDO y el vector vacío pBBR1MCS-1 fue utilizada como control (Tabla 2). El operón *dha* clonado en el plásmido pS221·PDO contiene su propio regulador endógeno, de modo que la síntesis de 1,3-PDO en este sistema es regulable por el agregado de glicerol, que actúa como sustrato de la vía, y por el agregado de vitamina B12, ya que una de las enzimas de la vía es B12-dependiente.

Los precultivos se realizaron dispersando una colonia fresca en 5 ml de medio LB suplementado con cloranfenicol y kanamicina, y se incubaron en un agitador orbital a 37°C y 200 rpm por 18 h. Los cultivos fueron preparados en botellas de vidrio de 50 ml conteniendo 5 ml de medio LB suplementado con los antibióticos antes indicados, 40 g/l de glicerol y 0,15 mM de vitamina B12. Los mismos fueron inoculados a una DO_{600} inicial de 0,1 e incubados a 37°C con 200 rpm de agitación. La DO_{600} y la producción de 1,3-PDO de los cultivos fue monitoreada por un periodo de 24 h. Las concentraciones de 1,3-PDO y glicerol remanente fueron determinada por GC como se indica más adelante.

Producción de estireno

Los experimentos de producción de estireno se llevaron a cabo utilizando la cepa BL21(DE3) transformada con los plásmidos pS4412palRt, pS2311fdcSc y pPhaP328. La misma cepa transformada con pS4412palRt, pS2311fdcSc y el vector vacío pSEVA328 fue utilizada como control. Los precultivos se realizaron dispersando una colonia fresca en 5 ml de medio de cultivo (LB o M9 TE) suplementado con estreptomycin, cloranfenicol y kanamicina, y se incubaron en un agitador orbital a 37°C y 200 rpm por 18 h. Los cultivos fueron preparados en medio LB o M9 TE, suplementado con los antibióticos antes indicados, 10 g/l de glucosa y 2 g/l de L-Phe. Los mismos fueron inoculados a una DO_{600} inicial de 0,1 e incubados a 37°C con 200 rpm de agitación. La inducción de los cultivos se realizó como se detalla a continuación: a los 30 min de crecimiento se añadió ácido m-toluico 1mM con el objetivo de inducir la expresión de *phaP*, y al cabo de otros 30 min (post-inducción) se añadió CHPA 0,5 mM y ciclohexanona 1mM con el objetivo de inducir la expresión de *pal* y *fdc1*, respectivamente.

Para evitar la pérdida del producto, las cepas fueron crecidas en botellas cerradas con tapones de goma y precintos de aluminio. Para mantener una atmósfera aeróbica se utilizó una relación de volumen de cultivo:volumen del frasco ($V_c:V_f$) de 1:10 (botellas de vidrio de 50 ml conteniendo 5 ml de medio) o 1:20 (botellas de vidrio de 100 ml conteniendo 5 ml de medio). Además, se ensayaron dos condiciones de crecimiento: cultivos monofásicos (sin fase orgánica añadida) y cultivos bifásicos, en los cuales se añadió 1 ml de n-dodecano al medio con el fin de realizar una recuperación *in situ* del producto (Figura 14). Se utilizó una fracción de volumen de solvente de 0,2 dado que en trabajos previos se había observado que era suficiente para extraer adecuadamente el estireno de la fase acuosa que contiene las células (McKenna et al., 2015).

Dada la naturaleza volátil del estireno, la DO_{600} de los cultivos y el título de producto final fueron determinadas sólo a tiempo final, al cabo de 24 h de crecimiento. La concentración de estireno, L-Phe y glucosa fueron determinadas por GC, HPLC y un kit comercial, respectivamente.

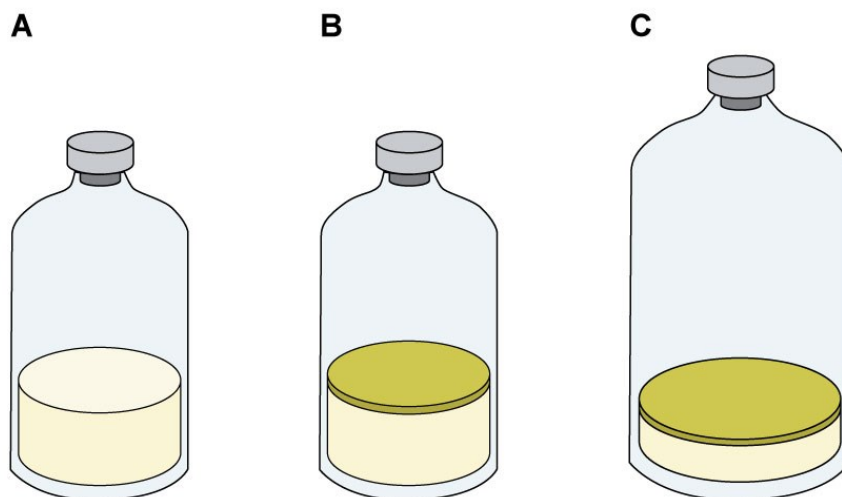


Figura 14. Recipientes y condiciones utilizadas en los ensayos de síntesis de estireno. A) Cultivos monofásicos en frascos de Vc:Vf 1:10 (botellas de 50 ml conteniendo 5 ml de medio). B) Cultivos bifásicos en frascos de Vc:Vf 1:10 (botellas de 50 ml conteniendo 5 ml de medio y 1 ml de n-dodecano). C) Cultivos bifásicos en frascos de Vc:Vf 1:20 (botellas de 100 ml conteniendo 5 ml de medio y 1 ml de n-dodecano). Vc:Vf: relación volumen de cultivo:volumen del frasco.

Técnicas de biología molecular

Construcciones de plásmidos

Construcción del plásmido pGroELS1

En el laboratorio se contaba con el plásmido pT-groE (Yasukawa et al., 1995), que porta un fragmento de DNA de 2,1 kb que contiene la región con los genes que codifican GroELS. Estos genes fueron amplificados por PCR usando el par de oligonucleótidos indicados en la Tabla 3, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 seg, alineamiento a 59°C por 30 seg y amplificación a 72°C por 2 min, y una extensión final a 72°C por 10 min. El amplicón obtenido fue cortado con las enzimas de restricción *Hind*III y *Bam*HI, y luego clonado en el vector pBBR1MCS-1 (bajo el control del promotor *lac*) cortado con las mismas enzimas. La construcción fue verificada por PCR y electroforesis en gel de agarosa, utilizando los mismos oligonucleótidos usados para la amplificación. La expresión de GroELS se verificó mediante SDS-PAGE.

Construcción del plásmido pPhaP328

Para la amplificación del gen *phaP* de *Azotobacter* sp. FA8 se utilizó como templado el plásmido pADP. Dado que los vectores pSEVA carecen de una secuencia de unión al ribosoma, al diseñar el oligonucleótido *forward*, añadimos un sitio sintético de unión a ribosoma conteniendo la secuencia Shine-Dalgarno de *lacZ* (Miller & Lindow, 1997), precediendo la secuencia del gen.

La reacción de PCR se realizó utilizando los oligonucleótidos indicados en la Tabla 3, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguido de 34 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 seg, alineamiento a 53°C por 30 seg y amplificación a 72°C por 2 min, y una extensión final a 72°C por 10 min. El amplicón obtenido fue cortado con las enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI*, y luego clonado en el vector pSEVA328 (bajo el control del promotor *xyIS-Pm*) cortado con las mismas enzimas. La construcción fue verificada por PCR y electroforesis en gel de agarosa, utilizando los mismos oligonucleótidos usados para la amplificación. La expresión de PhaP fue verificada por western blot.

Tabla 3: Oligonucleótidos utilizados para el clonado de los vectores pGroELS1 y pPhaP328

Vector	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Tm ^a	Amplicón esperado
pGroELS1	GroESL-F	ATT AAG CTT ACA CAG GAA ACA GCT ATG AAT ATT CGT CCA TTG	63,5°C	1,9 kb
	GroESL-R	AAA GGA TCC TTA CAT CAT GCC GCC CAT GCC	64,4°C	
pPhaP328	PhaP-F	ATT GGA TCC ACA CAG GAA ACA GCT ATG GCT TTT TTT GAT CTG	64,5°C	601 b
	PhaP-R	TCG AAG CTT GCC GTC AGG CAG TCT T	64,4°C	

^a Temperatura de *melting*.

Extracción de DNA plasmídico

Para la obtención de DNA plasmídico con alto grado de pureza se utilizó el kit comercial EasyPure® Plasmid MiniPrep Kit (Transgen Biotech), y se procedió siguiendo las especificaciones del fabricante.

Cuando los aislamientos de plásmidos se realizaron con el fin de verificar construcciones se utilizó el protocolo indicado a continuación. Dependiendo del número de copias del vector a extraer, se tomaron 1-5 ml de un cultivo *overnight* (ON) en LB suplementado con el antibiótico correspondiente, y se centrifugaron durante 5 minutos a 6.000 rpm. El pellet celular obtenido se resuspendió en 0,2 ml de Buffer 1 y luego se le añadió 0,2 ml de Buffer 2. Se mezcló por inversión de 4 a 5 veces y se incubó

a temperatura ambiente durante 5 min. A continuación, se agregaron 0,2 ml de Buffer 3 frío, se mezcló nuevamente por inversión y se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se pasó a un tubo limpio, al cual se le adicionaron 0,9 ml de etanol absoluto para precipitar el DNA plasmídico. Luego, el tubo se volvió a centrifugar durante 20 min, se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado del pellet con etanol 70%. Se descartó el etanol y se dejó secar el pellet, para luego resuspenderlo en 0,4 ml de agua deionizada.

Buffer 1: Tris-Cl 10 mM; pH 8,0; EDTA 1 mM; RNasa A 10 µg/ml

Buffer 2: NaOH 200 mM; SDS 1% (v/v)

Buffer 3: Acetato de potasio 3 M; pH 4,8

Reacciones de restricción y ligado

La digestión con enzimas de restricción (marca New England Biolabs o Promega) se realizó siguiendo protocolos estándares y las instrucciones de los fabricantes. Las reacciones de ligado se realizaron utilizando la enzima T4 DNA ligasa de New England Biolabs, siguiendo las especificaciones del fabricante. La relación DNA inserto/DNA vector fue de 3:1. La reacción se llevó a cabo por un periodo de 16 h a 16°C u ON a 4 °C.

Purificación y cuantificación de DNA

Se utilizó el kit comercial EasyPure® PCR Purification Kit (TransGen Biotech) para la purificación de fragmentos de DNA obtenidos por PCR o tratados con enzimas de restricción. El DNA se cuantificó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific) con su correspondiente software.

Electroforesis en geles de agarosa

La concentración de los geles de agarosa varió entre 0,7% y 1% (m/v), según el tamaño del fragmento a analizar. Las electroforesis se realizaron utilizando buffer TAE a 100 volts en cubas de Sigma (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA). Se utilizaron marcadores de peso molecular 1 kb o 100 pb, dependiendo del tamaño del fragmento a analizar. Los geles se tiñeron con solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml) 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.

TAE 50X (por litro):

Tris base _____ 242 g
 Ácido acético glacial _____ 57,1 ml
 EDTA 0,5 M (pH 8,0) _____ 100 ml

Buffer de siembra 6X (por 100 ml):

Azul de bromofenol _____ 0,25 g
 Sacarosa _____ 40 g

Preparación de células competentes

Para la obtención de células competentes de las cepas de *E. coli* requeridas se inocularon 10 ml de LB con dos o tres colonias aisladas de un cultivo de 24 horas realizado en medio sólido y se incubaron ON a 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 inicial de 0,05. Se incubó a 37°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. Al cabo de dicho tiempo, se centrifugó por 10 min a 4.000 rpm y 4°C para obtener el pellet celular. Los pasos posteriores varían según si se prepararon células competentes por tratamiento químico (quimiocompetentes) o electrocompetentes.

- Quimiocompetentes: El pellet se resuspendió en 8 ml de una solución de CaCl₂ 0,1 M fría. Se incubó 1 hora a 4°C y luego se centrifugó por 10 min a 4°C y 4.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue suavemente resuspendido en 200 µl de CaCl₂ 0,1 M y glicerol 10 % (m/v).
- Electrocompetentes: El pellet se lavó tres veces con 50 ml de glicerol 10% (m/v) en agua destilada y finalmente se resuspendió en 400 µl de la misma solución de lavado.

En cualquiera de los casos las células se separaron en alícuotas de 50 µl. Las mismas se conservaron a -70°C hasta su utilización.

Transformación de células competentes

Dependiendo del tratamiento realizado para obtener las células competentes, se procedió como se indica a continuación:

- Quimiocompetentes: Se añadieron 5-10 µl de DNA (10-50 ng) a 50 µl de células competentes, y se incubó durante 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. Para la recuperación de las células

competentes se agregaron 500 μ l de SOC y se incubó 1 hora a 37°C con agitación constante (150 rpm). Al terminar el período de recuperación, las células se centrifugaron por 5 min a 5.000 rpm y el pellet se sembró en placas con medio de selección según correspondiese.

- Electrocompetentes: 2 μ l de DNA se agregaron a 50 μ l de células electrocompetentes. 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 las células competentes se agregó 1 ml de SOC y se incubó 1 hora a 37°C con agitación constante (150 rpm). Al terminar el período de recuperación se centrifugaron las células por 5 min a 5.000 rpm y se sembró el pellet celular en placas con medio de selección según correspondiese.

Técnicas para el estudio de proteínas

Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Cuando fue necesario corroborar la sobreexpresión de alguna proteína, se corrió el extracto proteico en un gel de poliacrilamida. El extracto proteico se preparó tomando 1 ml de cultivo, centrifugando a 6.000 rpm por 5 min. El pellet obtenido fue resuspendido en 100 μ l de solución fisiológica. En un tubo nuevo, se mezclaron 30 μ l de la solución celular y 10 μ l de buffer de siembra. Este tubo fue luego calentado en baño de glicerol a 100°C durante 5 min. Una vez calentada, la muestra ya está lista para sembrar, o puede ser almacenada a -20°C hasta el momento de su siembra.

Las electroforesis desnaturalizantes en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) se realizaron en una cuba de electroforesis vertical (10 cm \times 10 cm \times 1 mm; BioRad Labs.). Se utilizó una concentración de acrilamida de 12% (v/v) en el gel separador y de 4,5% (v/v) en el gel concentrador. La electroforesis se llevó a cabo con amperaje constante (25 mA) hasta que las muestras atravesaron el gel concentrador; a partir de ese momento la corriente se aumentó a 35 mA. Los geles se tiñeron en una solución de 0,25% (m/v) de Coomassie Brilliant Blue R-250 en 45% (v/v) de metanol y 10% (v/v) de ácido acético durante una hora. Para decolorar, se dejaron ON en una solución de 40% (v/v) de metanol y 10% (v/v) de ácido acético.

Solución de acrilamida 30% (para 500 ml):

Acrilamida _____ 146 g
N,N'-Metilen-bisacrilamida _____ 4 g

Buffer gel separador (4X, para 500 ml):

Tris base _____ 90,83 g
SDS _____ 2 g

Se lleva a pH 8,8 con HCl

Buffer gel concentrador (4X, para 500 ml):

Tris base_____30,23 g

SDS_____2 g

Se lleva a pH 6,8 con HCl

Gel separador (12%) (para 25 ml):

Buffer gel separador 4X_____6,25 ml

Sc. acrilamida 30%_____10 ml

Persulfato de amonio 10%_____0,130 ml

TEMED_____0,014 ml

Agua deionizada_____8,606 ml

Gel concentrador (4,5%) (para 10 ml):

Buffer gel concentrador 4X_____2,5 ml

Sc. acrilamida 30%_____1,5 ml

Persulfato de amonio 10%_____0,04 ml

TEMED_____0,02 ml

Agua deionizada_____6 ml

Buffer de corrida (por litro):

Tris base_____3 g

Glicina_____14,4 g

SDS_____1 g

Buffer de siembra (4X, para 10 ml):

Tris 0,25M (pH 6,8)_____5 ml

SDS_____0,6 g

Sacarosa_____4 g

Azul de bromofenol_____0,004 g

2-mercaptoetanol_____2 ml

Western blot

Luego del SDS-PAGE, se incubó el gel en buffer de transferencia durante 20 min. Se utilizó una membrana de PVDF, la cual fue sumergida en metanol durante unos segundos para su activación y luego en buffer de transferencia durante 20 minutos. A continuación, se armó el sándwich de transferencia de la siguiente manera: 3 papeles Whatman embebidos en buffer de transferencia, membrana, gel, 3 papeles Whatman embebidos en buffer de transferencia. El sándwich se colocó en un aparato de transferencia semiseco (TE70, ECL Semi-Dry Transfer Unit, Amersham Biosciences) y se corrió a 80 mA durante 40 min. Luego de la transferencia, se procedió a realizar el bloqueo. Para ello,

la membrana se incubó en la heladera ON en TBS Tween 0,5% (v/v) con 5% (m/v) de leche descremada. Al día siguiente se lavó la membrana 2 veces con TBS Tween 0,5% (v/v) y una vez con TBS. Luego se incubó con agitación a temperatura ambiente durante 1 hora con una dilución 1/10.000 del suero anti-PhaP en TBS con BSA 3% (m/v). Tras dicho período de incubación, se realizaron 2 lavados con TBS Tween 0,5% (v/v) y un último lavado con TBS. Posteriormente, se incubó durante 1 hora con una dilución 1/10.000 del anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina (NEN Life Sciences Products) en TBS Tween 0,01% (v/v) con 5% (m/v) de leche descremada. Finalmente, se realizaron 3 lavados al igual que en el caso anterior. Las proteínas fueron reveladas mediante una reacción de quimioluminiscencia, para la cual se mezcló, en el momento del revelado, 1ml de solución de revelado A y 1 ml de solución de revelado B y se cubrió con ella la membrana. Luego, se expuso la membrana en una cámara Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences).

Buffer de transferencia (por litro):

Tris base	5,8 g
Glicina	2,88 g
SDS	0,37 g
Metanol	200 ml

TBS 1X:

Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
NaCl	150 mM

Solución A (10 ml):

Luminol 250 mM	0,1 ml
Ac. Cumárico 90 mM	0,044 ml
Tris 1M (pH 8,5)	1 ml
Agua deionizada	8,856 ml

Solución B (1 ml):

H ₂ O ₂ 30%	0,64 µl (se agrega en el momento)
Tris 1M (pH 8,5)	0,1 ml
Agua deionizada	0,9 ml

Métodos analíticos

Determinación de etanol, 1,3-PDO y glicerol

Los estándares se prepararon en medio LB. Para las determinaciones por cromatografía gaseosa, 250 µl del estándar correspondiente fueron disueltos en 750 µl de etanol o acetona para la determinación de glicoles (1,3-PDO y glicerol) y etanol, respectivamente. Dichas diluciones se agitaron en vórtex

durante 1 minuto y luego se centrifugaron a 9.000 rpm por 3 minutos a 4°C para la precipitación de sales. Las muestras biológicas fueron filtradas a través de membranas de nylon de 0,22 µm y luego disueltas en el solvente correspondiente y centrifugadas como se describió previamente para los estándares. Los compuestos fueron medidos usando un cromatógrafo gaseoso 7820 A equipado con un detector de ionización de llama (FID) y un muestreador automático de líquidos ALS 7693 (Agilent, CA, EE. UU.). La separación se realizó utilizando una columna capilar HP-INNOWAX (30 m, espesor de película de 0,25 µm y diámetro interno de 0,25 mm) con N₂ como gas portador.

Para la determinación de 1,3-PDO y glicerol se utilizó un método que permite la determinación simultánea de ambos compuestos (Egoburo et al., 2017). El horno GC se calentó a 185°C durante 3 min, luego se calentó hasta 220°C a una velocidad de 40°C/min, y se mantuvo durante 1 min. Las temperaturas del inyector y del FID se ajustaron a 290°C y 300°C, respectivamente, y el flujo de la columna de gas fue de 2,5 ml/min. El volumen de inyección fue de 2 µl y la relación de *split* fue de 30:1.

Para la determinación de etanol, la temperatura del horno se ajustó a 35°C durante 8 min. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 150°C y 300°C, respectivamente, y el flujo de nitrógeno fue de 1 ml/min. El volumen de inyección fue de 1 µl y la relación de *split* fue de 90:1.

Determinación de glucosa

La glucosa remanente se midió en sobrenadantes de cultivos utilizando el kit de determinación de glucosa de Wiener Laboratorios SAIC (Rosario, Argentina). Para ello, se centrifugó 1 ml de cultivo y se diluyó el sobrenadante 1:4 en agua bidestilada. Las muestras procesadas fueron entonces analizadas siguiendo las instrucciones del kit. La reacción colorimétrica se midió con un espectrómetro UV-Vis ajustado a 505 nm. Para la cuantificación se prepararon patrones de concentraciones conocidas de glucosa.

Determinación de estireno

Dado que el estireno tiene baja solubilidad en agua (0,03% a 20 °C), fue necesario realizar una extracción con hexano antes de determinar su concentración mediante cromatografía gaseosa. Para ello, una vez cosechados los cultivos, se los incubó a 4°C por 20 min. Al cabo de ese tiempo, se les añadieron 2 ml de hexano a los cultivos monofásicos (5 ml) y se los agitó durante 2 min utilizando un vortex. La mezcla bifásica se centrifugó a 4.000 rpm durante 10 min a 4°C para sedimentar las células

y sales. Finalmente, se retiró 1 ml de la fase orgánica para su análisis por GC y se guardó 1 ml de fase acuosa para la determinación de fenilalanina y glucosa. En el caso de los cultivos bifásicos, que ya tenían 1 ml de dodecano, se añadió sólo 1 ml de hexano. Luego se procedió de igual manera que con los cultivos monofásicos.

Los estándares de estireno se prepararon en las mismas botellas de vidrio utilizadas para los cultivos. Se prepararon 5 ml del medio de cultivo utilizado, al cual se le añadieron 0,28 µl de estireno para obtener una concentración final de 50 mg/l. Al estándar de los cultivos bifásicos se le añadió también 1 ml de dodecano. Luego los estándares fueron incubados a 4°C por 20 min. Al cabo de dicho tiempo, se realizó la extracción con hexano de acuerdo a lo anteriormente descrito.

La concentración de estireno fue determinada por cromatografía gaseosa, utilizando una columna no polar HP-5 (30 m, espesor de película de 0,25 µm y diámetro interno de 0,32 mm) con N₂ como gas portador. La temperatura del horno se ajustó a 40°C durante 12 min. Luego se aumentó hasta 315°C, temperatura a la cual se mantuvo por 3 min. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 250°C y 300°C, respectivamente, y el flujo de nitrógeno fue de 25 ml/min. El volumen de inyección fue de 1 µl y la relación de *split* fue de 90:1.

Determinación de fenilalanina

La fenilalanina remanente se midió en sobrenadantes de cultivos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para ello, se diluyeron los sobrenadantes 1:3 en agua bidestilada y luego se filtraron a través de membranas de nylon de 0,22 µm. Las muestras procesadas se guardaron a 4°C hasta el momento del análisis. La fenilalanina fue detectada utilizando un equipo de HPLC (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, Maryland, EE.UU.) con una columna de fase reversa (ZORBAX Eclipse Plus C18; Agilent Technologies) y un detector UV-Vis (SPD-10A, Shimadzu Scientific Instruments) a una longitud de onda de 210 nm. La elución se desarrolló utilizando metanol 40% (v/v) y ácido trifluoroacético 0,1% (v/v) como fase móvil con un flujo constante de 0,4 ml/min a temperatura ambiente.

Determinación de ácidos orgánicos

Los ácidos de fermentación fueron determinados en los sobrenadantes de cultivos mediante HPLC. Para ello, los sobrenadantes obtenidos por centrifugación de muestras de 1 ml fueron diluidos 1:5 en agua bidestilada y filtrados a través de membranas de 0,22 µm de poro, y se guardaron a 4°C hasta el

momento del análisis. Los ácidos (citrato, piruvato, acetato, D-lactato, formiato y succinato) fueron detectados utilizando un equipo de HPLC con una columna de intercambio de cationes (Aminex HPX-87H; BioRad Labs., Hercules, California, EE.UU.) y un detector UV-Vis. La elución se desarrolló utilizando H_2SO_4 5 mM como fase móvil con un flujo constante de 0,6 ml/min, y la columna fue operada a 50°C.

Los resultados obtenidos fueron expresados en función del peso seco de biomasa. La conversión de densidad celular (DO_{600}) a gramos de biomasa se realizó considerando que una unidad de DO_{600} corresponde a 0,3 g/l de peso seco. Esta equivalencia es normalmente utilizada en bibliografía (Krause et al., 2010) y también fue corroborada con curvas de calibración (DO_{600} vs peso seco) en nuestro laboratorio.

Análisis estadísticos

Los experimentos realizados en este trabajo de tesis fueron repetidos independientemente al menos 3 veces, reportándose el valor medio del parámetro correspondiente \pm su desviación estándar. Cuando se realizaron comparaciones entre dos cepas, las diferencias en los resultados fueron evaluadas mediante una prueba t de Student a 2 colas, definiendo un p-valor $< 0,05$ como significativo. Para hacer comparaciones entre 3 o más cepas, los resultados se analizaron aplicando un ANOVA de un factor seguido de un test de Tukey HSD, definiendo como significativo un p-valor $< 0,05$. Los análisis estadísticos como los supuestos de las pruebas utilizadas fueron realizados con el software InfoStat.

Resultados

Capítulo I: Protección brindada por PhaP ante diferentes tipos de estrés

Efecto de PhaP ante el estrés osmótico

En experimentos previos realizados en nuestro laboratorio se había observado que la expresión de *phaP* de *Azotobacter* sp. FA8 protege a *E. coli* del estrés térmico y oxidativo. Con el objetivo de continuar estudiando los efectos beneficiosos de esta proteína, nos resultó de interés analizar su capacidad de proteger a las células frente al estrés osmótico. Para ello, trabajamos con la cepa de *E. coli* ADA100, transformada con los plásmidos pADP (que expresa *phaP* de *Azotobacter* sp. FA8 bajo el control del promotor *lac*), o pBBR1MCS-1 (plásmido vacío, cepa control) (Tabla 2).

Lo primero que hicimos fue analizar el crecimiento de las cepas obtenidas en ausencia de agentes estresores. Para ello, se crecieron las cepas en medio LB, a 37°C con una agitación de 200 rpm, y se monitoreó la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) durante 24 h. En estas condiciones, no se observaron diferencias significativas entre la cepa productora de PhaP y la cepa control en la velocidad específica (máxima) de crecimiento (μ_{max} , ecuación 3 en Materiales y métodos) ($1,04 \pm 0,06 \text{ h}^{-1}$ vs $0,97 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$, valores calculados a partir de las horas 1 a 3 de las curvas de crecimiento) ni en la DO_{600} final ($3,9 \pm 0,2$ vs $3,8 \pm 0,1$) (Figura 15).

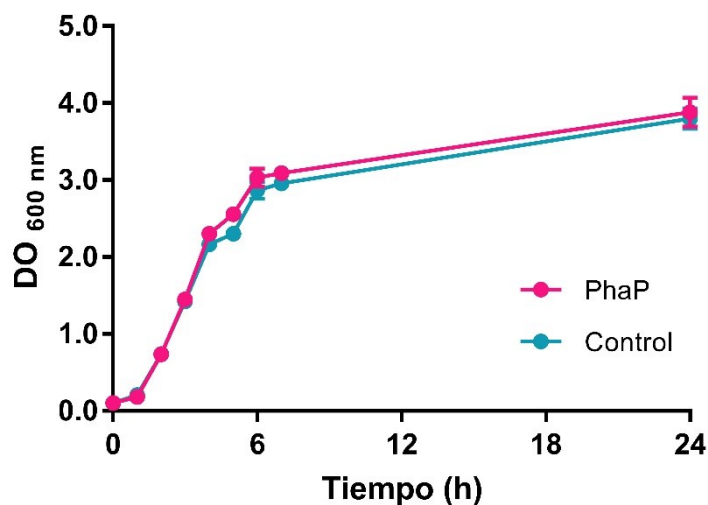


Figura 15. Curvas de crecimiento de las cepas de *E. coli* ADA100/pADP2 (PhaP) y ADA100/pBBR1MCS-1 (control), en ausencia de agentes estresores. Los experimentos fueron realizados en medio LB en condiciones de aerobiosis (200 rpm). Las barras de error indican \pm desvío estándar entre triplicados. $DO_{600 \text{ nm}}$: densidad óptica medida a 600 nm.

Para estudiar el desempeño de estas cepas en presencia de estrés osmótico, se desafió a ambas cepas con dos concentraciones de NaCl distintas: 0,7 M y 1 M (Figura 16). En ambos casos, al cabo de 24 h de crecimiento, se observó que los cultivos presentaban flóculos o sedimentos ocasionados por el estrés de crecer en altas concentraciones de sal. Esto dificultó la medición de las absorbancias (DO_{600})

finales de los cultivos que, como se puede ver, tienen mayor error que las de los tiempos previos. Durante la fase de crecimiento exponencial, en cambio, es posible observar diferencias entre la cepa que expresa *phaP* y la cepa control, en ambas concentraciones de NaCl. No obstante, dado que en presencia de NaCl 0,7 M las cepas crecieron más, y se podían apreciar mejor las diferencias, elegimos continuar los análisis con esta concentración.

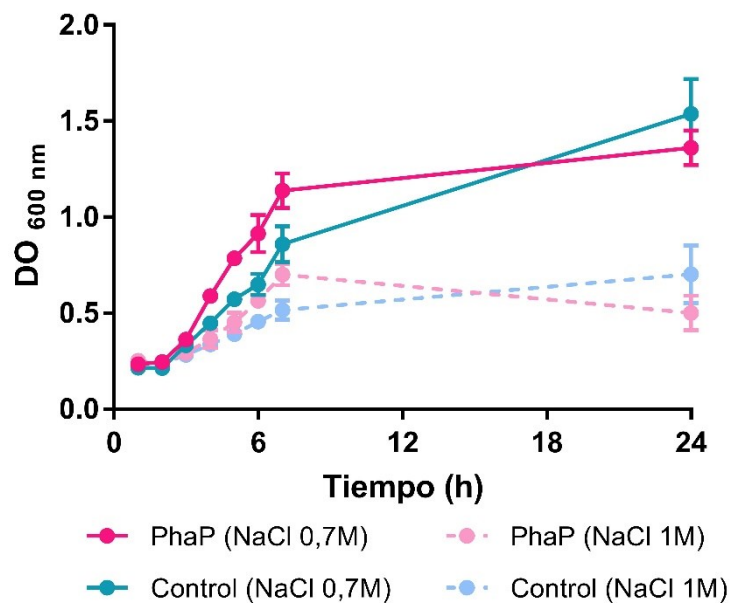


Figura 16. Tolerancia a estrés osmótico por NaCl de la cepa de *E. coli* ADA100. Se muestran las curvas de crecimiento de ADA100/pADP2 (PhaP) y ADA100/pBBR1 (control) en presencia de NaCl 0,7M (líneas continuas) y NaCl 1M (líneas discontinuas). Los experimentos fueron realizados en medio LB en condiciones de aerobiosis (200 rpm). Las barras de error indican \pm desvío estándar entre triplicados. $DO_{600\text{ nm}}$: densidad óptica medida a 600 nm.

Para determinar el efecto de PhaP ante las condiciones de estrés osmótico ocasionado por una concentración de NaCl de 0,7 M, se calcularon diversos parámetros cinéticos de crecimiento. Por un lado, se evaluó el porcentaje de tolerancia de cada cepa como la relación entre su capacidad de aumentar la biomasa bajo las condiciones de estrés ensayadas y bajo condiciones normales (ecuación 1 en Materiales y métodos). A las 6 h de crecimiento, la cepa productora de PhaP mostró una tolerancia significativamente mayor en comparación con la cepa control (Tabla 4). No pudo calcularse este parámetro para las 24 h de crecimiento dado que, como dijimos previamente, los cultivos habían floculado y las mediciones de DO_{600} no eran confiables.

Por otro lado, se calculó el porcentaje de inhibición de las cepas, determinando el cociente entre sus velocidades de crecimiento con y sin estrés (ecuación 4 en Materiales y métodos). En este caso, la cepa que expresaba *phaP* mostró un porcentaje de inhibición significativamente menor que la cepa

control. Por último, se determinó la relación entre las velocidades de crecimiento de la cepa productora de PhaP y la cepa control en presencia del agente estresor utilizando el coeficiente de *fitness* relativo "s" (ecuación 5 en Materiales y métodos). El valor de s obtenido fue positivo (Tabla 4), lo cual pone de manifiesto que la expresión de *phaP* aumenta el *fitness* de las células, incrementando su tolerancia al estrés osmótico provocado por la presencia de altas concentraciones de NaCl.

Tabla 4: Parámetros cinéticos de los ensayos de tolerancia a estrés osmótico iónico en la cepa ADA100.

Parámetro	PhaP	Control
DO ₆₀₀ 24 h	N.D.	N.D.
μ_{\max} (h ⁻¹)	0,45 ± 0,02*	0,37 ± 0,01
Tolerancia (T%) 6 h	24 ± 4*	16 ± 2
Tolerancia (T%) 24 h	N.D.	N.D.
Inhibición (I%)	57 ± 2*	62 ± 1
Coef. <i>fitness</i> relativo (s)	22 ± 2	

Parámetros cinéticos de crecimiento en presencia de NaCl 0,7 M calculados para las cepas de *E. coli* ADA100/pADP2 (PhaP) y ADA100/pBBR1MCS-1 (control). Los experimentos fueron realizados en medio LB en condiciones de aerobiosis (200 rpm). Los valores de μ_{\max} fueron calculados utilizando las horas 2 a 4 de las curvas de crecimiento. Las diferencias entre cepas se evaluaron mediante una prueba t de Student, definiendo como significativo un p-valor < 0,05. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre cepas. DO₆₀₀: densidad óptica medida a 600 nm. μ_{\max} : velocidad específica de crecimiento. N.D.: no determinada.

A continuación, con la idea de estudiar el efecto de PhaP tanto ante estrés osmótico iónico como no iónico, se realizaron ensayos usando sacarosa como agente estresor. El uso de sacarosa ya había sido probado en la cepa ADA100 como agente causante de estrés hiperosmótico (Bianchi & Baneyx, 1999). En nuestros experimentos utilizamos una concentración de sacarosa de 20% (m/v), lo cual es ligeramente superior a la utilizada en los experimentos de Bianchi y colaboradores (quienes utilizaron una concentración 0,464 M equivalente a aproximadamente 16% (m/v)). La solución de sacarosa fue añadida a los cultivos al cabo de 1 hora y el crecimiento en presencia de este soluto se determinó monitoreando la DO₆₀₀ durante 24 h de cultivo (Figura 17).

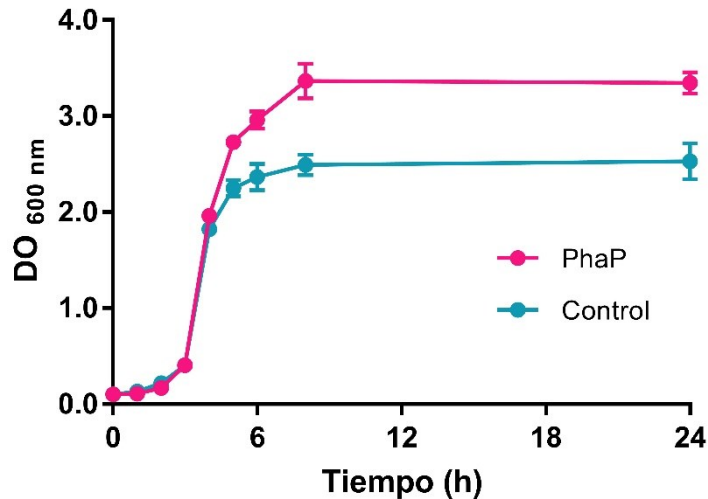


Figura 17. Tolerancia a estrés osmótico por sacarosa de la cepa de *E. coli* ADA100. Se muestran las curvas de crecimiento de ADA100/pADP2 (PhaP) y ADA100/pBBR1 (control) en presencia de sacarosa 20% (m/v). Los experimentos fueron realizados en medio LB en condiciones de aerobiosis (200 rpm). Las barras de error indican \pm desvío estándar entre triplicados. DO_{600 nm}: densidad óptica medida a 600 nm.

En presencia de sacarosa 20% (m/v), la cepa productora de PhaP mostró un incremento significativo en el crecimiento. Esto se vio reflejado tanto en la μ_{\max} como en la biomasa final a 24 h, la cual exhibió un 30% de aumento respecto de la cepa control. Los porcentajes de tolerancia a 6 y 24 h también fueron significativamente mayores para la cepa que expresa *phaP*. Cuando se calcularon los porcentajes de inhibición, se observó que la cepa que produce PhaP fue menos inhibida por la sacarosa que la cepa control, lo cual indica que la phasina ejercería un efecto protector ante el estrés osmótico provocado por este soluto (Tabla 5).

Tabla 5: Parámetros cinéticos de los ensayos de tolerancia a estrés osmótico no iónico en la cepa ADA100.

Parámetro	PhaP	Control
DO ₆₀₀ 24 h	3,3 \pm 0,1*	2,5 \pm 0,2
μ_{\max} (h ⁻¹)	0,66 \pm 0,01*	0,56 \pm 0,03
Tolerancia (T%) 6 h	97 \pm 3*	84 \pm 3
Tolerancia (T%) 24 h	88 \pm 5*	67 \pm 5
Inhibición (I%)	37 \pm 3*	42 \pm 2
Coef. <i>fitness</i> relativo (s)	18 \pm 4	

Parámetros cinéticos de crecimiento en presencia de sacarosa 20% (m/v) calculados para las cepas de *E. coli* ADA100/pADP2 (PhaP) y ADA100/pBBR1MCS-1 (control). Los experimentos fueron realizados en medio LB en condiciones de aerobiosis (200 rpm). Los valores de μ_{\max} fueron calculados utilizando las horas 1 a 3 de las curvas de crecimiento. Las diferencias entre cepas se evaluaron mediante una prueba t de Student, definiendo como significativo un p-valor $<$ 0,05. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre cepas. DO₆₀₀: densidad óptica medida a 600 nm. μ_{\max} : velocidad específica de crecimiento.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta parte demuestran que la expresión de *phaP* confiere a la cepa ADA100 una mayor tolerancia al estrés osmótico iónico, provocado por NaCl, y no iónico, provocado por sacarosa. Esto se suma a los efectos beneficiosos ya conocidos para esta phasina en *E. coli* recombinante.

Efecto de PhaP ante el estrés por solventes

Dado que se ha reportado que la expresión de chaperonas aumenta la tolerancia a solventes (Abdelaal et al., 2015; Tomas et al., 2003; Zingaro & Papoutsakis, 2012, 2013) y, considerando que PhaP posee dicha actividad (Mezzina et al., 2015), se buscó analizar también el efecto de esta phasina sobre la tolerancia a distintos solventes, particularmente etanol, butanol y 1,3-propanodiol (1,3-PDO). Para ello, trabajamos nuevamente con la cepa de *E. coli* ADA100, transformada con los plásmidos pADP (que expresa *phaP*), o pBBR1MCS-1 (plásmido vacío, cepa control) (Tabla 2).

Como nuestro objetivo era evaluar la tolerancia de estas cepas a los distintos solventes elegidos, debimos primero determinar concentraciones de trabajo que fuesen sub-inhedoras, es decir, concentraciones en las cuales ambas cepas pudieran crecer. En función de lo reportado en bibliografía al respecto de la tolerancia de *E. coli* a dichos solventes (Abdelaal et al., 2015; Zingaro & Papoutsakis, 2012, 2013), elegimos diferentes concentraciones para ensayar con cada uno de ellos. En el caso de 1,3-PDO, dado que no encontramos en la bibliografía trabajos que estudien la tolerancia de *E. coli* a este compuesto, elegimos concentraciones cercanas a los títulos máximos sintetizados en esta bacteria (Nakamura & Whited, 2003). De este modo, las concentraciones elegidas en cada caso fueron: para etanol 5 y 6% (v/v), para butanol 0,5 y 0,75% (v/v), y, finalmente, para 1,3-PDO 8 y 10% (v/v). Los solventes fueron añadidos al medio de cultivo en estas concentraciones después de la primera hora de crecimiento y luego se monitoreó la DO_{600} durante 24 h de cultivo (Figura 18). Para todos los solventes, elegimos la concentración más baja para continuar con los análisis dado que en esas condiciones ambas cepas tenían mayor crecimiento y era posible observar mejor las diferencias.

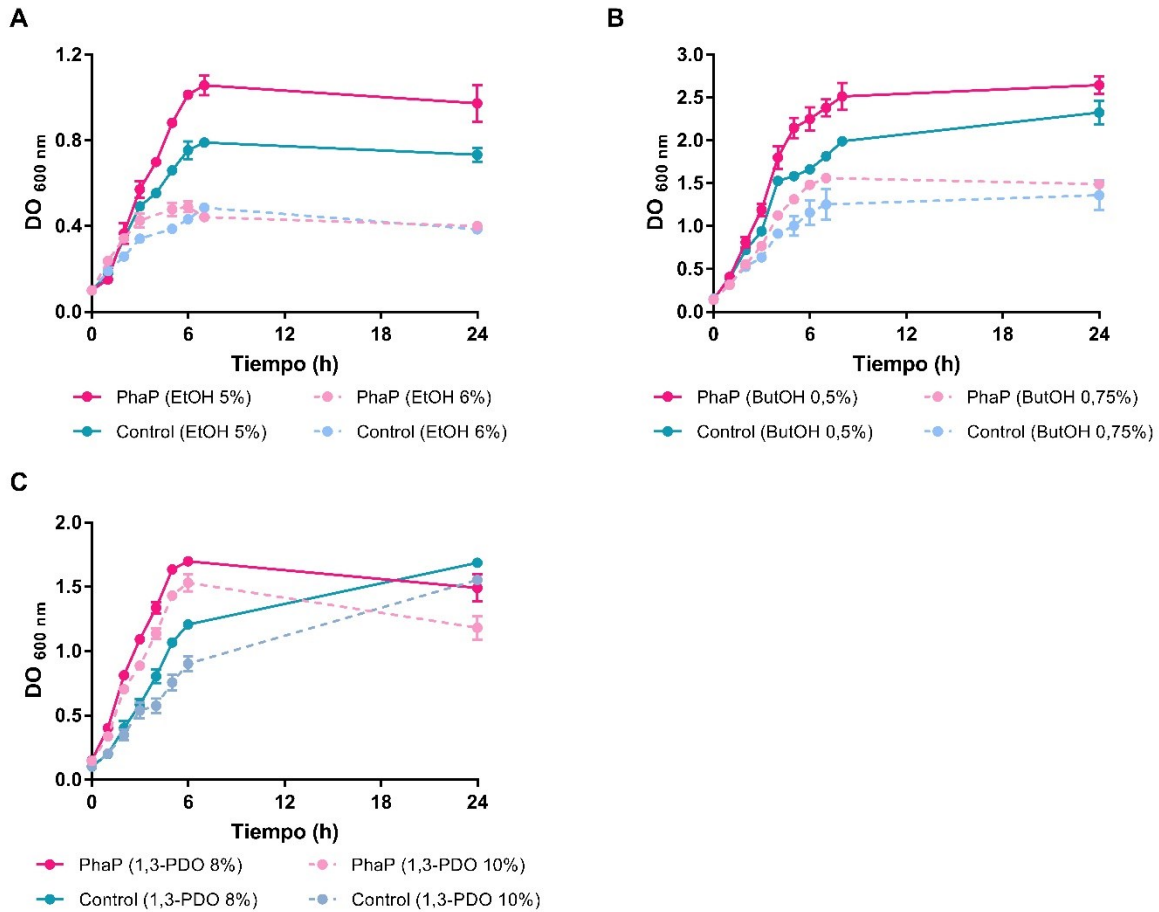


Figura 18. Determinación de la concentración sub-inhibitoria de cada solvente. Se muestran las curvas de crecimiento de *E. coli* ADA100/pADP2 (PhaP) y ADA100/pBBR1MCS-1 (control) en presencia de distintas concentraciones de etanol (A), butanol (B) y 1,3-propanodiol (C). Los experimentos fueron realizados en medio LB en condiciones de aerobiosis (200 rpm). Las barras de error indican \pm desvío estándar entre triplicados. DO_{600 nm}: densidad óptica medida a 600 nm. EtOH: etanol. ButOH: butanol. 1,3-PDO: 1,3-propanodiol.

En presencia de etanol 5% (v/v), la cepa productora de PhaP mostró un incremento significativo en el crecimiento respecto de la cepa control (Figura 19), reflejado en un aumento del 30% en la μ_{max} y en la biomasa final a 24 h (Tabla 6). Cuando se analizaron los parámetros cinéticos, se observó que la presencia de la phasina permitió a los cultivos alcanzar porcentajes de tolerancia 1,4 veces más altos que los de la cepa control, tanto a 6 como a 24 h. También se calculó el porcentaje de inhibición, que nos da una idea de cómo afecta el solvente las tasas de crecimiento de cada cepa, y se observó que la cepa que produce PhaP fue menos inhibida por la presencia del alcohol que la cepa control (Tabla 6). En conjunto, estos resultados nos demuestran que PhaP ejerce un efecto protector ante los efectos del etanol.

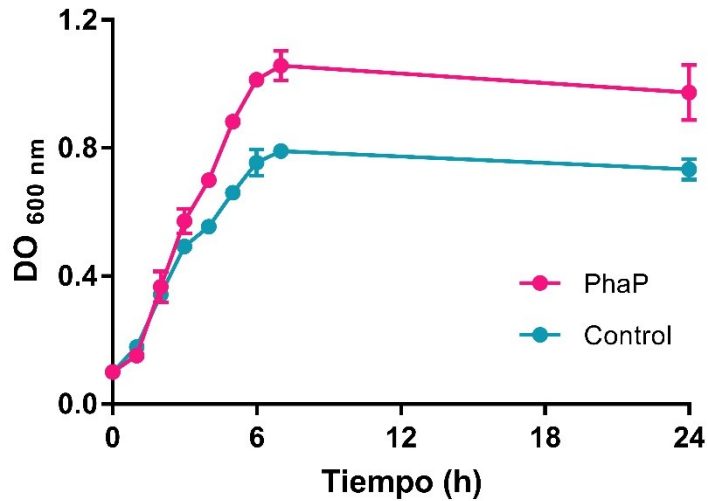


Figura 19. Tolerancia a etanol. Se muestran las curvas de crecimiento de *E. coli* ADA100/pADP2 (PhaP) y ADA100/pBBR1MCS-1 (control) en presencia de etanol 5% (v/v). Los experimentos fueron realizados en medio LB en condiciones de aerobiosis (200 rpm). Las barras de error indican \pm desvío estándar entre triplicados. DO_{600 nm}: densidad óptica medida a 600 nm.

Tabla 6: Parámetros cinéticos de los ensayos de tolerancia a etanol 5% (v/v) en la cepa ADA100.

Parámetro	PhaP	Control
DO ₆₀₀ 24 h	0,97 \pm 0,09*	0,73 \pm 0,03
μ_{\max} (h ⁻¹)	0,67 \pm 0,04*	0,51 \pm 0,01
Tolerancia (T%) 6 h	30 \pm 2*	22 \pm 2
Tolerancia (T%) 24 h	22 \pm 1*	15 \pm 1
Inhibición (I%)	36 \pm 1*	48 \pm 2
Coef. <i>fitness</i> relativo (s)	31 \pm 4	

Parámetros cinéticos de crecimiento en presencia de etanol 5% (v/v) calculados para las cepas de *E. coli* ADA100/pADP2 (PhaP) y ADA100/pBBR1MCS-1 (control). Los experimentos fueron realizados en medio LB en condiciones de aerobiosis (200 rpm). Los valores de μ_{\max} fueron calculados utilizando las horas 1 a 3 de las curvas de crecimiento. Las diferencias entre cepas se evaluaron mediante una prueba t de Student, definiendo como significativo un p-valor < 0,05. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre cepas. DO₆₀₀: densidad óptica medida a 600 nm. μ_{\max} : velocidad específica de crecimiento.

Cuando se desafió a las cepas con butanol 0,5% (v/v), la cepa productora de PhaP también creció más que la cepa control (Figura 20), lo cual se vio manifestado en una velocidad de crecimiento y una DO₆₀₀ final significativamente más altas (Tabla 7). No obstante, no se observaron diferencias significativas entre las cepas en la inhibición ni en el porcentaje de tolerancia a 24 h. Donde sí se observaron diferencias es en la fase exponencial tardía dado que, a las 6 h de crecimiento, los cultivos que expresaban la phasina mostraron una tolerancia significativamente mayor al butanol. Esto indicaría

que el efecto protector de PhaP ante este solvente ocurre durante las primeras etapas de crecimiento y hasta la fase exponencial tardía (Tabla 7).

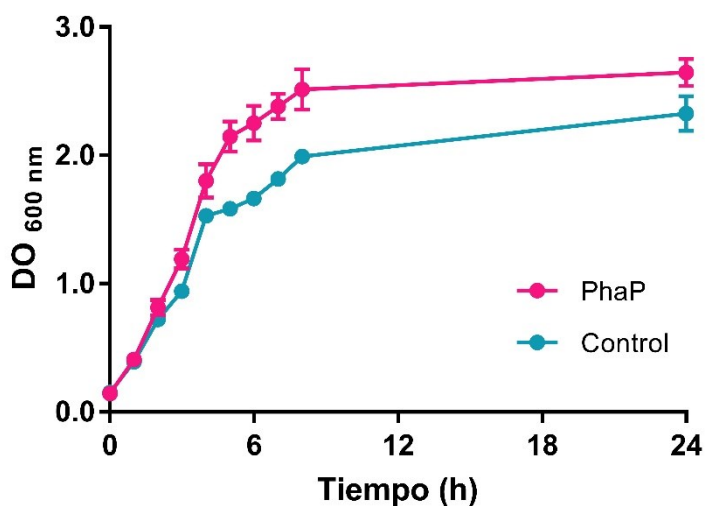


Figura 20. Tolerancia a butanol. Se muestran las curvas de crecimiento de *E. coli* ADA100/pADP2 (PhaP) y ADA100/pBBR1MCS-1 (control) en presencia de butanol 0,5% (v/v). Los experimentos fueron realizados en medio LB en condiciones de aerobiosis (200 rpm). Las barras de error indican \pm desvío estándar entre triplicados. DO_{600 nm}: densidad óptica medida a 600 nm.

Tabla 7: Parámetros cinéticos de los ensayos de tolerancia a butanol 0,5% (v/v) en la cepa ADA100.

Parámetro	PhaP	Control
DO ₆₀₀ 24 h	2,6 \pm 0,1*	2,3 \pm 0,1
μ_{\max} (h ⁻¹)	0,54 \pm 0,03*	0,44 \pm 0,02
Tolerancia (T%) 6 h	65 \pm 7*	48 \pm 1
Tolerancia (T%) 24 h	61 \pm 5	54 \pm 4
Inhibición (I%)	48 \pm 4	54 \pm 2
Coef. <i>fitness</i> relativo (s)	22 \pm 2	

Parámetros cinéticos de crecimiento en presencia de butanol 0,5% (v/v) calculados para las cepas de *E. coli* ADA100/pADP2 (PhaP) y ADA100/pBBR1MCS-1 (control). Los experimentos fueron realizados en medio LB en condiciones de aerobiosis (200 rpm). Los valores de μ_{\max} fueron calculados utilizando las horas 1 a 3 de las curvas de crecimiento. Las diferencias entre cepas se evaluaron mediante una prueba t de Student, definiendo como significativo un p-valor < 0,05. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre cepas. DO₆₀₀: densidad óptica medida a 600 nm. μ_{\max} : velocidad específica de crecimiento.

Finalmente, se analizó el efecto de PhaP en la tolerancia a 1,3-PDO (Figura 21). En estos cultivos, la cepa que expresa la phasina exhibió un μ_{\max} mayor y un aumento del 40% en la biomasa al cabo de 6 h. No obstante, durante la fase estacionaria y luego de adquirir cierta densidad celular, las células

de ambas cepas comenzaron a formar agregados y a sedimentar, interfiriendo de esta forma con las mediciones de absorbancia (DO_{600}). No obstante, la inhibición del crecimiento generada por el 1,3-PDO 8% (v/v) fue significativamente menor para la cepa productora de PhaP que para el control (Tabla 8).

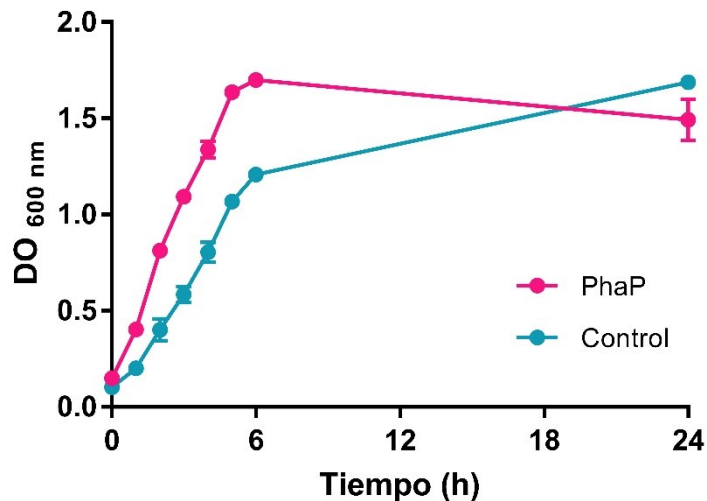


Figura 21. Tolerancia a 1,3-propanodiol. Se muestran las curvas de crecimiento de *E. coli* ADA100/pADP2 (PhaP) y ADA100/pBBR1MCS-1 (control) en presencia de 1,3-propanodiol 8% (v/v). Los experimentos fueron realizados en medio LB en condiciones de aerobiosis (200 rpm). Las barras de error indican \pm desvío estándar entre triplicados. DO_{600} nm: densidad óptica medida a 600 nm.

Tabla 8: Parámetros cinéticos de los ensayos de tolerancia a 1,3-propanodiol 8% (v/v) en la cepa ADA100.

Parámetro	PhaP	Control
DO_{600} 24 h	N.D.	N.D.
μ_{max} (h^{-1})	$0,85 \pm 0,02^*$	$0,68 \pm 0,05$
Tolerancia (T%) 6 h	$46 \pm 2^*$	38 ± 2
Tolerancia (T%) 24 h	N.D.	N.D.
Inhibición (I%)	$19 \pm 3^*$	30 ± 5
Coef. <i>fitness</i> relativo (s)	32 ± 3	

Parámetros cinéticos de crecimiento en presencia de 1,3-propanodiol 8% (v/v) calculados para las cepas de *E. coli* ADA100/pADP2 (PhaP) y ADA100/pBBR1MCS-1 (control). Los experimentos fueron realizados en medio LB en condiciones de aerobiosis (200 rpm). Los valores de μ_{max} fueron calculados utilizando las horas 1 a 3 de las curvas de crecimiento. Las diferencias entre cepas se evaluaron mediante una prueba t de Student, definiendo como significativo un p-valor $< 0,05$. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre cepas. DO_{600} : densidad óptica medida a 600 nm. μ_{max} : velocidad específica de crecimiento. N.D.: no determinada.

Para cada una de las condiciones de estrés analizadas se calculó también el coeficiente de *fitness* relativo (s). En todos los casos analizados este parámetro mostró valores positivos, indicando que la expresión de *phaP* aumenta el *fitness*, permitiendo a las células incrementar su tolerancia a solventes

tales como etanol, butanol y 1,3-PDO (Tablas 6 a 8). En conjunto, los resultados descritos en esta sección muestran que *E. coli* ADA100 es sensible a las sustancias químicas en las concentraciones ensayadas, y que la expresión heteróloga de *phaP* aumenta significativamente la tolerancia, incrementando el crecimiento de las bacterias.

Análisis de la tolerancia en la cepa mutante *groEL*

Dado que estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que PhaP tiene muchas propiedades similares a las chaperonas, y que se observó que la expresión de *phaP* aumenta la tolerancia a diversas condiciones de estrés, entre ellas el estrés osmótico y el provocado por solventes, se diseñaron experimentos para averiguar si el efecto protector de esta proteína era comparable al de GroELS, una de las chaperonas más conocidas y mejor caracterizadas.

En particular se analizó la capacidad de PhaP de complementar el fenotipo de sensibilidad a diferentes tipos de estrés en una mutante *groEL*. Dado que *groE* es un operón esencial en *E. coli* (Fayet et al., 1989), no hay mutantes de delección en los genes correspondientes. No obstante, se ha obtenido una mutante puntual denominada T850 (Takano & Kakefuda, 1972), que contiene una mutación cromosomal en el locus *groEL* que produce el cambio R268C (Veinger et al., 1998). Esta mutante es sensible a diferentes condiciones de estrés y ha sido utilizada con éxito en estudios de complementación de funciones de GroEL (Goloubinoff et al., 1989), por lo que decidimos utilizarla en nuestros experimentos.

Con el objetivo de evaluar si la expresión de la phasina podía complementar el fenotipo de la mutante, esta cepa fue transformada con los plásmidos pGroELS1 (expresa *groELS*), pADP (expresa *phaP*) o el vector vacío pBBR1MCS-1 (Tabla 2), y se analizó su crecimiento, primero, en ausencia de agentes estresores y, luego, en presencia de solventes y agentes de estrés osmótico.

En ausencia de agentes estresores, se observó un leve incremento en el crecimiento de la cepa T850 complementada con GroELS, dado por un aumento en la densidad celular final en comparación con la cepa control (Figura 22). Por su parte, la cepa que sobreexpresa *phaP* también mostró un aumento en la biomasa a 24 h respecto de la cepa control. Además, la cepa productora de la phasina no solo mostró un aumento significativo en la μ_{\max} respecto de la cepa control ($0,82 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ vs $0,72 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$), sino que para nuestra sorpresa también creció significativamente más rápido que la cepa que sobreexpresa *groELS* ($0,82 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ vs $0,76 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$, valores calculados utilizando las horas 0 a 3 de las curvas de crecimiento). Estos resultados indican que PhaP puede complementar funcionalmente los leves

defectos en el crecimiento generados por la mutación en *groEL* en ausencia de agentes estresores (Figura 22).

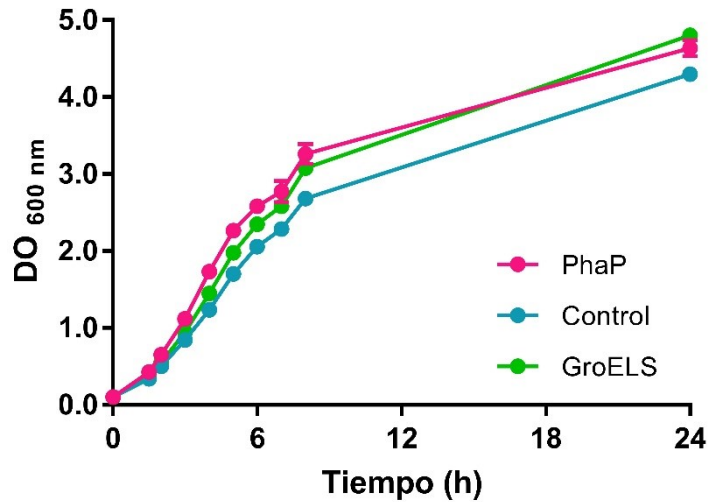


Figura 22. Curvas de crecimiento de *E. coli* T850 transformada con los plásmidos pADP2 (PhaP), pBBR1MCS-1 (control) o pGroELS1 (GroELS), en ausencia de agentes estresores. Los experimentos fueron realizados en medio LB en condiciones de aerobiosis (200 rpm). Las barras de error indican \pm desvío estándar entre triplicados. DO_{600 nm}: densidad óptica medida a 600 nm.

A continuación, se estudió si GroELS y PhaP podían aumentar la tolerancia de la cepa T850 a estrés osmótico. Para ello, se intentó crecer las cepas en las mismas condiciones que en la sección anterior, pero la presencia de NaCl 0,7M afectó bastante el crecimiento bacteriano y para poder obtener mediciones confiables de absorbancia debimos utilizar una concentración de sal más baja. En consecuencia, los cultivos fueron sometidos a estrés osmótico iónico mediante el agregado de NaCl al cabo de una hora de crecimiento a una concentración final de 0,3 M (Figura 23). A pesar de que bajo estas condiciones de estrés no se observaron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento, las cepas que expresaban *phaP* y *groELS* mostraron un aumento significativo en la biomasa respecto de la cepa control, tanto a 6 como a 24 h. Cuando se calcularon los porcentajes de tolerancia, si bien a las 6 h no se encontraron diferencias entre las cepas, a las 24 h la presencia de PhaP y GroELS generó un aumento significativo en la tolerancia respecto de la cepa control (Tabla 9). El aumento en la tolerancia observado en la cepa que expresa *phaP* fue incluso mayor que el de la cepa que expresa *groELS*.

En presencia de sacarosa 20% (m/v), si bien tanto la cepa que produce PhaP como la que produce GroELS aumentaron significativamente la biomasa final respecto de la cepa control, sólo la cepa que produce la phasina mostró un incremento significativo en la μ_{max} (Figura 24). En lo que respecta a los

porcentajes de tolerancia, los resultados fueron similares a los obtenidos frente al estrés osmótico iónico. Mientras que a las 6 h no se observaron diferencias significativas, a las 24 h tanto PhaP como GroELS incrementaron significativamente la tolerancia respecto del control (Tabla 9). Nuevamente, el efecto de PhaP fue significativamente mayor que el de GroELS.

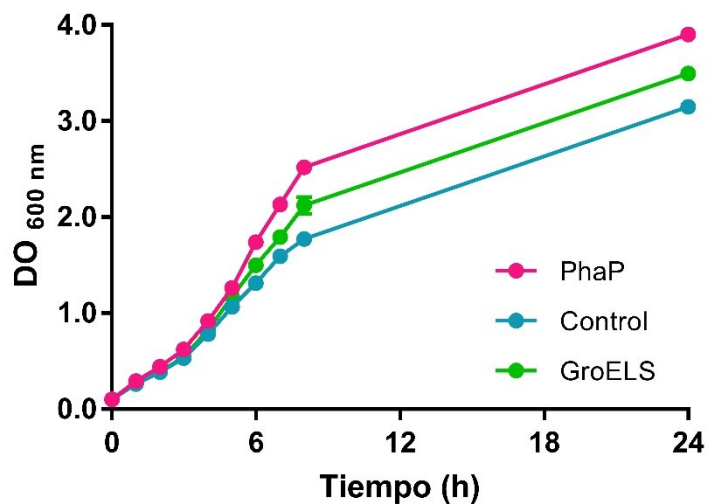


Figura 23. Tolerancia a estrés osmótico iónico de la cepa mutante *groEL*. Se muestran las curvas de crecimiento de *E. coli* T850 transformada con los plásmidos pADP2 (PhaP), pBBR1MCS-1 (control) o pGroELS1 (GroELS), en presencia de NaCl 0,3 M. Los experimentos fueron realizados en medio LB en condiciones de aerobiosis (200 rpm). Las barras de error indican \pm desvío estándar entre triplicados. DO_{600 nm}: densidad óptima medida a 600 nm.

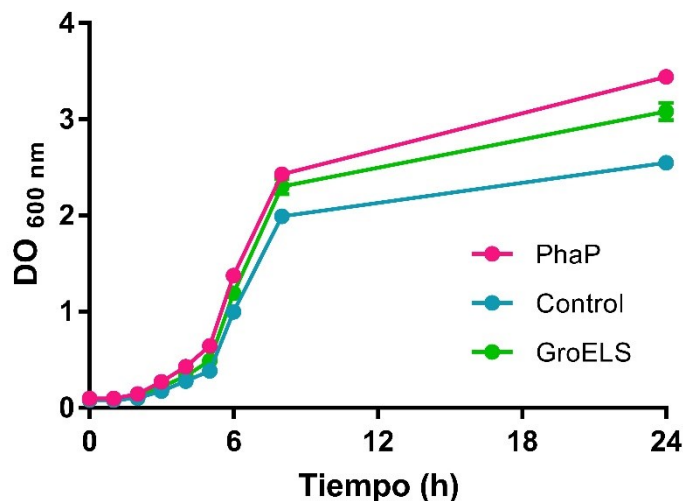


Figura 24. Tolerancia a estrés osmótico no iónico de la cepa mutante *groEL*. Se muestran las curvas de crecimiento de *E. coli* T850 transformada con los plásmidos pADP2 (PhaP), pBBR1MCS-1 (control) o pGroELS1 (GroELS), en presencia de sacarosa 20% (m/v). Los experimentos fueron realizados en medio LB en condiciones de aerobiosis (200 rpm). Las barras de error indican \pm desvío estándar entre triplicados. DO_{600 nm}: densidad óptima medida a 600 nm.

Tabla 9: Parámetros cinéticos de los ensayos de tolerancia a estrés osmótico en la cepa T850.

Agente de estrés	Cepa	DO ₆₀₀ 24 h	μ_{\max} (h ⁻¹)	Tolerancia (T%)	
				6 h	24 h
NaCl 0,3 M	PhaP	3,90 ± 0,04*	0,38 ± 0,01	66 ± 3	98 ± 1*
	Control	3,15 ± 0,04*	0,36 ± 0,01	71 ± 4	86 ± 1*
	GroELS	3,50 ± 0,08*	0,34 ± 0,02	69 ± 2	90 ± 2*
Sacarosa 20% (m/v)	PhaP	3,45 ± 0,03*	0,55 ± 0,02*	52 ± 1	93 ± 1*
	Control	2,55 ± 0,01*	0,50 ± 0,01	54 ± 1	68 ± 1*
	GroELS	3,10 ± 0,06*	0,51 ± 0,01	54 ± 1	77 ± 2*

Parámetros cinéticos de crecimiento calculados para las cepas de *E. coli* T850/pADP2 (PhaP), T850/pBBR1MCS-1 (control) y T850/pGroELS1 (GroELS) bajo condiciones de estrés osmótico. Los experimentos fueron realizados en medio LB en condiciones de aerobiosis (200 rpm). Los valores de μ_{\max} fueron calculados utilizando las horas 1 a 3 de las curvas de crecimiento. Se evaluaron las diferencias entre las cepas aplicando un ANOVA de un factor seguido de un test de Tukey HSD, definiendo como significativo un p-valor < 0,05. Los asteriscos (*) indican que los valores para una dada cepa difieren significativamente de los valores para las otras dos cepas. DO₆₀₀: densidad óptica a 600 nm. μ_{\max} : velocidad específica de crecimiento.

A continuación, analizamos también si GroELS y PhaP podían aumentar la tolerancia a solventes de la cepa T850. Para ello, se crecieron las cepas con los mismos solventes utilizados en la sección anterior. En presencia de etanol 5% (v/v), tanto PhaP como GroELS fueron capaces de aumentar significativamente la tolerancia a 24 h, obteniéndose un incremento en la biomasa final respecto de la cepa control del 45% y 30%, respectivamente (Figura 25). No obstante, a las 6 h sólo la cepa que expresa *phaP* mostró diferencias significativas en la tolerancia respecto de la cepa control. Del mismo modo, en lo que respecta a la velocidad de crecimiento, la cepa que produce PhaP fue la única que mostró un aumento significativo de este parámetro (Tabla 10).

Cuando se añadió butanol 0,5% (v/v) a los cultivos, no se observaron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento entre las cepas (Tabla 10). Sin embargo, se observó en las cepas que sobreexpresaban *phaP* y *groELS* un aumento en la biomasa final del 70% y 50%, respectivamente, en comparación con la cepa control (Figura 26). Esto evidenció que las cepas productoras de chaperonas tenían una tolerancia al butanol significativamente mayor que la cepa control a las 24 h (Tabla 10).

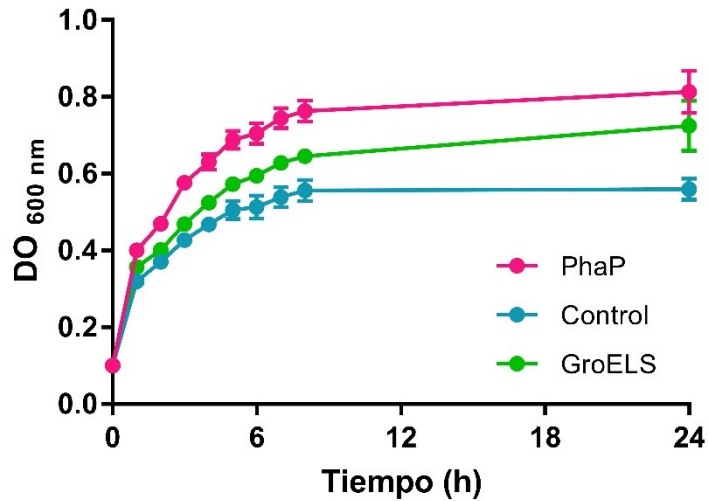


Figura 25. Tolerancia a etanol de la cepa mutante *groEL*. Se muestran las curvas de crecimiento de *E. coli* T850 transformada con los plásmidos pADP2 (PhaP), pBBR1MCS-1 (control) o pGroELS1 (GroELS), en presencia de etanol 5% (v/v). Los experimentos fueron realizados en medio LB en condiciones de aerobiosis (200 rpm). Las barras de error indican \pm desvío estándar entre triplicados. DO_{600 nm}: densidad óptica medida a 600 nm.

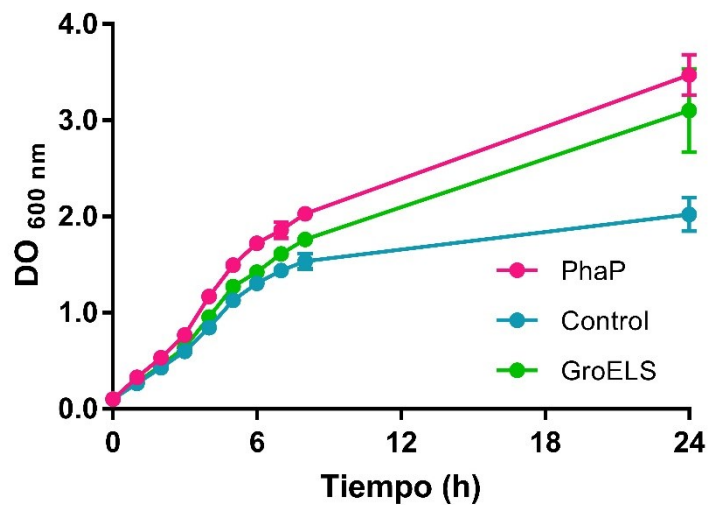


Figura 26. Tolerancia a butanol de la cepa mutante *groEL*. Se muestran las curvas de crecimiento de *E. coli* T850 transformada con los plásmidos pADP2 (PhaP), pBBR1MCS-1 (control) o pGroELS1 (GroELS), en presencia de butanol 0,5% (v/v). Los experimentos fueron realizados en medio LB en condiciones de aerobiosis (200 rpm). Las barras de error indican \pm desvío estándar entre triplicados. DO_{600 nm}: densidad óptica medida a 600 nm.

Finalmente, cuando se desafiaron los cultivos con 1,3-PDO 8% (v/v), tanto la cepa que expresa *phaP* como la que expresa *groELS* mostraron una mayor tolerancia que la cepa control al cabo de 24 h, incluso cuando no se observaron diferencias significativas en la μ_{\max} (Tabla 10). En este caso el efecto positivo en la tolerancia a 1,3-PDO fue más pronunciado en la cepa productora de GroELS, tanto a 6

como a 24h (Figura 27), lo cual le permitió a esta cepa alcanzar una biomasa final 40% más alta que la cepa control y 20% más alta que la cepa que expresa la phasina.

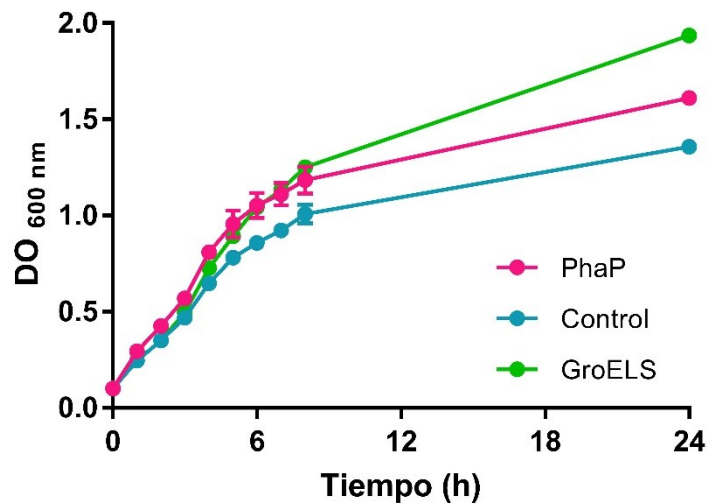


Figura 27. Tolerancia a 1,3-propanodiol de la cepa mutante *groEL*. Se muestran las curvas de crecimiento de *E. coli* T850 transformada con los plásmidos pADP2 (PhaP), pBBR1MCS-1 (control) o pGroELS1 (GroELS), en presencia de 1,3-propanodiol 8% (v/v). Los experimentos fueron realizados en medio LB en condiciones de aerobiosis (200 rpm). Las barras de error indican \pm desvío estándar entre triplicados. DO_{600 nm}: densidad óptica medida a 600 nm.

Tabla 10: Parámetros cinéticos de los ensayos de tolerancia a solventes en la cepa T850.

Agente de estrés	Cepa	DO ₆₀₀ 24h	μ_{max} (h ⁻¹)	Tolerancia (T%)	
				6hs	24hs
Etanol 5% (v/v)	PhaP	0,81 \pm 0,06	0,18 \pm 0,01*	15 \pm 1*	10 \pm 1
	Control	0,56 \pm 0,03*	0,12 \pm 0,01	11 \pm 1	6 \pm 1*
	GroELS	0,73 \pm 0,07	0,12 \pm 0,01	12 \pm 1	8 \pm 1
Butanol 0,5% (v/v)	PhaP	3,5 \pm 0,2	0,43 \pm 0,01	65 \pm 5	76 \pm 6
	Control	2,0 \pm 0,2*	0,41 \pm 0,01	60 \pm 4	44 \pm 4*
	GroELS	3,1 \pm 0,4	0,41 \pm 0,02	60 \pm 4	64 \pm 10
1,3-PDO 8% (v/v)	PhaP	1,61 \pm 0,01*	0,33 \pm 0,01	35 \pm 1	31 \pm 1*
	Control	1,36 \pm 0,04*	0,33 \pm 0,01	35 \pm 2	28 \pm 1*
	GroELS	1,94 \pm 0,01*	0,35 \pm 0,01	40 \pm 2*	38 \pm 1*

Parámetros cinéticos de crecimiento calculados para las cepas de *E. coli* T850/pADP2 (PhaP), T850/pBBR1MCS-1 (control) y T850/pGroELS1 (GroELS) bajo condiciones de estrés por solventes. Los experimentos fueron realizados en medio LB en condiciones de aerobiosis (200 rpm). Los valores de μ_{max} fueron calculados utilizando las horas 1 a 3 de las curvas de crecimiento. Se evaluaron las diferencias entre las cepas aplicando un ANOVA de un factor seguido de un test de Tukey HSD, definiendo como significativo un p-valor < 0,05. Los asteriscos (*) indican que los valores para una dada cepa difieren significativamente de los valores para las otras dos cepas. DO₆₀₀: densidad óptica a 600 nm. μ_{max} : velocidad específica de crecimiento.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta parte demuestran que la expresión de *phaP* mejora la tolerancia de la cepa mutante *groEL* ante todas las condiciones de estrés ensayadas. Si bien se observan algunas variaciones dependientes del agente estresor, los efectos de PhaP son muy similares a los obtenidos con GroELS, reforzando la hipótesis de que el incremento en la tolerancia a estos compuestos se debe al menos en parte a sus propiedades de chaperona.

Discusión

Sobre el efecto de PhaP en la tolerancia a estrés osmótico

La alta osmolaridad es un fenómeno común durante los procesos de fermentación microbiana, en los cuales se administran sustratos en alta concentración y se sintetizan bioproductos en altos títulos. Cuando las células están expuestas a estas condiciones, experimentan pérdida de agua en el citoplasma y despliegan mecanismos de respuesta como una mayor acumulación de iones potasio y solutos osmoprotectores. Dado que en varias bacterias se han encontrado evidencias de protección cruzada entre estrés osmótico, térmico y oxidativo (Gunasekera et al., 2008; Kilstrup et al., 1997; Meury & Kohiyama, 1991; Volker et al., 1992; A. Weber et al., 2006), y considerando que PhaP tiene un rol protector ante el estrés térmico y oxidativo en *E. coli* recombinante (de Almeida et al., 2011), se buscó analizar su capacidad de proteger a las células ante estrés osmótico.

Los resultados obtenidos demuestran que la expresión de la phasina produce un incremento significativo en la tolerancia de las células al estrés osmótico. Esto se vió reflejado en una mayor velocidad de crecimiento y una mayor producción de biomasa en la cepa que produce PhaP respecto de la cepa control, ante el estrés provocado tanto por NaCl como por sacarosa.

La figura 28 muestra la comparación de los efectos de PhaP ante los dos agentes estresores ensayados mediante los coeficientes de *fitness* relativo (*s*) y los porcentajes de tolerancia relativo [RT(%)]. El coeficiente *s* se calcula como el cociente entre las velocidades de crecimiento de la cepa que expresa *phaP* y la cepa control, bajo las condiciones de estrés analizadas (ecuación 5 en Materiales y métodos). De forma análoga, el RT(%) se calcula como el cociente entre las tolerancias de la cepa que produce la phasina y la cepa control (ecuación 2 en Materiales y métodos), bajo las mismas condiciones de estrés. Dado que la tolerancia a 24 h no pudo determinarse en todos los ensayos de estrés osmótico (porque la formación de sedimentos en algunos cultivos impidió la correcta medición de la DO₆₀₀), se muestran los RT(%) a las 6 h. Como se puede ver, la expresión de *phaP* tuvo efectos muy parecidos en el *fitness* relativo ante los dos agentes estresores. En cuanto a los RT(%), se puede ver que PhaP generó un incremento más marcado en la tolerancia ante el estrés osmótico iónico que ante el estrés osmótico neutro.

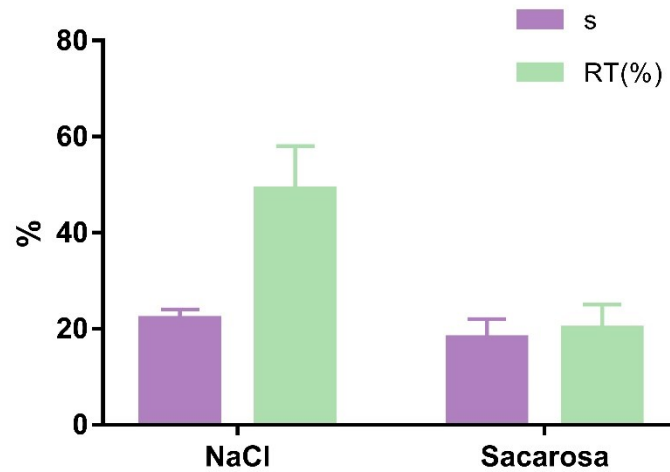


Figura 28. Coeficientes de *fitness* relativo (s) y porcentajes de tolerancia relativos [RT(%)] a 6 h de la cepa ADA100 productora de PhaP ante los agentes de estrés osmótico ensayados: NaCl 0,7M y sacarosa 20% (m/v). Las barras de error indican \pm desvío estándar entre triplicados.

Pese a que no ha sido descrito en la bibliografía que las chaperonas tengan algún rol en la respuesta a estrés osmótico, existen algunos trabajos que reportan un aumento de la expresión de ciertas HSPs, tales como Hsp31 y DnaK, en células de *E. coli* sometidas a este tipo de estrés (Meury & Kohiyama, 1991; A. Weber et al., 2006). Además, en un trabajo realizado en *Lactococcus lactis* se observó que la exposición a estrés osmótico por NaCl inducía la expresión de DnaK y GroELS en un patrón temporal similar al observado durante el estrés térmico, aunque a menores niveles de inducción. Los autores proponen que la expresión de estas HSPs en *L. lactis* se induce por la acumulación de proteínas desnaturalizadas como resultado del estrés osmótico (Kilstrup, Jacobsen, Hammer, & Vogensen, 1997). Esta idea se ve reforzada por estudios realizados en *E. coli*, en los cuales se observó que el shock osmótico provocado por 0,3 M de NaCl indujo la desestabilización de proteínas (Stadtmiller et al., 2017). El mecanismo propuesto en estos trabajos es que la pérdida de agua debido al estrés osmótico provoca una reducción de volumen celular, que aumenta el hacinamiento de los componentes del citoplasma reduciendo la estabilidad de las proteínas. Esta desestabilización se debe a interacciones atractivas transitorias de las proteínas entre sí y con otras macromoléculas, que hacen que se vuelvan más propensas a agregarse.

En función de estos resultados, se puede plantear la hipótesis de que el aumento de la tolerancia a estrés osmótico provocado por PhaP en los experimentos descritos en esta tesis, se debe, al menos en parte, a su rol como chaperona, asistiendo en la estabilización y plegado de proteínas desnaturalizadas, y/o evitando su agregación. Esta hipótesis se ve reforzada por diversos trabajos en los cuales la sobreexpresión de HSPs mejoró el crecimiento de *E. coli* (Ghafoori et al., 2017; Sugimoto et al., 2003; Tosukhowong et al., 2005) y otras bacterias (Chaurasia & Apte, 2009; Kaewchana et al.,

2021) ante condiciones de estrés osmótico. Más aún, en dos de estas investigaciones se determinó que la presencia de la chaperona disminuyó la cantidad de agregados proteicos generados bajo las condiciones de estrés osmótico (Chaurasia & Apte, 2009; Sugimoto et al., 2003).

Sobre el efecto de PhaP en la tolerancia a solventes

En los últimos años, la producción biológica de solventes y precursores químicos a partir de recursos renovables ha atraído una atención cada vez mayor como alternativa sostenible a los métodos de producción derivados del petróleo. No obstante, una de las mayores limitaciones para estas biotecnologías es la toxicidad ejercida por estos compuestos en las células que los sintetizan, provocando daños a las moléculas biológicas y membranas celulares, e interrumpiendo procesos biológicos esenciales. Las células responden a estos daños desplegando diversos mecanismos que incluyen la síntesis de proteínas de estrés y factores de transcripción, bombas de expulsión, modificaciones en la composición de la membrana y el metabolismo energético, y desintoxicación química (Mukhopadhyay, 2015; Nicolaou et al., 2010). Dado que se ha demostrado que la expresión de chaperonas y HSPs aumenta la tolerancia de diferentes bacterias a este tipo de compuestos químicos (Abdelaal et al., 2015; Desmond et al., 2004; Kang et al., 2007; Tomas et al., 2003; Zingaro & Papoutsakis, 2013), y que PhaP posee actividad de chaperona (Mezzina et al., 2015), se estudió si la expresión de esta phasina tenía el mismo efecto.

Los resultados obtenidos demuestran que la expresión heteróloga de *phaP* en *E. coli* aumenta la tolerancia a biocombustibles como etanol y butanol, y a sustancias químicas como el 1,3-PDO, protegiendo a las células del estrés provocado por estos solventes y apoyando aún más el rol protector general ejercido por PhaP en *E. coli*. La expresión de la phasina no sólo mejoró la producción de biomasa sino también aumentó significativamente la velocidad de crecimiento de las bacterias ante los tres agentes estresores. No obstante, los efectos de PhaP resultaron dependientes del solvente, en tanto se observaron diferentes patrones de crecimiento y respuestas en las células cuando fueron expuestas a los distintos compuestos. Este tipo de variaciones también fueron reportadas en otras cepas de *E. coli* que sobreexpresan chaperonas y proteínas de choque térmico, al ser desafiadas con distintos solventes y sustancias químicas (Abdelaal et al., 2015; Zingaro & Papoutsakis, 2012, 2013).

En la figura 29 se puede observar la comparación de los efectos de PhaP ante los diferentes solventes. En ella se muestran los coeficientes de *fitness* relativo (*s*) y los porcentajes de tolerancia relativa calculados para cada una de las condiciones ensayadas. Dado que la tolerancia a 24 h no pudo determinarse en todos los ensayos, los RT(%) comparados fueron los de las 6 h. Si comparamos los

coeficientes s , un parámetro cinético que depende de la velocidad de crecimiento, vemos que el efecto de PhaP fue menor ante el butanol. Por su parte, si comparamos el porcentaje de tolerancia relativo, un parámetro que se calculó a partir de la biomasa a las 6 h de cultivo, podemos observar que PhaP tuvo un menor efecto ante el 1,3-PDO. Una posible explicación para esto sería que butanol fue el solvente más tóxico para las células durante las primeras etapas del crecimiento, mientras que el 1,3-PDO lo fue en las fases más tardías. Una forma normalmente utilizada en la bibliografía para evaluar la toxicidad de los solventes es el logaritmo del coeficiente de partición octanol-agua ($\log P$), el cual se usa como medida de la hidrofobicidad de estos compuestos. Se ha reportado que los solventes orgánicos no polares con valores de $\log P$ entre 1 y 5 son particularmente tóxicos porque se reparten preferentemente en la membrana plasmática, desorganizando su estructura y alterando las funciones vitales de las células (Ramos et al., 2002). El etanol y el 1,3-PDO son compuestos polares, con valores $\log P$ negativos (-0,31 y -1,09, respectivamente), mientras que el butanol es menos polar y tiene un $\log P$ de 0,88, mucho más cercano al rango de mayor toxicidad. Según este criterio, el butanol sería el más tóxico de los tres solventes ensayados, lo cual explicaría las diferencias observadas en los coeficientes de *fitness* relativo. No obstante, siguiendo el mismo criterio, el 1,3-PDO sería el menos tóxico de los solventes, lo cual no coincide con lo observado al comparar el porcentaje de tolerancia relativo (Figura 29). Esto sugiere que la tolerancia a solventes es un fenómeno complejo y que el uso de $\log P$ para evaluar la toxicidad de solventes no siempre es útil. Esto ya había sido advertido por Zingaro y Papoutsakis, quienes observaron variaciones similares en los efectos de GroELS ante alcoholes con diferentes $\log P$. Los autores propusieron que considerar únicamente los efectos en la membrana no captura de forma realista la toxicidad de un solvente, dado que no se tienen en cuenta las interacciones de estos compuestos con las estructuras celulares internas (Zingaro & Papoutsakis, 2013).

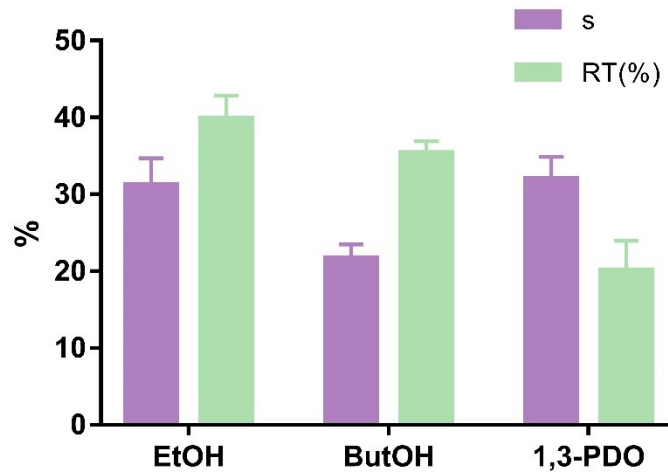


Figura 29. Coeficientes de *fitness* relativo (*s*) y porcentajes de tolerancia relativos [RT(%)] a 6 h de la cepa ADA100 productora de PhaP ante los diferentes solventes ensayados. EtOH: etanol 5% (v/v). ButOH: butanol 0,5% (v/v). 1,3-PDO: 1,3-propanodiol 8% (v/v). Las barras de error indican \pm desvío estándar entre triplicados.

En los últimos años se han estudiado las bases moleculares de la tolerancia a solventes en varias bacterias mediante técnicas de evolución adaptativa y expresión génica (Alsaker et al., 2010; Goodarzi et al., 2010; Minty et al., 2011; Ramos et al., 2015; Reyes et al., 2013). Estos estudios revelaron que la tolerancia es un fenómeno complejo, en el cual hay muchos aspectos involucrados, y la expresión de HSPs es uno de ellos. El mecanismo propuesto para la protección ejercida por las HSPs ante el estrés causado por los solventes es la estabilización y re-plegado de proteínas importantes para el metabolismo celular y la supervivencia, que se ven afectadas por estos compuestos (Nicolaou et al., 2010). Dado que se ha demostrado que PhaP tiene actividad de chaperona *in vitro* e *in vivo* (Mezzina et al., 2015), es posible que el aumento en la tolerancia a las sustancias químicas ensayadas también esté relacionada a su capacidad de ayudar a la estabilización de proteínas y su plegado.

Por último, cabe destacar que, si bien el estrés producido por el etanol y el butanol en bacterias fue extensamente estudiado (Nicolaou et al., 2010), no sucedió lo mismo con el 1,3-PDO. En un trabajo realizado en el productor natural *C. butyricum*, se propuso que el efecto inhibitorio del 1,3-PDO es similar al producido por otros dioles, incluyendo la desestabilización de la membrana (Colin et al., 2000). Además, la acumulación de 1,3-PDO en *C. butyricum* produjo un aumento en la síntesis de HSPs (Szymanowska-Powalowska & Kubiak, 2015), de manera similar a la reportada en estudios de transcriptómica y proteómica realizados en cepas de *E. coli* desafiadas con etanol y butanol (Brynildsen & Liao, 2009; Horinouchi et al., 2010; Rutherford et al., 2010; Soufi et al., 2015). No obstante, no se han explorado en profundidad las bases de la tolerancia a este compuesto. Si bien se han realizado varios trabajos de mutagénesis y evolución adaptativa en productores naturales de 1,3-PDO, el objetivo de los mismos era encontrar cepas más tolerantes para incrementar la productividad

(Yang et al., 2018), y el efecto de las mutaciones no fue analizado. En productores recombinantes tampoco se ha investigado la tolerancia, de modo que los experimentos realizados en esta tesis son los primeros en estudiar este fenómeno en *E. coli* recombinante y demuestran que el uso de chaperonas como PhaP es una estrategia efectiva para aumentar la tolerancia a esta sustancia química.

Sobre el efecto de PhaP en una cepa mutante *groEL*

Con el objetivo de seguir caracterizando el efecto de PhaP en la tolerancia a estrés osmótico y provocado por solventes, se estudió estos fenómenos en la cepa T850, la cual contiene una mutación en el locus *groEL* (Takano & Kakefuda, 1972). El fenotipo de esta mutante puede ser complementado tanto por GroELS (Goloubinoff et al., 1989) como por las proteínas de choque térmico IbpA e IbpB (Veinger et al., 1998), por lo que representa un modelo adecuado para analizar chaperonas de diferente tipo.

Tal como esperábamos, la complementación de esta cepa con un plásmido que expresa *groELS* mejoró su crecimiento en ausencia de agentes estresores y además produjo un incremento significativo de la tolerancia de la cepa a todas las condiciones de estrés ensayadas. Los mismos resultados fueron obtenidos cuando se transformó la cepa con un plásmido que expresa *phaP*, demostrando que la phasina es capaz de complementar los efectos fenotípicos de la mutación *groEL* de una forma similar a la proteína GroELS. Dado que PhaP no presenta similitud de secuencia o estructura con GroELS u otras chaperonas (Mezzina et al., 2014), su capacidad de aumentar la tolerancia de la mutante *groEL* a los agentes agresores analizados apoya la hipótesis de que esto se deba a su actividad de chaperona.

Si comparamos los porcentajes de tolerancia relativa a 24 h de las cepas que producen PhaP y GroELS, respecto de la cepa control, podemos ver que el efecto protector ante el estrés ejercido por la phasina fue mayor al ejercido por GroELS ante casi todos los agentes estresores (Figura 30). Este resultado fue inesperado y da cuenta de la magnitud del efecto de PhaP. Sólo frente al 1,3-PDO el desempeño de la cepa que expresa *groELS* fue mejor que el de la cepa que expresa *phaP*.

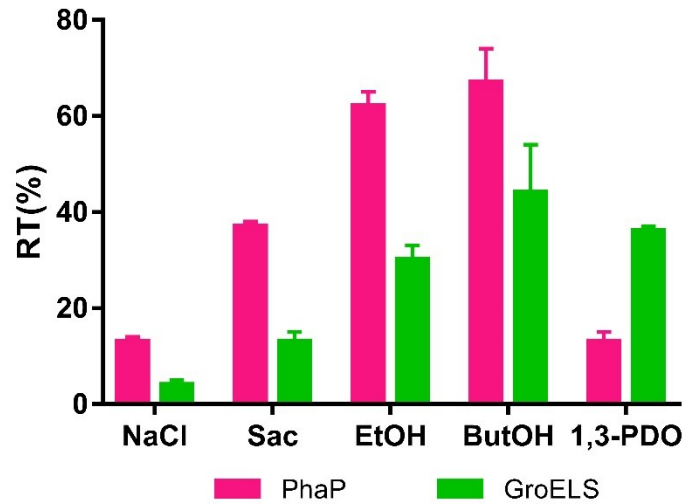


Figura 30. Porcentajes de tolerancia relativa a 24 h de las cepas T850/pADP2 (PhaP) y T850/pGroELS1 (GroELS) ante los diferentes estresores ensayados: NaCl 0,3 M; Sac: Sacarosa 20% (m/v); EtOH: etanol 5% (v/v); ButOH: butanol 0,5% (v/v); 1,3-PDO: 1,3-propanodiol 8% (v/v). Las barras de error indican \pm desvío estándar entre triplicados.

Las diferencias observadas en las tolerancias relativas de las cepas que producen PhaP y GroELS indican que el efecto protector ejercido la phasina podría involucrar mecanismos diferentes de los utilizados por GroELS. Por otra parte, dado que PhaP es una proteína de un tamaño mucho menor a GroELS (20 kDa vs aproximadamente 70 kDa), podría ser que su síntesis genere una carga metabólica menor que la carga asociada a la síntesis de GroELS, una proteína compleja de gran tamaño, potenciando aún más los efectos benéficos de PhaP.

Capítulo II: Síntesis de productos de interés biotecnológico

Efecto de PhaP en la producción de proteínas heterólogas

Con el objetivo de explorar las aplicaciones biotecnológicas de PhaP, nos propusimos analizar su capacidad de mejorar la producción de proteínas heterólogas en *E. coli*. Una de las estrategias más utilizadas para reducir la agregación y para optimizar la producción de proteínas heterólogas es la coexpresión de las mismas con chaperonas (Kolaj et al., 2009). Dado que ha sido demostrado que PhaP presenta actividad de chaperona (Mezzina et al., 2015), se planteó la hipótesis de que su coexpresión podría optimizar la síntesis de proteínas provenientes de otras bacterias en altos niveles de concentración, en sus formas solubles y activas. Para poner a prueba esta hipótesis, utilizamos dos enzimas beta-galactosidasas (β -gal) provenientes de la bacteria *Bifidobacterium breve* DSM 20213, cuya actividad se observó que aumentaba en presencia de chaperonas como GroELS (Arreola et al., 2014).

Para ello utilizamos la cepa T7 Express, una cepa derivada de la BL21 que posee una sustitución del operón *lac* por el gen de la RNA polimerasa del fago T7. Por un lado, esta mutación le confiere a la bacteria la capacidad de sintetizar proteínas clonadas bajo el sistema de expresión T7. Por otro lado, la mutación elimina el gen *lacZ* endógeno. Esta cepa fue transformada con los plásmidos pBbBG1 y pBbBG2 que portan los genes *lacZ* de las proteínas β -gal I (NCBI Ref. No. EFE90149.1) y β -gal II (NCBI Ref. No. EFE88654.1) de la bacteria *B. breve* DSM 20213, respectivamente. Las cepas resultantes fueron luego transformadas con los plásmidos pPhaP328, que porta el gen *phaP* de *Azotobacter* sp. FA8, y pSEVA328, como control (Tabla 2). En este sistema, la expresión de las β -galactosidasas heterólogas se indujo con IPTG y la de PhaP, con ácido m-toluico.

Los cultivos fueron crecidos a 30°C, en condiciones de aerobiosis (200 rpm) y la inducción se realizó al cabo de 1 h de crecimiento. A las 6 y 24 h se tomaron muestras de los cultivos para la determinación de la actividad β -galactosidasa, la cual se expresó en unidades de Miller (ecuación 6 en Materiales y métodos). El uso de la cepa T7 Express, al carecer de su gen *lacZ* endógeno, nos permitió asegurarnos que la actividad enzimática detectada en estos ensayos provenía exclusivamente de las proteínas heterólogas.

La coexpresión de PhaP con β -gal I aumentó significativamente los niveles de actividad enzimática, tanto a 6 como a 24 h (Figura 31). A pesar de que para ambas cepas la mayor actividad fue observada a las 6 h (5 h post-inducción), las diferencias entre cepas fueron más marcadas a las 24 h. La presencia de PhaP produjo un aumento relativo de la actividad de β -gal I de 1,4 y 3,5 veces a las 6 h y 24 h, respectivamente.

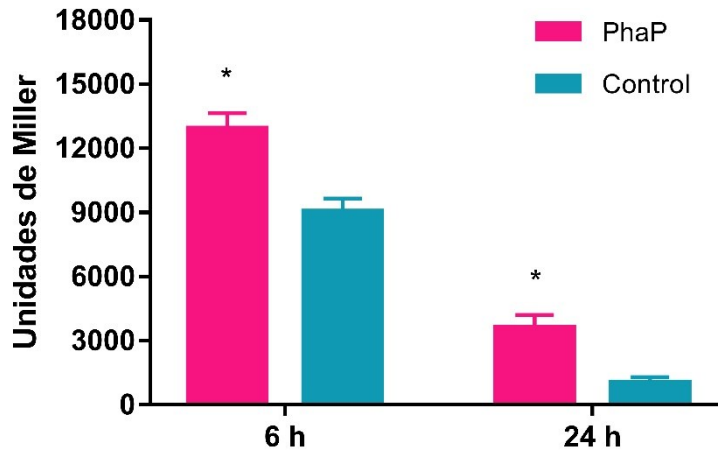


Figura 31. Actividad β -galactosidasa a 6 y 24 h en extractos libres de células de *E. coli* recombinante que expresan β -gal I de *B. breve* DSM 20213 con y sin coexpresión de PhaP. La actividad enzimática está expresada en unidades de Miller. Los valores corresponden al promedio de determinaciones realizadas por triplicado en al menos dos cultivos independientes \pm desviación estándar. Para cada hora, las diferencias entre las cepas se evaluaron con un t de Student, definiendo como significativo un p-valor $< 0,05$. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre las cepas.

Con β -gal II se obtuvieron actividades enzimáticas un poco más altas que con de β -gal I, pero los resultados fueron muy similares. La actividad de β -gal II fue significativamente mayor cuando fue coexpresada con PhaP, observándose un aumento de 2 y 3,2 veces respecto de la cepa control, a las 6 h y 24 h, respectivamente (Figura 32).

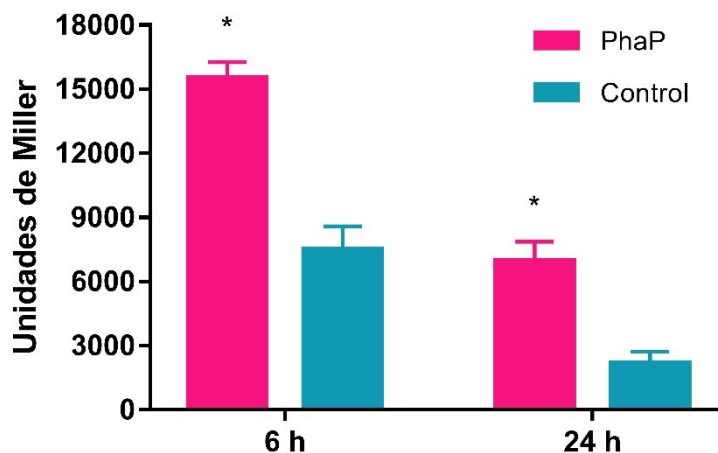


Figura 32. Actividad β -galactosidasa a 6 y 24 h en extractos libres de células de *E. coli* recombinante que expresan β -gal II de *B. breve* DSM 20213 con y sin coexpresión de PhaP. La actividad enzimática está expresada en unidades de Miller. Los valores corresponden al promedio de determinaciones realizadas por triplicado en al menos dos cultivos independientes \pm desviación estándar. Para cada hora, las diferencias entre las cepas se evaluaron con un t de Student, definiendo como significativo un p-valor $< 0,05$. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre las cepas.

Los resultados obtenidos en esta parte demuestran que la coexpresión de PhaP con las proteínas β -gal I y β -gal II de *B. breve* DSM 20213 permite optimizar su síntesis en sus formas solubles y activas. Los hallazgos son similares a los que habían sido reportados para estas mismas proteínas al ser coexpresadas con la chaperona GroELS (Arreola et al., 2014). Estos resultados constituyen una evidencia adicional de la función de chaperona de PhaP, esta vez a través de la determinación directa de la actividad enzimática de las proteínas heterólogas con las que fue coexpresada.

Efecto de PhaP en la producción de etanol

Dado que se ha observado que las chaperonas aumentan la tolerancia a etanol (Abdelaal et al., 2015; Zingaro & Papoutsakis, 2012, 2013), probablemente reduciendo el estrés causado por el mismo, se contempló la posibilidad de que este tipo de proteínas pudieran incrementar el *fitness* de cepas de *E. coli* productoras de este solvente. Más aún, en vista de que se ha observado que la sobreproducción de GroELS aumenta la producción de butanol en *C. acetobutylicum* (Tomas et al., 2003), se planteó la hipótesis de que la coexpresión de chaperonas pudiera mejorar también la síntesis de etanol en cepas de *E. coli* productoras de este compuesto. Teniendo en cuenta que PhaP reduce los niveles de expresión de genes relacionados a la respuesta a estrés (de Almeida et al., 2011), que presenta actividad de chaperona (Mezzina et al., 2015), y que en los experimentos descritos en el capítulo anterior hemos observado que aumenta la tolerancia a etanol exógeno, nos dispusimos analizar los efectos de la expresión de esta phasina en una cepa de *E. coli* productora de etanol.

Si bien *E. coli* es capaz de sintetizar etanol naturalmente, lo hace en muy bajas concentraciones. Para mejorar su síntesis y estudiar el efecto de PhaP en ella, se transformó la cepa ADA100 con el plásmido pET_{Lm}, el cual permite la sobreexpresión de *adhE* de *Leuconostoc mesenteroides*, una alcohol-acetaldehído deshidrogenasa bifuncional (AdhE_{Lm}) más eficiente que la de *E. coli* (Nikel et al., 2010) (Figura 2). Esta cepa productora de etanol fue luego transformada con el plásmido pADP (expresa *phaP*) o el vector vacío pBBR1MCS-1 (Tabla 2) y crecida en medio LB suplementado con 10 g/l de glucosa. Los cultivos fueron realizados en condiciones de microaerobiosis (150 rpm) para favorecer la síntesis de etanol, dado que es en condiciones de baja aireación donde naturalmente se sintetiza este alcohol en *E. coli*. La cepa que expresa la phasina mostró un aumento significativo en el crecimiento, reflejado en una mayor μ_{\max} respecto de la cepa control y en un aumento del 50% en la DO₆₀₀ a 24 h (Figura 33, Tabla 11). Más aún, con la cepa productora de PhaP se obtuvieron 0,84 g/l de etanol, lo cual representa un aumento del 70% en el título final de etanol en comparación con la cepa control (Tabla 11). Estos resultados indican que PhaP ayuda a aliviar el estrés provocado por el etanol

sintetizado por las células, ejerciendo un efecto positivo en el crecimiento celular y, en consecuencia, mejorando la producción de este alcohol en *E. coli*.

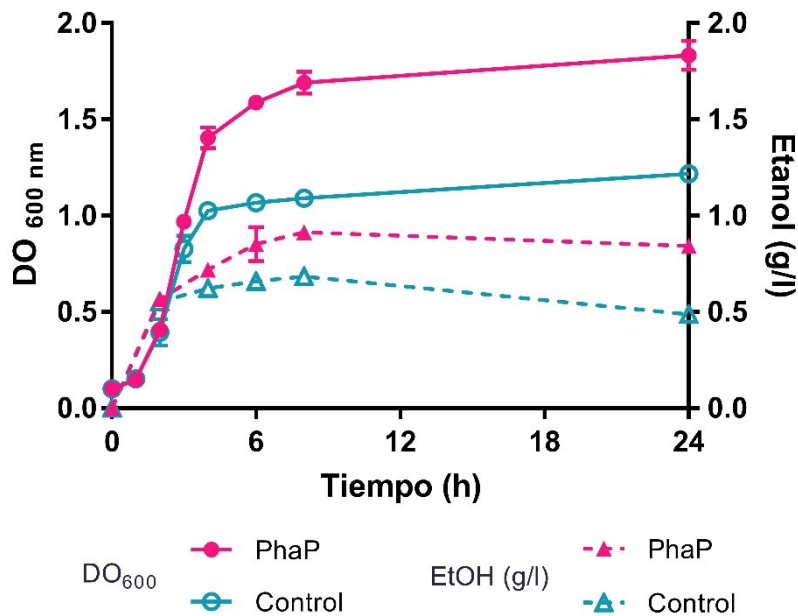


Figura 33. Efecto de PhaP en una cepa de *E. coli* productora de etanol. Se evaluó el crecimiento (líneas continuas) y la síntesis de etanol (líneas discontinuas) en *E. coli* ADA100/pET_{Lm} transformada con los plásmidos pADP2 (PhaP) o pBBR1MCS-1 (control). Las barras de error indican \pm desvío estándar entre triplicados. DO₆₀₀: densidad óptica medida a 600 nm.

Tabla 11: Efecto de PhaP sobre la síntesis de etanol.

Cepa	μ_{\max} (h ⁻¹)	DO ₆₀₀ 24h	Etanol (g/l)
PhaP	0,94 \pm 0,02*	1,83 \pm 0,08*	0,84 \pm 0,04*
Control	0,85 \pm 0,02	1,22 \pm 0,02	0,49 \pm 0,02

Las cepas son derivados de *E. coli* ADA100/pET_{Lm} transformada con los plásmidos pADP2 (PhaP) o pBBR1MCS-1 (control). Los experimentos fueron realizados en condiciones de microaerobiosis (150 rpm) en medio LB suplementado con 10 g/l de glucosa. Los valores corresponden al promedio de determinaciones realizadas por triplicado en al menos dos cultivos independientes \pm desviación estándar. Las diferencias entre las cepas se evaluaron con un t de Student, definiendo como significativo un p-valor < 0,05. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre las cepas. DO₆₀₀: densidad óptica a 600 nm. μ_{\max} : velocidad específica de crecimiento.

Con el fin de seguir caracterizando el efecto de PhaP sobre la síntesis de etanol, comparamos el efecto producido por esta proteína con el de GroELS, una chaperona bien conocida que permitió aumentar el rendimiento de butanol en cepas de *Clostridium* productoras de este alcohol (Tomas et al., 2003).

Para ello, repetimos los experimentos de producción de etanol, incluyendo en el análisis a GroELS. Transformamos nuestra cepa productora ADA100/pET_{Lm} con el plásmido pGROELS1 (que expresa *groELS*) y realizamos cultivos a 24 h para comparar el desempeño de los tres recombinantes etanologénicos (Figura 34). Como puede verse, PhaP y GroELS exhibieron efectos fenotípicos similares, aumentando significativamente el crecimiento, el consumo de glucosa y la concentración de etanol en comparación con la cepa control. Teniendo en cuenta las similitudes observadas en las cepas que expresan *phaP* y *groELS*, los resultados obtenidos en esta parte apoyan la hipótesis de que la coexpresión de chaperonas puede mejorar la producción de etanol en *E. coli* etanologénica. Además, brindan evidencia que señala que los efectos beneficiosos de PhaP en la acumulación de este alcohol se deben, al menos en parte, a sus propiedades de chaperona, ya que se observa un efecto ligeramente más marcado en la síntesis de etanol en la cepa que sobreexpresa *phaP* comparado con la que sobreexpresa *groELS*.

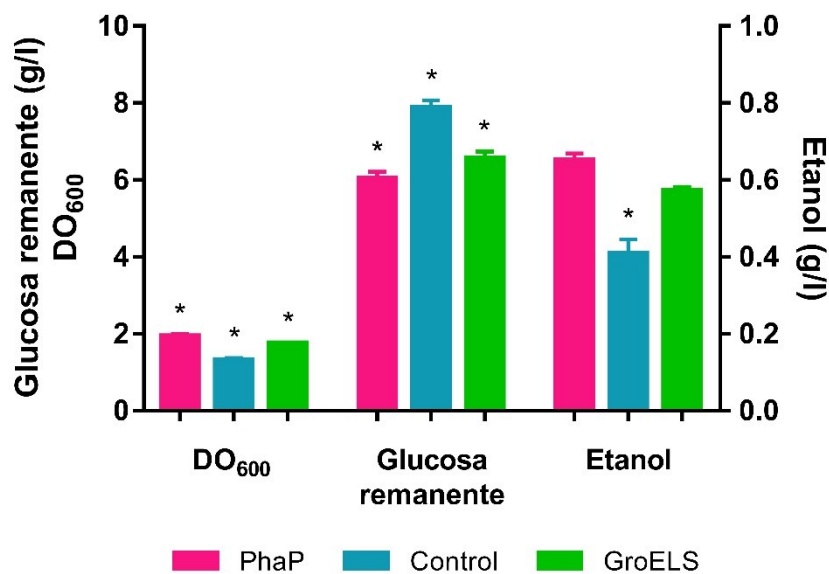


Figura 34. Efectos de PhaP y GroELS en la acumulación de etanol. Se evaluó la biomasa final, la cantidad de glucosa remanente y la concentración de etanol alcanzada al cabo de 24 h de crecimiento. Todas las cepas son derivados de *E. coli* ADA100/pET_{Lm} transformada con los plásmidos pADP2 (PhaP), pBBR1MCS-1 (control) o pGROELS1 (GroELS). Los experimentos fueron realizados en condiciones de microaerobiosis, en medio LB usando glucosa 10 g/l como sustrato. Los valores corresponden al promedio de determinaciones realizadas por triplicado en al menos dos cultivos independientes \pm desviación estándar. Para cada parámetro analizado, se evaluaron las diferencias de resultados entre las cepas aplicando un ANOVA de un factor seguido de un test de Tukey HSD, definiendo como significativo un p-valor < 0,05. Los asteriscos (*) indican que los valores para una dada cepa difieren significativamente de los valores para las otras dos cepas. DO₆₀₀: densidad óptica medida a 600 nm.

Efecto de PhaP en la producción de 1,3-PDO

Teniendo en cuenta que, como vimos previamente, PhaP no sólo es capaz de aumentar la tolerancia al etanol sino también de mejorar su acumulación en cepas productoras y, en vista de que PhaP también ha logrado incrementar la tolerancia a 1,3-propanodiol (1,3-PDO) exógeno, nos propusimos evaluar si esta proteína era capaz de mejorar la síntesis del diol en *E. coli* recombinante.

El 1,3-PDO puede sintetizarse a partir de glicerol mediante una vía metabólica de dos pasos. El primero es la deshidratación del glicerol a 3-hidroxi-propanal, reacción que es catalizada por la enzima glicerol-deshidratasa (GDHt). El segundo paso es la reducción NADH-dependiente del aldehído a 1,3-PDO, catalizada por la enzima 1,3-PDO-oxidoreductasa (PDOR) (Jiang et al., 2016; Nakamura & Whited, 2003) (Figura 3).

Con el objetivo de obtener una cepa de *E. coli* productora de 1,3-PDO, transformamos la cepa ADA100 con el plásmido pS221-PDO, el cual contiene los genes *dhaR*, *dhaG*, *dhaT*, *dhaB*, *dhaC*, *dhaE*, y *dhaF* de *K. pneumoniae* GLC29 bajo el control de sus elementos regulatorios nativos. Los genes *dhaB* y *dhaT* codifican las enzimas GDHt y PDOR, respectivamente. En este sistema, la síntesis de 1,3-PDO se induce por el agregado de glicerol, sustrato de la vía, y requiere del agregado de vitamina B12, en tanto la enzima glicerol-deshidratasa es B12-dependiente. La cepa productora de 1,3-PDO fue, a su vez, transformada con el plásmido pADP (que expresa *phaP*) o el vector vacío pBBR1MCS-1 (Tabla 2).

Para evaluar el efecto de PhaP sobre la acumulación de 1,3-PDO, se crecieron las cepas productoras en medio LB suplementado con 10 g/l de glicerol como fuente de carbono, en condiciones de aerobiosis (200 rpm). La cepa que expresa *phaP* creció significativamente más que la cepa control y también produjo más 1,3-PDO (Tabla 12). Al determinar el sustrato remanente a las 24 h en los sobrenadantes de los cultivos se observó que la cepa que expresa la phasina había consumido todo el glicerol del medio, mientras que aproximadamente la mitad de la concentración inicial de glicerol aún permanecía en los cultivos de la cepa control (Tabla 12). Esto podría deberse a que, al ser más tolerante al 1,3-PDO, la cepa con PhaP no vio limitado su crecimiento por la acumulación del diol, lo cual condujo a un mayor consumo de sustrato y síntesis de producto final.

En función de estos resultados, se repitió el experimento utilizando 40 g/l de glicerol en el medio de cultivo, con el objetivo de impulsar aún más la síntesis de 1,3-PDO. En este caso, la cepa que expresa *phaP* creció aproximadamente hasta la misma DO_{600} que en los cultivos con 10 g/l de glicerol, pero sintetizó mucho más 1,3-PDO que en esos ensayos (Tabla 12). En estas condiciones, la cepa productora de la phasina creció 2,2 veces más que la cepa control, con una μ_{max} significativamente mayor ($0,963 \pm 0,008 \text{ h}^{-1}$ vs $0,906 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$). Como puede verse en la figura 35, mientras que el crecimiento de la cepa control alcanzó un *plateau* a partir de las 8 h, la cepa con PhaP continuó creciendo por varias

horas más. La síntesis del diol se incrementó marcadamente durante la última fase de crecimiento, y continuó aumentando incluso después de que el crecimiento celular hubo cesado. Esto le permitió a la cepa que expresa *phaP* producir 5,2 g/l de 1,3-PDO, alcanzando un título 12,8 veces más alto que el de la cepa control (Figura 35, Tabla 12).

Tabla 12: Efecto de PhaP sobre la síntesis de 1,3-PDO utilizando diferentes concentraciones de sustrato.

Sustrato	Cepa	DO ₆₀₀ 24 h	1,3-PDO (g/l)	Glicerol remanente (g/l)
Glicerol 10 g/l	PhaP	21 ± 1*	1,24 ± 0,09*	-
	Control	7,9 ± 0,2	0,34 ± 0,08	6,04 ± 0,02
Glicerol 40 g/l	PhaP	20,0 ± 0,1*	5,2 ± 0,3*	14,6 ± 0,6*
	Control	8,9 ± 0,1	0,4 ± 0,1	32 ± 1

Las cepas son derivadas de *E. coli* ADA100/pS221-PDO transformada con los plásmidos pADP2 (PhaP) o pBBR1MCS-1 (control). Los experimentos fueron realizados en condiciones de aerobiosis (200 rpm) en medio LB suplementado con 10 g/l o 40 g/l de glicerol. Los valores corresponden al promedio de determinaciones realizadas por triplicado en al menos dos cultivos independientes ± desviación estándar. Las diferencias entre las cepas se evaluaron con un t de Student, definiendo como significativo un p-valor < 0,05. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre las cepas. DO₆₀₀: densidad óptica a 600 nm. 1,3-PDO: 1,3-propanodiol.

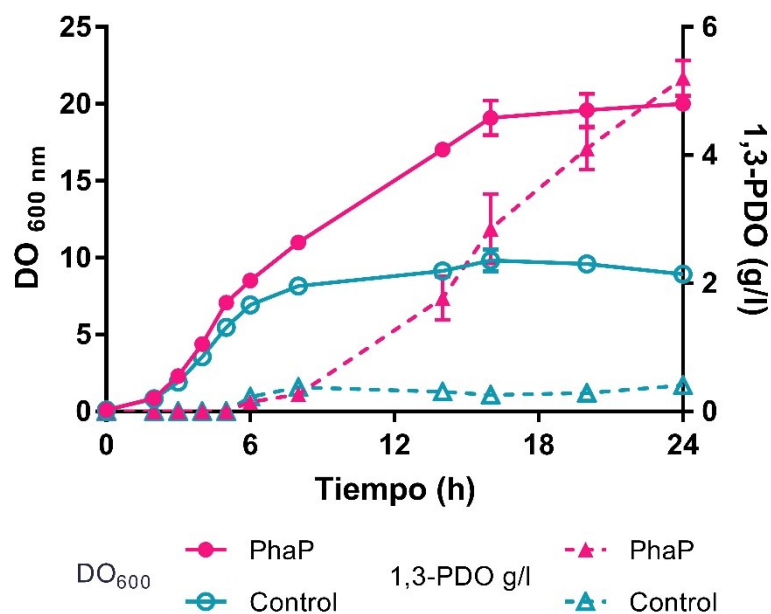


Figura 35. Efecto de PhaP en una cepa de *E. coli* productora de 1,3-PDO. Se evaluó el crecimiento (líneas continuas) y la síntesis de 1,3-PDO (líneas discontinuas) en *E. coli* ADA100/pS221-PDO transformada con los plásmidos pADP2 (PhaP) o pBBR1MCS-1 (control). Las barras de error indican ± desvío estándar entre triplicados. DO₆₀₀: densidad óptica medida a 600 nm. 1,3-PDO: 1,3-propanodiol.

Nuevamente, con el objetivo de comparar los efectos de PhaP con el de una chaperona bien conocida, repetimos los ensayos de producción incluyendo en el análisis a GroELS. Para ello, transformamos nuestra cepa productora ADA100/pS221-PDO con el plásmido pGROELS1 (que expresa *groELS*) y realizamos cultivos a 24 h para comparar el desempeño de los tres recombinantes productores de 1,3-PDO (Figura 36). Los ensayos fueron realizados en medio LB suplementado con 40 g/l de glicerol, en condiciones aeróbicas (200 rpm). El crecimiento de las cepas que expresan *phaP* o *groELS* fue aproximadamente el doble que el de la cepa control, con un incremento aún mayor del consumo de glicerol y de la concentración de 1,3-PDO, demostrando que ambas proteínas tienen un claro efecto en la síntesis de este bioproducto. Más aún, las cepas que producen PhaP y GroELS mostraron diferencias pequeñas pero no significativas en la DO₆₀₀ final, en la cantidad de glicerol remanente en el medio de cultivo, y en el título final de 1,3-PDO producido. Otra vez, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que los efectos beneficiosos de PhaP en la síntesis de bioproductos se deben a sus propiedades de chaperona, y que la coexpresión de las enzimas biosintéticas con este tipo de proteínas es una estrategia efectiva para mejorar la producción de compuestos de interés biotecnológico en *E. coli*.

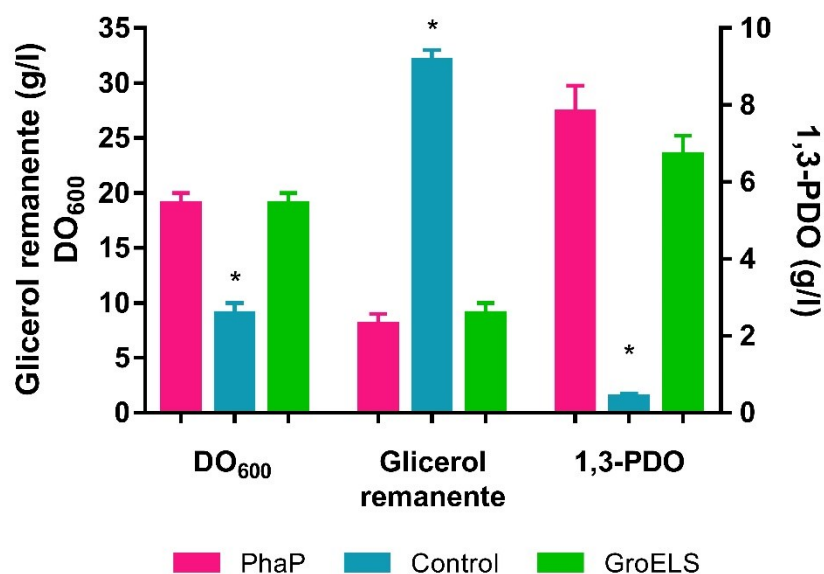


Figura 36. Efectos de PhaP y GroELS en la acumulación de 1,3-propanodiol. Se evaluó la biomasa final, la cantidad de glicerol remanente y la concentración de 1,3-propanodiol alcanzada al cabo de 24 h de crecimiento. Todas las cepas son derivados de *E. coli* ADA100/pS221-PDO transformada con los plásmidos pADP2 (PhaP), pBBR1MCS-1 (control) o pGROELS1 (GroELS). Los experimentos fueron realizados en condiciones aeróbicas, en medio LB usando glicerol 40 g/l como sustrato. Los valores corresponden al promedio de determinaciones realizadas por triplicado en al menos dos cultivos independientes \pm desviación estándar. Para cada parámetro analizado, se evaluaron las diferencias de resultados entre las cepas aplicando un ANOVA de un factor seguido de un test de Tukey HSD, definiendo como significativo un p-valor $< 0,05$. Los asteriscos (*) indican que los valores para una dada cepa difieren significativamente de los valores para las otras dos cepas. DO₆₀₀: densidad óptica medida a 600 nm. 1,3-PDO: 1,3-propanodiol.

Efecto de PhaP en la producción de estireno

Construcción de las cepas productoras de estireno

Dado que hemos visto que PhaP es capaz de mejorar la síntesis de varios productos de interés biotecnológico en *E. coli* recombinante, tales como proteínas heterólogas y solventes como el etanol y 1,3-PDO, se buscó analizar si su expresión también permitía obtener mayores títulos de estireno. Para ello, se transformó la cepa BL21(DE3) con los plásmidos pS4412palRt y pS2311fdcSc (gentilmente donados por el Dr. Pablo Nickel), los cuales permiten la sobreexpresión de *pal* de *Rhodospiridium toruloides* y *fdc1* de *S. cerevisiae*, respectivamente. Estos genes codifican las enzimas PAL y FDC, que permiten la síntesis de estireno en *E. coli* a partir de L-Phe (Figura 4). Esta cepa productora de estireno, a la cual denominamos BL21 sty, fue luego transformada con el plásmido pPhaP328 (que expresa *phaP*) o el vector vacío pSEVA328 (Tabla 2).

Como puede verse, nuestro sistema de expresión implica la síntesis de proteínas de diferentes orígenes en *E. coli*, cada una codificada en un plásmido distinto, además de la síntesis de un compuesto que no es parte del metabolismo de la bacteria, en un medio con varios antibióticos. Esto representa una carga metabólica importante para la bacteria, y una potencial fuente de estrés.

Dado que el número de plásmidos, así como su estabilidad, podría afectar el crecimiento celular (Bentley et al., 1990), antes de comenzar con los experimentos de producción realizamos curvas de crecimiento de las cepas. Para ello, se creció a las células en frascos de vidrio de 50 ml conteniendo 10 ml de medio LB. Los cultivos fueron cerrados con tapones de goma e incubados a 37°C con agitación constante de 200 rpm. Al cabo de 1 h de crecimiento se indujo la expresión de *phaP* con ácido m-toluico 1 mM (las proteínas PAL y FDC no fueron inducidas en estos ensayos). Como puede observarse en la figura 37, a pesar de que ambas cepas llegaron a valores similares de DO_{600} al cabo de 24 h, se observaron diferencias significativas en sus velocidades de crecimiento máxima. La cepa que expresa *phaP* creció significativamente más rápido que la cepa control ($0,608 \pm 0,009 \text{ h}^{-1}$ vs $0,56 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$), poniendo de manifiesto su efecto promotor de crecimiento en estas condiciones de mayor carga metabólica dada por el múltiple número de plásmidos.

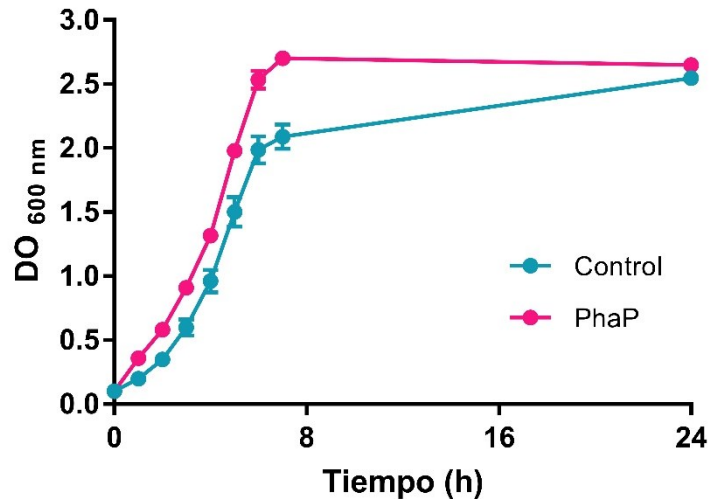


Figura 37. Curvas de crecimiento de la cepa de *E. coli* BL21 sty transformada con los plásmidos pPhaP328 (PhaP) o pSEVA328 (control). Los experimentos fueron realizados en botellas de 50 ml cerradas con tapones de goma, conteniendo 10 ml de medio LB, e incubadas a 37°C y 200 rpm de agitación. Las barras de error indican \pm desvío estándar entre triplicados. DO_{600 nm}: densidad óptica medida a 600 nm.

Optimización de las condiciones de crecimiento para la producción de estireno

Dado que el estireno es un compuesto volátil (presión de vapor: 4,5 mm Hg a 20°C), con una solubilidad limitada en agua (300 mg/l a 20°C), uno de los mayores desafíos de los ensayos de producción fue poder capturar la mayor cantidad posible del estireno producido. Para evitar la pérdida del producto, las cepas fueron crecidas en botellas cerradas con tapones de goma y precintos de aluminio. Además, se ensayaron dos condiciones de crecimiento: cultivos monofásicos y bifásicos. Mientras que los primeros no tuvieron fase orgánica añadida, a los cultivos bifásicos se les añadió n-dodecano en una fracción de volumen de 0,2 respecto del medio, con el fin de realizar una recuperación *in situ* del producto. El n-dodecano es un solvente ideal para este tipo de estrategias en tanto es un compuesto biocompatible pero no biodisponible, que posee una partición de alto equilibrio del estireno sobre el agua. Además, ya había sido efectivamente probado para la recuperación *in situ* de estireno y había demostrado ser capaz de extraer del medio de cultivo más del 99% del total del estireno producido, al ser utilizado en la misma fracción de volumen (McKenna et al., 2015).

Las cepas productoras fueron crecidas en condiciones de aerobiosis (200 rpm, utilizando una relación de volumen de cultivo:volumen del frasco [Vc:Vf] de 1:10) en medio LB suplementado con 10 g/l de glucosa y 2 g/l de L-Phe. Tanto en los cultivos bifásicos como en los monofásicos, la cepa que expresa

phaP produjo 6 veces más estireno que la cepa control (Figura 38). Estos resultados indican que PhaP también es capaz de mejorar la síntesis de estireno en *E. coli* recombinante.

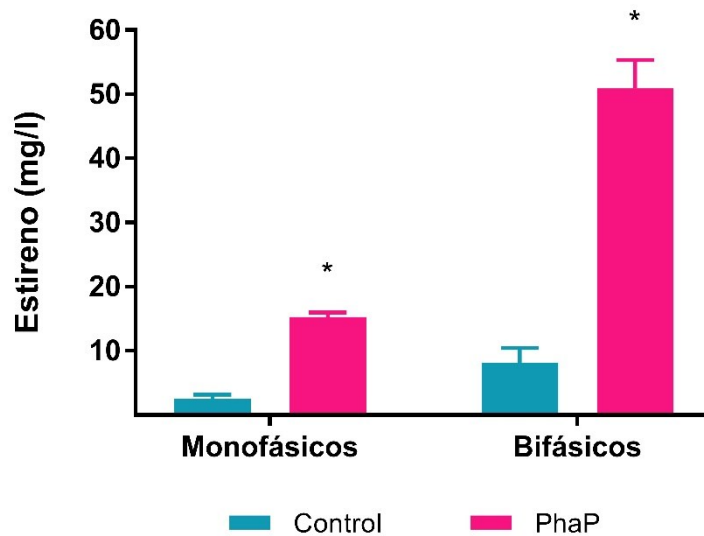


Figura 38. Efecto de PhaP sobre la síntesis de estireno en medio LB. Se determinó el título de estireno obtenido al cabo de 24 h por las cepas BL21 sty/pPhaP328 (PhaP) y BL21 sty/pSEVA328 (control). Los experimentos fueron realizados en botellas tapadas (relación de volumen de cultivo:volumen del frasco de 1:10), en medio LB suplementado con glucosa 10 g/l y L-fenilalanina 2 g/l. Los valores corresponden al promedio de determinaciones realizadas por triplicado en al menos dos cultivos independientes \pm desviación estándar. Las diferencias entre las cepas se evaluaron con un t de Student, definiendo como significativo un p-valor $< 0,05$. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre las cepas.

Si comparamos la producción entre los dos tipos de cultivo, se observa que en los cultivos bifásicos se obtuvo un aumento de más de 3 veces en el título de estireno que en los monofásicos (Tabla 13). Esto pone de manifiesto que la estrategia de recuperación *in situ* con n-dodecano resulta la más eficiente para la producción de estireno. Esto se debe a que el n-dodecano, además de favorecer la extracción del estireno, también favorece a las células dado que evita la potencial acumulación de este compuesto en el medio de cultivo hasta niveles inhibitorios (McKenna et al., 2015).

Tabla 13: Efecto de PhaP sobre la síntesis de estireno en medio LB.

Tipo de cultivo	Cepa	DO ₆₀₀ 24h	Estireno (mg/l)	L-Phe (g/l) remanente	Glucosa (g/l) remanente
Monofásico	PhaP	2,6 ± 0,3	15,3 ± 0,7*	1,6 ± 0,3	3,2 ± 0,3
	Control	2,9 ± 0,3	2,5 ± 0,7	2,0 ± 0,5	3,2 ± 0,7
Bifásico	PhaP	3,1 ± 0,1	51 ± 4*	1,3 ± 0,2	4,3 ± 0,4
	Control	3,3 ± 0,3	8 ± 2	1,6 ± 0,3	4,9 ± 0,4

Resultados obtenidos con las cepas BL21 sty/pPhaP328 (PhaP) y BL21 sty/pSEVA328 (control) al cabo de 24 h de crecimiento. Los experimentos fueron realizados en botellas tapadas (relación de volumen de cultivo:volumen del frasco de 1:10), en medio LB suplementado con glucosa 10 g/l y L-fenilalanina 2 g/l. Los valores corresponden al promedio de determinaciones realizadas por triplicado en al menos dos cultivos independientes ± desviación estándar. Las diferencias entre las cepas se evaluaron con un t de Student, definiendo como significativo un p-valor < 0,05. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre las cepas. DO₆₀₀: densidad óptica a 600 nm. L-Phe: L-fenilalanina.

Con el objetivo de seguir optimizando las condiciones de cultivo y, en vistas de un posible escalado futuro, decidimos repetir los experimentos utilizando un medio semi-definido. Este tipo de medios es más compatible con los procesos fermentativos, ya que, además de ser más barato, el medio mínimo ayuda a obtener resultados más reproducibles. El medio semi-definido utilizado, al cual denominamos medio M9 TE, consiste de una matriz de medio M9, con el agregado de tiamina, extracto de levadura y una solución de trazas. El extracto de levadura funciona como fuente de vitaminas y de nitrógeno orgánico, en forma de aminoácidos y péptidos.

De esta forma, las cepas productoras fueron crecidas en medio M9 TE, suplementado con 10 g/l de glucosa y 2 g/l de L-Phe, en botellas tapadas, con agitación (200 rpm, utilizando una relación Vc:Vf de 1:10), y en las dos condiciones de crecimiento previas: cultivos monofásicos, sin fase orgánica añadida, y cultivos bifásicos, con n-dodecano. Tal como habíamos visto previamente, la cepa que expresa *phaP* produjo mayores concentraciones de estireno en ambos tipos de cultivos (Figura 39). En los cultivos monofásicos, la cepa productora de PhaP sintetizó más del doble de estireno que la cepa control, mientras que en los cultivos bifásicos la producción fue casi 3 veces mayor en la cepa que expresa *phaP* (Tabla 14).

Si comparamos estos resultados con los obtenidos previamente con el medio LB, vemos que ambas cepas produjeron más estireno cuando fueron crecidas en medio M9 TE (Tablas 13 y 14). Esto pone de manifiesto que, además de ser menos costosa, la producción de estireno resultó más eficiente en un medio semi-definido como el M9 TE.

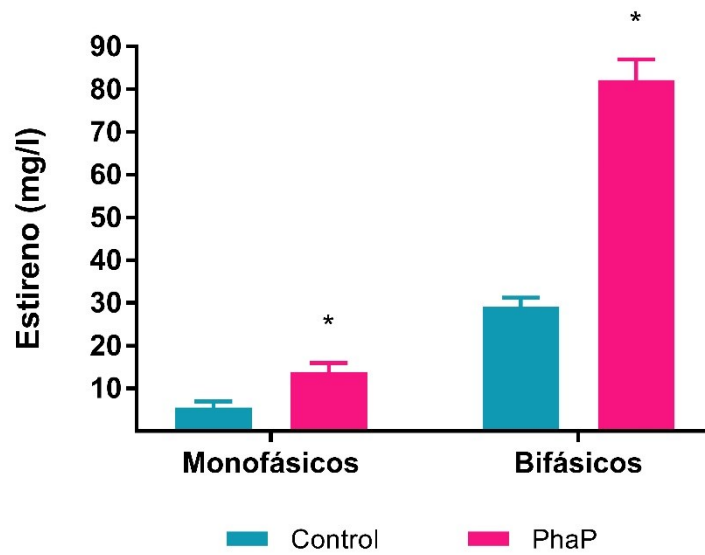


Figura 39. Efecto de PhaP sobre la síntesis de estireno en medio M9 TE. Se determinó el título de estireno obtenido al cabo de 24 h por las cepas BL21 sty/pPhaP328 (PhaP) y BL21 sty/pSEVA328 (control). Los experimentos fueron realizados en botellas tapadas (relación de volumen de cultivo:volumen del frasco de 1:10), en medio M9 TE suplementado con glucosa 10 g/l y L-fenilalanina 2 g/l. Los valores corresponden al promedio de determinaciones realizadas por triplicado en al menos dos cultivos independientes \pm desviación estándar. Las diferencias entre las cepas se evaluaron con un t de Student, definiendo como significativo un p-valor $< 0,05$. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre las cepas.

Tabla 14: Efecto de PhaP sobre la síntesis de estireno en medio M9 TE.

Tipo de cultivo	Cepa	DO ₆₀₀ 24h	Estireno (mg/l)	L-Phe (g/l) remanente	Glucosa (g/l) remanente
Monofásico	PhaP	2,74 \pm 0,04*	14 \pm 2*	1,78 \pm 0,03*	1,06 \pm 0,05*
	Control	2,19 \pm 0,09	5 \pm 1	2,03 \pm 0,07	1,71 \pm 0,11
Bifásico	PhaP	2,2 \pm 0,2	82 \pm 5*	1,58 \pm 0,02*	1,01 \pm 0,05*
	Control	2,0 \pm 0,2	29 \pm 2	1,77 \pm 0,04	1,8 \pm 0,1

Resultados obtenidos con las cepas BL21 sty/pPhaP328 (PhaP) y BL21 sty/pSEVA328 (control) al cabo de 24 h de crecimiento. Los experimentos fueron realizados en botellas tapadas (relación de volumen de cultivo:volumen del frasco de 1:10), en medio M9 TE suplementado con glucosa 10 g/l y L-fenilalanina 2 g/l. Los valores corresponden al promedio de determinaciones realizadas por triplicado en al menos dos cultivos independientes \pm desviación estándar. Las diferencias entre las cepas se evaluaron con un t de Student, definiendo como significativo un p-valor $< 0,05$. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre las cepas. DO₆₀₀: densidad óptica a 600 nm. L-Phe: L-fenilalanina.

Sin embargo, en estos experimentos nos llamó la atención que la DO₆₀₀ final alcanzada por los cultivos (Tabla 14) era mucho menor que la de los precultivos, los cuales normalmente alcanzaban una DO₆₀₀ de 5. Tanto el medio de cultivo, como el tipo de botellas, la temperatura y la agitación eran los mismos

para los precultivos y los cultivos. Las únicas diferencias entre ellos eran la inducción y la aireación, dado que los precultivos no estaban cerrados con tapones y precintos de aluminio. Para descartar que una baja aireación estuviese perjudicando el desempeño de las cepas durante la producción, decidimos repetir los experimentos utilizando botellas más grandes, para incrementar la disponibilidad de oxígeno, manteniendo la hermeticidad.

Nuevamente, las cepas productoras fueron crecidas en botellas tapadas, para evitar la pérdida de producto, pero utilizando una relación de Vc:Vf de 1:20. Se realizaron cultivos solamente en las condiciones bifásicas, dado que habíamos visto que eran las más eficientes, en medio M9 TE suplementado con 10 g/l de glucosa y 2 g/l de L-Phe. En estos ensayos, al igual que en los experimentos previos, la presencia de la phasina permitió alcanzar títulos de estireno significativamente mayores que la cepa control (Figura 40). En este caso, el título obtenido con la cepa productora de la phasina fue de 122 mg/l, convirtiéndose en el mayor de todos los experimentos realizados en este trabajo de tesis (Tabla 15).

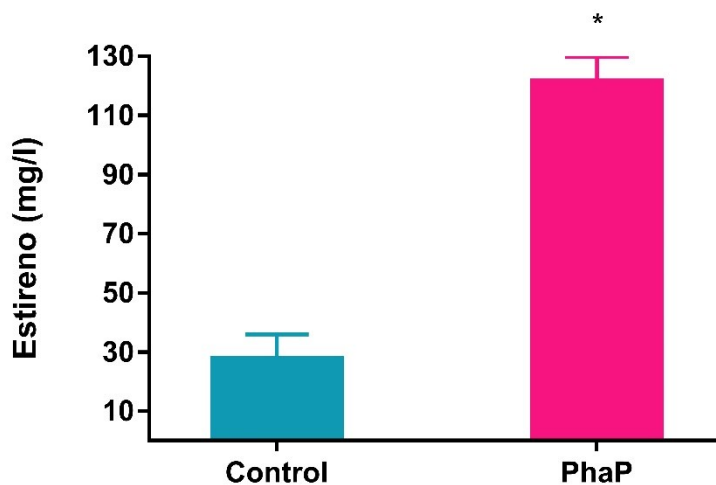


Figura 40. Síntesis de estireno en medio M9 TE en botellas con una relación de volumen de cultivo:volumen del frasco de 1:20. Se determinó el título de estireno obtenido al cabo de 24 h por las cepas BL21 sty/pPhaP328 (PhaP) y BL21 sty/pSEVA328 (control). Los experimentos fueron realizados en condiciones de aerobiosis, en medio M9 TE suplementado con glucosa 10 g/l y L-fenilalanina 2 g/l. Los valores corresponden al promedio de determinaciones realizadas por triplicado en al menos dos cultivos independientes \pm desviación estándar. Las diferencias entre las cepas se evaluaron con un t de Student, definiendo como significativo un p-valor $< 0,05$. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre las cepas.

Tabla 15: Síntesis de estireno en medio M9 TE con relación de volumen de cultivo:volumen de frasco de 1:20.

Tipo de cultivo	Cepa	DO ₆₀₀ 24h	Estireno (mg/l)	L-Phe (g/l) remanente	Glucosa (g/l) remanente
Bifásico	PhaP	5,7 ± 0,1*	122 ± 8*	0,98 ± 0,08*	0,1 ± 0,1
	Control	2,5 ± 0,1	28 ± 8	1,8 ± 0,1	0,1 ± 0,1

Resultados obtenidos con las cepas BL21 sty/pPhaP328 (PhaP) y BL21 sty/pSEVA328 (control) al cabo de 24 h de crecimiento. Los experimentos fueron realizados en botellas tapadas (relación de volumen de cultivo:volumen del frasco de 1:20), en medio M9 TE suplementado con glucosa 10 g/l y L-fenilalanina 2 g/l. Los valores corresponden al promedio de determinaciones realizadas por triplicado en al menos dos cultivos independientes ± desviación estándar. Las diferencias entre las cepas se evaluaron con un t de Student, definiendo como significativo un p-valor < 0,05. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre las cepas. DO₆₀₀: densidad óptica a 600 nm. L-Phe: L-fenilalanina.

Cuando comparamos los resultados en ambas condiciones de aireación, podemos ver que, si bien la cepa que expresa *phaP* produjo más estireno cuando fue crecida en botellas con una relación Vc:Vf de 1:20, la cepa control no mostró diferencias significativas en los títulos de estireno obtenidos en los dos tipos de botellas. Además, a pesar de que consumió toda la glucosa suministrada, la cepa control tampoco aumentó notablemente su biomasa final en los cultivos con relación Vc:Vf 1:20 (Tablas 14 y 15). En función de estos resultados, nos interesó estudiar cómo fue la distribución de carbono en los cultivos realizados en los dos tipos de botellas.

Caracterización metabólica de las cepas productoras de estireno

Con el fin de realizar una caracterización metabólica de las cepas, se determinó por HPLC la concentración de los ácidos orgánicos secretados por los cultivos en los dos tipos de frascos. Para que esta comparación tuviera en cuenta las diferencias en la biomasa, calculamos la producción específica de cada ácido como el cociente entre su concentración y el peso seco de biomasa.

Como puede observarse en la figura 41, todos los cultivos produjeron ácidos de fermentación como lactato, succinato, acetato, piruvato y citrato. Esto indica que, en cierto punto del crecimiento, las células llevaron a cabo una vía de fermentación ácido mixta. Como era esperable, el acetato fue el ácido mayoritario producido por ambas cepas, en los dos tipos de botella. La acumulación de acetato ha sido ampliamente descrita en *E. coli* cuando crece con una alta tasa de consumo de glucosa (Andersen & von Meyenburg, 1980) y es un fenómeno conocido como metabolismo de desbordamiento. No obstante, en los cultivos con relación Vc:Vf 1:20 que producen *phaP*, se observó

una disminución en la síntesis de acetato. La disminución en la síntesis de acetato y del resto de los ácidos en ambas cepas, al comparar las dos condiciones, refleja una diferencia en la disponibilidad de oxígeno. De este modo, podemos ver que la utilización de frascos con relación Vc:Vf 1:20 nos permitió aumentar la disponibilidad de oxígeno de los cultivos.

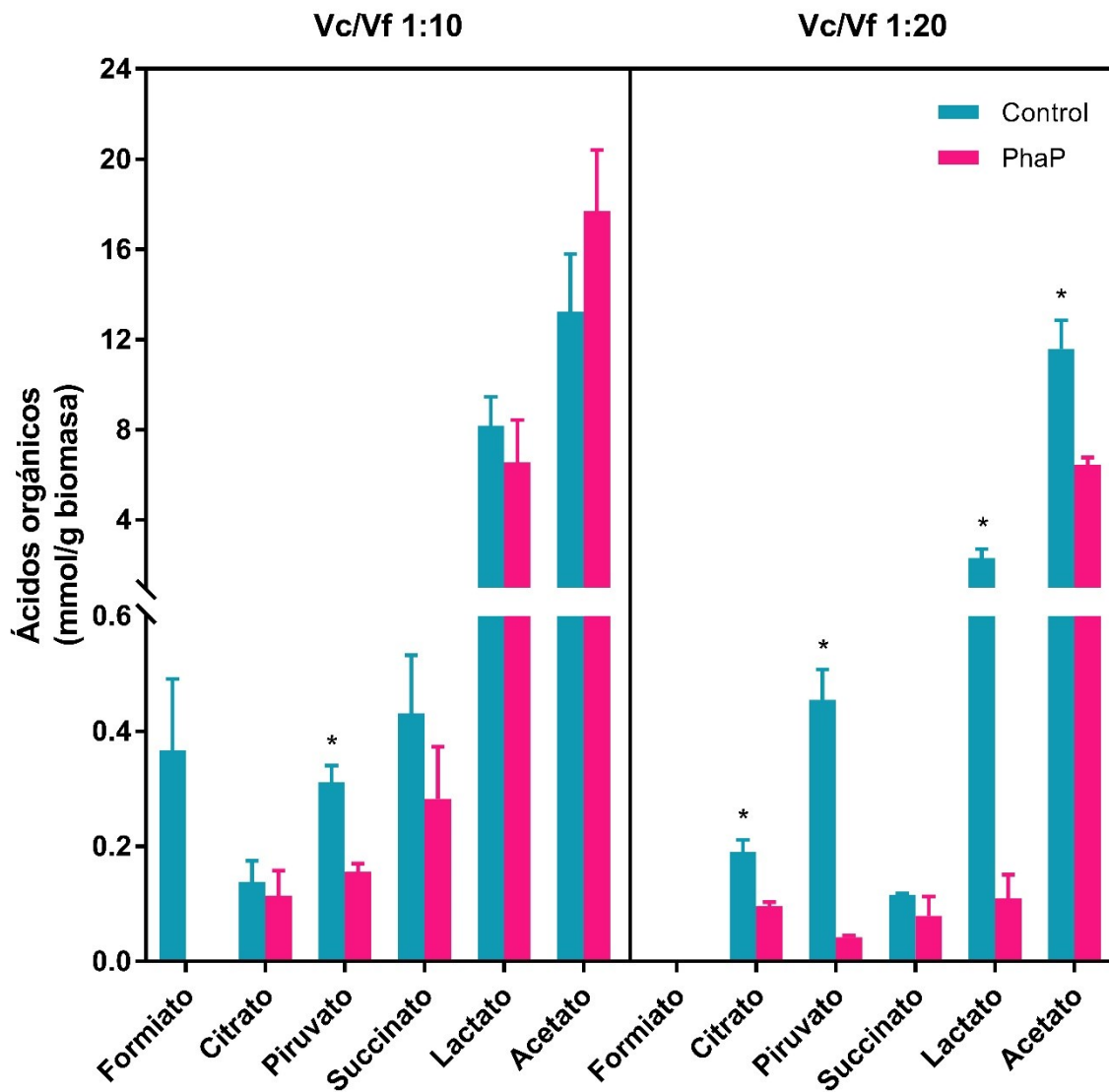


Figura 41. Perfil de secreción de ácidos orgánicos obtenido con las cepas BL21 sty/pPhaP328 (PhaP) y BL21 sty/pSEVA328 (control) al cabo de 24 h de crecimiento. Se comparan dos condiciones de cultivo: botellas tapadas con una relación Vc:Vf de 1:10 o 1:20, agitadas a 200 rpm. Los experimentos fueron realizados en condiciones bifásicas, en medio M9 TE suplementado con glucosa 10 g/l y L-fenilalanina 2 g/l. Los valores corresponden al promedio de determinaciones realizadas por triplicado en al menos dos cultivos independientes \pm desviación estándar. Las diferencias entre las cepas en cada condición se evaluaron con un t de Student, definiendo como significativo un p-valor $< 0,05$. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre las cepas. Vc:Vf: volumen de cultivo:volumen del frasco.

Para la cepa control, el crecimiento en los frascos con mayor espacio de cabeza no produjo una disminución tan marcada en la síntesis de ácidos fermentativos como en la de la cepa que expresa la phasina. De hecho, mientras que en los cultivos de relación Vc:Vf 1:10 no se habían observado diferencias significativas entre las cepas en la producción de la mayoría de los ácidos, en los cultivos más aireados, la síntesis de citrato, piruvato, lactato y acetato fue significativamente mayor para la cepa control que la cepa productora de PhaP (Figura 41).

Es particularmente notable la disminución en la concentración de formiato, aunque este ácido no es un producto mayoritario. No se detectó formiato en los cultivos de las cepas con mayor aireación, y en el caso de la cepa con PhaP en ninguna de las condiciones. También vale la pena destacar los niveles de detección de lactato, otro ácido que suele ser minoritario, aunque fue el segundo ácido más abundante en los cultivos en botellas pequeñas para ambas cepas, y en las botellas más grandes para la cepa control (Figura 41).

En conjunto, los resultados obtenidos en esta sección demuestran que la coexpresión de PhaP junto con las enzimas PAL y FDC es una estrategia efectiva para mejorar la síntesis de estireno. Si bien las condiciones del cultivo juegan un papel importante en los rendimientos de producción, la presencia de PhaP generó aumentos significativos en los títulos obtenidos bajo todas las condiciones probadas. Teniendo en cuenta que la utilización de frascos con mayor relación Vc:Vf nos permitió alcanzar mayores títulos de estireno a la vez que sintetizar menos sub-productos fermentativos, concluimos que las condiciones más adecuadas para la producción de este compuesto de alto valor agregado son los cultivos bifásicos en botellas con relación Vc:Vf de 1:20.

Discusión

Sobre el efecto de PhaP en la producción de proteínas heterólogas

La producción de proteínas recombinantes es crucial para el desarrollo de nuevos fármacos y *E. coli* es el organismo más utilizado para esta aplicación biotecnológica. No obstante, han sido reportadas diversas limitaciones relacionadas con este proceso, como la acumulación de las proteínas recombinantes en cuerpos de inclusión citoplasmáticos o periplasmáticos y la lisis celular, que reducen significativamente los rendimientos. Una de las estrategias más utilizadas para reducir la agregación y para optimizar la síntesis de estos productos recombinantes es la coexpresión con chaperonas (Kolaj et al., 2009; Overton, 2014). Dado que ha sido demostrado que PhaP presenta actividad de chaperona (Mezzina et al., 2015), se planteó la hipótesis de que su sobreexpresión podría optimizar la síntesis de proteínas provenientes de otras bacterias en sus formas solubles y activas. Para poner a prueba esta hipótesis, la coexpresamos con dos enzimas beta-galactosidasas provenientes de la bacteria *B. breve* DSM 20213. Los resultados obtenidos demostraron que la presencia de la phasina permite aumentar significativamente los niveles de actividad enzimática de las β -gal.

Estas mismas proteínas también habían sido coexpresadas con la chaperona GroELS, obteniéndose un aumento de la actividad enzimática de 30 y 14 veces para las β -gal I y II, respectivamente (Arreola et al., 2014). El efecto de PhaP en nuestros experimentos fue más modesto que el de GroELS, lográndose un aumento de más de 3 veces en la actividad de estas enzimas. Si bien las cepas y los plásmidos utilizados en esta tesis y el trabajo de Arreola y colaboradores son los mismos, hay ciertas variaciones en los ensayos que podrían dar cuenta de las diferencias observadas. En primer lugar, los autores crecieron las bacterias en MagicMedia, un medio que promueve altos niveles de expresión de genes regulados por T7 sin necesidad de agregar un reactivo inductor, mientras que nuestros cultivos fueron realizados en medio LB e inducidos con IPTG. Estas condiciones pueden impactar sobre la síntesis proteica, ya que ha sido demostrado que la inducción de pulsos puede conducir a la activación de varias proteasas inducibles por estrés (Hoffmann & Rinas, 2004). En segundo lugar, los autores crecieron las bacterias a 20°C mientras que nuestros ensayos fueron realizados a 30°C. El uso de temperaturas más bajas tiene como objetivo ralentizar la síntesis proteica y reducir la carga metabólica de la cepa, optimizando la producción. En tercer lugar, los autores utilizaron el vector comercial pGro7 (Takara Bio Inc.), que tiene un mayor número de copias que el vector que nosotros utilizamos para expresar la phasina (Jahn et al., 2016). Estos factores podrían explicar la diferencia en los niveles de aumento de la actividad enzimática promovidos por cada chaperona. Sin embargo, no puede descartarse que GroELS funcione mejor que PhaP para optimizar la expresión de estas β -gal. Ha sido extensamente demostrado que algunos sistemas de chaperonas funcionan bien para un

sustrato y no para otros, y que estas afinidades suelen ser difíciles de predecir (Martínez-Alonso et al., 2010; Schlieker et al., 2002). Sin ir más lejos, para un mismo tipo de proteína pueden observarse afinidades diferentes con la misma chaperona. Por ejemplo, mientras que la coexpresión de GroELS con las β -gal I y II de *B. breve* DSM 20213 condujo a un aumento notable en la actividad enzimática, la misma estrategia con la β -gal de *Lactobacillus helveticus* DSM 20075 no sólo no produjo un aumento en la actividad enzimática, sino que mostró una disminución de la actividad de cuatro veces en comparación con la obtenida en las células sin chaperonas (Kittibunchakul et al., 2019). Estos resultados demuestran la complejidad de los bioprocesos recombinantes y resaltan la importancia de continuar el estudio de posibles estrategias para mejorarlos.

Con respecto de la caracterización de PhaP, estos resultados completan las observaciones en las que se demostró la actividad chaperona *in vitro*, a través del análisis del efecto de PhaP sobre el plegado de citrato sintasa, e *in vivo*, en donde se observó que PhaP era capaz de mejorar la solubilidad de una proteína recombinante disminuyendo la formación de cuerpos de inclusión (Mezzina et al., 2015). Mientras que los trabajos anteriores se centraban en aspectos estructurales, las pruebas con las β -gal permitieron demostrar por primera vez que los efectos de PhaP aumentan la actividad enzimática de las proteínas coexpresadas.

Sobre el efecto de PhaP en la producción de etanol

Una de las principales limitaciones de la aplicación de microorganismos en la producción de solventes y biocombustibles es su toxicidad. La presencia y acumulación de estos compuestos tóxicos puede afectar negativamente las tasas de crecimiento y reducir la viabilidad celular, limitando la capacidad productiva de las cepas. Por esta razón, se han desarrollado diversas estrategias para aumentar la tolerancia de los microorganismos productores, como la expresión de bombas de eflujo, de proteínas que modifican la composición y fluidez de la membrana, o de proteínas involucradas en mecanismos de respuesta a estrés, entre otros (Dunlop, 2011; Nicolaou et al., 2010). Dado que se ha demostrado que la sobreexpresión de chaperonas permite aumentar la tolerancia bacteriana a solventes (Abdelaal et al., 2015; Zingaro & Papoutsakis, 2012, 2013), y que se han observado los mismos efectos con PhaP en los experimentos descritos en el primer capítulo, se evaluó la posibilidad de que esta estrategia también sea efectiva para mejorar la producción de solventes y precursores químicos en cepas capaces de sintetizarlos.

Para explorar esta hipótesis, se evaluó el efecto de PhaP en el crecimiento y la producción de etanol en una cepa etanológica de *E. coli* recombinante. En estos experimentos se observó que la

expresión de *phaP* incrementó el crecimiento bacteriano y el título del producto final en comparación con la cepa control, demostrando que la phasina no sólo es capaz de aumentar la tolerancia al etanol sino también de mejorar su producción. Adicionalmente, se hicieron ensayos para comparar el efecto de PhaP con una chaperona bien caracterizada como GroELS y los resultados fueron muy similares con ambas proteínas, reforzando la hipótesis de que la sobreexpresión de chaperonas es un método efectivo para aumentar la producción de este biocombustible.

Los primeros en utilizar esta estrategia fueron Tomas y colaboradores, quienes al sobreexpresar *groELS* en *C. acetobutylicum*, obtuvieron un aumento del 32% en el título de butanol (Tomas et al., 2003). Desde entonces, diversos autores sobreprodujeron HSPs homólogas y heterólogas en distintas cepas del productor natural *C. acetobutylicum* con el objetivo de mejorar la producción de este solvente (Bormann et al., 2014; Liao et al., 2017; Mann et al., 2012). Por otro lado, la sobreexpresión de *groELS* también se utilizó para mejorar la acumulación de etanol en el productor natural *Z. mobilis*, en el cual condujo a un aumento del título del 11% en fermentaciones a alta temperatura utilizando jugo de sorgo dulce como sustrato (Kaewchana et al., 2021). En *E. coli* recombinante, por su parte, la sobreexpresión de *ibpA* y *groELS* se utilizó para mejorar la síntesis de isopentenol y floroglucinol en un 11% y 40%, respectivamente (Foo et al., 2014; Zhang et al., 2017).

Si bien los ensayos de producción de etanol desarrollados en este trabajo de tesis fueron realizados como prueba de concepto de la capacidad de PhaP para mejorar la síntesis de compuestos químicos de alto valor agregado, se debe destacar que el aumento en el título obtenido con la phasina respecto de la cepa control (70%) es mayor que el de los trabajos antes descritos con otras chaperonas para diversos compuestos en productores naturales y recombinantes.

Sobre el efecto de PhaP en la producción de 1,3-propanodiol

Los resultados obtenidos con la cepa productora de etanol abrieron la posibilidad de que PhaP pueda también mejorar la síntesis de 1,3-PDO en una cepa de *E. coli* recombinante que produce este compuesto a partir de glicerol. Los experimentos realizados en esta parte demostraron que la expresión de *phaP* incrementó el crecimiento de la cepa productora de 1,3-PDO, lo cual se vio reflejado en un aumento de la velocidad de crecimiento y de la DO_{600} , y también el título del producto final, el cual fue casi 13 veces más alto que el de la cepa control. Pero a diferencia de lo observado en la cepa productora de etanol, en las cepas que producen 1,3-PDO, la presencia de PhaP no sólo mejoró el crecimiento, sino que también afectó la conversión de sustrato. Mientras que las células control cesaron de crecer y acumular 1,3-PDO al cabo de 8 h de cultivo, las células que expresaban *phaP*

mostraron una fase de crecimiento más larga y continuaron acumulando 1,3-PDO incluso después de alcanzar la fase estacionaria. Por un lado, esto podría deberse a que la presencia de PhaP otorga a las células mayor tolerancia a 1,3-PDO, permitiéndoles crecer por más tiempo. Por otro lado, el aumento de la acumulación del diol durante la fase estacionaria podría explicarse por la propiedad de chaperona de PhaP, que les permite a las enzimas GDHt y PDOR estar activas por más tiempo. Además, a diferencia de lo que ocurre con la síntesis de etanol, la disponibilidad del C para la síntesis de 1,3-PDO no depende del metabolismo central del C de las células (en el caso de etanol, a través del acetyl-CoA proveniente de glucólisis). El 1,3-PDO puede obtenerse por transformación directa del glicerol provisto en el medio de cultivo llevada a cabo por las enzimas heterólogas sobreexpresadas. Esto podría explicar por qué se sigue produciendo el compuesto aun después de que las células han dejado de crecer, haciendo que el aumento en la síntesis de 1,3-PDO sea mucho mayor que el aumento de biomasa.

El efecto de la phasina en la producción de 1,3-PDO puede ser comparado con lo observado por Tomas y colaboradores en la productora de butanol *C. acetobutylicum*, en la cual la sobreproducción de GroELS generó un aumento de las tasas metabólicas (absorción de sustrato y formación de producto) y una extensión de la fase activa de crecimiento (Tomas et al., 2003). Cuando se sobreexpresó GroELS en la cepa de *E. coli* productora de 1,3-PDO se observó un efecto similar, demostrando claramente que las chaperonas pueden aumentar el rendimiento de este bioproducto y apoyando la hipótesis que los efectos de PhaP están asociados a sus propiedades de chaperona.

Los efectos de PhaP en la producción de 1,3-PDO se siguieron explorando como parte de otra línea de investigación de nuestro laboratorio, centrada en la manipulación de reguladores globales para mejorar la síntesis de bioproductos. En esos experimentos, se trabajó con una cepa de *E. coli* mutante de delección en el regulador global ArcA. En cultivos en frasco agitado, la sobreexpresión de la phasina en este contexto genómico produjo un aumento del 45% en el título de 1,3-PDO. Cuando se escaló esos cultivos a un biorreactor, la presencia de PhaP permitió obtener más de 24 g/l de 1,3-PDO, lo cual representó un aumento en la síntesis de diol del 30%, con respecto a la cepa mutante sin phasina. Además, la presencia de PhaP mejoró todos los aspectos cinéticos del cultivo (rendimiento, productividades volumétrica y específica, consumo de glicerol), tanto respecto de la cepa salvaje como de la mutante sin PhaP. De hecho, la expresión de *phaP* en el contexto de la mutante *arcA* restauró la velocidad de crecimiento a los valores obtenidos con la cepa salvaje (Figura 42) (Egoburo et al., 2018). Por un lado, estos resultados ponen de manifiesto que los efectos beneficiosos de PhaP se pueden combinar con otras manipulaciones metabólicas para desarrollar cepas más eficientes, diseñadas a la medida de los bioproductos de interés. Por otro lado, estos resultados también indican que el efecto de PhaP se mantiene en condiciones de cultivo en biorreactor de escala laboratorio. Esto abre el

camino para su utilización en cultivos a escalas más altas para la síntesis de una diversidad de compuestos de valor agregado.

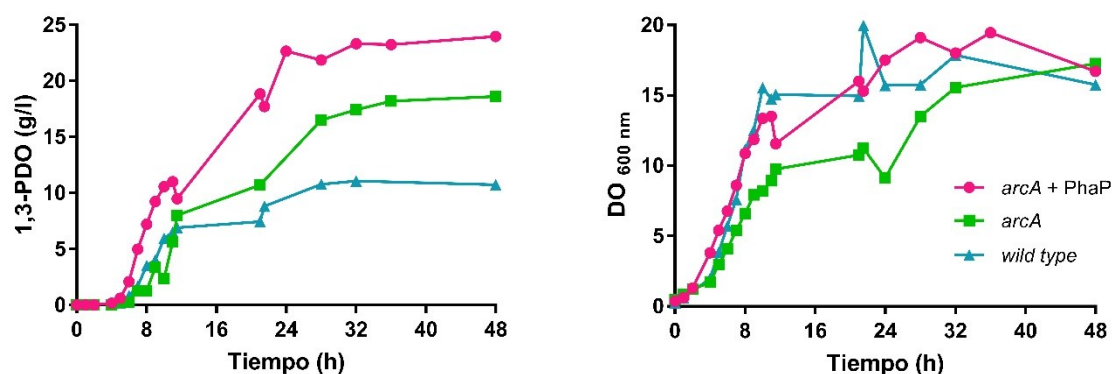


Figura 42. Efecto de PhaP en la producción de 1,3-PDO en cultivos en biorreactor de escala laboratorio. Las cepas *E. coli* BW25113 (*wild type*, triángulos) y su derivado mutante *arcA* (*arcA*, cuadrados) fueron transformadas con un plásmido que contiene los genes del regulón *dha* para la síntesis de 1,3-PDO. La cepa mutante *arcA* además fue transformada con el plásmido pPhaP328 (*arcA*+PhaP, círculos) para evaluar el efecto de la phasina. Los cultivos fueron realizados en medio M9 TE suplementado con glicerol 30 g/l en un biorreactor en condiciones completamente aireadas durante 48 h. La expresión de *phaP* se indujo mediante la adición de ácido m-toluico 0,5 mM cuando los cultivos alcanzaron la fase exponencial temprana ($DO_{600} = 0,8$). Adaptada de Egoeburo et al., 2018.

Sobre el efecto de PhaP en la producción de estireno

El estireno es un hidrocarburo aromático de gran importancia industrial que en la actualidad se produce químicamente a partir de materia prima derivada del petróleo. Si bien se ha diseñado una vía metabólica para la producción de estireno en *E. coli* (McKenna & Nielsen, 2011), la toxicidad de este compuesto limita su biosíntesis en las células. Estudios de transcriptómica revelaron que la toxicidad del estireno se debe a daños tanto en la envoltura celular como en el DNA, ante los cuales *E. coli* responde reduciendo la síntesis de biomoléculas, al mismo tiempo que interrumpe la división celular normal y dirige los recursos a la activación de sistemas de respuesta a estrés y fortalecimiento de la membrana (Machas et al., 2021). Como hemos visto en los experimentos descritos en este trabajo de tesis, PhaP aumenta la tolerancia de *E. coli* a solventes como etanol, butanol y 1,3-PDO, cuya toxicidad produce daños similares en las células. Además, esta phasina posee un efecto protector ante diversas condiciones de estrés, tales como estrés térmico, oxidativo y osmótico, y se ha visto que su coexpresión junto con las vías de síntesis de varios bioproductos llevó a una mayor producción de etanol, 1,3-PDO y enzimas recombinantes. En función de estos resultados, nos dispusimos a analizar los efectos de la expresión de esta phasina en una cepa de *E. coli* productora de estireno.

Para ello, construimos una cepa que produce las proteínas PAL y FDC y luego la transformamos con un plásmido para la expresión de *phaP* o el mismo vector vacío. Este sistema de expresión implica la síntesis de tres proteínas heterólogas en *E. coli*, cada una codificada en un plásmido distinto. Cuando analizamos el crecimiento de estas cepas en condiciones no productoras (sin inducir PAL ni FDC), observamos que la presencia de la phasina permitió a las células crecer más rápido y alcanzar valores de biomasa significativamente mayores que la cepa control durante la fase exponencial tardía. Estos resultados demostraron que PhaP exhibe un efecto promotor del crecimiento en condiciones de alta carga metabólica dada por la presencia de múltiples plásmidos en un medio de cultivo que contiene varios antibióticos.

A continuación, nos abocamos a la tarea de optimizar las condiciones de cultivo para la producción. La biosíntesis de estireno presenta varios desafíos debido su toxicidad y su alta volatilidad. Una de las estrategias más ampliamente utilizadas para hacer frente a ambas dificultades es la recuperación *in situ* del producto. Este método de extracción permite eliminar selectivamente el producto del cultivo a medida que se produce, favoreciendo su recuperación y evitando su potencial acumulación hasta niveles inhibitorios. Para nuestros ensayos utilizamos n-dodecano, un compuesto que ya había sido utilizado eficientemente por otros investigadores (K. Lee et al., 2019; Liu et al., 2018; McKenna et al., 2015). Esta estrategia de recuperación *in situ* nos permitió alcanzar títulos de estireno de tres a cinco veces más altos que en las condiciones monofásicas, cuando se la utilizó en los cultivos con medio LB y medio M9 TE, respectivamente. Estas diferencias fueron incluso mayores que las obtenidas por McKenna y colaboradores, en cuyos experimentos el uso de n-dodecano había permitido obtener el doble de estireno que en los cultivos monofásicos (McKenna et al., 2015).

En cuanto al crecimiento en ambas condiciones, nuestros experimentos no fueron muy concluyentes. Mientras que en los cultivos de LB las células crecidas en condiciones bifásicas alcanzaron mayores valores de biomasa, en los cultivos de M9 TE se observó lo contrario. Sería interesante realizar curvas de crecimiento en ambas condiciones para poder caracterizar mejor los efectos de la extracción *in situ*. Liu y colaboradores, quienes también trabajaron con derivados de la cepa BL21(DE3) realizaron curvas de crecimiento celular en cultivos monofásicos y bifásicos con miristato de isopropilo. Sus resultados revelaron que el crecimiento celular se incrementó significativamente en el cultivo bifásico en todas las horas, por lo que los autores concluyeron que el miristato de isopropilo pudo eliminar selectivamente el estireno de su sistema de reacción, manteniendo la concentración de estireno alrededor de las células por debajo del umbral de inhibición (Liu et al., 2018).

Otra de las condiciones que pusimos a punto en nuestros ensayos fue el medio de cultivo. Nuestro objetivo fue intentar utilizar medios semi-definidos, que son más rentables para su uso en la industria

que un medio complejo como el LB. Para ello, utilizamos el medio M9 TE, el cual está suplementado con tiamina, extracto de levadura y una solución de trazas. Lee y colaboradores emprendieron una búsqueda similar, y también optimizaron sus cultivos en un medio semi-definido. Los autores hicieron pruebas con cuatro fuentes complejas diferentes: extracto de levadura, peptona, triptona y casaminoácidos, y finalmente eligieron suplementar con extracto de levadura dado que les permitió obtener mayor crecimiento celular y producción de estireno (K. Lee et al., 2019). En nuestro caso, el cambio de medio de cultivo, si bien no condujo a mayores valores de biomasa final sí lo hizo con la producción de estireno, lo cual nos da buenas perspectivas para el escalado a cultivos en biorreactor (Figura 43).

Con el cambio de medio de cultivo nos dimos cuenta que también debíamos poner a punto la aireación. Hasta entonces nuestros cultivos habían sido crecidos en botellas de 50 ml con 5 ml de medio, lo cual representaba una relación $V_c:V_f$ de 1:10, que además de ser la estándar para los cultivos aeróbicos de *E. coli*, también era mayor a la utilizada en la mayoría de los trabajos de producción de estireno en frasco agitado (1:5) (K. Lee et al., 2019; Liang et al., 2020; Liu et al., 2018; McKenna et al., 2015; McKenna & Nielsen, 2011). No obstante, cuando probamos nuestros cultivos en botellas de 100 ml con 5 ml de medio ($V_c:V_f$ 1:20), vimos que ambas cepas crecieron significativamente más. Más aún, en la cepa que expresa la phasina se observó un aumento significativo en la síntesis de estireno (Figura 43). Esto puso de manifiesto que las condiciones de aireación son importantes para asegurar una buena producción, sobre todo en estos ensayos en los cuales los recipientes deben estar cerrados herméticamente para evitar la pérdida de producto. Si bien ninguna de las investigaciones realizadas en frasco agitado reporta problemas en la aireación de los cultivos, en la mayoría de estos trabajos los recipientes utilizados eran matraces. Es posible que la agitación en tales recipientes permita un mejor intercambio de gases con el cultivo que nuestras botellas, o simplemente es una variable que otros investigadores no tuvieron en cuenta. Los únicos trabajos en donde reportan un control de la disponibilidad de oxígeno en cultivos de frasco agitado son el de Machas y colaboradores, en el cual los autores realizan un intercambio del espacio de cabeza de cada cultivo con gas oxígeno puro, y el de McKenna y colaboradores, en el cual utilizan el colorante indicador resazurina (Machas et al., 2021; McKenna & Nielsen, 2011).

Con respecto de la caracterización metabólica de las cepas en las condiciones de cultivo empleadas, se pudo reforzar la idea de que un mayor espacio de cabeza en las botellas disminuyó el flujo de carbono hacia los productos de fermentación. Si bien en el modelo utilizado en este trabajo esto no debería afectar demasiado a la síntesis de estireno, ya que se produce a partir de fenilalanina agregada al medio y no a través del metabolismo central del C, estas diferencias adquirirán mayor relevancia en

estudios futuros en los que se utilicen cepas sobreproductoras de fenilalanina en las que no se agregará el sustrato exógenamente.

Las diferencias observadas en la concentración de formiato son especialmente llamativas. Es posible que el estado de oxidación de las células no alcanzase el grado de reducción necesaria para la producción de este metabolito, una posibilidad que se apoya en la reducción en la síntesis de lactato, otro de los ácidos determinados cuya síntesis se ve favorecida por condiciones más reducidas. Por otra parte, no se puede descartar que las células sintetizaran formiato, pero este fuera degradado rápidamente debido al propio metabolismo celular o a una posible actividad inespecífica de la decarboxilasa sobreexpresada, FDC, aunque esta actividad nunca ha sido reportada.

Con respecto de la síntesis de lactato, mientras que en los cultivos de relación Vc:Vf 1:10 no se observaron diferencias entre las cepas en la síntesis de este ácido fermentativo, en los cultivos en las botellas más grandes su síntesis disminuyó significativamente en la cepa que expresa *phaP*, pero no en la cepa control. Estas discrepancias indican que, además de la disponibilidad de oxígeno, hay otros factores de estrés afectando la distribución de carbono. Por ejemplo, el estrés metabólico es una condición que ha sido ampliamente reportada en bioprocesos recombinantes. El drenaje de precursores de energía y biomasa, incluyendo aminoácidos y nucleótidos, hacia la síntesis de material recombinante impone severas alteraciones en el metabolismo de las células hospedadoras (Carneiro et al., 2013). Dado que la síntesis de proteínas es el proceso que más energía consume en la célula, la generación de energía puede volverse crítica en los productores recombinantes, quienes pueden verse impulsados a activar vías alternativas como la fosforilación a nivel de sustrato (Hoffmann & Rinas, 2004). A esto se le suma el estrés provocado por el estireno, que promueve un cambio en el comportamiento celular del "modo de crecimiento" al "modo de supervivencia", activando diversos mecanismos de respuesta (Machas et al., 2021). En este contexto, el efecto promotor del crecimiento ejercido por PhaP bajo condiciones de alta carga metabólica podría explicar las diferencias en la distribución del carbono observadas entre las cepas. De acuerdo con esta hipótesis, bajo condiciones de producción de estireno, cuando todas las proteínas recombinantes están inducidas, PhaP ejercería un efecto promotor del crecimiento que conduce a una mayor producción de biomasa y una menor acumulación de subproductos fermentativos en comparación con la cepa control.

En la figura 43 se muestran los sucesivos pasos de optimización y los títulos alcanzados por las cepas en cada uno de ellos. Como se puede observar, mientras que con la cepa productora de la phasina se logró aumentar la síntesis de estireno en cada paso de optimización, la cepa control no mostró mejoras en el último paso. Esto puede deberse a que el estireno producido por las células alcanzó una concentración inhibitoria, a que la cinética enzimática de PAL o FDC alcanzó un límite en esas

condiciones de reacción, o bien que la disponibilidad de oxígeno no estaba condicionando el crecimiento de la cepa. Si comparamos los títulos obtenidos por la cepa control en el último paso de optimizaciones respecto del primero, obtenemos un aumento de 12 veces en el título de estireno. Si hacemos la misma comparación para la cepa que expresa la phasina, el título obtenido en el último paso es 8 veces más alto que el del primero. Estas diferencias en los aumentos de cada cepa podemos atribuirlos a que las mayores concentraciones de estireno producidas por la cepa que expresa *phaP* afectan negativamente las potenciales mejoras de cada paso. Sin embargo, si evaluamos el incremento total de nuestro sistema, comparando el título obtenido por la cepa que produce PhaP en el último paso con el título obtenido por la cepa control en el primero, obtenemos un incremento de 48 veces en la concentración de estireno.

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que la expresión de *phaP* en la cepa productora de estireno nos permitió aumentar significativamente la producción de este compuesto. Esto podría deberse a varias razones.

- i. Por un lado, es posible que el efecto protector ejercido por PhaP en *E. coli*, le proporcionó una mayor tolerancia a estireno y le permitió reducir la carga metabólica impuesta por la expresión de material recombinante. Esta hipótesis se basa en resultados obtenidos en este trabajo de tesis, en los cuales se observó que PhaP confirió a las células que la producen: (a) una mayor tolerancia ante solventes como etanol, butanol y 1,3-PDO, los cuales generan daños similares al estireno en la membrana y las biomoléculas, y (b) un aumento en la velocidad de crecimiento y producción de biomasa en un contexto de alta carga metabólica impuesta por la presencia de múltiples plásmidos.
- ii. Por otro lado, la actividad chaperona de PhaP podría haber incrementado la actividad de las enzimas PAL y FDC. Esta hipótesis se basa en las propiedades de tipo chaperona observadas tanto *in vitro* como *in vivo* en trabajos anteriores (Mezzina et al., 2015), a lo que se suman los resultados que muestran que PhaP pudo mejorar la actividad de β -galactosidasas heterólogas en este trabajo de tesis.

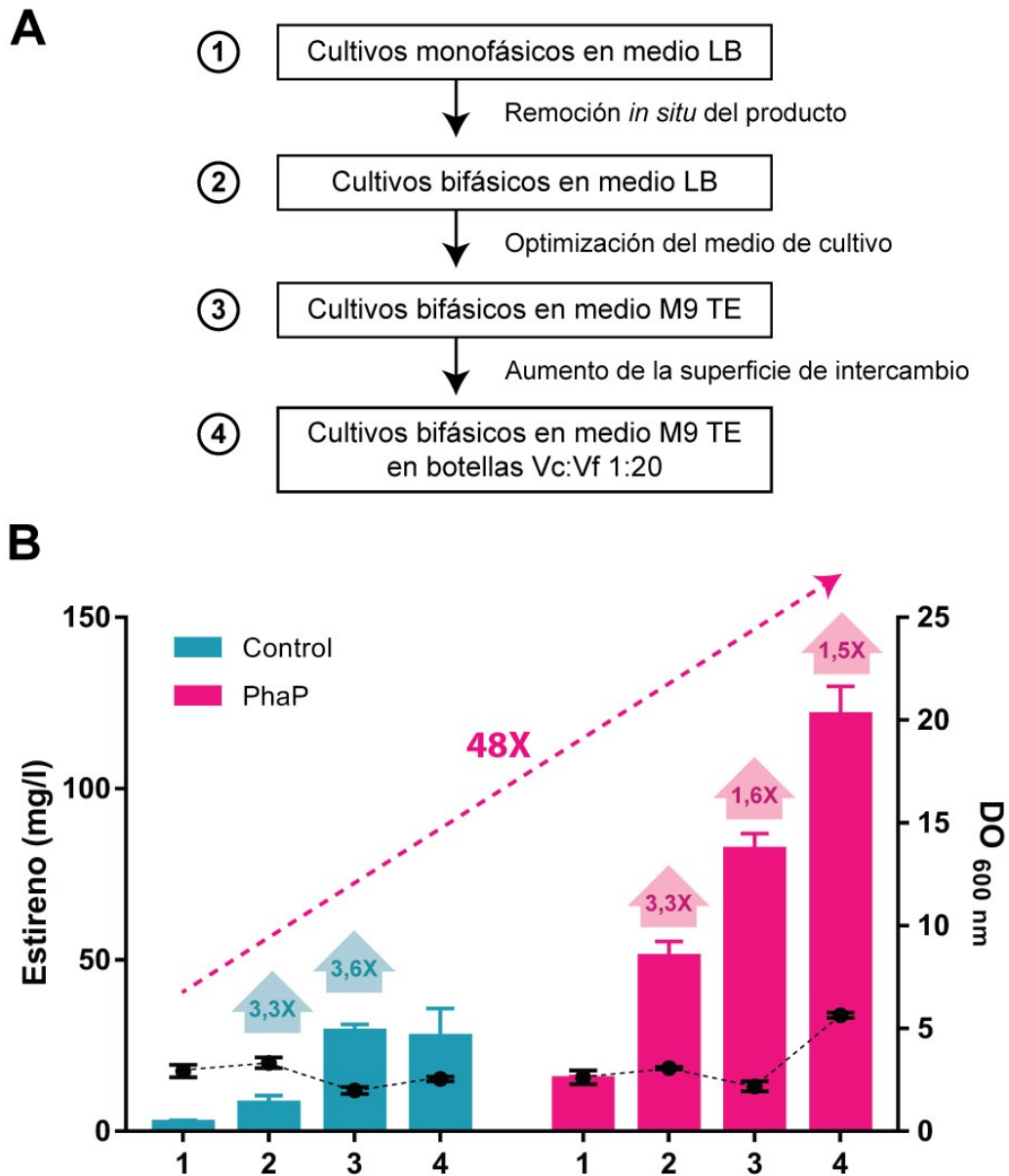


Figura 43. Puesta a punto de la producción de estireno en las cepas BL21 sty/pPhaP328 (PhaP) y BL21 sty/pSEVA328 (control). A. Esquema general de las estrategias utilizadas, indicando con números cada paso. B. Títulos de estireno (barras) y biomasa final (puntos) alcanzados por cada cepa en los distintos pasos de optimización. Las flechas ubicadas arriba de las barras indican el aumento en el título de estireno obtenido en cada paso respecto del paso anterior para esa misma cepa. La flecha discontinua indica el aumento obtenido en el último paso de optimización de la cepa PhaP en comparación con el primer paso de la cepa control. Vc:Vf: volumen de cultivo:volumen del frasco. DO₆₀₀: densidad óptica a 600 nm.

La hipótesis de que PhaP logra aumentar el título de estireno gracias a su efecto protector ante el estrés se ve reforzada por estudios de transcriptómica y proteómica realizados por otros investigadores en cepas de *E. coli* expuestas a estireno endógeno o exógeno, en los cuales reportaron un aumento en el contenido de HSPs. Por un lado, Machas y colaboradores observaron que la

expresión de *rpoH* aumentó significativamente en las células expuestas a estireno exógeno, mientras que *ibpA* e *ibpB* fueron dos de los genes cuya expresión se indujo más significativamente tanto en células expuestas a estireno exógeno como en células productoras (Machas et al., 2021). Por otro lado, en estudios de proteómica también se observó una mayor producción de IbpA, IbpB y RpoH a partir de las 2 h desde la inducción de los genes PAL y FDC (Webb et al., 2022). Teniendo en cuenta que se ha demostrado que PhaP reduce los niveles de expresión de *ibpA*, *ibpB* y *rpoH* (de Almeida et al., 2011), podemos pensar que la mayor síntesis de estireno obtenida en las cepas que expresan *phaP* está relacionado con su efecto protector general ante el estrés. Es posible que, en condiciones de acumulación de estireno, la actividad de chaperona de PhaP le permita cumplir una función análoga a la de IbpA/B, estabilizando y re-plegando proteínas importantes para hacer frente a los daños provocados en el DNA y la membrana.

El uso de chaperonas con el objetivo de mejorar la síntesis de estireno fue puesto a prueba en el trabajo de Webb y colaboradores, junto con el de otras proteínas relacionadas con el metabolismo de membrana, reguladores transcripcionales, y proteínas de función desconocida. En particular, se estudiaron 6 chaperonas cuya abundancia en el proteoma había aumentado en presencia de estireno: CspC, HslO, IbpA/B, CpxP y Spy. CspC es una chaperona de DNA, HslO es una chaperona con actividad ante estrés oxidativo, y CpxP y Spy son chaperonas periplasmáticas. De todas ellas, las únicas que mostraron un aumento importante en la síntesis de estireno al ser sobreexpresadas en *E. coli* fueron *hslO* y *cpxP*. No obstante, mientras que la delección de *hslO* también aumentó la síntesis de estireno, la mutación de *cpxP* tuvo efectos negativos en el título. Por esta razón, los autores continuaron los análisis sólo con la chaperona periplasmática. Si bien la cepa final tenía otras mutaciones, si analizamos únicamente el efecto de la sobreexpresión de *cpxP*, podemos ver que esta proteína mejora la síntesis de estireno en 1,5 veces (Webb et al., 2022). Aunque los contextos genómicos son distintos, y el título de estireno obtenido en nuestros experimentos es mucho menor al de Webb y colaboradores, la expresión de *phaP* en nuestros cultivos permitió aumentar el título de estireno en más de 4 veces (en los cultivos bifásicos en botellas con relación Vc:Vf 1:20), lo cual demuestra la magnitud del efecto de la phasina y su potencial biotecnológico en la síntesis de este compuesto.

Conclusiones y Perspectivas

Conclusiones

En las últimas décadas, la crisis climática ha puesto en el foco del debate la necesidad de reducir la dependencia de los combustibles fósiles. Un factor clave para avanzar hacia una economía más sostenible es el desarrollo de biorrefinerías que permitan sintetizar productos químicos de forma eficiente y rentable a partir de fuentes renovables. Sin embargo, existen muchas limitaciones que impiden que las cepas bacterianas alcancen la productividad necesaria para reemplazar exitosamente la síntesis química tradicional.

El trabajo realizado durante esta tesis constituye uno de los esfuerzos para desarrollar cepas más resistentes al gran número de condiciones desfavorables que se presentan durante los bioprocesos. Los resultados obtenidos demuestran que la expresión de la phasina PhaP de *Azotobacter* sp. FA8 en *E. coli* recombinante permite obtener cepas más robustas, con mayor tolerancia ante diversos agentes de estrés. En particular, se observó que la presencia de PhaP produce un incremento significativo en la tolerancia de las células al estrés osmótico provocado tanto por NaCl como por sacarosa, y a diversos solventes y precursores químicos, como el etanol, butanol y 1,3-PDO. Frente a todos los agentes estresores se observó una mayor velocidad de crecimiento y una mayor producción de biomasa en la cepa que produce la phasina respecto de la cepa control. Esto se suma al efecto protector ante el estrés térmico y oxidativo ejercido por PhaP en *E. coli* recombinante, que ya había sido descrito en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio.

Dado que también se había descrito que PhaP tiene actividad de chaperona, nos preguntamos si los efectos en la tolerancia se debían a esta propiedad de la phasina de asistir en el plegado proteico. Para responder esta pregunta, realizamos ensayos de complementación de una cepa mutante *groEL* con GroELS y PhaP, utilizando los mismos agentes agresores antes indicados. La similitud en los resultados obtenidos con las dos proteínas llevó a la conclusión de que el efecto ejercido por PhaP puede explicarse, al menos en parte, por su actividad de chaperona.

La relevancia de estos resultados radica en que, tanto la hiperosmolaridad dada por las altas concentraciones de sustratos, como la acumulación de productos con diferentes niveles de toxicidad, son algunas de las limitaciones principales de las fermentaciones bacterianas, que impiden a las células alcanzar una velocidad de crecimiento celular estable y una elevada productividad. Otras limitaciones típicas de los bioprocesos incluyen el estrés oxidativo, el pH bajo y la presencia de inhibidores en el sustrato.

A modo de prueba de concepto, realizamos cultivos en escala de laboratorio para evaluar si los efectos beneficiosos de la expresión de *phaP* en *E. coli* se traducían en una mayor eficiencia en la síntesis de

diversos productos de interés industrial. En primer lugar, analizamos la capacidad de PhaP de optimizar la producción de proteínas heterólogas. La coexpresión de la phasina con beta-galactosidasas provenientes de la bacteria *B. breve* DSM 20213 permitió incrementar significativamente los niveles de actividad enzimática obtenidos respecto de la cepa control. Esto demostró que PhaP es capaz de mejorar la síntesis de estas proteínas en sus formas solubles y activas. Este resultado tiene relevancia no sólo para la producción de proteínas, sino también para otros bioproductos como solventes y precursores químicos, que son producidos en *E. coli* mediante la expresión de sus enzimas biosintéticas, a menudo heterólogas.

En segundo lugar, demostramos que la capacidad de PhaP de aumentar la tolerancia a etanol y 1,3-PDO también contribuye a alcanzar una mayor acumulación de estos compuestos en cepas productoras de *E. coli* recombinante. Si bien el aumento en la producción de etanol puede explicarse por un aumento de la biomasa, en el caso de 1,3-PDO el efecto de PhaP fue mucho más notable, dado que el aumento en la síntesis del compuesto fue mucho mayor que el incremento de biomasa. En la cepa productora de 1,3-PDO, la expresión de la phasina permitió cumplir con los tres criterios más importantes de biotecnología industrial: lograr una utilización más eficiente del sustrato, una tasa de crecimiento celular más estable y una productividad de biosíntesis más eficiente (Tao et al., 2022).

Por último, pusimos a punto la síntesis de estireno en cultivos en frasco agitado. Para ello hicimos varias modificaciones consecutivas en las condiciones de crecimiento, que nos permitieron optimizar la producción de este compuesto aromático. En este sistema, la presencia de PhaP nos permitió aumentar 48 veces el título de estireno, en comparación con la cepa control en las condiciones menos optimizadas. De esta manera, se determinó que las condiciones más adecuadas para la síntesis de estireno son: cultivos que coexpresen la phasina junto con las enzimas PAL y FDC, crecidos en botellas de relación Vc:Vf 1:20, cerradas con tapones de goma y precintos de aluminio, en medio M9 TE, con el agregado de n-dodecano en una fracción de volumen de 0,2 para la extracción *in situ* del producto, y agitadas a 200 rpm.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis completan la caracterización de los efectos beneficiosos de PhaP sobre *E. coli*, ya que, a las evidencias de actividad chaperona a través del plegado de proteínas *in vivo* e *in vitro*, se suman experimentos que revelaron que PhaP también es capaz de aumentar la actividad enzimática de las proteínas heterólogas coexpresadas. En la figura 44 se detallan todos los hallazgos obtenidos con PhaP de *Azotobacter* sp. FA8 a lo largo de los años en nuestro laboratorio.

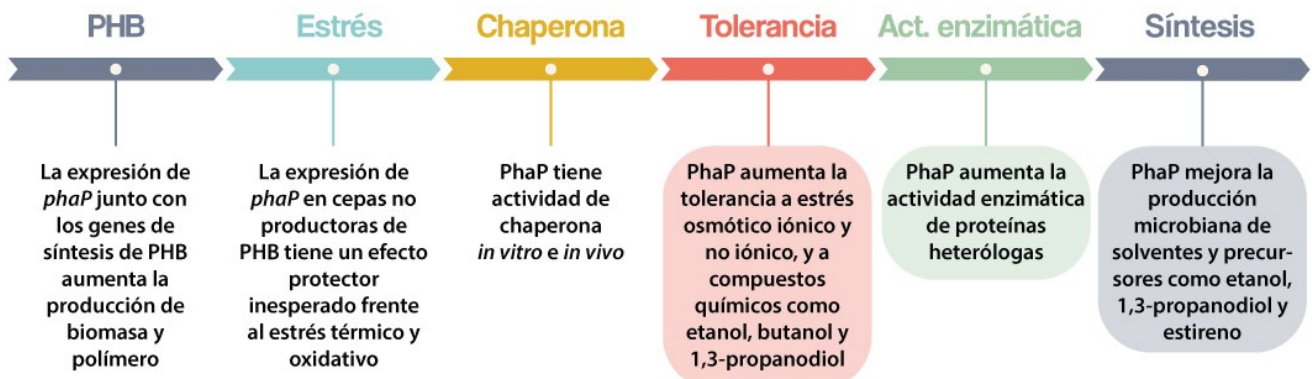


Figura 44. Hallazgos relacionados a PhaP de *Azotobacter* sp. FA8 realizados por nuestro laboratorio. Los resultados que forman parte de esta tesis están marcados con recuadros.

Además, hemos demostrado que la expresión de *phaP* de *Azotobacter* sp. FA8 permite la obtención de cepas más robustas para una variedad de aplicaciones biotecnológicas, especialmente en la síntesis de diversos bioproductos. El desarrollo de cepas más tolerantes es uno de los desafíos más grandes de la biotecnología industrial, y la utilización de recombinantes con mayor tolerancia a varias condiciones de estrés podría facilitar la optimización de la síntesis de nuevos compuestos de valor agregado.

Perspectivas

Los estudios planteados en esta tesis contribuyeron a aumentar el conocimiento sobre las propiedades de la phasina PhaP de *Azotobacter* sp. FA8, así como de sus posibles aplicaciones. A partir de este trabajo surgen tres líneas de trabajo futuras:

Con respecto a la síntesis de estireno:

Dado que hemos visto que la coexpresión de *phaP* con las enzimas PAL y FDC condujo a una mayor acumulación de estireno en *E. coli* recombinante, sería interesante poder determinar si esto se debe a que: (i) PhaP ejerce un efecto protector general ante el estrés provocado por este compuesto, brindando a las células una mayor tolerancia, y/o (ii) PhaP aumenta la actividad enzimática de PAL y FDC, gracias a su actividad de chaperona, permitiendo una mayor síntesis de producto. Para responder este interrogante, nuestro laboratorio ha adquirido tCA con el fin de analizar la actividad enzimática de estas proteínas, tanto *in vitro* como *in vivo*, y es nuestra intención realizar estos experimentos durante la investigación posdoctoral.

Por otra parte, si bien nuestros resultados son muy prometedores, los títulos obtenidos con nuestra cepa productora siguen siendo mucho menores que los reportados por otros investigadores que trabajan en el tema. Incluso con la dificultad para comparar las productividades en los diferentes entornos genómicos de las cepas utilizadas en bibliografía, nuestro sistema tiene aún mucho por mejorar. Especialmente, nos interesa probar la expresión de la phasina en una cepa sobreproductora de L-Phe. Esta es una de las estrategias más utilizadas para la bioproducción de estireno dado que permite la obtención del producto directamente a partir de la fuente de C (por ejemplo, glucosa), haciendo innecesario el agregado de L-Phe, disminuyendo así el costo de los sustratos. Para ello, nos pusimos en contacto con Koma y colaboradores, quienes nos facilitaron la cepa M-PAR-121, en la cual vamos a probar nuestro sistema de expresión (Koma et al., 2020).

Por último, también está en nuestros planes modificar el sistema de expresión de las enzimas, combinando PAL y FDC en un mismo vector, con el objetivo de reducir la carga metabólica de la cepa.

Con respecto a la síntesis de otros bioproductos:

Los resultados obtenidos en esta tesis abren las puertas para el uso de PhaP en la optimización de la síntesis de una diversidad de compuestos de interés biotecnológico. En particular, sería interesante poder probar el efecto de PhaP en la síntesis de butanol, dado que hemos demostrado que la phasina aumenta la tolerancia a este compuesto cuando es añadido de forma exógena. En el laboratorio se dispone de cepas butanológicas cuyo metabolismo y genoma ya ha sido estudiado (Díaz Peña et al., 2020), que podrían usarse como fuente de los genes necesarios.

Con respecto a las propiedades de otras phasinas:

Sería interesante estudiar si las propiedades descritas para PhaP de *Azotobacter* sp. FA8 son exclusivas de esta proteína o son extensivas a otras phasinas provenientes de otras bacterias. Para ello ya hemos clonado en vectores pSEVA varias phasinas, representativas de las familias PF09361 y PF05597. Las mismas se detallan a continuación:

- PhaP de *Azotobacter chroococcum* (familia PF09361)
- PhbP de *Pseudomonas extremaustralis* (familia PF09361)
- PhaP1 de *C. necator* H16 (familia PF09361)
- PhaF de *P. putida* KT2440 (familia PF05597)
- Phal de *P. putida* KT2440 (familia PF05597)

El objetivo es estudiar también la phasina PhaP de *B. megaterium*, representante de la familia PF09602, para la cual tuvimos dificultades con el clonado.

Una vez que se tengan todos los vectores, tenemos planeado comparar las propiedades de las distintas phasinas mediante el ensayo de coexpresión con las proteínas beta-galactosidasas descrito en esta tesis, para determinar si son capaces de mejorar la actividad de la enzima.

Bibliografía

- Abdelaal, A. S., Ageez, A. M., Abd El-Hadi, A. E.-H. A., & Abdallah, N. A. (2015). Genetic improvement of n-butanol tolerance in *Escherichia coli* by heterologous overexpression of *groESL* operon from *Clostridium acetobutylicum*. *3 Biotech*, *5*(4), 401–410. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0235-8>
- Aditiya, H. B., Mahlia, T. M. I., Chong, W. T., Nur, H., & Sebayang, A. H. (2016). Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *66*, 631–653. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.015>
- Alsaker, K. V., Paredes, C., & Papoutsakis, E. T. (2010). Metabolite stress and tolerance in the production of biofuels and chemicals: Gene-expression-based systems analysis of butanol, butyrate, and acetate stresses in the anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology and Bioengineering*, *105*(6), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/bit.22628>
- Andersen, K. B., & von Meyenburg, K. (1980). Are growth rates of *Escherichia coli* in batch cultures limited by respiration? *Journal of Bacteriology*, *144*(1), 114–123. <https://doi.org/10.1128/jb.144.1.114-123.1980>
- Anderson, A. J., & Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, *54*(4), 450–472. <https://doi.org/10.1128/mr.54.4.450-472.1990>
- Arreola, S. L., Intanon, M., Suljic, J., Kittl, R., Pham, N. H., Kosma, P., Haltrich, D., & Nguyen, T. H. (2014). Two β -galactosidases from the human isolate *Bifidobacterium breve* DSM 20213: Molecular cloning and expression, biochemical characterization and synthesis of galacto-oligosaccharides. *PLoS ONE*, *9*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104056>
- Arsène, F., Tomoyasu, T., & Bukau, B. (2000). The heat shock response of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, *55*(1–3), 3–9. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00206-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00206-3)
- Atsumi, S., Cann, A. F., Connor, M. R., Shen, C. R., Smith, K. M., Brynildsen, M. P., Chou, K. J. Y., Hanai, T., & Liao, J. C. (2008). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metabolic Engineering*, *10*(6), 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2007.08.003>
- Ayub, N., Pettinari, M. J., Méndez, B. S., & López, N. I. (2007). The polyhydroxyalkanoate genes of a stress resistant Antarctic *Pseudomonas* are situated within a genomic island. *Plasmid*, *58*(3), 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2007.05.003>
- Ayub, N., Pettinari, M., Ruiz, J., & López, N. (2004). A Polyhydroxybutyrate-Producing *Pseudomonas* sp. Isolated from Antarctic Environments with High Stress Resistance. *Current Microbiology*,

- 49(3), 170–174. <https://doi.org/10.1007/s00284-004-4254-2>
- Ayub, N., Tribelli, P., & López, N. (2009). Polyhydroxyalkanoates are essential for maintenance of redox state in the Antarctic bacterium *Pseudomonas* sp. 14-3 during low temperature adaptation. *Extremophiles*, 13(1), 59–66. <https://doi.org/10.1007/s00792-008-0197-z>
- Bäckström, B. T., Brockelbank, J. A., & Rehm, B. H. A. (2007). Recombinant *Escherichia coli* produces tailor-made biopolyester granules for applications in fluorescence activated cell sorting: functional display of the mouse interleukin-2 and myelin oligodendrocyte glycoprotein. *BMC Biotechnology*, 7(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-3>
- Banki, M. R., Gerngross, T. U., & Wood, D. W. (2005). Novel and economical purification of recombinant proteins: Intein-mediated protein purification using *in vivo* polyhydroxybutyrate (PHB) matrix association. *Protein Science*, 14, 1387–1395. <https://doi.org/10.1110/ps.041296305.each>
- Battesti, A., Majdalani, N., & Gottesman, S. (2011). The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology*, 65, 189–213. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102946>
- Bentley, W. E., Mirjalili, N., Andersen, D. C., Davis, R. H., & Kompala, D. S. (1990). Plasmid-encoded protein: The principal factor in the “metabolic burden” associated with recombinant bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, 35(7), 668–681. <https://doi.org/10.1002/bit.260350704>
- Bianchi, A. A., & Baneyx, F. (1999). Hyperosmotic shock induces the sigma32 and sigmaE stress regulons of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 34(5), 1029–1038. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01664.x>
- Blanch, H. W. (2012). Bioprocessing for biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(3), 390–395. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.10.002>
- Borden, J. R., & Papoutsakis, E. T. (2007). Dynamics of Genomic-Library Enrichment and Identification of Solvent Tolerance Genes for *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(9), 3061–3068. <https://doi.org/10.1128/AEM.02296-06>
- Bormann, S., Baer, Z. C., Sreekumar, S., Kuchenreuther, J. M., Dean Toste, F., Blanch, H. W., & Clark, D. S. (2014). Engineering *Clostridium acetobutylicum* for production of kerosene and diesel blendstock precursors. *Metabolic Engineering*, 25, 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.07.003>
- Bremer, E., & Krämer, R. (2019). Responses of microorganisms to osmotic stress. *Annual Review of*

- Microbiology*, 73, 313–334. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115504>
- Brown, B., Immethun, C., Wilkins, M., & Saha, R. (2022). Biotechnical applications of phasins: Small proteins with large potential. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 158(January), 112129. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112129>
- Brynildsen, M. P., & Liao, J. C. (2009). An integrated network approach identifies the isobutanol response network of *Escherichia coli*. *Molecular Systems Biology*, 5(1), 277. <https://doi.org/10.1038/msb.2009.34>
- Bukau, B. (1993). Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Molecular Microbiology*, 9(4), 671–680. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01727.x>
- Carneiro, S., Ferreira, E. C., & Rocha, I. (2013). Metabolic responses to recombinant bioprocesses in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 164(3), 396–408. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.08.026>
- Carrió, M. M., & Villaverde, A. (2001). Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. *FEBS Letters*, 489(1), 29–33. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02073-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02073-7)
- Chaurasia, A. K., & Apte, S. K. (2009). Overexpression of the *groESL* Operon Enhances the Heat and Salinity Stress Tolerance of the Nitrogen-Fixing Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC7120. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(18), 6008–6012. <https://doi.org/10.1128/AEM.00838-09>
- Cherubini, F. (2010). The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, 51(7), 1412–1421. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.01.015>
- Cho, C., Choi, S. Y., Luo, Z. W., & Lee, S. Y. (2015). Recent advances in microbial production of fuels and chemicals using tools and strategies of systems metabolic engineering. *Biotechnology Advances*, 33(7), 1455–1466. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.11.006>
- Chung, H. J., Bang, W., & Drake, M. A. (2006). Stress Response of *Escherichia coli*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(3), 52–64. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2006.00002.x>
- Clark, D. S., Whitehead, T., Robb, F. T., Laksanalamai, P., & Jiemjit, A. (2014). *Heterologous expression of extremophile heat shock proteins and chaperones in microorganisms to increase tolerance to toxic compounds.*

- Colin, T., Bories, A., & Moulin, G. (2000). Inhibition of *Clostridium butyricum* by 1,3-propanediol and diols during glycerol fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *54*(2), 201–205. <https://doi.org/10.1007/s002530000365>
- de Almeida, A., Catone, M. V., Rhodius, V. A., Gross, C. A., & Pettinari, M. J. (2011). Unexpected stress-reducing effect of PhaP, a poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated protein, in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(18), 6622–6629. <https://doi.org/10.1128/AEM.05469-11>
- de Almeida, A., Nikel, P. I., Giordano, A. M., & Pettinari, M. J. (2007). Effects of granule-associated protein PhaP on glycerol-dependent growth and polymer production in poly(3-hydroxybutyrate)-producing *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(24), 7912–7916. <https://doi.org/10.1128/AEM.01900-07>
- Desmond, C., Fitzgerald, G. F., Stanton, C., & Ross, R. P. (2004). Improved Stress Tolerance of GroESL-Overproducing *Lactococcus lactis* and Probiotic *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(10), 5929–5936. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.5929-5936.2004>
- Diamant, S., Eliahu, N., Rosenthal, D., & Goloubinoff, P. (2001). Chemical Chaperones Regulate Molecular Chaperones *in Vitro* and in Cells under Combined Salt and Heat Stresses. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(43), 39586–39591. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103081200>
- Díaz Peña, R., Alvarez, D., Egoburo, D., Ruiz, J., & Pettinari, M. J. (2020). Genomic and metabolic insights into solvent production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* GSU5. *Biofuel Research Journal*, *7*(2), 1149–1158. <https://doi.org/10.18331/BRJ2020.7.2.3>
- Domínguez-Ferreras, A., Pérez-Arnedo, R., Becker, A., Olivares, J., Soto, M. J., & Sanjuán, J. (2006). Transcriptome Profiling Reveals the Importance of Plasmid pSymB for Osmoadaptation of *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, *188*(21), 7617–7625. <https://doi.org/10.1128/JB.00719-06>
- Dong, H., Nilsson, L., & Kurland, C. G. (1995). Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *Journal of Bacteriology*, *177*(6), 1497–1504. <https://doi.org/10.1128/jb.177.6.1497-1504.1995>
- Dong, Y., Li, P., Chen, C. bo, Wang, Z. hui, Ma, P., & Chen, G. Q. (2010). The improvement of fibroblast growth on hydrophobic biopolyesters by coating with polyhydroxyalkanoate granule binding protein PhaP fused with cell adhesion motif RGD. *Biomaterials*, *31*(34), 8921–8930.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.001>

- Dunlop, M. J. (2011). Engineering microbes for tolerance to next-generation biofuels. *Biotechnology for Biofuels*, 4(Figure 1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-32>
- Egoburo, D. E., Diaz Peña, R., Alvarez, D. S., Godoy, M. S., Mezzina, M. P., & Pettinari, M. J. (2018). Microbial Cell Factories à la Carte : Elimination of Global Regulators Cra and ArcA Generates Metabolic Backgrounds Suitable for the Synthesis of Bioproducts in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(19), e01337-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01337-18>
- Egoburo, D. E., Diaz Peña, R., Kolender, A., & Pettinari, M. J. (2017). Optimization and Validation of a GC–FID Method for Quantitative Determination of 1,3-Propanediol in Bacterial Culture Aqueous Supernatants Containing Glycerol. *Chromatographia*, 80(7), 1121–1127. <https://doi.org/10.1007/s10337-017-3310-6>
- Fan, F., Wang, L., Ouyang, Z., Wen, Y., & Lu, X. (2018). Development and optimization of a tumor targeting system based on microbial synthesized PHA biopolymers and PhaP mediated functional modification. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(7), 3229–3241. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8790-2>
- Fayet, O., Ziegelhoffer, T., & Georgopoulos, C. (1989). The *groES* and *groEL* heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *Journal of Bacteriology*, 171(3), 1379–1385. <https://doi.org/10.1128/jb.171.3.1379-1385.1989>
- Fletcher, S., & Csonka, L. (1998). Characterization of the induction of increased thermotolerance by high osmolarity in *Salmonella*. *Food Microbiology*, 15(3), 307–317. <https://doi.org/10.1006/fmic.1997.0167>
- Foo, J. L., Jensen, H. M., Dahl, R. H., George, K., Keasling, J. D., Lee, T. S., Leong, S., & Mukhopadhyay, A. (2014). Improving Microbial Biogasoline Production in *Escherichia coli* Using Tolerance Engineering. *MBio*, 5(6), 1–9. <https://doi.org/10.1128/mBio.01932-14>
- Fukuda, D., Watanabe, M., Sonezaki, S., Sugimoto, S., Sonomoto, K., & Ishizaki, A. (2002). Molecular characterization and regulatory analysis of *dnaK* operon of halophilic lactic acid bacterium *Tetragenococcus halophila*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93(4), 388–394. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(02\)80072-X](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(02)80072-X)
- Galán, B., Dinjaski, N., Maestro, B., De Eugenio, L. I., Escapa, I. F., Sanz, J. M., García, J. L., & Prieto, M. A. (2011). Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida* KT2442. *Molecular Microbiology*, 79(2),

402–418. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07450.x>

- Georgopoulos, C., & Welch, W. J. (1993). Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annual Review of Cell Biology*, 9, 601–634. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.09.110193.003125>
- Ghafoori, H., Askari, M., & Sarikhan, S. (2017). Molecular cloning, expression and functional characterization of the 40-kDa heat shock protein, DnaJ, from *Bacillus halodurans*. *Process Biochemistry*, 54, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.12.017>
- Gill, R., Valdes, J., & Bentley, W. (2000). A Comparative Study of Global Stress Gene Regulation in Response to Overexpression of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 2(3), 178–189. <https://doi.org/10.1006/mben.2000.0148>
- Goloubinoff, P., Gatenby, A. A., & Lorimer, G. H. (1989). GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*. In *Nature* (Vol. 337, Issue 6202, pp. 44–47). <https://doi.org/10.1038/337044a0>
- Goodarzi, H., Bennett, B. D., Amini, S., Reaves, M. L., Hottes, A. K., Rabinowitz, J. D., & Tavazoie, S. (2010). Regulatory and metabolic rewiring during laboratory evolution of ethanol tolerance in *E. coli*. *Molecular Systems Biology*, 6(378), 1–12. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.33>
- Green, E. M. (2011). Fermentative production of butanol-the industrial perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.02.004>
- Grubbe, W. S., Rasor, B. J., Krüger, A., Jewett, M. C., & Karim, A. S. (2020). Cell-free styrene biosynthesis at high titers. *Metabolic Engineering*, 61(June), 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.05.009>
- Gunasekera, T. S., Csonka, L. N., & Paliy, O. (2008). Genome-Wide Transcriptional Responses of *Escherichia coli* K-12 to Continuous Osmotic and Heat Stresses. *Journal of Bacteriology*, 190(10), 3712–3720. <https://doi.org/10.1128/JB.01990-07>
- Han, M. J., Park, S. J., Lee, J. W., Min, B., Lee, S. Y., Kim, S., & Yoo, J. S. (2006). Analysis of Poly(3-Hydroxybutyrate) Granule-Associated Proteome in Recombinant *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 16(6), 901–910.
- Han, M. J., Park, S. J., Park, T. J., & Lee, S. Y. (2004). Roles and applications of small heat shock proteins in the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(4), 426–436. <https://doi.org/10.1002/bit.20227>

- Han, M. J., Yoon, S. S., & Lee, S. Y. (2001). Proteome Analysis of Metabolically Engineered *Escherichia coli* Producing Poly(3-Hydroxybutyrate). *Journal of Bacteriology*, 183(1), 301–308. <https://doi.org/10.1128/JB.183.1.301-308.2001>
- Handrick, R., Reinhardt, S., Schultheiss, D., Reichart, T., Schüler, D., Jendrossek, V., & Jendrossek, D. (2004). Unraveling the function of the *Rhodospirillum rubrum* activator of polyhydroxybutyrate (PHB) degradation: the activator is a PHB-granule-bound protein (phasin). *Journal of Bacteriology*, 186(8), 2466–2475. <https://doi.org/10.1128/JB.186.8.2466-2475.2004>
- Hauf, W., Watzer, B., Roos, N., Klotz, A., & Forchhammer, K. (2015). Photoautotrophic polyhydroxybutyrate granule formation is regulated by cyanobacterial phasin PhaP in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(13), 4411–4422. <https://doi.org/10.1128/AEM.00604-15>
- Hengge-Aronis, R., Lange, R., Henneberg, N., & Fischer, D. (1993). Osmotic regulation of rpoS-dependent genes in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 175(1), 259–265. <https://doi.org/10.1128/jb.175.1.259-265.1993>
- Hengge-Aronis, R. (1996). Back to log phase: σ S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 21(5), 887–893. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.511405.x>
- Hoffmann, F., & Rinas, U. (2000). Kinetics of Heat-Shock Response and Inclusion Body Formation During Temperature-Induced Production of Basic Fibroblast Growth Factor in High-Cell-Density Cultures of Recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, 16(6), 1000–1007. <https://doi.org/10.1021/bp0000959>
- Hoffmann, F., & Rinas, U. (2004). Stress Induced by Recombinant Protein Production in *Escherichia coli*. In *Physiological Stress Responses in Bioprocesses* (pp. 73–92). <https://doi.org/10.1007/b93994>
- Hokamura, A., Fujino, K., Isoda, Y., Arizono, K., Shiratsuchi, H., & Matsusaki, H. (2015). Characterization and identification of the proteins bound to two types of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas* sp. 61-3. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79(8), 1369–1377. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1023250>
- Horinouchi, T., Tamaoka, K., Furusawa, C., Ono, N., Suzuki, S., Hirasawa, T., Yomo, T., & Shimizu, H. (2010). Transcriptome analysis of parallel-evolved *Escherichia coli* strains under ethanol stress. *BMC Genomics*, 11(1), 579. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-579>

- Isar, J., & Rangaswamy, V. (2012). Improved n-butanol production by solvent tolerant *Clostridium beijerinckii*. *Biomass and Bioenergy*, *37*, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.12.046>
- Jahn, M., Vorpahl, C., Hübschmann, T., Harms, H., & Müller, S. (2016). Copy number variability of expression plasmids determined by cell sorting and droplet digital PCR. *Microbial Cell Factories*, *15*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0610-8>
- James, D. H., & Castor, W. M. (2011). Styrene. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. https://doi.org/10.1002/14356007.a25_329.pub2
- Jang, Y. S., Kim, B., Shin, J. H., Choi, Y. J., Choi, S., Song, C. W., Lee, J., Park, H. G., & Lee, S. Y. (2012). Bio-based production of C2-C6 platform chemicals. *Biotechnology and Bioengineering*, *109*(10), 2437–2459. <https://doi.org/10.1002/bit.24599>
- Jarboe, L. R., Grabar, T. B., Yomano, L. P., Shanmugan, K. T., & Ingram, L. O. (2007). Development of ethanologenic bacteria. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, *108*(July), 237–261. https://doi.org/10.1007/10_2007_068
- Jarboe, L. R., Zhang, X., Wang, X., Moore, J. C., Shanmugam, K. T., & Ingram, L. O. (2010). Metabolic engineering for production of biorenewable fuels and chemicals: Contributions of synthetic biology. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2010*. <https://doi.org/10.1155/2010/761042>
- Jendrossek, D. (2009). Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). *Journal of Bacteriology*, *191*(10), 3195–3202. <https://doi.org/10.1128/JB.01723-08>
- Jiang, W., Wang, S., Wang, Y., & Fang, B. (2016). Key enzymes catalyzing glycerol to 1,3-propanediol. *Biotechnology for Biofuels*, *9*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0473-6>
- Jürgen, B., Lin, H. Y., Riemschneider, S., Scharf, C., Neubauer, P., Schmid, R., Hecker, M., & Schweder, T. (2000). Monitoring of genes that respond to overproduction of an insoluble recombinant protein in *Escherichia coli* glucose-limited fed-batch fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, *70*(2), 217–224. [https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20001020\)70:2<217::AID-BIT11>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1097-0290(20001020)70:2<217::AID-BIT11>3.0.CO;2-W)
- Kaewchana, A., Techaparin, A., Boonchot, N., Thanonkeo, P., & Klanrit, P. (2021). Improved high-temperature ethanol production from sweet sorghum juice using *Zymomonas mobilis* overexpressing *groESL* genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *105*(24), 9419–9431. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11686-0>
- Kang, H.-J., Heo, D.-H., Choi, S.-W., Kim, K.-N., Shim, J., Kim, C.-W., Sung, H.-C., & Yun, C.-W. (2007).

- Functional characterization of Hsp33 protein from *Bacillus psychrosaccharolyticus*; additional function of HSP33 on resistance to solvent stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358(3), 743–750. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.184>
- Kawashima, Y., Orita, I., Nakamura, S., & Fukui, T. (2015). Compositional regulation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by replacement of granule-associated protein in *Ralstonia eutropha*. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 187. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0380-8>
- Kilstrup, M., Jacobsen, S., Hammer, K., & Vogensen, F. K. (1997). Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL, and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(5), 1826–1837. <https://doi.org/10.1128/aem.63.5.1826-1837.1997>
- Kitagawa, M., Matsumura, Y., & Tsuchido, T. (2000). Small heat shock proteins, IbpA and IbpB, are involved in resistances to heat and superoxide stresses in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 184(2), 165–171. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(00\)00038-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(00)00038-0)
- Kittibunchakul, S., Pham, M.-L., Tran, A.-M., & Nguyen, T.-H. (2019). β -Galactosidase from *Lactobacillus helveticus* DSM 20075: Biochemical Characterization and Recombinant Expression for Applications in Dairy Industry. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 947. <https://doi.org/10.3390/ijms20040947>
- Kolaj, O., Spada, S., Robin, S., & Wall, J. G. (2009). Use of folding modulators to improve heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 8(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-9>
- Koma, D., Kishida, T., Yoshida, E., Ohashi, H., Yamanaka, H., Moriyoshi, K., Nagamori, E., & Ohmoto, T. (2020). Chromosome Engineering To Generate Plasmid-Free Phenylalanine- and Tyrosine-Overproducing *Escherichia coli* Strains That Can Be Applied in the Generation of Aromatic-Compound-Producing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(14), 1–24. <https://doi.org/10.1128/AEM.00525-20>
- Koutinas, A. A., Vlysidis, A., Pleissner, D., Kopsahelis, N., Lopez Garcia, I., Kookos, I. K., Papanikolaou, S., Kwan, T. H., & Lin, C. S. K. (2014). Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers. *Chemical Society Reviews*, 43(8), 2587–2627. <https://doi.org/10.1039/c3cs60293a>
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., & Peterson, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad host range cloning vector PBBR1MCS, carrying

- different antibiotic resistance cassettes. *Gene*, 166(1), 175–176. <https://doi.org/10.1089/152045500436104>
- Krause, M., Ukkonen, K., Haataja, T., Ruottinen, M., Glumoff, T., Neubauer, A., Neubauer, P., & Vasala, A. (2010). A novel fed-batch based cultivation method provides high cell-density and improves yield of soluble recombinant proteins in shaken cultures. *Microbial Cell Factories*, 9, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-11>
- Lee, J. H., Nam, D. H., Lee, S. H., Park, J. H., Park, C. B., & Jeong, K. J. (2016). Solar-to-chemical conversion platform by Robust Cytochrome P450-P(3HB) complex. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 33, 28–32. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2015.10.002>
- Lee, K., Bang, H. B., Lee, Y. H., & Jeong, K. J. (2019). Enhanced production of styrene by engineered *Escherichia coli* and *in situ* product recovery (ISPR) with an organic solvent. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1129-6>
- Li, R., Yang, J., Xiao, Y., & Long, L. (2019). In vivo immobilization of an organophosphorus hydrolyzing enzyme on bacterial polyhydroxyalkanoate nano-granules. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 166. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1201-2>
- Li, X., Chang, H., Luo, H., Wang, Z., Zheng, G., Lu, X., He, X., Chen, F., Wang, T., Liang, J., & Xu, M. (2015). Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds coated with PhaP-RGD fusion protein promotes the proliferation and chondrogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells *in vitro*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(3), 1169–1175. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35265>
- Lian, J., McKenna, R., Rover, M. R., Nielsen, D. R., Wen, Z., & Jarboe, L. R. (2016). Production of biorenewable styrene: utilization of biomass-derived sugars and insights into toxicity. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(5), 595–604. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1734-x>
- Liang, L., Liu, R., Foster, K. E. O., AlakshChoudhury, Cook, S., Cameron, J. C., Srubar, W. V., & Gill, R. T. (2020). Genome engineering of *E. coli* for improved styrene production. *Metabolic Engineering*, 57(September 2019), 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.09.007>
- Liao, Z., Zhang, Y., Luo, S., Suo, Y., Zhang, S., & Wang, J. (2017). Improving cellular robustness and butanol titers of *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 by introducing heat shock proteins from an extremophilic bacterium. *Journal of Biotechnology*, 252(December 2016), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.04.031>

- Ling, H., Teo, W., Chen, B., Leong, S. S. J., & Chang, M. W. (2014). Microbial tolerance engineering toward biochemical production: From lignocellulose to products. *Current Opinion in Biotechnology*, 29(1), 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.03.005>
- Liu, C., Men, X., Chen, H., Li, M., Ding, Z., Chen, G., Wang, F., Liu, H., Wang, Q., Zhu, Y., Zhang, H., & Xian, M. (2018). A systematic optimization of styrene biosynthesis in *Escherichia coli* BL21(DE3). *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1017-z>
- López, N., Floccari, M., Steinbüchel, A., García, A., & Méndez, B. (1995). Effect of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) content on the starvation-survival of bacteria in natural waters. *FEMS Microbiology Ecology*, 16(2), 95–101.
- Machas, M., Kurgan, G., Abed, O. A., Shapiro, A., Wang, X., & Nielsen, D. (2021). Characterizing *Escherichia coli*'s transcriptional response to different styrene exposure modes reveals novel toxicity and tolerance insights. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 48(1–2). <https://doi.org/10.1093/jimb/kuab019>
- Madison, L. L., & Huisman, G. W. (1999). Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 21–53.
- Maehara, A., Ueda, S., Nakano, H., & Yamane, T. (1999). Analyses of a polyhydroxyalkanoic acid granule-associated 16-kilodalton protein and its putative regulator in the *pha* locus of *Paracoccus denitrificans*. *Journal of Bacteriology*, 181(9), 2914–2921.
- Maestro, B., Galán, B., Alfonso, C., Rivas, G., Prieto, M. A., & Sanz, J. M. (2013). A New Family of Intrinsically Disordered Proteins: Structural Characterization of the Major Phasin PhaF from *Pseudomonas putida* KT2440. *PLoS ONE*, 8(2), e56904. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056904>
- Mann, M. S., Dragovic, Z., Schirmacher, G., & Lütke-Eversloh, T. (2012). Over-expression of stress protein-encoding genes helps *Clostridium acetobutylicum* to rapidly adapt to butanol stress. *Biotechnology Letters*, 34(9), 1643–1649. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-0951-2>
- Mao, S., Luo, Y., Zhang, T., Li, J., Bao, G., Zhu, Y., Chen, Z., Zhang, Y., Li, Y., & Ma, Y. (2010). Proteome Reference Map and Comparative Proteomic Analysis between a Wild Type *Clostridium acetobutylicum* DSM 1731 and its Mutant with Enhanced Butanol Tolerance and Butanol Yield. *Journal of Proteome Research*, 9(6), 3046–3061. <https://doi.org/10.1021/pr9012078>
- Martínez-Alonso, M., García-Fruitós, E., Ferrer-Miralles, N., Rinas, U., & Villaverde, A. (2010). Side effects of chaperone gene co-expression in recombinant protein production. *Microbial Cell*

- Factories*, 9, 1–6. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-64>
- Mato, A., Tarazona, N. A., Hidalgo, A., Cruz, A., Jiménez, M., Pérez-Gil, J., & Prieto, M. A. (2019). Interfacial Activity of Phasin PhaF from *Pseudomonas putida* KT2440 at Hydrophobic–Hydrophilic Biotemplates. *Langmuir*, 35(3), 678–686. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03036>
- McKenna, R., Moya, L., McDaniel, M., & Nielsen, D. R. (2015). Comparing in situ removal strategies for improving styrene bioproduction. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(1), 165–174. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1255-9>
- McKenna, R., & Nielsen, D. R. (2011). Styrene biosynthesis from glucose by engineered *E. coli*. *Metabolic Engineering*, 13(5), 544–554. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.06.005>
- McKenna, R., Thompson, B., Pugh, S., & Nielsen, D. R. (2014). Rational and combinatorial approaches to engineering styrene production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 123. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0123-2>
- Merrick, J. M., & Doudoroff, M. (1961). Enzymatic synthesis of poly-beta-hydroxybutyric acid in bacteria. *Nature*, 189, 890–892.
- Meury, J., & Kohiyama, M. (1991). Role of heat shock protein DnaK in osmotic adaptation of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 173(14), 4404–4410. <https://doi.org/10.1128/jb.173.14.4404-4410.1991>
- Mezzina, M. P., Alvarez, D. S., Egoburo, D. E., Díaz Peña, R., Nickel, P. I., & Pettinari, M. J. (2017). A new player in the biorefineries field: phasin PhaP enhances tolerance to solvents and boosts ethanol and 1,3-propanediol synthesis in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(14), e00662-17.
- Mezzina, M. P., Alvarez, D. S., & Pettinari, M. J. (2020). PHA Granule-Associated Proteins and Their Diverse Functions. In M. Koller (Ed.), *The Handbook of Polyhydroxyalkanoates* (pp. 35–50). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429296611-3>
- Mezzina, M. P., & Pettinari, M. J. (2016). Phasins, Multifaceted Polyhydroxyalkanoate Granule-Associated Proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(17), 5060–5067. <https://doi.org/10.1128/AEM.01161-16>
- Mezzina, M. P., Wetzler, D. E., Catone, M. V., Bucci, H., Di Paola, M., & Pettinari, M. J. (2014). A phasin with many faces: structural insights on PhaP from *Azotobacter* sp. FA8. *PLoS One*, 9(7), e103012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103012>

- Mezzina, M. P., Wetzler, D. E., de Almeida, A., Dinjaski, N., Prieto, M. A., & Pettinari, M. J. (2015). A phasin with extra talents: a polyhydroxyalkanoate granule-associated protein has chaperone activity. *Environmental Microbiology*, *17*(5), 1765–1776. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12636>
- Miller, W. G., & Lindow, S. E. (1997). An improved GFP cloning cassette designed for prokaryotic transcriptional fusions. *Gene*, *191*(2), 149–153. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00051-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00051-6)
- Mingardon, F., Clement, C., Hirano, K., Nhan, M., Luning, E. G., Chanal, A., & Mukhopadhyay, A. (2015). Improving olefin tolerance and production in *E. coli* using native and evolved AcrB. *Biotechnology and Bioengineering*, *112*(5), 879–888. <https://doi.org/10.1002/bit.25511>
- Minty, J. J., Lesnefsky, A. A., Lin, F., Chen, Y., Zaroff, T. A., Veloso, A. B., Xie, B., McConnell, C. A., Ward, R. J., Schwartz, D. R., Rouillard, J.-M., Gao, Y., Gulari, E., & Lin, X. N. (2011). Evolution combined with genomic study elucidates genetic bases of isobutanol tolerance in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, *10*(1), 18. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-18>
- Mogk, A., Mayer, M. P., & Deuerling, E. (2002). Mechanisms of Protein Folding: Molecular Chaperones and Their Application in Biotechnology. *ChemBioChem*, *3*(9), 807–814. [https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20020902\)3:9<807::AID-CBIC807>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20020902)3:9<807::AID-CBIC807>3.0.CO;2-A)
- Moldes, C., García, P., García, J. L., & Prieto, M. A. (2004). In vivo immobilization of fusion proteins on bioplastics by the novel tag BioF. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(6), 3205–3212. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3205-3212.2004>
- Moon, H. G., Jang, Y. S., Cho, C., Lee, J., Binkley, R., & Lee, S. Y. (2016). One hundred years of clostridial butanol fermentation. *FEMS Microbiology Letters*, *363*(3). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw001>
- Mukhopadhyay, A. (2015). Tolerance engineering in bacteria for the production of advanced biofuels and chemicals. *Trends in Microbiology*, *23*(8), 498–508. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.04.008>
- Nakamura, C. E., & Whited, G. M. (2003). Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Current Opinion in Biotechnology*, *14*(5), 454–459. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2003.08.005>
- Navarrete, C., Jacobsen, I. H., Martínez, J. L., & Procentese, A. (2020). Cell Factories for Industrial Production Processes: Current Issues and Emerging Solutions. *Processes*, *8*(768).

<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/pr8070768>

- Neumann, L., Spinozzi, F., Sinibaldi, R., Rustichelli, F., Pötter, M., & Steinbüchel, A. (2008). Binding of the major phasin, PhaP1, from *Ralstonia eutropha* H16 to poly(3-hydroxybutyrate) granules. *Journal of Bacteriology*, *190*(8), 2911–2919. <https://doi.org/10.1128/JB.01486-07>
- Nicolaou, S. A., Gaida, S. M., & Papoutsakis, E. T. (2010). A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: From biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation. *Metabolic Engineering*, *12*(4), 307–331. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2010.03.004>
- Nikel, P., de Almeida, A., Melillo, E. C., Galvagno, M. A., & Pettinari, M. J. (2006). New Recombinant *Escherichia coli* Strain Tailored for the Production of Poly(3-Hydroxybutyrate) from Agroindustrial By-Products. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(6), 3949–3954. <https://doi.org/10.1128/AEM.00044-06>
- Nikel, P., Ramirez, M. C., Pettinari, M. J., Méndez, B. S., & Galvagno, M. A. (2010). Ethanol synthesis from glycerol by *Escherichia coli* redox mutants expressing adhE from *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of Applied Microbiology*, *109*(2), 492–504. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04668.x>
- OECD/Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2021). Biofuels. In *OECD-FAO Agricultural Outlook 2021-2030*. OECD Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1787/89d2ac54-en>
- Okochi, M., Kanie, K., Kurimoto, M., Yohda, M., & Honda, H. (2008). Overexpression of prefoldin from the hyperthermophilic archaeum *Pyrococcus horikoshii* OT3 endowed *Escherichia coli* with organic solvent tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *79*(3), 443–449. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1450-1>
- Olson, D. G., Sparling, R., & Lynd, L. R. (2015). Ethanol production by engineered thermophiles. *Current Opinion in Biotechnology*, *33*, 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.02.006>
- Overton, T. W. (2014). Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discovery Today*, *19*(5), 590–601. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.11.008>
- Pettinari, M., Chaneton, L., Vazquez, G., Steinbüchel, A., & Méndez, B. S. (2003). Insertion sequence-like elements associated with putative polyhydroxybutyrate regulatory genes in *Azotobacter* sp. FA8. *Plasmid*, *50*(1), 36–44. [https://doi.org/10.1016/S0147-619X\(03\)00009-X](https://doi.org/10.1016/S0147-619X(03)00009-X)
- Pettinari, M., Vazquez, G. J., Silberschmidt, D., Rehm, B., Steinbüchel, A., & Mendez, B. S. (2001). Poly

- (3-Hydroxybutyrate) synthesis genes in *Azotobacter* sp. strain FA8. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11), 5331–5334. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.5331>
- Pfeiffer, D., & Jendrossek, D. (2013). Development of a transferable bimolecular fluorescence complementation system for the investigation of interactions between poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins in gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(9), 2989–2999. <https://doi.org/10.1128/AEM.03965-12>
- Pfeiffer, D., & Jendrossek, D. (2014). PhaM is the physiological activator of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthase (PhaC1) in *Ralstonia eutropha*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(2), 555–563. <https://doi.org/10.1128/AEM.02935-13>
- Pfeiffer, D., Wahl, A., & Jendrossek, D. (2011). Identification of a multifunctional protein, PhaM, that determines number, surface to volume ratio, subcellular localization and distribution to daughter cells of poly(3-hydroxybutyrate), PHB, granules in *Ralstonia eutropha* H16. *Molecular Microbiology*, 82(4), 936–951. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07869.x>
- Pieper-Fürst, U., Madkour, M. H., Mayer, F., & Steinbüchel, A. (1994). Purification and characterization of a 14-kilodalton protein that is bound to the surface of polyhydroxyalkanoic acid granules in *Rhodococcus ruber*. *Journal of Bacteriology*, 176(14), 4328–4337. <https://doi.org/10.1128/jb.176.14.4328-4337.1994>
- Pieper-Fürst, U., Madkour, M. H., Mayer, F., & Steinbüchel, A. (1995). Identification of the region of a 14-kilodalton protein of *Rhodococcus ruber* that is responsible for the binding of this phasin to polyhydroxyalkanoic acid granules. *Journal of Bacteriology*, 177(9), 2513–2523. <https://doi.org/10.1128/jb.177.9.2513-2523.1995>
- Pötter, M., Müller, H., Reinecke, F., Wiczorek, R., Fricke, F., Bowien, B., Friedrich, B., & Steinbüchel, A. (2004). The complex structure of polyhydroxybutyrate (PHB) granules: four orthologous and paralogous phasins occur in *Ralstonia eutropha*. *Microbiology*, 150(7), 2301–2311. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26970-0>
- Prieto, M. A., Bühler, B., Jung, K., Witholt, B., & Kessler, B. (1999). PhaF, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated protein of *Pseudomonas oleovorans* GPO1 involved in the regulatory expression system for *pha* genes. *Journal of Bacteriology*, 181(3), 858–868.
- Quagliano, J. C., Alegre, P., & Miyazaki, S. S. (1994). Isolation and characterization of *Azotobacter* sp. for the production of poly- β -hydroxyalkanoates. *Rev Argent Microbiol*, 26, 21–27.
- Rahman, A., Linton, E., Hatch, A. D., Sims, R. C., & Miller, C. D. (2013). Secretion of polyhydroxybutyrate

- in *Escherichia coli* using a synthetic biological engineering approach. *Journal of Biological Engineering*, 7(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-7-24>
- Ramos, J. L., Duque, E., Gallegos, M. T., Godoy, P., Ramos-González, M. I., Rojas, A., Terán, W., & Segura, A. (2002). Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 56, 743–768. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.161038>
- Ramos, J. L., Sol Cuenca, M., Molina-Santiago, C., Segura, A., Duque, E., Gómez-García, M. R., Udaondo, Z., & Roca, A. (2015). Mechanisms of solvent resistance mediated by interplay of cellular factors in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(4), 555–566. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv006>
- Record, M. T., Courtenay, E. S., Cayley, D. S., & Guttman, H. J. (1998). Responses of *E. coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(4), 143–148. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01196-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01196-7)
- Reyes, L. H., Abdelaal, A. S., & Kao, K. C. (2013). Genetic Determinants for n -Butanol Tolerance in Evolved *Escherichia coli* Mutants: Cross Adaptation and Antagonistic Pleiotropy between n -Butanol and Other Stressors. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(17), 5313–5320. <https://doi.org/10.1128/AEM.01703-13>
- Rinas, U. (1996). Synthesis Rates of Cellular Proteins Involved in Translation and Protein Folding Are Strongly Altered in Response to Overproduction of Basic Fibroblast Growth Factor by Recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, 12(2), 196–200. <https://doi.org/10.1021/bp9600039>
- Rosano, G. L., Morales, E. S., & Ceccarelli, E. A. (2019). New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Science*, 28(8), 1412–1422. <https://doi.org/10.1002/pro.3668>
- Ruiz, J., López, N., Fernández, R., & Méndez, B. (2001). Polyhydroxyalkanoate Degradation Is Associated with Nucleotide Accumulation and Enhances Stress Resistance and Survival of *Pseudomonas oleovorans* in Natural Water Microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 225–230. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.225-230.2001>
- Ruiz, J., Lopez, N., & Mendez, B. (1999). Polyhydroxyalkanoates degradation affects survival of *Pseudomonas oleovorans* in river water microcosms. *Revista Argentina de Microbiología*, 31(4), 201–204. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10615683>
- Rutherford, B. J., Dahl, R. H., Price, R. E., Szmids, H. L., Benke, P. I., Mukhopadhyay, A., & Keasling, J. D.

- (2010). Functional Genomic Study of Exogenous n -Butanol Stress in Escherichia coli. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(6), 1935–1945. <https://doi.org/10.1128/AEM.02323-09>
- Sabra, W., Groeger, C., & Zeng, A.-P. (2015). Microbial Cell Factories for Diol Production. In Q. Ye, J. Bao, & J.-J. Zhong (Eds.), *Bioreactor Engineering Research and Industrial Applications I: Cell Factories* (Vol. 155, pp. 165–197). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/10_2015_330
- Saxena, R. K., Anand, P., Saran, S., & Isar, J. (2009). Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances*, 27(6), 895–913. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.07.003>
- Schalck, T., Van Den Bergh, B., & Michiels, J. (2021). Increasing solvent tolerance to improve microbial production of alcohols, terpenoids and aromatics. *Microorganisms*, 9(2), 1–23. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020249>
- Schiel-Bengelsdorf, B., Montoya, J., Linder, S., & Dürre, P. (2013). Butanol fermentation. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 34(13–14), 1691–1710. <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.827746>
- Schlieker, C., Bukau, B., & Mogk, A. (2002). Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the *E. coli* cytosol: implications for their applicability in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 96(1), 13–21. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00033-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00033-0)
- Scholey, D. V., Burton, E. J., & Williams, P. E. V. (2016). The bio refinery; Producing feed and fuel from grain. *Food Chemistry*, 197, 937–942. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.063>
- Schultheiss, D., Handrick, R., Jendrossek, D., Hanzlik, M., & Schüler, D. (2005). The presumptive magnetosome protein Mms16 is a poly(3-hydroxybutyrate) granule-bound protein (phasin) in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Journal of Bacteriology*, 187(7), 2416–2425. <https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2416-2425.2005>
- Seo, H.-M., Kim, J.-H., Jeon, J.-M., Song, H.-S., Bhatia, S. K., Sathiyarayanan, G., Park, K., Kim, K. J., Lee, S. H., Kim, H. J., & Yang, Y.-H. (2016). In situ immobilization of lysine decarboxylase on a biopolymer by fusion with phasin. *Process Biochemistry*, 51(10), 1413–1419. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.07.019>
- Seo, M. C., Shin, H. D., & Lee, Y. H. (2003). Functional role of granule-associated genes, phaP and phaR, in poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis in recombinant *E. coli* harboring phbCAB operon. *Biotechnology Letters*, 25(15), 1243–1249. <https://doi.org/10.1023/A:1025074926821>

- Silva-Rocha, R., Martínez-García, E., Calles, B., Chavarría, M., Arce-Rodríguez, A., De Las Heras, A., Páez-Espino, A. D., Durante-Rodríguez, G., Kim, J., Nikel, P. I., Platero, R., & De Lorenzo, V. (2013). The Standard European Vector Architecture (SEVA): A coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1), 666–675. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1119>
- Soufi, B., Krug, K., Harst, A., & Macek, B. (2015). Characterization of the *E. coli* proteome and its modifications during growth and ethanol stress. *Frontiers in Microbiology*, *6*(FEB), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00103>
- Stadmler, S. S., Gorenek-Benitez, A. H., Guseman, A. J., & Pielak, G. J. (2017). Osmotic Shock Induced Protein Destabilization in Living Cells and Its Reversal by Glycine Betaine. *Journal of Molecular Biology*, *429*(8), 1155–1161. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.03.001>
- Sugimoto, S., Nakayama, J., Fukuda, D., Sonezaki, S., Watanabe, M., Tosukhowong, A., & Sonomoto, K. (2003). Effect of heterologous expression of molecular chaperone DnaK from *Tetragenococcus halophilus* on salinity adaptation of *Escherichia coli*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *96*(2), 129–133. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)90114-9](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)90114-9)
- Szymanowska-Powałowska, D., & Kubiak, P. (2015). Effect of 1,3-propanediol, organic acids, and ethanol on growth and metabolism of *Clostridium butyricum* DSP1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(7), 3179–3189. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6292-4>
- Takano, T., & Kakefuda, T. (1972). Involvement of a Bacterial Factor in Morphogenesis of Bacteriophage Capsid. *Nature New Biology*, *239*(89), 34–37. <https://doi.org/10.1038/newbio239034a0>
- Tambo, N. (2006). Technology in the high entropy world. *Water Science and Technology*, *53*(9), 1–8. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.269>
- Tan, Z., Khakbaz, P., Chen, Y., Lombardo, J., Yoon, J. M., Shanks, J. V., Klauda, J. B., & Jarboe, L. R. (2017). Engineering *Escherichia coli* membrane phospholipid head distribution improves tolerance and production of biorenewables. *Metabolic Engineering*, *44*(August), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.08.006>
- Tan, Z., Yoon, J. M., Nielsen, D. R., Shanks, J. V., & Jarboe, L. R. (2016). Membrane engineering via trans unsaturated fatty acids production improves *Escherichia coli* robustness and production of biorenewables. *Metabolic Engineering*, *35*, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.02.004>

- Tao, Y., Wang, H., Wang, J., Jiang, W., Jiang, Y., Xin, F., Zhang, W., & Jiang, M. (2022). Strategies to improve the stress resistance of *Escherichia coli* in industrial biotechnology. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1–12. <https://doi.org/10.1002/bbb.2358>
- Tesfaw, A., & Assefa, F. (2014). Current Trends in Bioethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* : Substrate, Inhibitor Reduction, Growth Variables, Coculture, and Immobilization. *International Scholarly Research Notices*, 2014, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/532852>
- Tessmer, N., Konig, S., Malkus, U., Reichelt, R., Potter, M., & Steinbuchel, A. (2007). Heat-shock protein HspA mimics the function of phasins sensu stricto in recombinant strains of *Escherichia coli* accumulating polythioesters or polyhydroxyalkanoates. *Microbiology*, 153(2), 366–374. <https://doi.org/10.1099/mic.0.29260-0>
- Tian, S. J., Lai, W. J., Zheng, Z., Wang, H. X., & Chen, G. Q. (2005). Effect of over-expression of phasin gene from *Aeromonas hydrophila* on biosynthesis of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyhexanoate. *FEMS Microbiology Letters*, 244(1), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.01.020>
- Tomas, C. A., Welker, N. E., & Papoutsakis, E. T. (2003). Overexpression of groESL in *Clostridium acetobutylicum* Results in Increased Solvent Production and Tolerance, Prolonged Metabolism, and Changes in the Cell's Transcriptional Program. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4951–4965. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4951-4965.2003>
- Tosukhowong, A., Nakayama, J., Mizunoe, Y., Sugimoto, S., Fukuda, D., & Sonomoto, K. (2005). Reconstitution and function of *Tetragenococcus halophila* chaperonin 60 tetradecamer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(1), 30–37. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.30>
- Ushimaru, K., Motoda, Y., Numata, K., & Tsuge, T. (2014). Phasin Proteins Activate *Aeromonas caviae* Polyhydroxyalkanoate (PHA) Synthase but Not *Ralstonia eutropha* PHA Synthase. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(9), 2867–2873. <https://doi.org/10.1128/AEM.04179-13>
- Veinger, L., Diamant, S., Buchner, J., & Goloubinoff, P. (1998). The Small Heat-shock Protein IbpB from *Escherichia coli* Stabilizes Stress-denatured Proteins for Subsequent Refolding by a Multichaperone Network. *Journal of Biological Chemistry*, 273(18), 11032–11037. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.18.11032>
- Volker, U., Mach, H., Schmid, R., & Hecker, M. (1992). Stress proteins and cross-protection by heat shock and salt stress in *Bacillus subtilis*. *Journal of General Microbiology*, 138(10), 2125–2135. <https://doi.org/10.1099/00221287-138-10-2125>

- Webb, J. P., Paiva, A. C., Rossoni, L., Alstrom-Moore, A., Springthorpe, V., Vaud, S., Yeh, V., Minde, D. P., Langer, S., Walker, H., Hounslow, A., Nielsen, D. R., Larson, T., Lilley, K., Stephens, G., Thomas, G. H., Bonev, B. B., Kelly, D. J., Conradie, A., & Green, J. (2022). Multi-omic based production strain improvement (MOBpsi) for bio-manufacturing of toxic chemicals. *Metabolic Engineering*, 72(February), 133–149. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2022.03.004>
- Weber, A., Kögl, S. A., & Jung, K. (2006). Time-Dependent Proteome Alterations under Osmotic Stress during Aerobic and Anaerobic Growth in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 188(20), 7165–7175. <https://doi.org/10.1128/JB.00508-06>
- Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V. F., & Hengge, R. (2005). Genome-Wide Analysis of the General Stress Response Network in *Escherichia coli*: σ S-Dependent Genes, Promoters, and Sigma Factor Selectivity. *Journal of Bacteriology*, 187(5), 1591–1603. <https://doi.org/10.1128/JB.187.5.1591>
- Wei, D. X., Chen, C. B., Fang, G., Li, S. Y., & Chen, G. Q. (2011). Application of polyhydroxyalkanoate binding protein PhaP as a bio-surfactant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(4), 1037–1047. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3258-7>
- Wieczorek, R., Pries, A., Steinbüchel, A., & Mayer, F. (1995). Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Bacteriology*, 177(9), 2425–2435. <https://doi.org/10.1128/jb.177.9.2425-2435.1995>
- Xia, P.-F., Turner, T. L., & Jayakody, L. N. (2016). The Role of GroE Chaperonins in Developing Biocatalysts for Biofuel and Chemical Production. *Enzyme Engineering*, 05(03). <https://doi.org/10.4172/2329-6674.1000153>
- Yang, M., Yun, J., Zhang, H., Magocha, T. A., Zabed, H., Xue, Y., Fokum, E., Sun, W., & Qi, X. (2018). Genetically engineered strains: Application and advances for 1,3-Propanediol production from glycerol. *Food Technology and Biotechnology*, 56(1), 3–15. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5444>
- Yao, Y. C., Zhan, X. Y., Zhang, J., Zou, X. H., Wang, Z. H., Xiong, Y. C., Chen, J., & Chen, G. Q. (2008). A specific drug targeting system based on polyhydroxyalkanoate granule binding protein PhaP fused with targeted cell ligands. *Biomaterials*, 29(36), 4823–4830. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.09.008>
- Yasukawa, T., Kanei-Ishii, C., Maekawa, T., Fujimoto, J., Yamamoto, T., & Ishii, S. (1995). Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin.

- Journal of Biological Chemistry*, 270(43), 25328–25331.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.43.25328>
- York, G. M., Junker, B. H., Stubbe, J., & Sinskey, A. J. (2001). Accumulation of the PhaP phasin of *Ralstonia eutropha* is dependent on production of polyhydroxybutyrate in cells. *Journal of Bacteriology*, 183(14), 4217–4226. <https://doi.org/10.1128/JB.183.14.4217>
- York, G. M., Stubbe, A., & Sinskey, A. J. (2001). New insight into the role of the PhaP phasin of *Ralstonia eutropha* in promoting synthesis of polyhydroxybutyrate. *Society*, 183(7), 2394–2397. <https://doi.org/10.1128/JB.183.7.2394>
- York, G. M., Stubbe, J., & Sinskey, A. J. (2002). The *Ralstonia eutropha* PhaR Protein Couples Synthesis of the PhaP Phasin to the Presence of Polyhydroxybutyrate in Cells and Promotes Polyhydroxybutyrate Production. *Journal of Bacteriology*, 184(1), 59–66. <https://doi.org/10.1128/JB.184.1.59-66.2002>
- Zhang, R., Cao, Y., Liu, W., Xian, M., & Liu, H. (2017). Improving phloroglucinol tolerance and production in *Escherichia coli* by GroESL overexpression. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 227. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0839-x>
- Zhao, H., Wei, H., Liu, X., Yao, Z., Xu, M., Wei, D., Wang, J., Wang, X., & Chen, G.-Q. (2016). Structural Insights on PHA Binding Protein PhaP from *Aeromonas hydrophila*. *Scientific Reports*, 6(1), 39424. <https://doi.org/10.1038/srep39424>
- Zingaro, K. A., & Papoutsakis, E. T. (2012). Toward a semisynthetic stress response system to engineer microbial solvent tolerance. *MBio*, 3(5), 1–9. <https://doi.org/10.1128/mBio.00308-12>. Editor
- Zingaro, K. A., & Papoutsakis, E. T. (2013). GroESL overexpression imparts *Escherichia coli* tolerance to i-, n-, and 2-butanol, 1,2,4-butanetriol and ethanol with complex and unpredictable patterns. *Metabolic Engineering*, 15(1), 196–205. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.07.009>