



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

**OPTIMIZACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE ÁCIDO HIALURÓNICO EN
ESCHERICHIA COLI RECOMBINANTE A PARTIR DE XILOSA**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA,
MENCIÓN QUÍMICA

DANIELA BEATRIZ VAISMAN ROMERO

PROFESORES GUÍAS:
JUAN ASENJO DE LEUZE
BÁRBARA ANDREWS FARROW

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
BERNARDO GONZÁLEZ OJEDA
MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS
ORIANA SALAZAR AGUIRRE

SANTIAGO DE CHILE

2014

RESUMEN

Cada día hay un mayor interés por generar productos con valor agregado a partir de diferentes tipos de residuos. Uno de estos productos es el ácido hialurónico (hyaluronic acid, HA), polímero con variados usos en la medicina y la cosmetología. El HA es sintetizado a partir de una enzima llamada Hialuronan Sintasa o HAS. Esta enzima es una proteína de membrana que sintetiza HA a partir de 2 precursores: Ácido UDP-Glucurónico y UDP-N-Acetilglucosamina, compuestos que se encuentran naturalmente en las bacterias *Escherichia coli*.

El presente trabajo tuvo como objetivo la construcción de una *Escherichia coli* recombinante capaz de sintetizar HA a partir de xilosa como fuente de carbono alternativa a la glucosa. Este azúcar es uno de los más abundantes en los residuos hemicelulósicos de la industria forestal chilena. Para mejorar el consumo de xilosa por parte de la bacteria nativa *E. coli Top10* se usó la técnica de la Evolución Adaptativa de Laboratorio de Palsson (Adaptive Laboratory Evolution, ALE). Este proceso se realizó mediante un cultivo continuo en medio R2 y xilosa como única fuente de carbono. La cepa evolucionada fue transformada con el gen *hasA* de *Streptococcus equisimilis* (*sehasA*) obteniendo la cepa *Top10 Evo:pMBAD-sseAB*. Para el análisis del cambio generado por la ALE se realizó un Análisis de Balance de Flujos (Flux Balance Analysis, FBA) a partir de un Modelo a Escala Genómica (Genome Scale Model, GSM) del microorganismo. Además, se optimizó el cultivo de la cepa *Top10 Evo:pMBAD-sseAB* en cuanto a las siguientes condiciones: tiempo de adición de inductor y su concentración, control de pH, temperatura de crecimiento post-inducción y concentración de azúcar suplementada.

El ALE realizado tuvo una duración de 48 días. Como resultado se obtuvo que la velocidad específica de crecimiento en xilosa de la cepa *E. coli Top10* aumentó un 36%: de 0,24 [h^{-1}] a 0,33 [h^{-1}].

Se determinó que un mayor rendimiento de HA se obtiene al hacer 2 adiciones de inductor al cultivo. Anteriormente en la literatura se había observado este fenómeno, pero nunca en una expresión recombinante de proteína asociada a un vector regulado con el promotor P_{BAD} , correspondiente al del presente trabajo. Una temperatura de crecimiento post-inducción de 28,5 °C presentó los mejores rendimientos. Además, se definió que la adición de xilosa a una concentración de 20 g/L 2 horas después de la inducción, y de 12 g/L a las 24 horas de cultivo (el doble de lo presentado en la literatura) aumenta el rendimiento de HA en cultivos en xilosa.

Finalmente, las condiciones de cultivo seleccionadas fueron: inducción con 2 adiciones de 0,05 g/L de L-arabinosa, temperatura de crecimiento post-inducción de 28,5 °C y concentración de azúcar suplementada de 20 g/L después de la inducción y 12 de g/L a las 24 horas de cultivo. El rendimiento de HA obtenido en estas condiciones fue de 195,8 mg/g.cel, más del doble que el rendimiento obtenido en condiciones basales, el que fue de 92,6 mg/g.cel.

Con el FBA realizado fue posible corroborar que la cepa evolucionada tenía mejoras metabólicas en comparación con la cepa no evolucionada, cambio producido por el ALE. Estas mejoras permitieron que los flujos asociados a las vías de las pentosas fosfato, la glicólisis y el ciclo de ácidos tricarbóxicos fueran mayores en la cepa evolucionada en un 12 % y 29 % en promedio, durante el consumo de xilosa y manosa, respectivamente. Además, dado que las diferencias observadas entre las cepas evolucionada y no evolucionada se observaron tanto en xilosa como en manosa, y permitieron una mayor producción de HA y de biomasa, se infirió que la ALE impactó alguna enzima de la glicólisis.

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción	1
1.1. El Ácido Hialurónico	1
1.2. Descripción General del Proyecto	4
1.3. Fuentes de Carbono Alternativas a la Glucosa: la Xilosa y la Manosa	5
1.4. Selección del Microorganismo: La Bacteria <i>Escherichia coli</i>	8
1.5. El Metabolismo de <i>Escherichia coli</i> y la Producción Recombinante de Ácido Hialurónico	9
1.6. Evolución Adaptativa de Laboratorio: ALE	10
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivo General	13
2.2. Objetivos Específicos	13
3. PLAN DE TRABAJO Y METODOLOGÍA	14
3.1. Plan de Trabajo	14
3.2. Metodología	17
3.2.1. Evolución Adaptativa de Laboratorio	17
3.2.2. Construcción de las Cepas <i>Top10 Evo:pMBAD-sseAB</i> y <i>Top10:pMBAD-sseAB</i>	19
3.2.3. Construcción de la Cepa <i>Ros:pET22-hasA</i>	21
3.2.4. Medición de Ácido Hialurónico	23
3.2.5. Optimización de las Condiciones de Cultivo para la Producción de Ácido Hialurónico	24
3.2.6. Construcción y Análisis de Flujo a Partir de un Modelo a Escala Genómica	28

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1. Aumento de la Velocidad Específica de Crecimiento de <i>E. coli</i> en Xilosa: Evolución Adaptativa de Laboratorio	31
4.1.1. Selección de Medio Definido para la ALE	31
4.1.2. Evolución Adaptativa de Laboratorio para el Aumento de la Velocidad Específica de Crecimiento de <i>E. coli Top10</i> en Xilosa	34
4.2. Construcción de las Cepas <i>Top10 Evo:pMBAD-sseAB</i> y <i>Top10:pMBAD-sseAB</i> con Actividad HAS <i>in vivo</i>	37
4.2.1. Transformación de las Cepas <i>E. coli Top10 Evo</i> y <i>E. coli Top10</i> con el Vector pMBAD- <i>sseAB</i>	37
4.2.2. Verificación de la Actividad HAS <i>in vivo</i> de las Cepas <i>Top10 Evo:pMBAD-sseAB</i> y <i>Top10:pMBAD-sseAB</i>	41
4.3. Construcción de la Cepa <i>E. coli Rosetta (DE3)</i> Recombinante con Actividad HAS	41
4.3.1. Obtención del Gen <i>hasA</i>	42
4.3.2. Clonación del Gen <i>hasA</i> en el Vector pET22	45
4.4. Definición del Método de Medición de Ácido Hialurónico	46
4.5. Optimización de las Condiciones de Cultivo para la Producción de Ácido Hialurónico	47
4.5.1. Tiempo de Adición de Inductor y su Concentración	47
4.5.2. Ajuste de pH	54
4.5.3. Temperatura de Crecimiento Post-inducción	61
4.5.4. Concentración de Xilosa Suplementada	67
4.5.5. Comparación Condiciones Optimizadas y Basales	72
4.6. Construcción y Análisis de Flujo a Partir de un Modelo a Escala Genómica	77
4.6.1. Construcción del Modelos a Escala Genómica	77
4.6.2. Obtención de Datos de Entrada para el Análisis de Balance de Flujos	80
4.6.3. Análisis de Balance de Flujos de las Cepas Evolucionada y No Evolucionada con un Modelo a Escala Genómica	83
5. Conclusiones	87

Bibliografía	89
A. Cepas y Vectores	97
A.1. Cepas	97
A.1.1. <i>Escherichia coli Top10</i>	97
A.1.2. <i>E. coli Rosetta (DE3)</i>	98
A.2. Vectores	98
A.2.1. Vector de expresión pET22	98
A.2.2. Vector de expresión pBAD y su versión pMBAD	99
B. Secuencias Génicas y Secuenciación	101
B.1. Vector pMBAD	101
B.2. Gen HasA de <i>Streptococcus equisimilis</i>	102
B.3. Gen HasA de <i>Streptococcus pyogenes</i> y Partidores	103
B.4. Secuenciación	105
C. Aplicaciones del Ácido Hialurónico	106
C.1. Aplicaciones del HA en la medicina	106
C.2. Aplicaciones del HA en la cosmética	106
D. Soluciones Stock y Buffers	107
D.1. Stock Ampicilina (amp)	107
D.2. Stock Cloranfenicol (cam)	107
D.3. Stock IPTG 0,5 M	107
D.4. Stock L-arabinosa 0,1 M	107
D.5. Stock ADN genómico (gADN)	107
D.6. Stock dNTPs	108
D.7. Stock Partidores	108
D.8. Stock Glicerol	108
D.9. Stock BSA 10X	108

D.10. Buffer Tris 10 mM	108
D.11. Glicerol 10%	108
D.12. Solución 0.1 M CaCl ₂	109
D.13. Solución 0,1 M CaCl ₂ / 15% Glicerol	109
D.14. Buffer Fosfato de Sodio pH 7,2	109
D.15. Buffer Fosfato de Sodio Urea 8 M	109
E. Medios de Cultivo	110
E.1. Medios Luria Bertani	110
E.1.1. Medio Luria Bertani (LB)	110
E.1.2. Medio LB Agar	110
E.1.3. Placas con Medio LB Agar	110
E.2. Medio Definido R	111
E.3. Medio Definido R2	112
E.4. Medio Definido M9	113
E.5. Medios Selectivos	114
F. Cultivos y Curvas de Crecimiento	115
F.1. Crecimiento de Inóculos	115
F.2. Construcción de Curva de Crecimiento	115
F.2.1. Preparación	115
F.2.2. Medir Absorbancias	115
F.2.3. Determinación de Peso Seco	116
F.2.4. Construcción de Curva de Crecimiento	116
G. Evolución Adaptativa de Laboratorio	117
H. Preparación y Transformación de Células Competentes	118
H.1. Transformación de células mediante Shock Térmico	118
H.2. Preparación de células termocompetentes	118

I. Separación Fracciones Celulares	120
I.1. Obtención de Fracciones Celulares Totales	120
J. Electroforesis	122
J.1. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)	122
J.2. Electroforesis en Gel de Agarosa	123
K. Purificación de ADN	124
K.1. Purificación de productos de PCR usando el kit QIAquick (QIAquick PCR Purification Kit Protocol)	124
K.2. Miniprep: Purificación de ADN plasmidial usando el kit QIAprep (Spin Miniprep Kit y una microcentrifuga)	124
K.3. Purificación de productos de fragmentos de ADN usando el kit QIAEX II (QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol)	125
L. Medición del Ácido Hialurónico	126
L.1. Concentrar Ácido Hialurónico (Bracke et al., 1985; Yu, 2008)	126
L.2. Ensayo de Carbazol Modificado (Bitter & Muir, 1962)	126
M. Medición de Xilosa	128
M.1. Medición de la concentración de xilosa mediante HPLC	128
N. Programas y Soluciones de PCR	129
N.1. PCR de Colonias	129
N.2. PCR con GoTaq Polimerasa	129
N.2.1. Soluciones	130
N.2.2. Programas	130
N.3. PCR con KOD Hot Start Polimerasa	130
N.3.1. Soluciones	131
N.3.2. Programas	131
Ñ. Digestión y Ligación	133

Ñ.1. Doble digestion con enzimas de restricción <i>XhoI</i> y <i>NdeI</i>	133
Ñ.2. Ligación a vector pET22	133
O. Cálculo de Concentración y Rendimiento de Ácido Hialurónico	134
O.1. Concentración en función del volumen de cultivo	134
O.2. Rendimiento en función de la concentración celular	134
P. Tablas y Figuras Adicionales	135
P.1. Curvas de crecimiento de cepas <i>Top10</i> y <i>Top10 Evo</i> después del ALE	135
P.2. Optimización	135
P.2.1. Optimización de la concentración y el tiempo de inducción	136
P.2.2. Optimización de ajuste de pH	146
P.2.3. Optimización de la temperatura de inducción	149
P.2.4. Optimización de concentración de xilosa suplementada	151
P.2.5. Comparación condiciones optimizadas y basales	153
P.3. Modelo a Escala Genómica	154
P.3.1. Metabolitos y reacciones de las vías centrales de la cepa recombinante	155
P.3.2. Código de Matlab	157
Q. Cultivo tipo Batch y Continuo de <i>Escherichia coli</i>	159

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 El Ácido Hialurónico

Cada día hay un mayor interés por generar productos con valor agregado a partir de diferentes tipos de residuos, para reducir la cantidad de éstos, además de generar utilidades a partir de los productos desarrollados. Gracias a la Ingeniería Genética gran parte de estas industrias se han dedicado a la generación de biocombustibles, productos farmacológicos, compuestos químicos, y también la síntesis de diferentes clases de compuestos biológicos, entre ellos el ácido hialurónico (hyaluronic acid, HA). Este polímero tiene variados usos en la medicina y la cosmetología, teniendo un alto valor comercial. El mercado global de esta sustancia alcanzó un estimado de US\$800 millones el año 2008 (Wang, 2012) y se proyecta que para el año 2017 su mercado llegará a los US\$2,5 billones (Millenium-Research-Group, 2014) (Business-Wire, 2011). Esto demuestra una enorme expansión de su economía haciéndolo un compuesto cuya producción industrial es muy atractiva por su alta rentabilidad y grandes proyecciones.

El HA es un polímero que es sintetizado por unas proteínas de membrana llamadas Hialuronan Sintetasas (HAS). Los mamíferos poseen 3 de estas enzimas. También otros organismos poseen HAS: *Xenopus laevis* (una rana africana) y las bacterias *Pasteurella multocida*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus pyogenes* (Brenda, 2011). Esta enzima es una proteína de membrana que sintetiza HA a partir de 2 precursores: Ácido Glucurónico y N-Acetilglucosamina. Estos compuestos se encuentran naturalmente en las bacterias *E. coli* ya que el primero forma parte de la vía de las pentosas fosfato y el segundo es un compuesto que se utiliza para sintetizar la pared celular (Varki et al., 1999). El HA es un glicosaminoglicano aniónico, no sulfatado distribuido ampliamente a través de los tejidos conjuntivos, epiteliales y neuronales. Es formado en la membrana plasmática y puede llegar a tener un peso molecular muy alto (a) (Fasher et al., 1997). Es un polímero de disacáridos, compuestos por ácido-D-glucurónico y D-N-acetilglucosamina, unidos alternando enlaces glicosídicos β -1,4 y β -1,3 (Varki et al., 1999), como se muestra en la Figura 1.1.

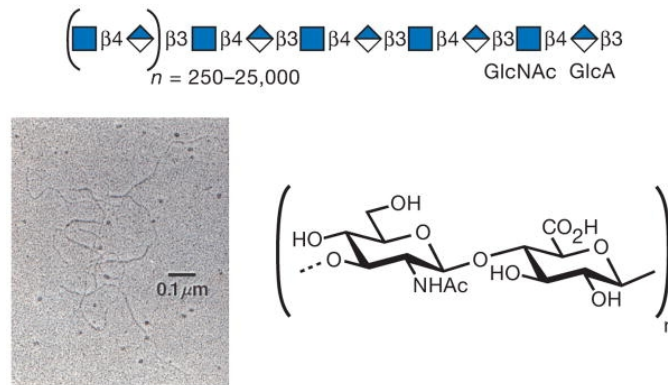


Figura 1.1: Esquema de la molécula de HA y una fotografía microscópica del polímero (Varki et al., 1999).

Las HAS extienden la molécula de HA adicionando repetidamente Ácido-D-Glucurónico y D-N-Acetilglucosamina al polisacárido al extremo reducido del polímero, extendiéndolo hacia el espacio extracelular. En la Figura 1.2 se muestra un esquema de lo anterior (Varki et al., 1999).

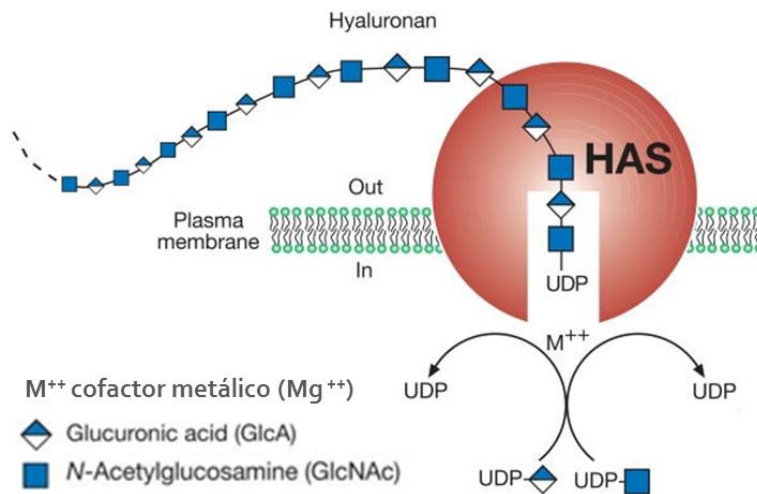


Figura 1.2: Esquema de la biosíntesis de ácido hialurónico a partir de la Hialuronan Sintasa.

El HA tiene propiedades fisicoquímicas únicas, siendo hidrofílico, viscoso y lubricante. Es un importante componente de la piel, el cartílago articular, el humor vítreo del ojo y el fluido sinovial (articulaciones). Además, participa en la regeneración de la piel y tiene un rol importante en la hidrodinámica del tejido, su movimiento y la proliferación celular. Por otro lado, interactúa con algunos receptores de membrana, jugando un rol importante para el sistema inmune. En particular, el HA interactúa con proteínas tales como CD44, RHAMM, y el fibrinógeno, lo que influye en mu-

chos procesos naturales, tales como la angiogénesis, el cáncer, la movilidad celular, la curación de heridas y la adhesión celular. Como reflejo de estas variadas funciones el HA ha atraído la atención de una amplia gama de campos como la medicina, cosmetología y alimentos saludables. Una lista de aplicaciones se encuentra en el Anexo C.

Tradicionalmente HA ha sido extraído a partir de crestas de gallos, pero hoy en día es producido por la fermentación de *Streptococcus*. En la actualidad, los problemas de calidad y otros factores a motivado la búsqueda de métodos de producción alternativos. En trabajos anteriores se ha logrado la expresión recombinante de la enzima HAS, y se logró que fuera activa en *E. coli*, permitiendo la síntesis recombinante de HA utilizando diferentes medios y fuentes de carbono. Los trabajos con mayores rendimientos se muestran en la Tabla 1.1 (Liu et al., 2011) (Yu y Stephanopoulos, 2008).

Tabla 1.1: Producción de ácido hialurónico a partir de microorganismos (Liu et al., 2011) (Yu y Stephanopoulos, 2008)

Microorganismo	Volumen Cultivo	Fuente Carbono	Concentración HA
<i>Streptococcus sp.</i>	45 L	Glucosa 4 % p/v	6,9 [g/L]
<i>S. equi subsp. zooepidemicus</i>	100 mL	Jugo de manzana 95 % v/v	0,9 [g/L]
<i>S. equi subsp. zooepidemicus</i>	1,8 L	Glicógeno 5 % p/v	2,5 [g/L]
<i>Bacillus subtilis</i> recombinante (<i>sehasA-hasB-vgb</i>)	50 mL	Glucosa 1 % p/v	1,8 [g/L]
<i>Lactococcus lactis</i> recombinante (<i>szhasA-hasB</i>)	50 mL	Glucosa 1 % p/v	0,7 [g/L]
<i>Lactococcus lactis</i> recombinante (<i>szhasA-hasB-hasC</i>)	2,4 L	Glucosa 2 % p/v	1,8 [g/L]
<i>E. coli</i> recombinante (<i>sehasA-hasB</i>)	40 mL	Glucosa 1 % p/v	0,19 [g/L]
<i>E. coli</i> recombinante (<i>pmhasA-hasB</i>)	1 L	Glucosa 4,5 % p/v GlcNAc 1,2 % p/v	3,8 [g/L]
<i>E. coli</i> recombinante (<i>pmhasA-hasB</i>)	250 mL	Glucosa 10 % p/v	0,26 [g/L]

En la tabla anterior se observa que en los trabajos realizados con *E. coli* se obtuvieron bajas concentraciones de HA (0,19 g/L y 0,26 g/L), en comparación con las otras cepas, excepto cuando se utiliza un precursor del polímero como fuente de carbono adicional (3,8 g/L) (Liu et al., 2011).

1.2 Descripción General del Proyecto

El objetivo del presente trabajo fue sintetizar HA a partir de una bacteria de rápido crecimiento y fácil control, que utilice como fuente de carbono azúcares que son parte de los desechos hemicelulósicos de la industria forestal. Es por esto que se construyeron dos *E. coli* recombinantes: Una que expresa el gen *hasA* de *Streptococcus equisimilis* (*sehasA*), el que codifica para una HAS a partir del vector pMBAD-*sseAB* (un pBAD modificado), vector gentilmente provisto por el Doctor Gregory Stephanopoulos (Department of Chemical Engineering, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA). Este constructo posee el gen *sehasA* modificado (substitución de todos los “rare codons”): *ssehasA*, además del gen *ugd* (*A*), gen codificante de la enzima clave para la síntesis de uno de los precursores del HA en *E. coli* (Yu y Stephanopoulos, 2008). La cepa utilizada es el *E. coli Top10*. La segunda cepa recombinante consiste en la bacteria *E. coli Rosetta (DE3)* transformada con el vector pET22-*sphasA*. Este vector fue construido a partir del gen *hasA* que codifica para una HAS de la bacteria *Streptococcus pyogenes* (*sphasA*). Esta cepa en particular expresa 7 tARN asociados a “rare codons” de *E. coli* que están presentes en el gen *sphasA* (Novagen, 2004).

Para el crecimiento de las bacterias y principalmente para la síntesis de HA se utilizaron azúcares que provengan de residuos forestales como suplementos al medio de cultivo. En particular, se seleccionaron xilosa y manosa porque éstos son abundantes en los residuos hemicelulósicos del *Eucalyptus globulus* y del *Pinus radiata* respectivamente (Akinterinwa y Cirino, 2009) (Bajpai, 2013), árboles que son importantes en la industria forestal chilena (Business-Chile, 2014). Con este fin se usó de la Evolución Adaptativa de Laboratorio de Palsson (Adaptive Laboratory Evolution, ALE) (Palsson, 2011) para mejorar el consumo de xilosa por parte de la bacteria. Esto se logró mediante el crecimiento de la cepa nativa en un medio definido con el azúcar en cuestión como única fuente de carbono para la célula, manteniendo la fase de crecimiento exponencial por aproximadamente 700 generaciones, de tal forma que ciertas mutaciones espontáneas que favorezcan el crecimiento en las condiciones dadas fueran propagadas en el tiempo (Portnoy et al., 2008) (Portnoy et al., 2011) (Conrad et al., 2011). Este proceso se realizó mediante un cultivo continuo (Fu et al., 2013) (Dragosits y Mattanovich, 2013). Para el análisis del cambio generado por la evolución se realizó un Análisis de Balance de Flujos (Flux Balance Analysis, FBA) a partir de un Modelo a Escala Genómica (Genome Scale Model, GSM) del microorganismo (Orth et al., 2011). Este análisis se realizó en Matlab con la ayuda del toolbox COBRA (Becker et al., 2007) (Schellenberger et al., 2011). Trabajos en la misma línea han sido desarrollados en el CeBiB, los que dan cuenta de lo útil de estas herramientas *in silico* (Gonzalez et al., 2003) (Moisset et al., 2012) (Merino et al., 2010). Otro de los objetivos de este trabajo consistió en optimizar la producción de HA generado por la

cepa ya evolucionada y transformada con el vector pMBAD-*sseAB* (cepa evolucionada) a partir de los siguientes criterios: tiempo de adición de inductor y su concentración, ajuste de pH, temperatura de crecimiento post-inducción y concentración de xilosa suplementada. Con la identificación de las mejores condiciones (condiciones optimizadas) para producir HA a partir de la cepa evolucionada se realizó un cultivo en bioreactor para definir si el conjunto de las condiciones optimizadas fueron favorables para el cultivo y la producción de HA.

1.3 Fuentes de Carbono Alternativas a la Glucosa: la Xilosa y la Manosa

En la actualidad hay un creciente interés por disminuir la generación de residuos en las diferentes industrias y vida diaria, fomentando procesos que involucren la reutilización de éstos. En particular, en la industria forestal se genera una gran variedad de residuos lignocelulósicos (celulosa, hemicelulosa y lignina), algunas de ellas difíciles de procesar. Existen diferentes técnicas para la hidrólisis del material lignocelulósico como el tratamiento con líquidos iónicos (Rogers y Seddon, 2003), hidrólisis enzimática (Ohgrena et al., 2007), hidrólisis ácida (Lavaracka et al., 2002), hidrólisis alcalina (Bjerre et al., 1996), etc. De esta manera se puede disponer de las azúcares fermentables que la componen. Es por esto que es de gran importancia encontrar nuevos usos para estos compuestos (Cortínez, 2010).

La hemicelulosa es un polímero complejo de heterosacáridos formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) que forman cadenas ramificadas, y los ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico. Los azúcares están unidos por enlaces β -1,4, α -1,4 y ocasionalmente β -1,3 (Cuervo et al., 2009). Las Figuras 1.4 y 1.5 muestran lo recientemente descrito.

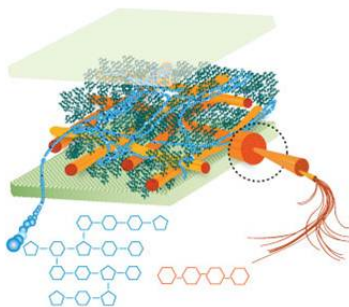


Figura 1.3: Esquema de material lignocelulósico compuesto por lignina (en naranja) y hemicelulosa (en celeste).

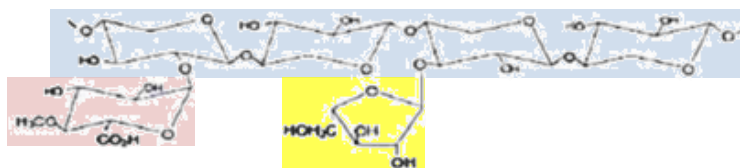


Figura 1.4: Ejemplo de hemicelulosa. Glucosa en celeste, xilosa en amarillo y manosa en rosado.

En particular, en el CeBiB es de gran interés trabajar con las materias primas provistas por el pino y el eucalipto, árboles que se producen en gran cantidad en Chile para la directa comercialización de la madera y para la elaboración de productos asociados, por ejemplo en la industria de la celulosa. En la Tabla 1.2 se muestran las composiciones del *Pinus radiata* y del *Eucalyptus globulus* (Bajpai, 2013).

Tabla 1.2: Composición del *Pinus radiata* y del *Eucalyptus globulus*.

<i>Pinus radiata</i>		<i>Eucalyptus globulus</i>	
Compuesto	%	Compuesto	%
Celulosa	45-50	Celulosa	40-50
Hemicelulosa	20-30	Hemicelulosa	22-35
Manosa	6-13	Manosa	1-2
Galactosa	2-4	Galactosa	1-1,9
Xilosa	5-10	Xilosa	14-19
Arabinosa	2-4	Arabinosa	0,6-1
Ramnosa	-	Ramnosa	0,3-1
Ácidos urónicos	3-6	Ácidos urónicos	2
Lignina	25-35	Lignina	22-35
Extraíbles	3-8	Extraíbles	1-5

En la tabla anterior se puede observar que las azúcares más abundantes en la fracción de la hemicelulosa del *Pinus radiata* y del *Eucalyptus globulus* son la manosa y la xilosa respectivamente. Es por esto que en este trabajo se propone utilizar como fuentes de carbono alternativas a la glucosa para el cultivo de células estas 2 azúcares las que se muestran en las Figuras 1.5 y 1.6.

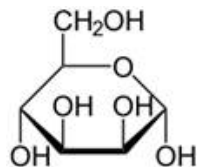


Figura 1.5: Esquema de la D-manosa.

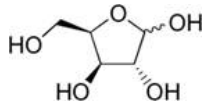


Figura 1.6: Esquema de la D-xilosa.

La bacteria *E. coli* es capaz naturalmente de metabolizar xilosa ya que posee transportadores específicos para esta azúcar: el transportador FGH, una proteína ATP dependiente formada por 3 monómeros codificadas por los genes *xylF*, *xylH* y *xylG*; y el transportador protón-xilosa E codificado por el gen *xylE*. La degradación de la xilosa es llevada a cabo por una xilosa-isomerasa y una D-xiluloquinasa (codificadas por los genes *xylA* y *xylB*, respectivamente). Luego, la xilulosa entra al Ciclo de las Pentosas Fosfato (PPP por sus siglas en inglés, Phosphate Pentoses Pathway) y así puede ser utilizada con fuente única de carbono. Un esquema de lo anterior se muestra en la Figura 1.7.

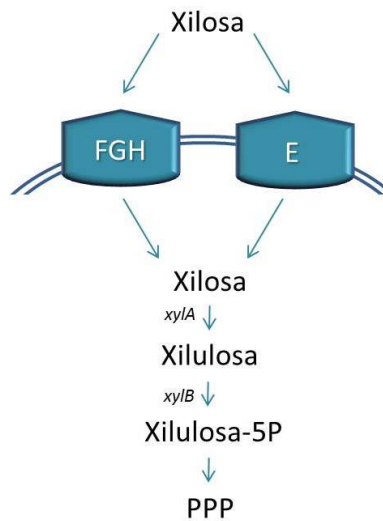


Figura 1.7: Metabolismo de la xilosa en *E. coli*. FGH: Transportador de xilosa. E: Transportador protón-xilosa.

De forma similar, la *E. coli* metaboliza la manosa gracias a un complejo transportador codificado por el operón *manXYZ*, y el operón *ptsHI* codifica para la enzima que convierte la manosa a manosa-6-fosfato una vez que el azúcar llega al citoplasma. Finalmente, la fosfomanosa isomerasa codificada por el gen *manA* convierte la manosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato, la que es parte de la glicólisis (Stolz et al., 1993). Un esquema de lo anterior se muestra en la Figura 1.8.

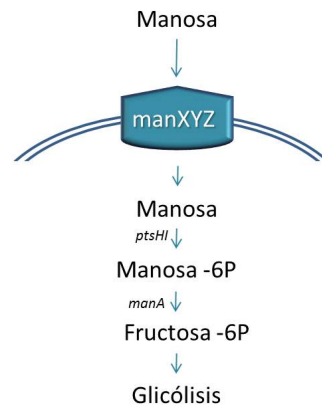


Figura 1.8: Metabolismo de la manosa en *E. coli*. manXYZ: complejo transportador de manosa.

Finalmente, dado que la xilosa y manosa son azúcares que se encuentran en un alto porcentaje en árboles de importancia en la industria nacional, y son metabolizadas por *E. coli*, se utilizaron como fuentes de carbono alternativas a la glucosa para los cultivos de *E. coli*.

1.4 Selección del Microorganismo: La Bacteria *Escherichia coli*

Actualmente existe una gran variedad de células hospederas capaces de producir proteínas y otros compuestos de forma recombinante. La selección de qué tipo de célula utilizar radica en la naturaleza del compuesto a producir y las ventajas o desventajas de su cultivo. En particular, la utilización de células eucariontes se relaciona con la producción recombinante de enzimas de la misma naturaleza debido a, por ejemplo, que la actividad de la enzima depende de las glicosilaciones que ésta requiere, las que sólo se producen en células de ésta naturaleza, pero estos cultivos son más lentos y costosos en comparación con los cultivos procariontes (Sahdev et al., 2008).

En este trabajo se produce HA en forma recombinante a partir de un gen procarionte, por lo que microorganismos de ésta naturaleza son adecuados. En particular, la bacteria *E. coli* presenta ciertas ventajas: (1) es una microorganismo de muy rápido crecimiento, el que alcanza estado estacionario en pocas horas por lo que su dinámica es fácil de estudiar (Sezonov et al., 2007) (Bentley et al., 1990), (2) medios de cultivos complejos ricos para estas bacterias están disponibles en el mercado y son económicos (Rosano y Ceccarelli, 2014), y (3) su transformación con ADN exógeno es simple y rápida con plasmidios comerciales (Pope y Kent, 1996). Existe una gran variedad de vectores de expresión y variantes mutantes aptas para las condiciones específicas requeridas (Jonasson et al., 2012) (Choi et al., 2003).

En particular en este trabajo se utiliza la cepa *E. coli Top10* para la clonación del gen foráneo

y las cepas *E. coli Top10* y *E. coli Rosetta (DE3)* para la expresión del gen de interés. La cepa *E. coli Top10* fue utilizada en este trabajo consiste en la versión quimiocompetente y se utilizó para clonar y expresar el vector pMBAD-*sseAB* dadas referencias anteriores que utilizaron dicha cepa (Yu y Stephanopoulos, 2008). La cepa *E. coli Rosetta (DE3)* se utilizó para la expresión de genes provenientes de *Streptococcus*, cuyo código genético tiene un alto uso de los codones para los que esta cepa suplementa. Además, el tener una expresión inducible, favorece un crecimiento de las bacterias previo a la expresión de la proteína recombinante que presenta una carga metabólica importante en muchos casos. Un detalle de las cepas utilizadas se encuentra en el Anexo A.

1.5 El Metabolismo de *Escherichia coli* y la Producción Recombinante de Ácido Hialurónico

La expresión recombinante de los genes *hasA* tienen el fin de construir bacterias *E. coli* capaces de sintetizar HA *in vivo*. Para entender como esto es posible se presenta parte del metabolismo central de *E. coli*, el que se puede observar en la Figura 1.9 (Yamada y Kawasaki, 2005).

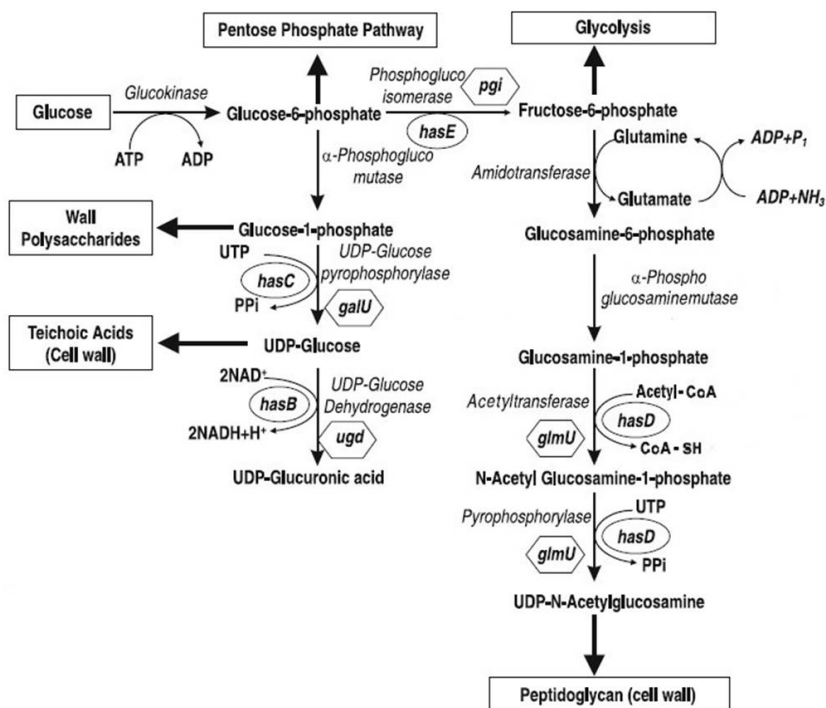


Figura 1.9: Metabolismo central de *E. coli*. Los óvalos y letras cursivas corresponden a enzimas y los hexágonos a genes. Los compuestos y rutas están en negritas.

La HAS utiliza como precursores ácido UDP-Glucurónico y UDP-N-Acetilglucosamina. Por lo que esta enzima puede obtener los precursores necesarios a partir del metabolismo central de la bacteria

huésped. Incorporando la HAS, el metabolismo resultante de la *E. coli* recombinante es el que se muestra en la Figura 1.10 (Yu y Stephanopoulos, 2008).

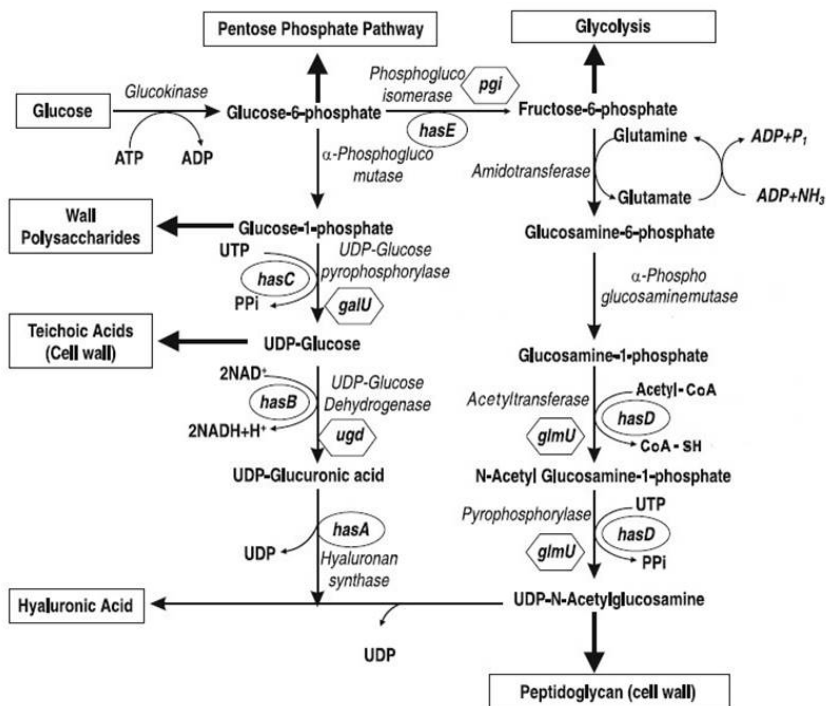


Figura 1.10: Metabolismo central de la *E. coli* recombinante que expresa la Hialuronan Sintasa. Los óvalos y letras cursivas corresponden a enzimas y los hexágonos a genes. Los compuestos y rutas están en negritas.

A partir de la Figura 1.10 se observa que la UDP-N-Acetilglucosamina es utilizada por la célula para la síntesis de distintos compuestos que componen la pared celular de la célula. Por este motivo que es importante considerar que la síntesis de HAS no es sólo una carga metabólica, si no también si se encuentra en su forma activa, presenta una competencia al crecimiento celular. Es por esto que su expresión debe fomentarse una vez que determinada densidad celular deseada haya sido alcanzada, de tal forma que las células puedan tener como función principal la síntesis de HA. Un detalle de los vectores utilizados se encuentra en el Anexo A.

1.6 Evolución Adaptativa de Laboratorio: ALE

La evolución adaptativa de laboratorio (Adaptive Laboratory Evolution, ALE) consiste en que al cultivar un microorganismo en condiciones claramente definidas por períodos prolongados de tiempo, en el intervalo de semanas a años, permite la selección de fenotipos mejorados. Las células microbianas ofrecen ventajas importantes para los estudios ALE: (a) la mayoría tienen necesidades

de nutrientes simples, (b) puede ser cultivada fácilmente en el laboratorio y (c) generalmente crecen muy rápido y pueden ser cultivadas por varios cientos de generaciones dentro de varias semanas o meses (con velocidades específicas de crecimiento típicas en el rango de $\mu = 0,05$ a $1,0$ [1/h]). En contraste con la genómica comparativa, la ALE permite cambios fenotípicos que están claramente asociados con un cierto ambiente que conduce a la selección de rasgos (Parés y Juárez, 1997) (Palsson, 2011).

En particular, en este trabajo la ALE fue utilizada para mejorar el consumo de la fuente de carbono por parte del huésped. Esto se logra mediante el crecimiento de la cepa nativa en un medio definido y con el azúcar definido (xilosa en este caso) como única fuente de carbono. Manteniendo la fase de crecimiento exponencial por aproximadamente 700 generaciones, ciertas mutaciones espontáneas que favorecen el crecimiento en las condiciones dadas son propagada en el tiempo (Portnoy et al., 2008) (Portnoy et al., 2011) (Conrad et al., 2011). Este proceso se puede realizar mediante un cultivo semi-continuo (Fu et al., 2013) y continuo (Figura 1.11) (Dragosits y Mattanovich, 2013).

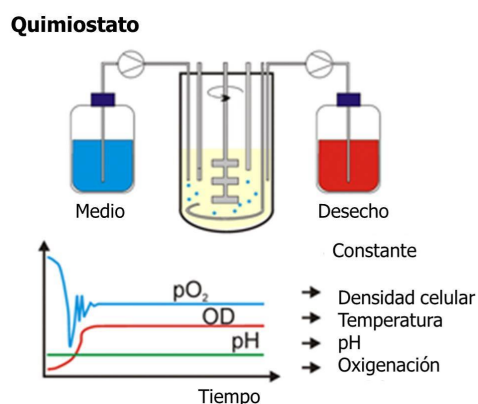


Figura 1.11: Esquema de ALE en cultivo continuo. Medio fresco en azul y medio con células (desecho) en rojo. Gráfico de monitoreo de condiciones: densidad celular, temperatura oxigenación, pH y oxigenación se mantienen constantes durante el cultivo.

Parte de las aplicaciones para las que se ha utilizado la ALE han sido experimentos bajo estrés ambiental para la adaptación de la cepa a altas temperaturas (Riehle et al., 2003) (Rudolph et al., 2010) (Tenaillon et al., 2012) (Blaby et al., 2012), a radiación ultra violeta (Alcántara-Díaz et al., 2004), heladas (Sleight y Lenski, 2007), presión osmótica (Stoebel et al., 2009), altas concentraciones de etanol (Goodarzi et al., 2010) (Horinouchi et al., 2010) u otros alcoholes (Atsumi et al., 2010) (Minty et al., 2011) (Reyes et al., 2012) (Dragosits et al., 2013). También hay numerosos experimentos relacionados con mejorar el consumo de un nutriente en particular como glucosa (Cooper et al., 2003) (Notley-McRobb y Ferenci, 1999) (Conrad et al., 2010) (Charusanti et al., 2010) (Jiang

et al., 2012), glicerol (Weikert et al., 1997) (Ibarra et al., 2002) (Fong et al., 2005) (Lee y Palsson, 2010), lactosa (Dekel y Alon, 2005) (Quan et al., 2012), etc.

2.1 Objetivo General

Optimizar el proceso de síntesis de ácido hialurónico en *E. coli* recombinante a partir de xilosa como fuente de carbono.

2.2 Objetivos Específicos

- ◇ Obtener una bacteria *E. coli* cuya velocidad específica de crecimiento sea mayor a la cepa nativa al crecer con xilosa como única fuente de carbono por medio de la Evolución Adaptativa de Laboratorio.
- ◇ Definir un método para la medición de ácido hialurónico.
- ◇ Obtener una *E. coli* evolucionada recombinante para la producción de ácido hialurónico.
- ◇ Optimizar las condiciones del cultivo de la *E. coli* recombinante en cuanto a tiempo de adición de inductor y su concentración, ajuste de pH, temperatura de crecimiento post-inducción y concentración de azúcar suplementada.
- ◇ Analizar las diferencias en los flujos metabólicos entre la *E. coli* evolucionada y no evolucionada por medio de un Análisis de Balance de Flujos a partir de un Modelo a Escala Genómica.

PLAN DE TRABAJO Y METODOLOGÍA

3.1 Plan de Trabajo

Un esquema general del plan de trabajo a realizar consiste en 4 etapas las que se describen a continuación.

La primera etapa consiste en una Evolución Adaptativa de Laboratorio (Adaptive Laboratory Evolution, ALE) para aumentar la velocidad específica de crecimiento de la cepa *E. coli Top10* en un medio con xilosa como única fuente de carbono. Esta metodología general se describe en la figura 3.1.

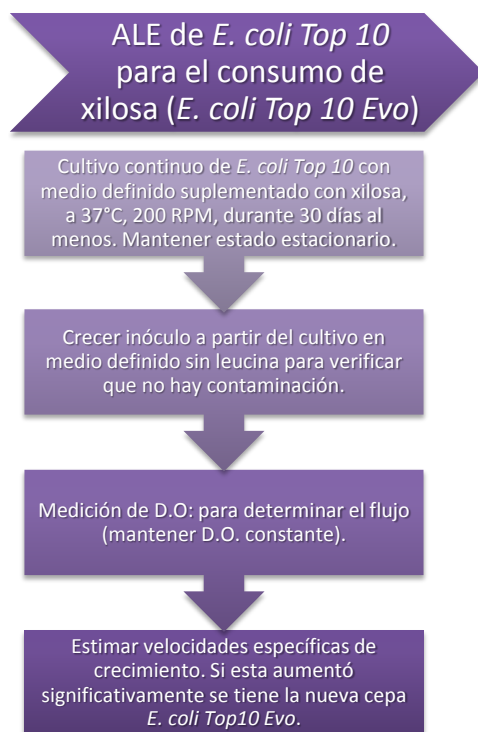


Figura 3.1: Metodología del Proyecto: Evolución Adaptativa de Laboratorio.

La segunda etapa consiste en la construcción de cepas recombinantes productoras de ácido hialurónico (hyaluronic acid, HA): una *E. coli Top10* transformada con el vector de expresión pMBAD-*sseAB* y una *E. coli Rosetta (DE3)* con el vector de expresión pET22-*hasA*. Esta metodología general se

describe en la figura 3.2.

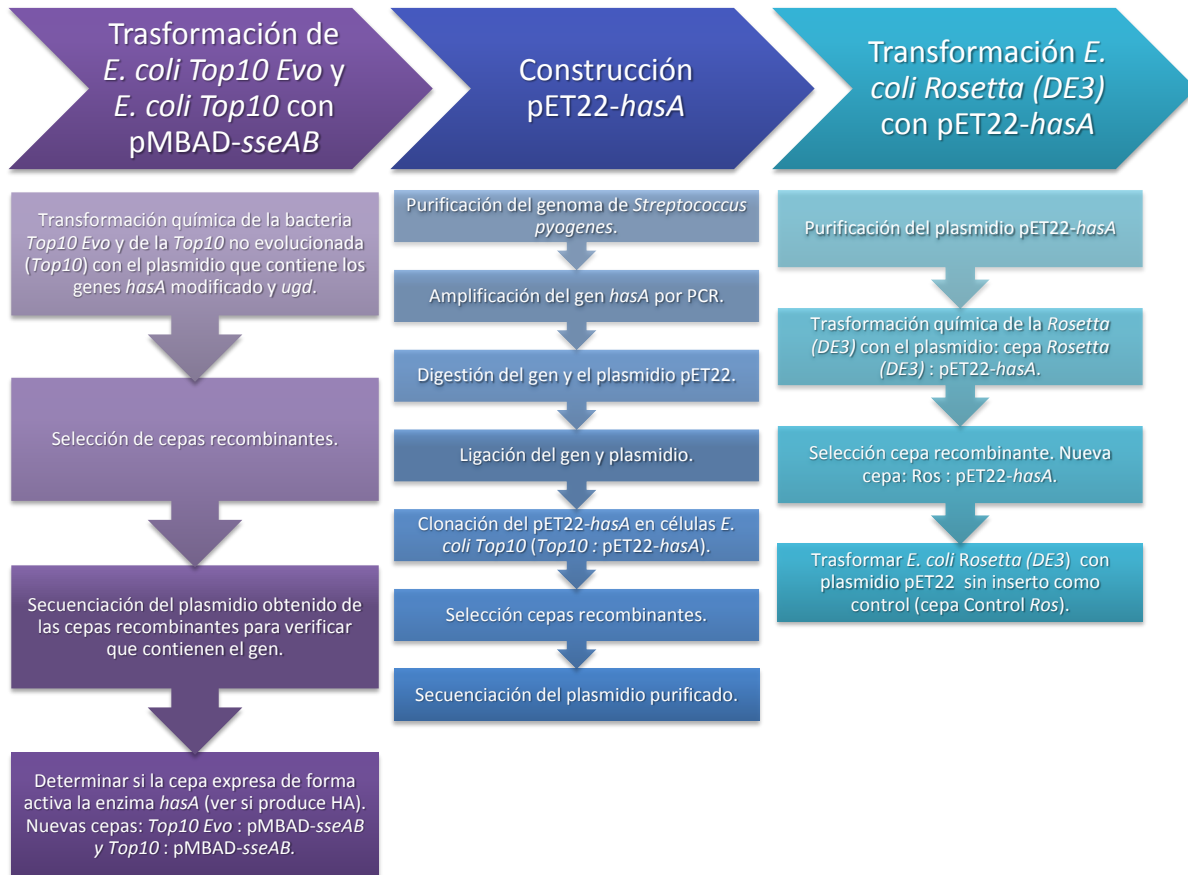


Figura 3.2: Metodología del Proyecto: Construcción de cepas y controles.

La tercera etapa consiste en la estandarización del método para medir HA, y la optimización de las condiciones del cultivo batch de la cepa recombinante para lograr una mayor producción de HA. Un detalle de las metodologías utilizadas y los criterios de optimización se describe en la figura 3.3. y 3.4 a continuación.

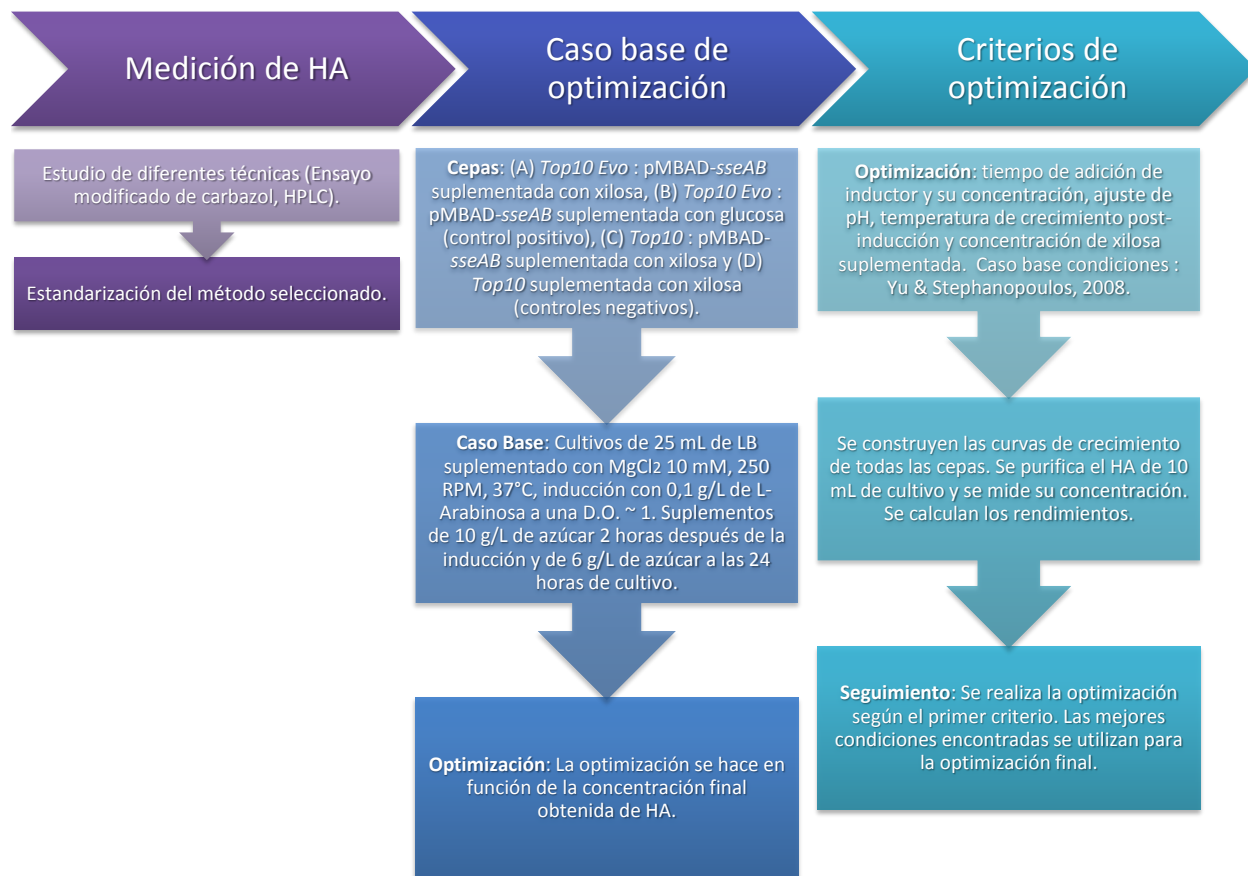


Figura 3.3: Metodología del Proyecto: Optimización de las condiciones de cultivo para la producción de ácido hialurónico.

Finalmente, la cuarta etapa consiste en la construcción de un Modelo a Escala Genómica (Genome Scale Model, GSM) de la cepa *E. coli Top10:pMBAD-sseAB* para estudiar los cambios metabólicos producidos a partir de la ALE, y estimar los valores de los flujos asociados a las principales vías metabólicas de la cepa recombinante. Esta metodología general se describe en la figura 3.4.

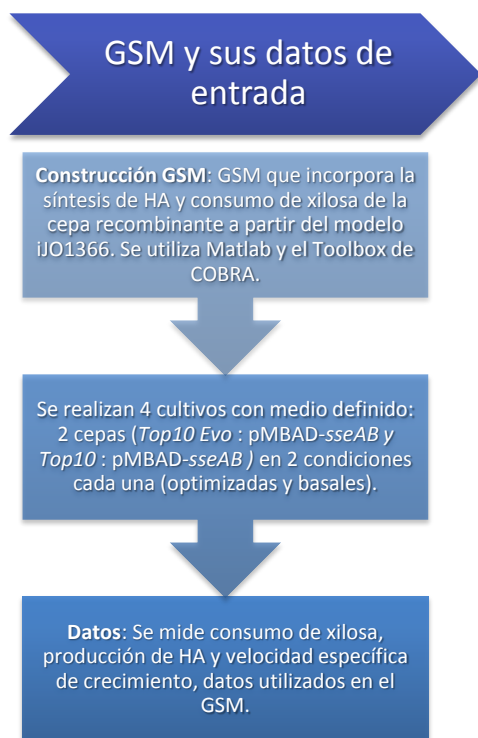


Figura 3.4: Metodología del Proyecto: Modelo a Escala Genómica.

3.2 Metodología

Un detalle de la metodología utilizada en cada una de las etapas descritas anteriormente se muestra a continuación:

3.2.1 Evolución Adaptativa de Laboratorio

Selección de Medio Definido

Primero que todo es necesario confirmar que las fuentes de carbono seleccionadas (xilosa y manosa) son metabolizadas por las bacterias *E. coli*. Para ello realizar un cultivo batch de 100 mL con medio definido M9 suplementado con leucina 10 mM (la cepa es auxótrofa para este aminoácido) (Anexo E) y fuentes de carbono: (a) 10 % p/v de xilosa, (b) 10 % p/v de manosa y (c) 5 % p/v de xilosa y 5 % p/v de manosa. Dejar crecer por 10 horas a 37 °C y 200 RPM. Construir las curvas de crecimiento (Anexo F).

Para la ALE en primer lugar es necesario definir el medio adecuado para la adaptación. Para generar la presión selectiva en cuanto a la fuente de carbono se debe usar un medio definido. En la literatura se encontraron 2 medios definidos comúnmente utilizados para el crecimiento de *E.*

coli. Estos medios son el M9 (Yamazaki et al., 1994) y el R (Lee y Chang, 1993). Para definir que medio utilizar se hacen cultivos batch de 100 mL de la cepa nativa *E. coli Top10* de Invitrogen con los medios definidos suplementados con leucina 10 mM y 2% p/v de xilosa o 2% p/v de glucosa y como control positivo se otro cultivo con medio LB (detalles del medio en el Anexo E). Se crecen por 28 horas a 37 °C y 200 RPM. Se hacen las curvas de crecimiento y se identifica que medio es más apto para la cepa en cuestión.

Cultivo Continuo para la Evolución Adaptativa de Laboratorio

Un vez definido el medio con el que se va a trabajar, se cultiva la cepa nativa *E. coli Top10* en un medio definido seleccionado suplementado con leucina 10 mM y 2% p/v de xilosa. Este cultivo continuo se encuentra a 37 °C y 200 RPM. Se alimenta con un flujo de aire y/u oxígeno de 1,5 L/min para un volumen de 500 mL aproximadamente. Por tratarse de una bacteria sin resistencia (nativa) el cultivo no tiene presión selectiva. Es por esto que se trabajó en condiciones de asepsia lo más estrictas posibles (sin aire acondicionado, en un laboratorio sin presencia de hongos, y siempre bajo mechero y con desinfección con etanol al 70%). Además, para asegurar que no hubo contaminación, por tratarse de una cepa auxótrofa para leucina, cada día se creció un inóculo con parte del cultivo en evolución y medio R2 sin leucina suplementado con xilosa. Así, al verificar que este inóculo no presenta crecimiento, se corroboraba que no hubiera contaminación.

El cultivo se mantiene con una densidad óptica (D.O.) constante la que va a ser definida a partir del flujo utilizado. Este flujo debe ser regulado con cuidado para evitar el "wash out" de las células. Esto quiere decir que si el flujo es mayor a la velocidad con que las bacterias se reproducen, estas podrían ser descartadas. Se trabaja con una D.O. relativamente baja ($\approx 0,5$) para que los requerimientos de las células sean bajos (en cuanto a nutrientes y oxígeno). Con estas dos medidas se asegura que los nutrientes y oxígeno estén en exceso para que su velocidad de crecimiento sea μ_{max} . Más detalles de la teoría se encuentra en la sección 1.6. El detalle del procedimiento realizado se encuentra en el Anexo G.

La velocidad específica de crecimiento se estima a partir de la ecuación Q.7. Si se ve un cambio significativo en la velocidad de crecimiento se concluye que como resultado se ha obtenido una bacteria *E. coli Top10* evolucionada en cuanto a su capacidad de alimentarse a partir de xilosa, llamada en adelante *Top10 Evo*. En la literatura se ha visto un aumento de un 24% de la velocidad de crecimiento medio con galactosa con fuente de carbono, en una evolución de 62 días (Dragosits y Mattanovich, 2013), por lo que se espera tener resultados similares. Las velocidades específicas de crecimiento máximas (μ_{max}) de las cepas *E. coli Top10* (en adelante *Top10*) y *Top10 Evo* se calculan a partir de un cultivo batch en medio definido con xilosa como única fuente de carbono y

construyendo su curva de crecimiento para verificar si su cambio fue significativo (Anexo F).

3.2.2 Construcción de las Cepas *Top10 Evo:pMBAD-sseAB* y *Top10:pMBAD-sseAB*

En este trabajo se construyó una *E. coli* recombinante que expresa el gen *hasA* de *Streptococcus equisimilis* (*sehasA*), el que codifica para una HAS a partir del vector *pMBAD-sseAB*, vector provisto por Gregory Stephanopoulos (Department of Chemical Engineering, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA). Este constructo posee el gen *sehasA* modificado: *ssehasA*, además del genes *ugd* (A), el que codifica para una enzima que produce UDP-D-glucuronato, un precursor del HA (Yu y Stephanopoulos, 2008). La otra cepa recombinante consiste en una *E. coli Rosetta (DE3)* transformada con el vector *pET22-hasA*, vector que tiene la secuencia del gen *hasA* que codifica para una HAS de la bacteria *Streptococcus pyogenes*.

El gen *hasA* de la bacteria *Streptococcus equisimilis* (*sehasA*) tiene 1.254 pares de bases, que codifican para 417 aminoácidos y codifica para una HAS de 47,8 kDa de peso. Este gen fue modificado, sustituyendo todos los "rare codons". Estos codones corresponden a aquellos cuyo tARN correspondiente es muy poco abundante o inexistentes en *E. coli* ($\leq 1\%$). Por este motivo este gen se modificó eliminando estos codones, con mutaciones silentes y se construyó el gen *ssehasA* (synthetic *S. equisimilis hasA*), o en forma abreviada *sseA*. El constructo de los genes *sseA* y *ugd* (B) se les abrevia como *sseAB* (Yu y Stephanopoulos, 2008). La secuencia de este gen se encuentra en el Anexo B. Un esquema del plasmidio *pMBAD* con el constructo *sseAB* se muestra en la Figura 3.5.

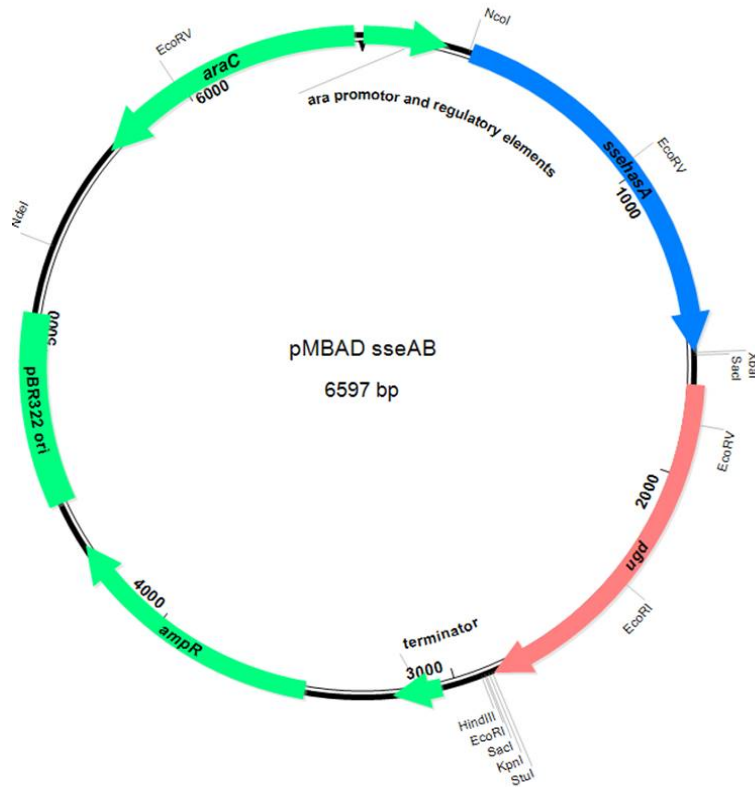


Figura 3.5: Esquema del plasmidio pMBAD-*sseAB*.

Transformación de las Cepas *Top10 Evo* y *Top10* con el Vector pMBAD-*sseAB*

Hacer termocompetentes *Top10 Evo* (Anexo H). Trasformación de *Top10 Evo* y *Top10* con vector pMBAD-*sseAB* por shock térmico (Anexo H). Seleccionar las cepa recombinante con medio LB agar selectivo (Anexo E). Crecer cepas seleccionadas en medio LB selectivo (Anexo E). Conservar las cepas en stock glicerol para su uso en la posterior optimización de cultivo (Anexo D).

Para verificar si la enzima es expresada hacer cultivos de 20 mL cada uno en medio LB selectivo de la cepa *Top10 Evo* (37 °C, 200 RPM) e inducir la producción recombinante con L-arabinosa. Luego, a 20 mL del cultivo hacerle una extracción de fracciones celulares totales (Anexo I) y hacer una electroforesis en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) con las fracciones correspondiente a proteínas integrales de membrana (Anexo J). Para la extracción preparar Buffer de Fosfato de Sodio pH 7.2 (Anexo D) ya que es el buffer adecuado para la enzima Hialuronan Sintasa. A otros 5 mL de cada cultivo, purificar el plasmidio por medio del kit QIAprep (en adelante miniprep) (Anexo K) y mandar a secuenciar el vector obtenido (Anexo B).

Para establecer si las cepas son productoras de HA se crecen ambas cepas (*Top10 Evo*:pMBAD-

sseAB y *Top10:pMBAD-sseAB*) en cultivos batch en medio LB selectivo a 37 °C y 200 RPM. Una vez alcanzada una D.O. ≈ 1 suplementar L-arabinosa (inductor). A las 2 horas suplementar 10 g/L de xilosa. A las 24 horas de cultivo suplementar 6 g/L de xilosa. A las 48 horas de cultivo proceder a precipitar el HA (Anexo L). Si se observa producto (gel transparente) es que las bacterias producen HA, por lo que se puede definir si la enzima es activa *in vivo*.

Si las cepas son productoras de HA en adelante se les llamó evolucionada y *Top10:pMBAD-sseAB*.

3.2.3 Construcción de la Cepa *Ros:pET22-hasA*

El gen *hasA* de la bacteria *Streptococcus pyogenes* tiene 1.260 pares de bases, que codifican para 419 aminoácidos. Es rico en AT (67%) y contiene 7 "rare codons" (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, CGA y CGA). Este factor es determinante a la hora de seleccionar el microorganismo a transformar para la expresión de este gen: la *Rosetta (DE3)* (ver sección 1.1.2). Para ver la secuencia del gen que componen el gen ir al Anexo B.

Obtención del Gen *hasA*

Para obtener el gen *hasA* que se desea clonar y expresar, se compró el genoma completo de *Streptococcus pyogenes* desde ATCC (producto 700294D-5). El genoma se presenta liofilizado por lo que es disuelto en agua Milli-Q y se preparan diluciones adecuadas (Anexo D). Como alternativa también se utilizó directamente la cepa *Streptococcus pyogenes* y se le extrajo su genoma con el Wizard Genomic DNA Purification Kit (Novagen, 2010).

Se diseñaron partidores adecuados para otorgarle al gen *hasA* el marco de lectura correcto y la adición de los sitios de restricción necesarios para su ligación al vector de expresión pET22. Además, sus T_m son lo más parecidas posibles y no forman estructuras secundarias. También se verifica que no sean complementarios a otras regiones del genoma (SPHasAfwr y SPHasArev, Anexo B). Por medio de PCR con la con gradiente de temperatura se define la T_a adecuada para amplificar eficientemente el fragmento deseado (Solución 1 y programa DANIVAI1, Anexo N). Luego, se realiza un PCR a la T_a definida para amplificar el gen *hasA* (Solución 1 y programa DANIVAI2, Anexo N). Si en la fase anterior se obtiene un producto de PCR único (se visualiza en un gel de agarosa, Anexo J), se purifica por medio del kit QIAquick (Anexo K). Si se observan más bandas será necesario purificar la banda de interés desde un gel de agarosa por medio del Kit QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol (Anexo K). Sobre este producto se realiza un nuevo PCR con la KOD Hot Start Polimerasa y se obtiene el gen *hasA* en el marco de lectura correcto, además de los sitios de restricción necesarios para digerirlo con las enzimas *NdeI* y *XhoI*, y así unirlo al vector pET22 (HasAfwr2 y HasArev2, Anexo B) (Solución 2 y programa DANIVAI2, Anexo N).

Clonación del Gen *hasA* en el Vector pET22-*hasA*

El vector pET22 es purificado mediante una miniprep a células que lo almacenan. Luego es digerido mediante una doble digestión con las enzimas *NdeI* y *XhoI* (Anexo Ñ) y purificado a partir de un gel de agarosa con el Kit QIAEX II.

El producto de PCR purificado se le realiza una doble digestión con las enzimas *NdeI* y *XhoI*. Luego se liga el vector de pET22 mediante el protocolo de ligación correspondiente (Anexo Ñ) y se purifica con el kit QIA PCR Purification. Se transforman células *Top10* por medio de shock térmico con el producto de ligación. Se seleccionan colonias recombinantes con un medio LB agar selectivo. Estas cepas en adelante son llamadas *Top10:pET22-hasA*. Se crecen inóculos en medio LB selectivo de al menos 3 colonias seleccionadas. Se guardan 2 stock glicerol de cada colonia. El objetivo de esta etapa es conservar el gen *hasA* y tener una forma fácil para recuperar el fragmento por medio de una miniprep a un inóculo crecido a partir de un stock glicerol.

Luego, se purifica el plasmidio por medio de una miniprep a partir de un inóculo de la cepa *Top10:pET22-hasA* y se secuencia el vector.

Transformación de *Rosetta (DE3)* con el Gen *hasA*

Crear un inóculo de *Top10:pET22-hasA*. Purificar el pADN por medio una miniprep a partir del inóculo. Transformar *Rosetta (DE3)* con el producto de la miniprep mediante shock térmico. Crecer en medio LB agar selectivo. Seleccionar al menos 4 cepas recombinantes. Hacer 2 stock glicerol de cada cepa seleccionada. En adelante esta cepa corresponde a la cepa *Ros:pET22-hasA*. Hacer cultivos de 200 mL de medio LB selectivo para cada cepa seleccionada. Cultivar en las siguientes condiciones: cultivo aeróbico, a 37°C, 200 RPM e inducción con IPTG (concentración final de 0,25 mM) a una D.O. $\approx 0,6$ (esta medida variará entre los diferentes cultivos). La inducción se realiza al mismo tiempo cuando todos los cultivos tengan una D.O. de al menos 0,6). Interrumpir el cultivo cuando se llegue a la D.O. deseada ($\approx 1,2$).

Finalizar el cultivo en hielo y centrifugar 5 mL del cultivo, realizar una miniprep y mandar a secuenciar. Con el mismo producto de miniprep, realizar una PCR de colonias con GoTaq Polimerasa con los partidores Hasfwr2 y Hasrev2, la solución 1 y el programa DANIVAI1 (Anexo N) para confirmar la presencia del gen *hasA*.

Construcción de la Cepa Control

Transformar *E. coli Rosetta (DE3)* con el vector de expresión pET22 sin inserto mediante shock térmico. Crecer en medio LB agar selectivo y elegir al menos 2 colonias para hacer 2 stock glicerol de cada una. En adelante esta corresponde a la cepa Control *Ros*.

3.2.4 Medición de Ácido Hialurónico

La medición de la concentración de ácido hialurónico fue fundamental para poder definir la productividad de las cepas y condiciones evaluadas. En particular, fue relevante para la etapa de optimización donde se compararon una gran cantidad de muestras, por lo que la precisión del método toma especial importancia. Es por esto que en esta etapa se evaluaron dos métodos para cumplir con este objetivo: el ensayo modificado de carbazol y la cromatografía líquida de alta presión.

Ensayo de Carbazol Modificado

El método utilizado se basa en la técnica Ensayo de Carbazol Modificado de Bitter & Muir, 1962. Este método consiste en la despolimerización del HA y así medir los monómeros de ácido glucurónico a partir de su reacción con el carbazol, generando una tinción púrpura. La concentración de HA se estima como 2,05 veces la cantidad del ácido glucurónico (se mide la absorbancia y se compara con una curva de calibración). Un detalle del protocolo se encuentra en el Anexo L (T. y H., 1962).

Cromatografía Líquida de Alta Presión

Para la medición de la concentración de HA mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) se utilizó una columna Shodex OHpak SB-806M HQ (Showa Denko, Tokyo, Japón), una columna de exclusión molecular acuosa a base de polímero. Sus características son:

- ◇ Tamaño: 8 mm ID x 300 mm
- ◇ Material: Polihidroximetacrilato
- ◇ Límite de exclusión: 2×10^7 Da
- ◇ Tamaño de las partículas: 13 μm

Esta columna permite medir la concentración de HA y también identificar el peso molecular del polímero. Dado que no se posee un estándar de peso molecular, esta columna permite en este trabajo medir la concentración y establecer si el peso molecular del producto es similar, mayor o menor al peso molecular del estándar.

Para las cromatografías se utilizaron los elementos y condiciones siguientes:

- ◇ Columna: Ohpak SB-806 HQ
- ◇ Condiciones:
 - Elución: 0,1 M NaNO_3 Acuoso.

- Flujo: 0,5 mL/min.
- Detector: RI.
- Temperatura autosampler: Temperatura ambiente.
- Temperatura horno: 40 °C.
- Volumen de inyección: 50 μ L.
- Polaridad: (+).
- Concentración de estándares: 0 - 1 g/L de HA.

Estas condiciones eran las recomendadas por el proveedor en su página web (Shodex, 2014).

3.2.5 Optimización de las Condiciones de Cultivo para la Producción de Ácido Hialurónico

La optimización de las condiciones de cultivo para la producción de HA consiste en que a partir de las condiciones de cultivo utilizadas en la literatura (Yu y Stephanopoulos, 2008), variar individualmente algunas de estas condiciones para definir si algunas de estas variaciones conlleva una mayor producción de HA (Ansmant y Motorin, 2003).

Una vez que se obtuvieron cepas evolucionadas transformantes productoras de HA (en adelante, cepa evolucionada), se procedió a evaluar las condiciones de cultivo, para obtener un mayor rendimiento en cuanto a la producción de HA. También se evaluó la diferencia obtenida entre la cepa evolucionada y la cepa no evolucionada. Para ello se evaluaron diferentes condiciones. Estas condiciones son las siguientes:

1. Tiempo de adición de inductor y su concentración
2. Ajuste de pH
3. Temperatura de crecimiento post-inducción
4. Concentración de azúcar suplementada.

(A) Evolucionada en xilosa

(B) No evolucionada en xilosa

(C) Evolucionada en glucosa

(D) No evolucionada en glucosa

(E) Nativa en xilosa

Las condiciones basales de estas optimizaciones consisten en el siguiente experimento:

- ◇ Cultivo batch aeróbico en matraz.
- ◇ 25 mL de medio LB suplementado con 10 mM de $MgCl_2$ y 100 $\mu g/mL$ de ampicilina si corresponde.
- ◇ Cultivo por 48 horas a 37 °C y 250 RPM.
- ◇ Inducción con la adición de 0,1 g/L de L- arabinosa cuando la D.O. sea de al menos 0,8.
- ◇ Adición de suplemento para alcanzar una concentración de 10 g/L de xilosa o glucosa (según corresponda) 2 horas después de la inducción.
- ◇ Adición de suplemento para alcanzar una concentración de 6 g/L de xilosa o glucosa (según corresponda) a las 24 horas de cultivo.

Luego, se construyó la curva de crecimiento para cada para comparar los efectos de las condiciones de inducción y las diferencias entre las cepas evaluadas. El HA se midió por HPLC en todos los cultivos. Para ello se de cada cultivo se tomaron 10 mL y se concentró el HA (Anexo L). Cada muestra de HA en NaCl 0,1 M es filtrada y luego se mide la concentración de HA en el HPLC con la columna Ohpak SB-806 HQ (Anexo L). Las curvas de calibración se hicieron junto con cada batch de medición en HPLC para tener menos variables no controladas. Los estándares se hicieron a partir de HA comercial (Hyaluronic acid sodium salt from *Streptococcus equi*, Sigma) en agua milli-Q en diluciones con concentraciones entre 0 a 1 g/L. Finalmente, se calcularon las concentraciones y rendimientos de HA obtenidos (Anexo O).

Tiempo de Adición de Inductor y su Concentración

La presente etapa tiene como objetivo seleccionar el tiempo de adición de inductor y la concentración de inductor para la producción de HA, ara una mayor producción de HA. Además, el menor uso de inductor disminuye los costos del cultivo, es por esto que se busca en lo posible disminuir su concentración. Por otro lado, se quiere identificar si es mejor inducir con la adición de inductor en 2 periodos del cultivo. Con este objetivo se evaluaron las siguientes condiciones:

1. Inducción con la adición de 0,1 g/L de L-arabinosa cuando la D.O. sea de 1,0 aproximadamente.

2. Inducción con 2 adiciones de 0,05 g/L de L-arabinosa cuando la D.O. sea de 1,0 aproximadamente y 2 horas después (junto con el primer suplemento de azúcar).
3. Inducción con la adición de 0,02 g/L de L-arabinosa cuando la D.O. sea de 1,0 aproximadamente.
4. Sin Inducción.

Las primeras 3 condiciones se evaluaron para las todas las cepas para contar con controles positivos y negativos (de la A a la E). La condición 4 (sin inducción) fue un control negativo que sólo se evaluó para la cepa A.

El experimento se realizó en las condiciones basales, con la única diferencia en el método de inducción, que consisten en las diferentes condiciones a evaluar. Se construyeron las diferentes curvas de crecimiento para comparar los efectos de las condiciones de inducción y las diferencias entre las cepas evaluadas. También se calcularon las concentraciones y rendimientos de HA obtenidos.

Optimización de Ajuste de pH

En esta optimización se busca definir si es necesario y cómo bajar el pH del cultivo debido a la acidez del producto generado. Es por esto que se avalúan 3 diferentes condiciones para controlar discretamente el pH:

1. Sin NaOH adicional.
2. Adición de NaOH 1 M para alcanzar una concentración final de 0,012 M de NaOH a las 24 horas de cultivo.
3. Adición de NaOH 1 M para alcanzar una concentración final de 0,024 M de NaOH a las 24 horas de cultivo.

Las 3 condiciones se evaluaron para las cepas A, B, C y E.

El experimento se realizó en las condiciones basales, con la única diferencia que se adicionaron diferentes volúmenes de NaOH 1 M a las 24 horas de cultivo, si correspondía, lo que consistía en las diferentes condiciones a evaluar. Se construyeron las diferentes curvas de crecimiento para comparar los efectos de las condiciones de inducción y las diferencias entre las cepas evaluadas. También se calcularon las concentraciones y rendimientos de HA obtenidos.

Optimización de Temperatura de Crecimiento Post-inducción

En esta optimización se busca encontrar la mejor temperatura de cultivo posterior a la inducción por L-arabinosa para fomentar la producción de HA. Se ha visto que en algunos casos de producción recombinante de proteínas u otros compuestos, que el bajar la temperatura después de la inducción, una vez se tenga una densidad celular apropiada, puede favorecer la producción recombinante, ya que las células disminuyen la velocidad con que se duplican, pudiendo utilizar los recursos disponibles en la expresión recombinante (Jones et al., 1987) (Lilie et al., 1998). Por otro lado, la disminución de la velocidad del metabolismo en general, puede también bajar la producción recombinante, por lo que quizás la producción de ácido hialurónico se vea perjudicada. Es por esto que se evalúan 3 condiciones:

1. Crecimiento a 37 °C y 37 °C post-inducción.
2. Crecimiento a 37 °C y 28,5 °C post-inducción.
3. Crecimiento a 37 °C y 20 °C post-inducción.

Las 3 condiciones se evaluaron para las cepas A, B, C y E para contar con controles positivos y negativos.

El experimento se realizó en las condiciones basales, con la única diferencia en el cambio de temperatura después de la inducción, en caso que corresponda. Se construyeron las diferentes curvas de crecimiento para comparar los efectos de las condiciones de inducción y las diferencias entre las cepas evaluadas. También se calcularon las concentraciones y rendimientos de HA obtenidos.

Optimización de Concentración de Xilosa Suplementada

En esta optimización se busca encontrar la mejor concentración de xilosa suplementada a los cultivos 2 horas después de la inducción y a las 24 horas de cultivo para fomentar la producción de HA. El fin es no suplementar más azúcar del necesario para bajar los costos, sin que éste sea una limitante. Es por esto que se evalúan las siguientes 3 condiciones:

1. Suplemento de azúcar para alcanzar una concentración de 10 g/L 2 horas después de la inducción y de 6 g/L a las 24 horas de cultivo.
2. Suplemento de azúcar para alcanzar una concentración de 20 g/L 2 horas después de la inducción y de 12 g/L a las 24 horas de cultivo.
3. Suplemento de azúcar para alcanzar una concentración de 30 g/L 2 horas después de la inducción y de 18 g/L a las 24 horas de cultivo.

Las 3 condiciones se evaluaron para las cepas A, B y C para contar con controles positivos y negativos. El experimento se realizó en las condiciones basales, con la única diferencia en la concentración de azúcar suplementada, en caso que corresponda. Se construyeron las diferentes curvas de crecimiento para comparar los efectos de las condiciones de inducción y las diferencias entre las cepas evaluadas. También se calcularon las concentraciones y rendimientos de HA obtenidos.

Comparación Condiciones Optimizadas y Basales

Una vez realizadas las optimizaciones individuales y definidas las mejores condiciones de cultivo, se cultivan bajo estas condiciones las siguientes cepas:

- (A) Evolucionada en xilosa en condiciones optimizadas
- (B) Evolucionada en xilosa en condiciones basales
- (C) No evolucionada en xilosa en condiciones optimizadas

Las condiciones del cultivo, medidas de absorbancia, cálculo de peso seco y medición de concentración de HA fueron realizadas de la misma forma que los cultivos anteriores, con la única diferencia que los cultivos se realizaron en triplicado y en volúmenes de 100 mL cada uno. Se construyeron las diferentes curvas de crecimiento para comparar los efectos de las condiciones de inducción y las diferencias entre las cepas evaluadas. También se calcularon las concentraciones y rendimientos de HA obtenidos.

3.2.6 Construcción y Análisis de Flujo a Partir de un Modelo a Escala Genómica

Con el objetivo de identificar los cambios metabólicos surgidos a partir de la transformación de la cepa *E. coli Top10* para que produzca HA y también los cambios generados con la ALE. Para esto se construyó un GSM y se hizo un FBA para determinar los flujos metabólicos de las cepas en cuestión. El detalle de cómo se lleva a cabo esta etapa se describe a continuación.

Construcción del Modelo a Escala Genómica

Se trabajó a partir del GSM iJO1366 (Orth et al., 2011). Se incorporó la reacción llevada a cabo por la Hialuronan Sintasa. Se trabajó en Matlab R2012a con el Toolbox de COBRA (Becker et al., 2007) (Schellenberger et al., 2011) el que utiliza el SBML como lenguaje (Systems Biology Markup Language) (Bornstein et al., 2008).

Obtención de Datos de Entrada

Los datos de entrada para el modelo se obtienen a partir de cultivos de la cepa evolucionada, *Top10:pMBAD-sseAB* y la cepa no evolucionada, *Top10:pMBAD Control*. Esta última cepa consiste en la cepa *E. coli Top10* transformada con el vector *pMBAD-sseAB* modificado al cual se le ha escindido un fragmento que contiene gran parte del gen codificante para la enzima HAS, por lo que ésta no se expresa. Esta cepa fue construida y provista gentilmente por Natalie Feltes.

Las cepas se cultivaron en un medio definido con xilosa o manosa como única fuente de carbono disponible. Es por esto que no se pueden ocupar extracto de levadura, triptona u otros compuestos complejos que tienen variadas fuentes de carbono disponibles para las células. Además, con el medio definido es posible establecer claramente que flujos de entrada quedan libres, de acuerdo a la composición del medio trabajado. Otro factor importante es que el FBA hace un análisis de estado estacionario. Este estado estacionario se supone se alcanza durante el crecimiento exponencial de las células, por lo que la toma de datos se debe realizar durante este periodo (Feng et al., 2012).

Las condiciones de cultivo son las siguientes:

- ◇ Cultivo batch en 200 mL de medio R2 con 20 g/L de xilosa o manosa y antibiótico (Anexo E)
- ◇ pH 6,8
- ◇ 37 °C
- ◇ 200 RPM
- ◇ Aeróbico

El procedimiento es el siguiente:

- ◇ Crecer inóculos (12-40 horas). Estos inóculos demoran más de lo común debido a que las células deben sintetizar todos los precursores que requieren (los que normalmente se encuentran en medios complejos).
- ◇ Inocular matraz con 50 mL de medio R2.
- ◇ Una vez alcanzada una D.O. de 1 inducir la producción de HA adicionando 0,1 g/L de L-arabinosa.
- ◇ A las 24 horas de cultivo, agregar 150 mL de medio R2 fresco (verificar que el cultivo tenga una D.O. entre 0,3 y 0,7).

- ◇ Medir D.O. y tomar muestras cada 30 minutos: 10 mL para precipitación de HA y 1,5 mL de sobrenadante para medir la concentración de xilosa o manosa (Anexo M).
- ◇ Construir la curva de crecimiento e ir monitoreando que se trate de crecimiento exponencial.
- ◇ Repetir las tomas de muestra hasta que el crecimiento exponencial cese.
- ◇ Medir el peso seco de las células finalizando el cultivo, y su D.O.
- ◇ Medir concentración de HA y de xilosa o manosa de cada muestra.

Con los datos anteriores, se construyen las curvas de biomasa y se define el intervalo de crecimiento exponencial a partir del cual se calculan los flujos de producción de HA, consumo de xilosa o manosa y producción de biomasa (en $[mmol/g.cel \cdot hora]$).

Análisis de Balance de Flujos de las Cepas Evolucionada y No Evolucionada con un Modelo a Escala Genómica

- ◇ Integrar los datos de entrada al modelo.
- ◇ Hacer el FBA correspondiente a cada cepa con el toolbox COBRA de Matlab.
- ◇ Analizar la diferencia entre los flujos y las cepas estudiadas.

4.1 Aumento de la Velocidad Específica de Crecimiento de *E. coli* en Xilosa: Evolución Adaptativa de Laboratorio

Para realizar la ALE en primer lugar es necesario definir las condiciones en las que ésta se realizará. El objetivo de esta adaptación es aumentar la velocidad específica de crecimiento de la cepa en xilosa. Para esto, se realiza un cultivo cuya única fuente de carbono sea esta azúcar, por lo que el medio debe ser definido, descartando el uso de medio LB, TB u otro que contenga otras fuentes de carbono. En una primera etapa se verificó que la cepa *E. coli Top 10* consumiera xilosa y manosa siendo las únicas fuentes de carbono disponibles, y se evaluó que medio definido utilizar entre el M9 o R2 (el medio R2 consiste en el medio R diluido al doble de volumen). Luego, se realizó la ALE en un cultivo continuo en el medio seleccionado y los resultados obtenidos se muestran a continuación.

4.1.1 Selección de Medio Definido para la ALE

Primero que todo, se hizo un cultivo batch con medio definido M9 suplementado con xilosa y/o manosa. Esto se hizo para verificar antes que todo que se estuviera trabajando con las fuentes de carbono apropiadas para el crecimiento de *E. coli*. Los resultados de estos cultivos se muestran en la Figura 4.1.

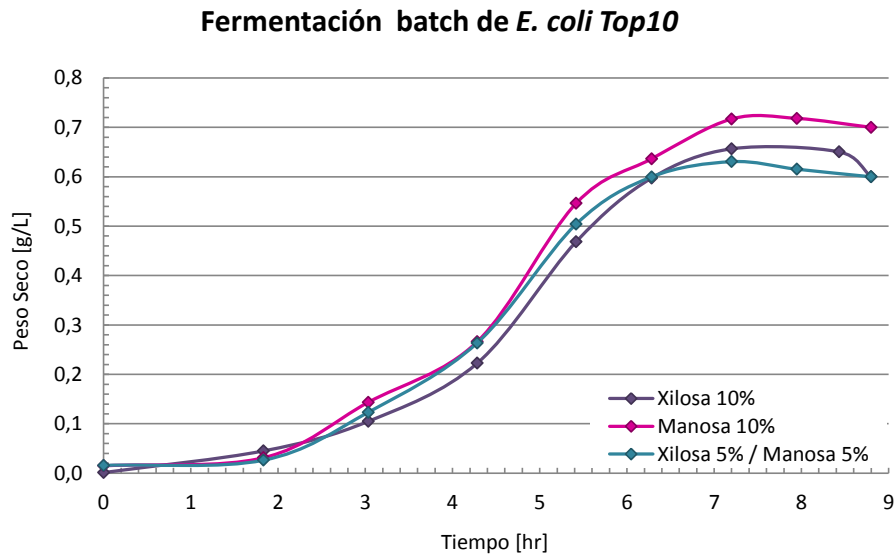


Figura 4.1: Curvas de crecimiento de cepa nativa *E. coli* Top10 en de medio definido M9 suplementado con leucina y fuente de carbono al 10 % p/v, 37°C y 200 RPM.

Con la figura anterior se puede concluir que ambas azúcares son metabolizadas por las bacterias *E. coli* y su crecimiento con manosa, xilosa o una combinación de las azúcares muestra crecimientos similares, aunque algo mayores en el caso de la manosa.

Para definir el medio definido a utilizar se cultivo la cepa *E. coli* Top 10 en medio M9 y R2 con xilosa y glucosa como fuente de carbono (además de la leucina requerida por la cepa auxótrofa para este aminoácido). Esto se hizo debido a que el medio R contenía muchas sales precipitadas y se quiso definir si con esta dilución las células presentaban un buen crecimiento (Anexo E). Las curvas de crecimiento obtenidas se muestran en la Figura 4.2.

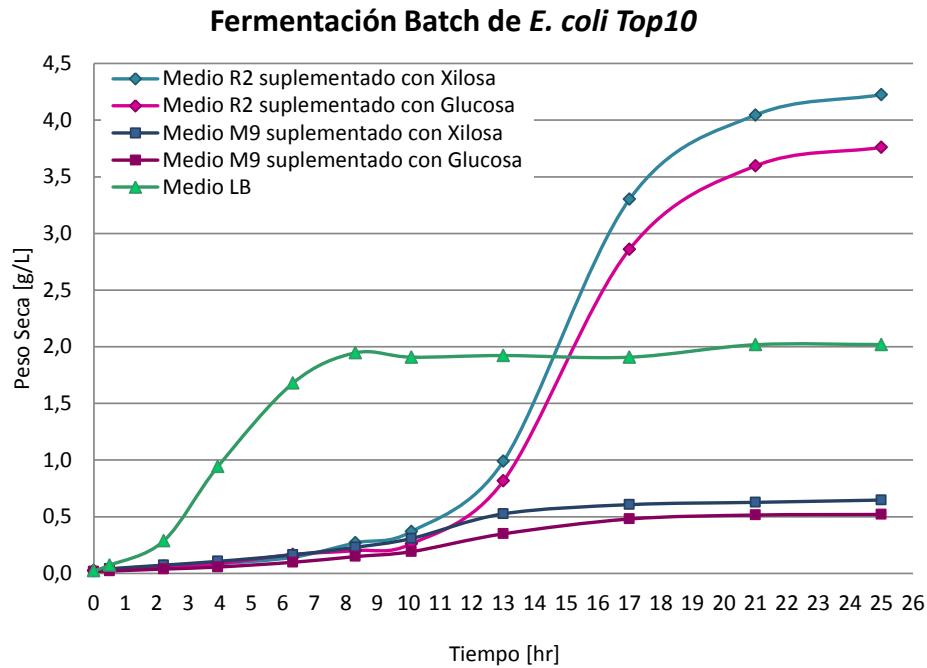


Figura 4.2: Curvas de crecimiento de cepa nativa *E. coli* Top10 en de medios definidos. Medios R2 con xilosa, R2 con glucosa, M9 con xilosa, M9 con glucosa y LB; 37°C y 200 RPM.

En la figura anterior se pueden concluir cosas muy interesantes. En primer lugar es evidente que el uso de medio R2 es más rico que el M9 ya que permite una densidad celular mucho mayor y una mayor velocidad de crecimiento (mayor pendiente durante el crecimiento exponencial). Esto es lo que se esperaba ya que el medio M9 es medio mínimo, no así el R2. Al observar que el peso seco de células al final de los cultivos con R2 supera los 3,5 g/L con lo que se puede suponer que los requerimientos de las células son satisfechos por este medio.

Por otro lado, es interesante observar que los cultivos con xilosa como fuente de carbono llegan a un mayor peso seco de células al finalizar el cultivo. Esto podría suponer que la xilosa es una mejor fuente de carbono que la glucosa para esta cepa.

Además, se pueden ver otros factores relevantes: el periodo *Lag* con el medio R2 es muy largo (10 horas aproximadamente) en comparación con el *Lag* en el medio LB (1 hora aproximadamente). Este factor era esperable debido a que el cultivo de medio definido requiere sintetizar todos los precursores, factores, de crecimiento, aminoácidos, etc. desde cero, en cambio el medio LB al tener extracto de levadura proporciona todos estos elementos directamente. Es por esto que es importante que los cultivos con medio definido sean notablemente más largos para poder observar el crecimiento

exponencial. Finalmente, vale la pena recalcar el hecho que el peso seco de células final obtenido con el medio R2 suplementado con xilosa fue un 109 % mayor a la obtenida a partir del medio LB (4,23 y 2,02 g/L respectivamente). Con este resultado se puede concluir que el medio definido R2 es el adecuado para trabajar con la cepa *E. coli Top10* y que no tiene compuestos limitantes, siendo un buen medio para la ALE.

4.1.2 Evolución Adaptativa de Laboratorio para el Aumento de la Velocidad Específica de Crecimiento de *E. coli Top10* en Xilosa

El cultivo para llevar a cabo la ALE se realizó por un periodo de 48 días. A medida que la cepa evoluciona, su velocidad específica de crecimiento debería aumentar lo que tiene como consecuencia la necesidad de aumentar la tasa de dilución (dado que $D = \mu$, Anexo Q). Es importante que el cultivo permanezca en crecimiento exponencial, para estar en presencia de μ_{max} como velocidad específica de crecimiento.

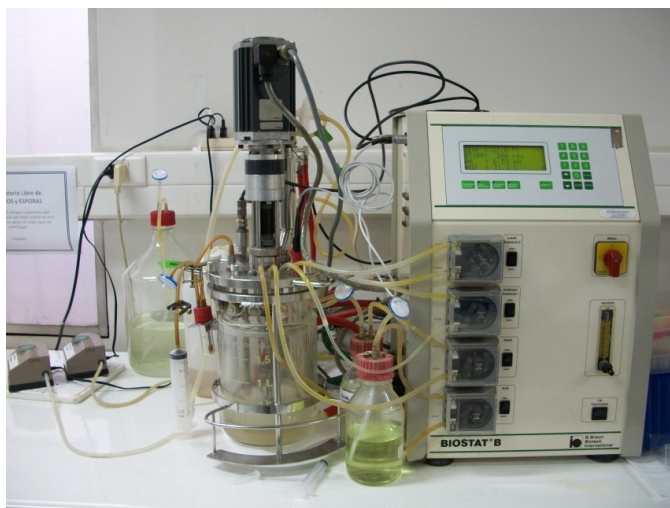


Figura 4.3: Fotografía del ALE realizado.

En el biorreactor, el flujo era controlado por una bomba peristáltica que regulaba el porcentaje de tiempo en rotación. En el caso de este cultivo, la dilución se calculó a partir de este flujo, de la siguiente forma:

Inicio del Cultivo

Bomba: 17,7 mL/min

Volumen de cultivo: 500 mL

Porcentaje de flujo: 13 %

$$F = 17,7 \text{ mL/min} \cdot 13\% \cdot 60 \text{ min/h} = 126 \text{ mL/h} \quad (4.1)$$

$$\mu_{max} = D = F/V = \frac{126 \text{ mL/h}}{500 \text{ mL}} = 0,25 \text{ h}^{-1} \quad (4.2)$$

Fin del Cultivo

Bomba: 17,7 mL/min

Volumen de cultivo: 500 mL

Porcentaje de flujo: 15,3 %

$$F = 17,7 \text{ mL/min} \cdot 13\% \cdot 60 \text{ min/h} = 162,486 \text{ mL/h} \quad (4.3)$$

$$\mu_{max} = D = F/V = \frac{162,486 \text{ mL/h}}{500 \text{ mL}} = 0,33 \text{ h}^{-1} \quad (4.4)$$

Con esto se pudo concluir que la velocidad específica de crecimiento aumento considerablemente durante la ALE. Para corroborar lo observado y eliminar los errores que los cálculos anteriores arrastran, se hicieron cultivos batch de las cepas y sus curvas de crecimiento para definir a partir de éstas la velocidad específica de crecimiento máxima (sección 1.6). Las curvas de crecimiento obtenidas se muestran en la Figura 4.4.

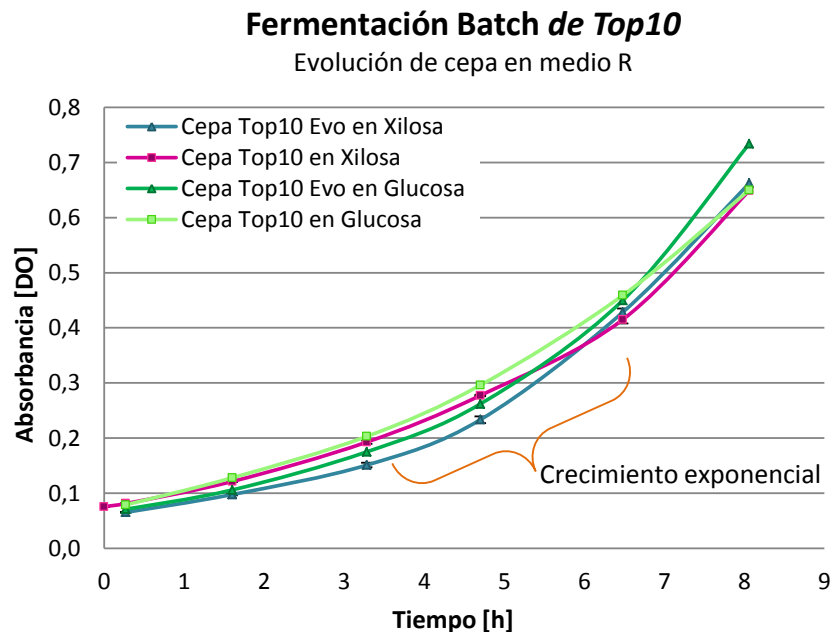


Figura 4.4: Curvas de crecimiento promedio de las cepas *E. coli* Top10 evolucionada y no evolucionada en xilosa (en triplicado) y en glucosa. Medio R2, 37°C Y 200 RPM.

A partir de las curvas observadas en la Figura 4.4 se puede inferir que un buen intervalo de tiempo para definir el crecimiento exponencial es entre las 3 y 7 horas de cultivo. A partir de este intervalo se calculó la velocidad específica de crecimiento para cada cepa evaluada a partir de la ecuación correspondiente (Anexo Q, ecuación Q.1). Un detalle de los valores obtenidos se encuentra en el Anexo P.

Luego, con las curvas de crecimiento y una vez definido el periodo exponencial, se calcularon las velocidades específicas de crecimiento máximas (μ_{max}) las que se muestran en la Figura 4.5.

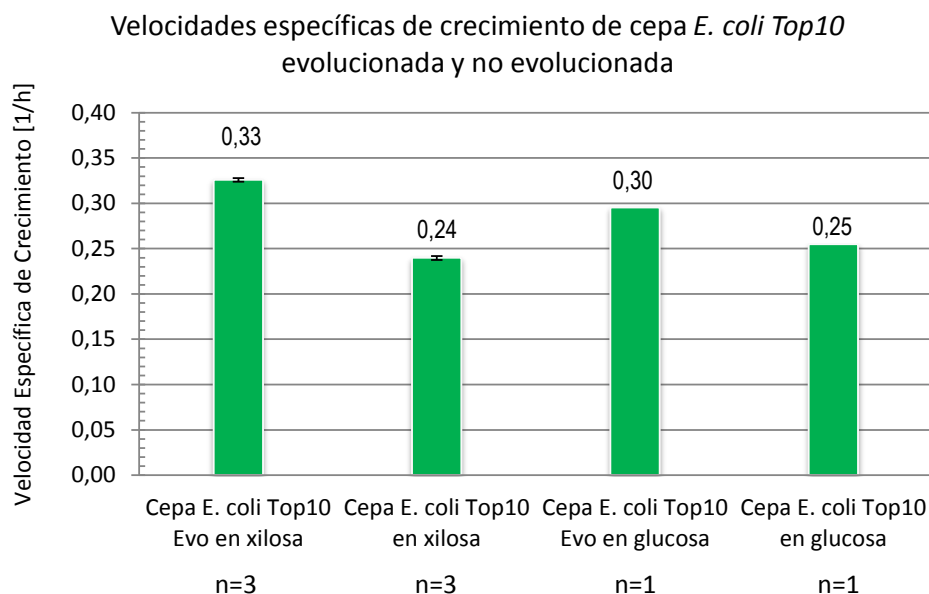


Figura 4.5: Velocidades específicas de crecimiento máximas (μ_{max}) de las cepas evolucionada y no evolucionada en xilosa (triplicado) y en glucosa.

Las μ_{max} obtenidas son en promedio de $0,33 [h^{-1}]$ para la cepa *E. coli* Top10 Evo en xilosa, $0,24 [h^{-1}]$ para la cepa *E. coli* Top10 en xilosa, $0,30 [h^{-1}]$ para la cepa *E. coli* Top10 Evo en glucosa y $0,26 [h^{-1}]$ para la cepa *E. coli* Top10 en glucosa.

Lo primero que se puede concluir a partir de estos resultados es que las μ_{max} obtenidas de los cultivos se condicen con las velocidades estimadas a partir de la tasa de dilución del cultivo continuo. En el inicio del cultivo continuo se obtuvo un $\mu_{max} = 0,25 [h^{-1}]$, muy similar al $\mu_{max} = 0,24 [h^{-1}]$ obtenido a partir del cultivo de cepa *E. coli* Top10 en xilosa. En el caso de la μ_{max} al final del cultivo, éste se estimó en un $\mu_{max}=0,33 [h^{-1}]$, igual al $\mu_{max} = 0,33 [h^{-1}]$ obtenido con el cultivo de esta cepa *E. coli* Top10 Evo en xilosa.

Con estos resultados, se concluye que la μ_{max} en medio R2 suplementado con xilosa aumentó un

36 % gracias a la ALE. Como efecto colateral se observa un aumento de la velocidad específica de crecimiento de la cepa en glucosa de aproximadamente un 16 %. Con estos resultados se concluye que se cumplió con el objetivo planteado.

4.2 Construcción de las Cepas *Top10 Evo:pMBAD-sseAB* y *Top10:pMBAD-sseAB* con Actividad HAS *in vivo*

En esta etapa se construyeron las cepas *E. coli Top10 Evo_pMBAD-sseAB* y *E. coli Top10_pMBAD-sseAB* y se verificó la presencia de los genes foráneos. Luego, se determinó si poseían actividad HAS *in vivo*, al verificar si la cepas producían HA al ser inducidas con L-arabinosa. Cada una de las etapas necesarias y sus resultados se describen a continuación.

4.2.1 Transformación de las Cepas *E. coli Top10 Evo* y *E. coli Top10* con el Vector *pMBAD-sseAB*

Se transformaron las cepas *E. coli Top10 Evo* y *E. coli Top10* con el vector *pMBAD-sseAB*. Se plaquearon en medio LB agar selectivo y crecieron numerosas colonias. De éstas, 6 de cada placa se guardaron y fueron llamadas *Top10 Evo:pMBAD-sseAB* 1 a la 6 y *Top10:pMBAD-sseAB* 1 a la 6.

Para verificar si la enzima era expresada si hicieron cultivos en medio LB selectivo de la cepa *Top10 Evo:pMBAD-sseAB* 1 con diferentes métodos de inducción. Luego, se realizó una extracción de proteínas totales cuya electroforesis en gel de poliacrilamida de las fracciones correspondiente a las proteínas integrales de membrana se muestra en la Figura 4.6.

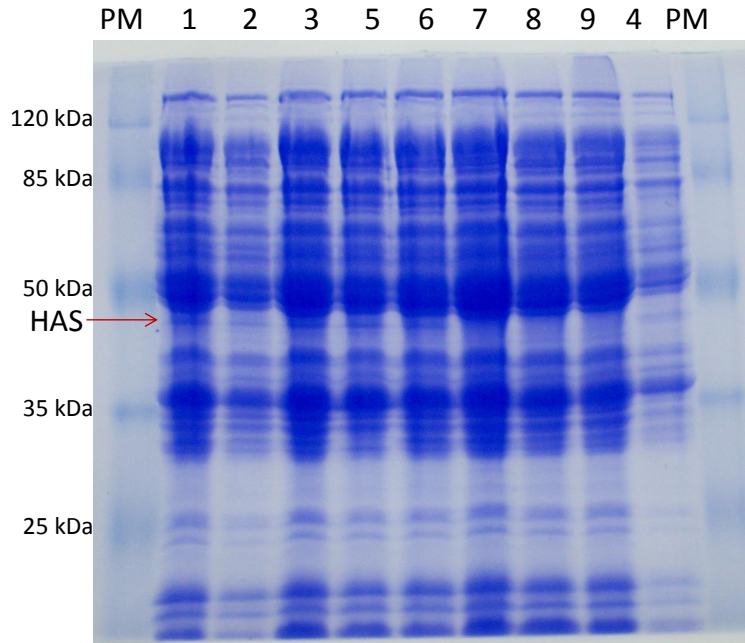
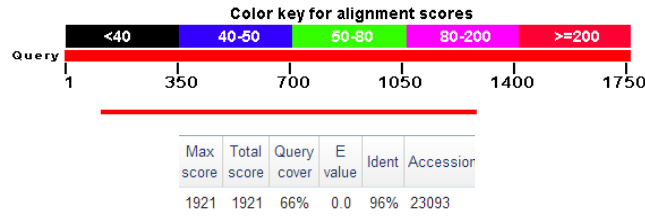


Figura 4.6: Electroforesis de las fracciones de proteínas integrales de membrana. Cepa *Top10 Evo:pMBAD-sseAB* con diferentes métodos de inducción: (1) 0,1 g/L L-arabinosa D.O=0,8, (2) 0,05 g/L L-arabinosa D.O=0,8, (3) 0,025 g/L L-arabinosa D.O=0,8, (4) 0,1 g/L L-arabinosa D.O.=0,6, (5) 0,05 g/L L-arabinosa D.O=0,6, (6) 0,025 g/L L-arabinosa D.O=0,6, (7) sin inducción. Cepa *Top10 Evo* (8) con inducción de 0,1 g/L L-arabinosa D.O=0.8 y (9) sin inducción.

A partir de la Figura 4.6 se puede apreciar una delgada banda del peso esperado (HAS: 47,8 kDa). Esta banda está presente en los carriles con proteína asociada a un cultivo con un método de inducción que permitió la expresión de la HAS (carriles del (1) al (6)). En el caso del carril con proteína de esta misma cepa pero sin inducción (carril (7)) no se aprecia la banda, ni tampoco en el caso de proteína extraída de cepas no recombinantes, con o sin inducción (carriles (8) y (9)). Con estos resultados se concluye que hubo expresión de la enzima HAS.

Por otro lado, aquellos cultivos cuyas proteínas de membranas están en los carriles del 1 al 6, se purificó el vector de expresión y el ADN se mandó a secuenciar a Macrogen y los resultados obtenidos confirman que el vector contiene los genes *ssehasA* y *ugd*, como se esperaba. Los alineamientos obtenidos para la cepa *Top10 Evo:pMBAD-sseAB* asociada al carril 1 del gel anterior se muestran en las Figuras 4.7 y 4.8.



Sequence ID: lc|23093 Length: 1254 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 1160 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1921 bits(1040)	0.0	1129/1170(96%)	13/1170(1%)	Plus/Plus
Query 118	ATGCGTACCCTGAAGAACCCTGATTACGGTGGTTGCATTTAGCATTITTTGGGTTCTGCTG	177		
Sbjct 1	ATGCGTACCCTGAAGAACCCTGATTACGGTGGTTGCATTTAGCATTITTTGGGTTCTGCTG	60		
Query 178	ATTTATGTGAACGTTTACCTGTTTCGGCGCGAAAGGCAGCCTGAGCATTATGGTTTTCTG	237		
Sbjct 61	ATTTATGTGAACGTTTACCTGTTTCGGCGCGAAAGGCAGCCTGAGCATTATGGTTTTCTG	120		
Query 238	CTGATCGCGTATCTGCTGGTTAAAATGAGCCTGAGCTTCTTCTATAAGCCGTTTAAAGGC	297		
Sbjct 121	CTGATCGCGTATCTGCTGGTTAAAATGAGCCTGAGCTTCTTCTATAAGCCGTTTAAAGGC	180		
Query 298	CGTGACGCCAGTATAAAGTGGCCGCGATTATCCGAGCTATAATGAAGATGCGGAAAGC	357		
Sbjct 181	CGTGACGCCAGTATAAAGTGGCCGCGATTATCCGAGCTATAATGAAGATGCGGAAAGC	240		
Query 358	CTGCTGGAGACGCTGAAGACGCTGCAACAGCAGACCTACCCACTGGCGGAAATTTACGTT	417		
Sbjct 241	CTGCTGGAGACGCTGAAGACGCTGCAACAGCAGACCTACCCACTGGCGGAAATTTACGTT	300		
Query 418	GTGGACGATGGCAGCGCGGATGAGACCGGTATTAAGCGTATCGAGGATTAATGTTTCGIGAT	477		
Sbjct 301	GTGGACGATGGCAGCGCGGATGAGACCGGTATTAAGCGTATCGAGGATTAATGTTTCGIGAT	360		
Query 478	ACGGGCGATCTGAGCAGCAATGTGATCGTGCATCGTAGCAGAAAAATCAGGGCAAACGT	537		
Sbjct 361	ACGGGCGATCTGAGCAGCAATGTGATCGTGCATCGTAGCAGAAAAATCAGGGCAAACGT	420		
Query 538	CACGCACAAGCCTGGGCCTTCGAACGCGAGGATGCAGATGTTTTCTGACGTTGGATAGC	597		
Sbjct 421	CACGCACAAGCCTGGGCCTTCGAACGCGAGGATGCAGATGTTTTCTGACGTTGGATAGC	480		
Query 598	GATACGTACATTTACCCGGATGCACTGGAAGAGTCTGTAACAACTTTAATGATCCGAGC	657		
Sbjct 481	GATACGTACATTTACCCGGATGCACTGGAAGAGTCTGTAACAACTTTAATGATCCGAGC	540		
Query 658	GTGTTTGGCGCGACGGGCCACCTGAATGTGCGCAATCGTCAGACCAACCTGCTGACCCGC	717		
Sbjct 541	GTGTTTGGCGCGACGGGCCACCTGAATGTGCGCAATCGTCAGACCAACCTGCTGACCCGC	600		
Query 718	CTGACCGATATCCGTTATGATAACGCATTTGGCGTGAACGTCGAGCCCAAGCGTGACC	777		
Sbjct 601	CTGACCGATATCCGTTATGATAACGCATTTGGCGTGAACGTCGAGCCCAAGCGTGACC	660		
Query 778	GGCAATATCCTGGTGTGTAGCGTCCGCTGAGCGTGTATCGCCGTGAGGTGGTGGTCCA	837		
Sbjct 661	GGCAATATCCTGGTGTGTAGCGTCCGCTGAGCGTGTATCGCCGTGAGGTGGTGGTCCA	720		
Query 838	AATATTGATCGCTACATCAACCAGACGTTTCTGGGTATTCGCGTGAACATCGGCGATGAC	897		
Sbjct 721	AATATTGATCGCTACATCAACCAGACGTTTCTGGGTATTCGCGTGAACATCGGCGATGAC	780		
Query 898	CGTTGCCTGACGAATACGCAACCGACCTGGGCAAGACCGTGTACCAAGCACCAGCGAAG	957		
Sbjct 781	CGTTGCCTGACGAATACGCAACCGACCTGGGCAAGACCGTGTACCAAGCACCAGCGAAG	840		
Query 958	TGTATCACCGATGTGCCGACAGATGAGCACCTATCTGAACAACAAAATCGTTGGAAT	1017		
Sbjct 841	TGTATCACCGATGTGCCGACAGATGAGCACCTATCTGAACAACAAAATCGTTGGAAT	900		
Query 1018	AAGAGCTTTTTCTGAGAGCATTATCAGCGTGAAGAAAGATTATGAATAACCCGTTTGTG	1077		
Sbjct 901	AAGAGCTTTTTCTGAGAGCATTATCAGCGTGAAGAAAGATTATGAATAACCCGTTTGTG	960		
Query 1078	GCCCTGTGGACCATCTGGAAATAGCATGTTTCATGAAGCTGGGGGACAGCGGGGTTGA	1137		
Sbjct 961	GCCCTGTGGACCATCTGGAAATAGCATGTTTCATGAAGCTGGGGGACAGCGGGGTTGA	1019		
Query 1138	CTTCTTTGGGGAAACGTGCGCCAACTTAATGGGTGGCGGTTCTGGCGTTCTCGGGGA	1197		
Sbjct 1020	CTTCTTTGGGGAAACGTGCGCGAGTTCGACTGGCT-GCGTGTCTGGCAATC-CTGGTT	1077		
Query 1198	ATAATCTTTATTGGGGGGCGGTGCCGGAATAAT-CATTACATAGTGGAAAG-ATACACC	1255		
Sbjct 1078	ATTATCTTTATTGGGCG-CTGTGCCGTAA-TATTATTACAT-GCTG-AAGCATCCACT	1133		
Query 1256	GGAGTGTCTTG-TGAGGCGCAITCTTATgg 1284			
Sbjct 1134	G-AGCTTCCTGCTGAGCC-CATTCT-ATGG 1160			

Figura 4.7: Alineamiento de la secuenciación con el gen *ssehasA*.

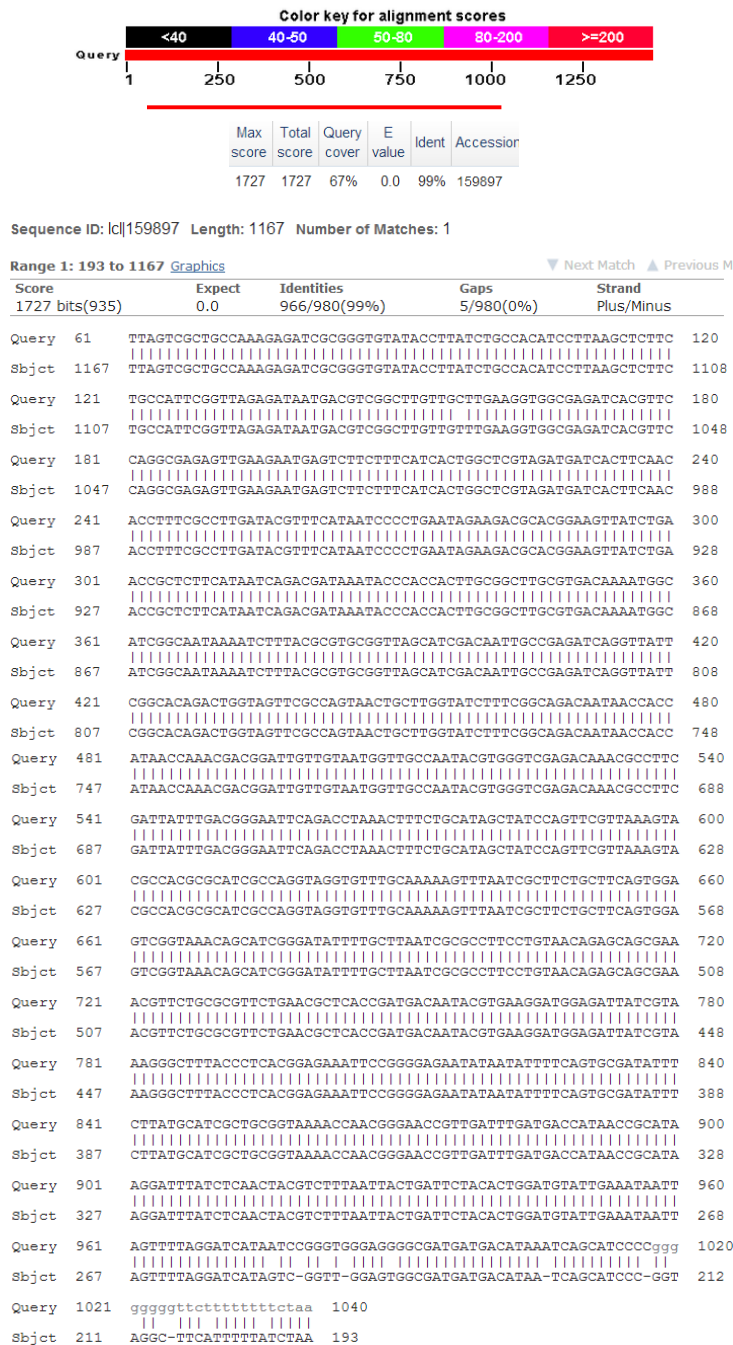


Figura 4.8: Alineamiento de la secuenciación con el gen *ugd*.

Con el resultado anterior se verificó la presencia del constructo *sseAB* con los genes *hasA* y *ugd* en la cepa recombinante.

4.2.2 Verificación de la Actividad HAS *in vivo* de las Cepas *Top10 Evo:pMBAD-sseAB* y *Top10:pMBAD-sseAB*

Se hicieron cultivos de las cepas *Top10 Evo:pMBAD-sseAB* y *Top10:pMBAD-sseAB* para verificar la producción de HA. Una vez precipitado el HA se verificó que las cepas recombinantes efectivamente producen el polímero al observar un gel translúcido. Una fotografía del HA obtenido a partir del cultivo de las cepas *Top10 Evo:pMBAD-sseAB*, *Top10:pMBAD-sseAB* y *Top10* se muestran en la Figura 4.9.

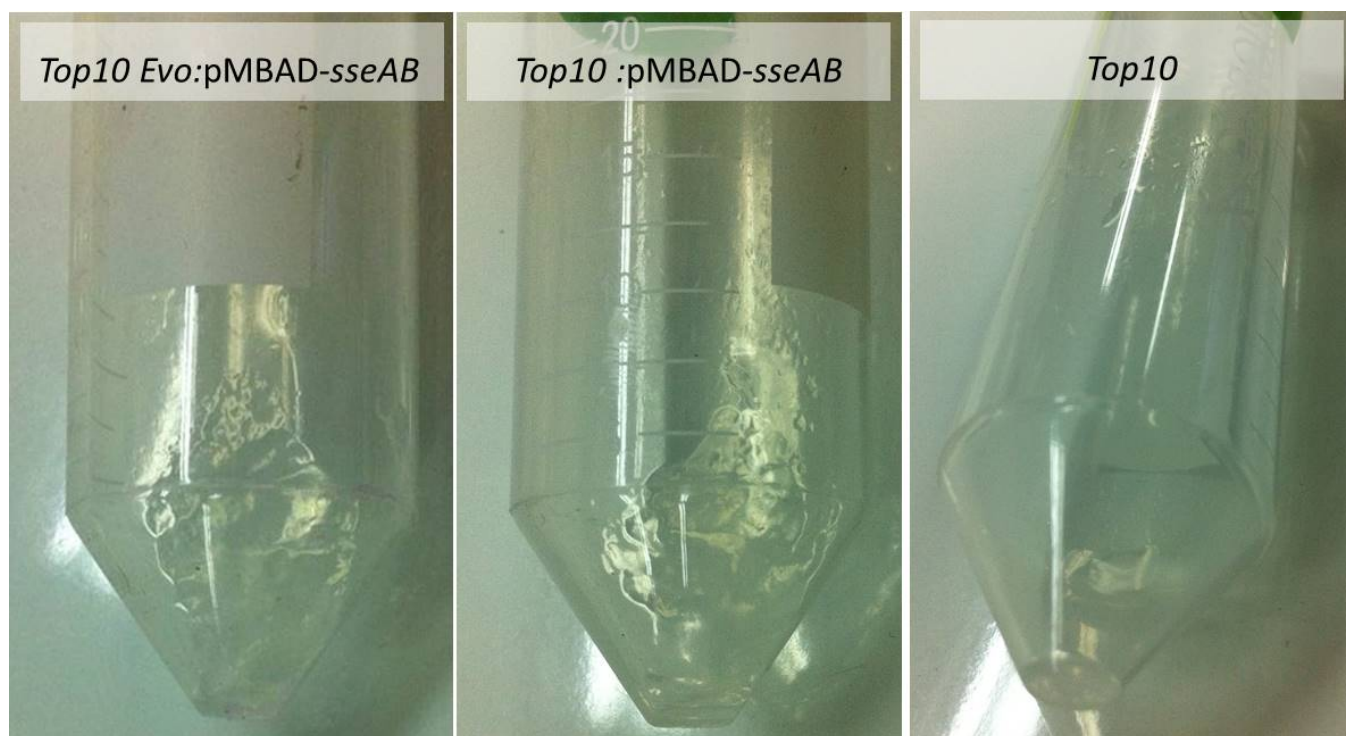


Figura 4.9: Fotografía de HA precipitado a partir del cultivo de las cepas *Top10 Evo:pMBAD-sseAB*, *Top10:pMBAD-sseAB* y *Top10*.

A partir de todos los resultados anteriores se puede concluir que las cepas *Top10 Evo:pMBAD-sseAB* y *Top10:pMBAD-sseAB* expresan HAS en su forma activa *in vivo* y producen HA.

4.3 Construcción de la Ceba *E. coli Rosetta (DE3)* Recombinante con Actividad HAS

Para la construcción de la cepa *E. coli Rosetta (DE3)* transformada con el vector pET22-*hasA* fue necesario en principio construir el vector, para lo que fue necesario obtener el gen *hasA* desde el genoma de *Streptococcus pyogenes*, ligarlo al vector pET22 y transformar la cepa en cuestión.

Luego, se verificó la presencia del gen *hasA* por medio de PCR de colonias y secuenciación. Un detalle de los resultados obtenidos se muestra a continuación.

4.3.1 Obtención del Gen *hasA*

Dado que no se tiene el gen *hasA* de *Streptococcus pyogenes* en ningún vector, fue necesario aislarlo desde el genoma de este microorganismo. Con este objetivo se diseñaron los partidores y los PCR requeridos. Luego, si hicieron los PCR planteados para obtener el producto deseado el que se puede ligar al vector pET22 para su posterior expresión recombinante. Los resultados de estas etapas se muestran a continuación.

En primer lugar, se diseñaron los partidores para la amplificación del gen *hasA* de *Streptococcus pyogenes*.

- ◊ PCR 1 y partidores SPHasAfwr y SPHasArev: generar un único producto a partir del genoma de *Streptococcus pyogenes* y contiene el gen *hasA* y regiones adyacentes.
- ◊ PCR 2 y partidores HasAfwr y HasArev: a partir del producto del PCR 1 se amplifica un fragmento que contiene el gen *hasA* en el marco de lectura apropiado para su directa ligación al vector de expresión pET22, adicionando los sitios de restricción necesarios y el marco de lectura correcto para su expresión.

La decisión de hacer 2 pares de partidores diferentes se debe a que para el PCR 1 el templado es el genoma de *Streptococcus pyogenes*, por lo que una preocupación era no amplificar otras zonas del genoma, lo que con estos partidores en teoría no sucedería. En cambio, con los partidores para el PCR 2 se podrían generar productos no deseados. Los partidores del PCR 2 incorporan el codón de inicio de la transcripción y generan un fragmento en el marco de lectura correcto para la expresión del gen *hasA*. También tienen la secuencia para agregar los sitios de restricción para las enzimas *XhoI* y *NdeI* necesarios para la ligación al vector pET22.

Con el segundo par de partidores se tuvo problemas en etapas posteriores. El primero consiste en que se hicieron numerosos PCR para la amplificación del gen *hasA* que no dieron el resultado esperado. Es por esto que se infirió que el que uno de los partidores termine en una timina puede ser un problema. Esto se infiere porque la unión de la última base del partidor al templado es importante para un PCR eficiente. Por este motivo se recomienda que sea una C o G ya que la unión es más fuerte. Debido a lo anterior se mandó a hacer un nuevo partidor (HasAfwr2). El segundo problema consistió en que no era posible digerir correctamente el producto generado. El motivo de este problema era que el fragmento no tenía suficientes nucleótidos aguas arriba del sitio de restricción del partidor HasArev, por lo que la enzima no es capaz de anclarse. Es por este

motivo que se diseñó el partidador HasArev2. Las secuencias y características de estos partidores se encuentran en la Anexo B.

Se trabajó con diferentes enzimas polimerasas y la que finalmente dio mejores resultados fue la KOD Polimerasa. Con ésta se realizó un PCR en gradiente de temperatura. Las temperaturas de alineamiento consideradas varían entre 45 y 63,6 °C. Una electroforesis de los productos generados se muestra a continuación en la Figura 4.10.

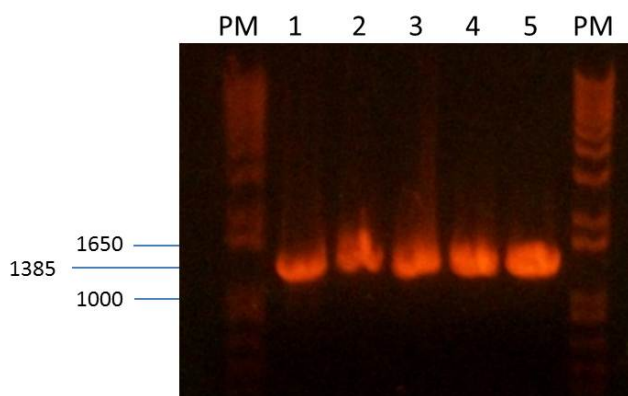


Figura 4.10: Electroforesis de 10 μL de cada uno de los productos de PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % a 40 v por 60 min. Marcador de Peso Molecular (PM) y muestras de PCRs a diferentes T_a : 45°C (1), 47,8°C (2), 54,7°C (3), 59,4°C (4) y 63,6°C (5).

La banda que se observa es del largo esperado (1.385 pb). A partir de este PCR en gradiente se definió como temperatura de alineamiento 64°C para prevenir la amplificación de fragmentos no deseados.

Luego, se prepararon 3 volúmenes de solución de 100 μL cada uno para amplificar el gen con la T_a seleccionada (Figura 4.11).

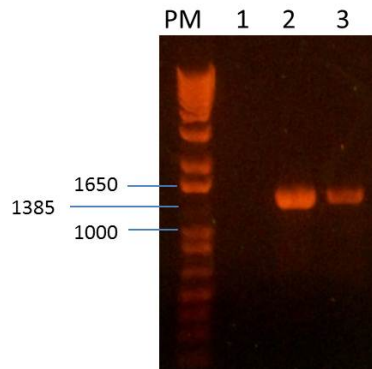


Figura 4.11: Electroforesis de 10 μ L de cada uno de los productos de PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1% a 40 v por 60 min. Marcador de Peso Molecular (PM) y muestras de los 3 PCRs realizados (triplicado).

Gracias a la electroforesis anterior se concluye que el PCR bien logrado en el caso de los PCR 2 y 3. Se infiere que al PCR 1 no contenía algún reactivo (enzima, dNTPs, partidores, etc.) por lo que esta muestra es descartada para las etapas siguientes. En el caso de los PCR 2 y 3 se logra una banda del tamaño esperado (1.385 pb). Este producto de PCR es purificado y utilizado para las etapas posteriores. El producto fue purificado y se utilizó para una PCR con los partidores Hasfwr2 y HasArev2. Se realizó una electroforesis del producto de PCR la que se muestra en la figura 4.12.

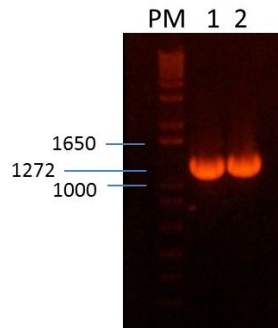


Figura 4.12: Electroforesis de 10 μ L de cada uno de los productos de PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1% a 40 v por 60 min. Marcador de Peso Molecular (PM) y muestras de PCR 1 (1) y 2 (2).

Fueron bien logrados ambas PCRs, observándose abundante producto del largo esperado en ambos casos (1.272 pb). Este largo corresponde al gen *hasA* de *Streptococcus pyogenes*.

4.3.2 Clonación del Gen *hasA* en el Vector pET22

El vector pET22 y el gen *hasA* fueron ligados se transformaron las *E. coli Top10* para conservar el vector pET22-*hasA* (en adelante cepa *Top10*:pET22-*hasA*) y se guardaron stock glicerol de ellas. Este vector se mando a secuenciar para comprobar la presencia del inserto. Los resultados de la secuenciación no son concluyentes, ya que los resultados no muestran el alineamiento que se espera (resultado no mostrado).

Se transformó la cepa *Rosetta (DE3)* con el vector pET22-*hasA* y se seleccionaron 12 colonias a partir de medio selectivo, de las cuales se guardaron stocks glicerol (en adelante *Ros*:pET22-*hasA* 1 - 12). Para verificar que los vectores contuvieran el gen *hasA* se hicieron PCRs de colonias. Los productos se observaron en un gel de electroforesis el que se muestra en la Figura 4.13.

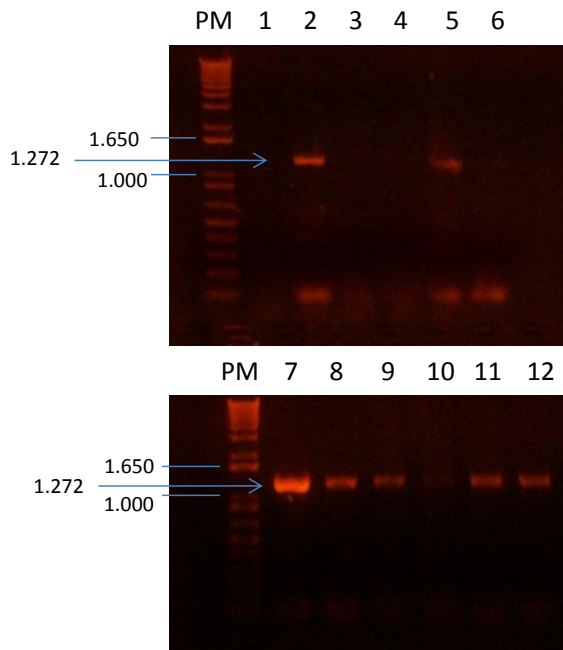


Figura 4.13: Electroforesis de los productos de PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % a 80 v por 30 min. Marcador de Peso Molecular (PM), cepas *Ros*:pET22-*hasA* 1 - 12: (1) - (12).

Con el resultado anterior se confirma que las colonias de los carriles 2, 5, 7, 8, 9, 11 y 12 contienen el gen *hasA* al observarse productos del largo esperado.

Por otro lado, se hicieron cultivos para verificar si hay expresión de la HAS, pero no se observó producción de HA.

4.4 Definición del Método de Medición de Ácido Hialurónico

Para la medición de HA se evaluaron dos técnicas que se utilizan ampliamente en la literatura: el ensayo modificado de carbazol y la cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

En cuanto al ensayo modificado de carbazol, la construcción de la curva de calibración a partir de glucuronolactona se realizó 3 veces. El protocolo no arrojó los resultados esperados, obteniéndose absorbancias menores a 0,1 en todas las muestras. Además, en las 3 ocasiones no se encontró una relación lineal entre la concentración del ácido y las absorbancias observadas. Además, en la literatura se ha observado que este ensayo no es altamente específico, mostrando reacción cruzada con algunos compuestos como sucrosa y en particular NaCl (Frazier et al., 2008). En este trabajo el HA y sus estándares fueron solubilizados en una solución 0,1 M de NaCl. Debido esto, el ensayo en cuestión no es el adecuado debido a que se produce un alto ruido o error debido a que las muestras de HA están diluidas en NaCl 0,1 M.

Por los motivos recientemente planteados la concentración de HA en adelante se midió mediante HPLC. Para medir la concentración de HA se contemplaron diferentes métodos en HPLC (columnas y protocolos). El método de mayor resolución y reproducibilidad tanto en la literatura como en lo probado en el laboratorio fue mediante la columna Shodex OHpak SB-806M HQ y NaNO₃ como solución de elución. Los detalles del método utilizado se encuentra en la sección 3.2.4. Las curvas obtenidas a partir de los estándares se muestran en la figura 4.14.

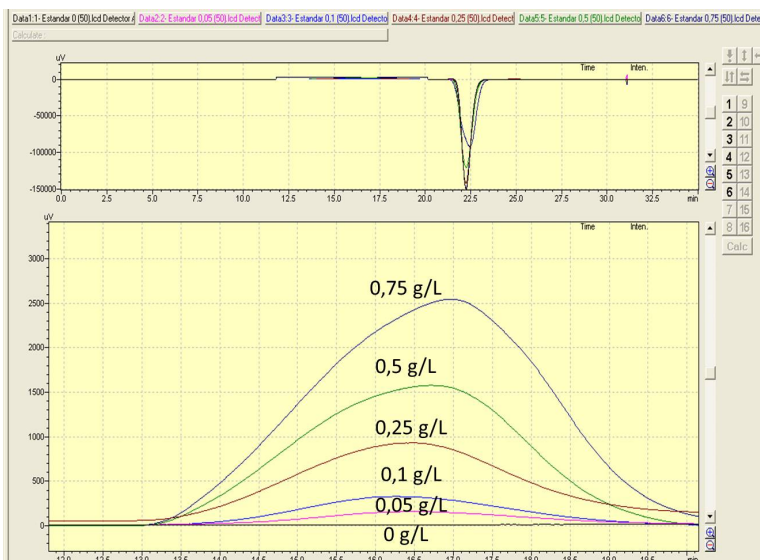


Figura 4.14: Cromatografía de los estándares de HA. Desde 0 a 0,75 g/L.

Los resultados obtenidos fueron altamente reproducibles, por lo que el protocolo utilizado fue

siempre el mismo. Para evitar mayor ruido, cada batch de muestras se realizó en conjunto con una curva de calibración.

4.5 Optimización de las Condiciones de Cultivo para la Producción de Ácido Hialurónico

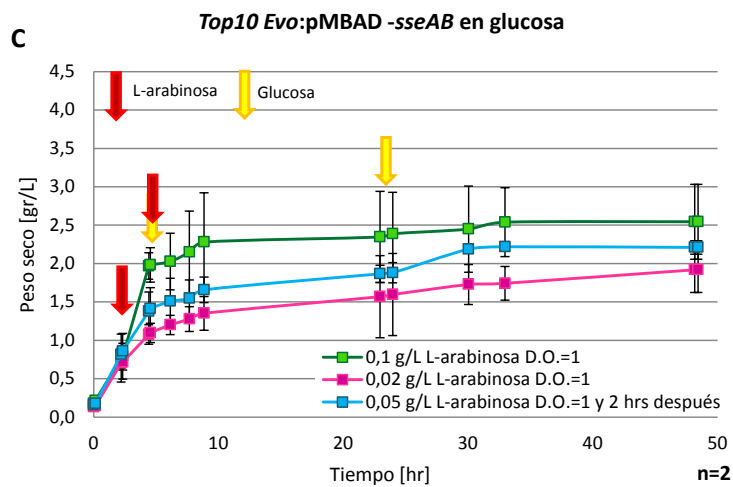
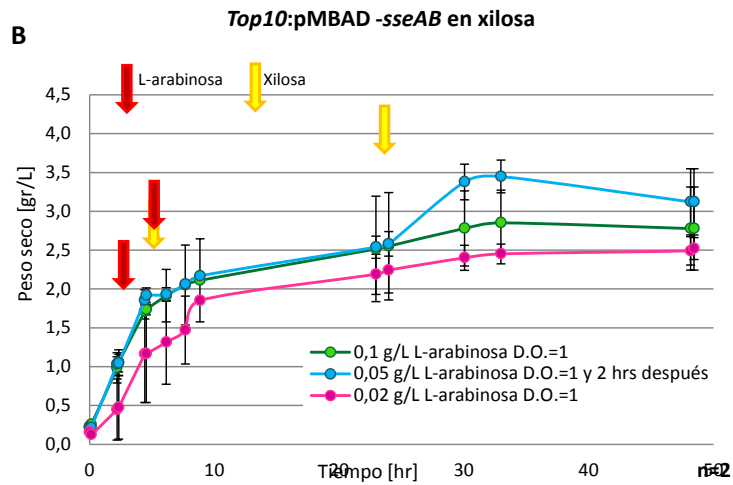
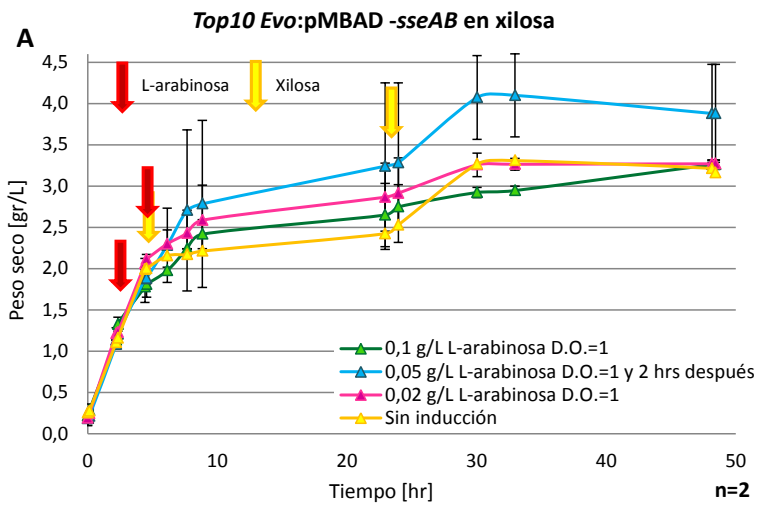
En la este capítulo se presentan los resultados obtenidos a partir de cada una de las optimizaciones a las condiciones de cultivo de *E. coli Top10* transformada con el vector pMBAD-*sseAB* (evolucionada) para la producción de ácido hialurónico. Las condiciones evaluadas fueron: tiempo de adición de inductor y su concentración, ajuste de pH, temperatura de crecimiento post-inducción y concentración de azúcar suplementada.

4.5.1 Tiempo de Adición de Inductor y su Concentración

Para la selección del tiempo de adición de inductor y su concentración se quiso determinar si el utilizar un método de inducción que involucrara la adición de inductor en 2 momentos diferentes del cultivo, conlleva una mayor producción de HA. Este supuesto se basa en que en trabajos anteriores se ha visto que la inducción con más de una adición de inductor conlleva una mayor producción de proteína recombinante (Aucoin et al., 2006) (Schulz y Schumann, 1996). Sin embargo, este fenómeno no se ha estudiado en vectores de expresión que contengan el promotor P_{BAD} .

La selección del tiempo de adición de inductor y su concentración se realizó con 3 experimentos independientes. Durante el primer experimento, hubo problemas con determinadas muestras de HA durante la filtración previo su análisis en HPLC, por lo que no se pudo hacer el análisis completo de los resultados. Sin embargo, a partir de dichos resultados fue posible observar una tendencia a una mayor concentración de HA con una inducción con 2 adiciones de 0,05 g/L de L-arabinosa a una D.O. de 1,0 y 2 horas después. Los resultados del segundo y tercer experimento, de los cuales se obtuvieron todos los datos necesarios, se muestran a continuación.

El primer resultado obtenido consiste en las diferentes curvas de crecimiento para comparar los efectos de las condiciones de inducción y las diferencias entre las cepas evaluadas. Estas curvas se observan en la Figura 4.15.



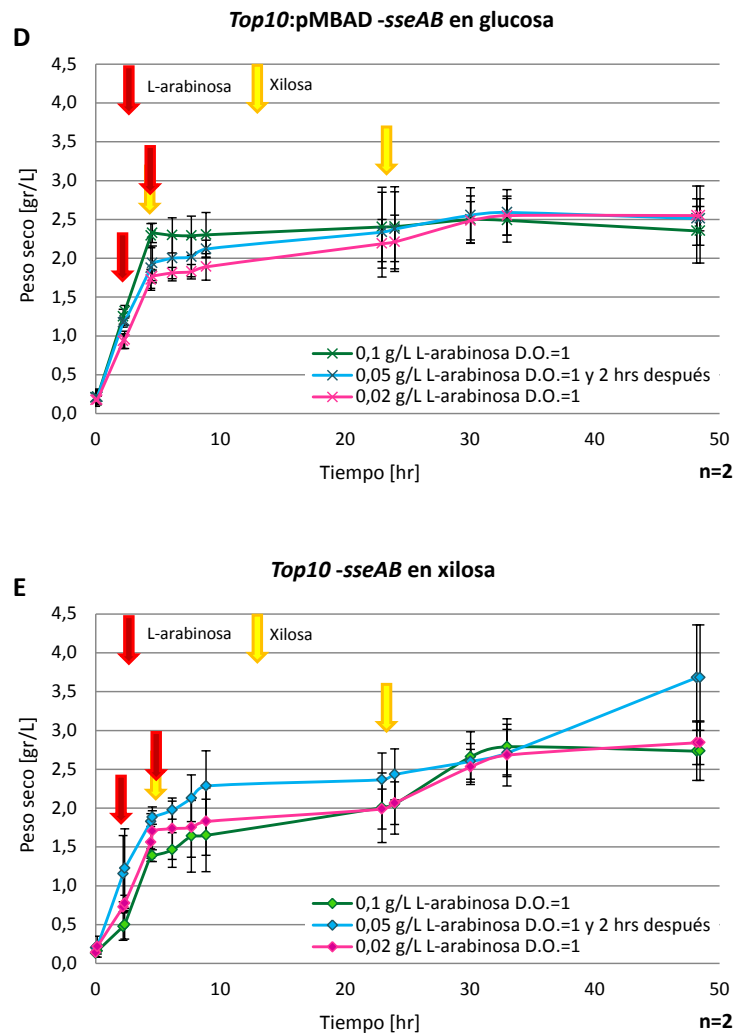


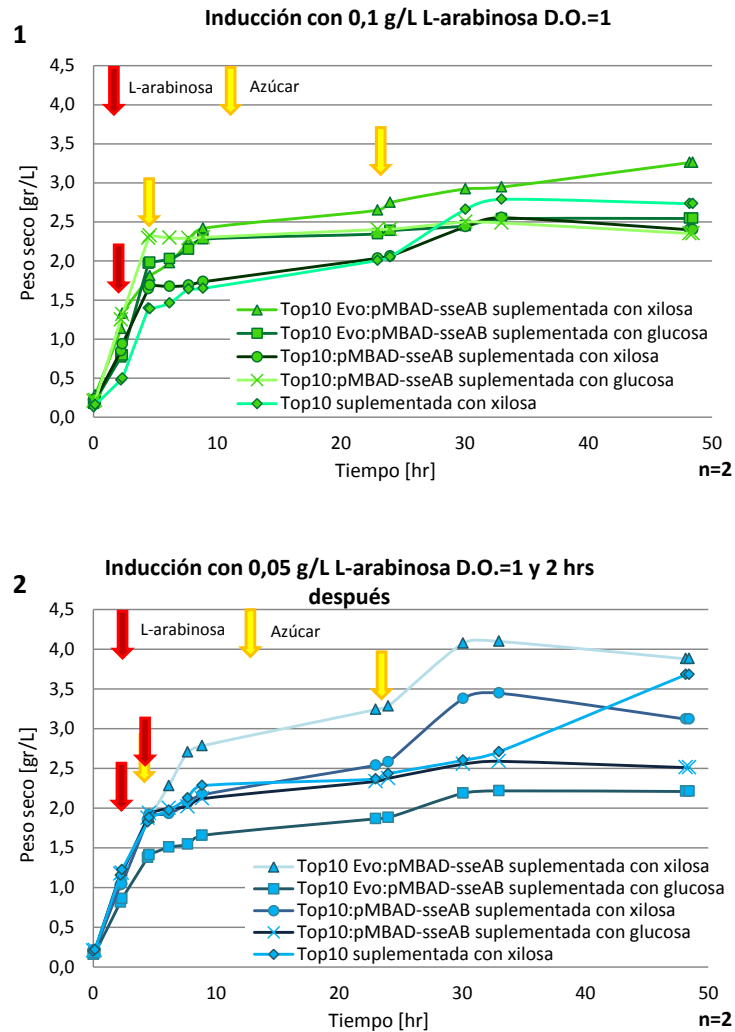
Figura 4.15: Curvas de crecimiento de las 50 horas de cultivo bajo diferentes condiciones de inducción. Cepas (A) evolucionada en xilosa, (B) no evolucionada en xilosa, (C) evolucionada en glucosa, (D) no evolucionada en glucosa y (E) nativa en xilosa. Las cepas fueron evaluadas bajo 3 condiciones de inducción con L-arabinosa: 0,1 g/L a una D.O. de 1,0, 0,05 g/L a una D.O. de 1,0 y 2 horas después y 0,02 g/L a una D.O. 1,0. Medio LB suplementado con $MgCl_2$, 37 °C, 250 RPM, suplemento de azúcar de 10 g/L 2 horas después de la inducción y de 6 g/L a las 24 horas de cultivo.

De la Figura 4.15 se puede inferir que no hay un efecto general del inductor sobre la velocidad específica de crecimiento en las condiciones evaluadas, ya que durante las primeras horas del cultivo se observa un mayor crecimiento bajo diferentes condiciones dependiendo del cultivo. Además, estas variaciones pueden atribuirse a las pequeñas diferencias de la concentración de células inicial.

Además, se observa que bajo la segunda condición (inducción con 0,05 g/L de L-arabinosa a una D.O.=1,0 y 2 horas después), el peso seco de células final es de los mayores en todos los cultivos.

Dado este resultado en todos los cultivos, se puede inferir que esa condición es la más favorable en cuanto a este criterio.

Otro factor que es posible evaluar, corresponde al comportamiento de las diferentes cepas bajo las mismas condiciones de inducción. Estas curvas de crecimiento se muestran en la Figura 4.16.



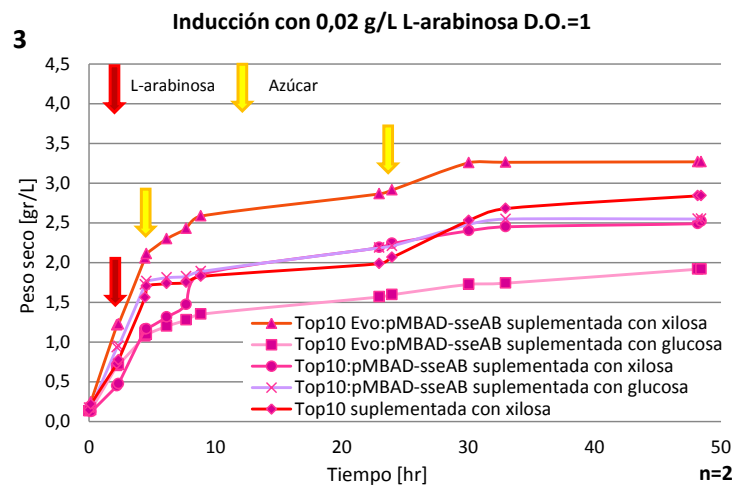
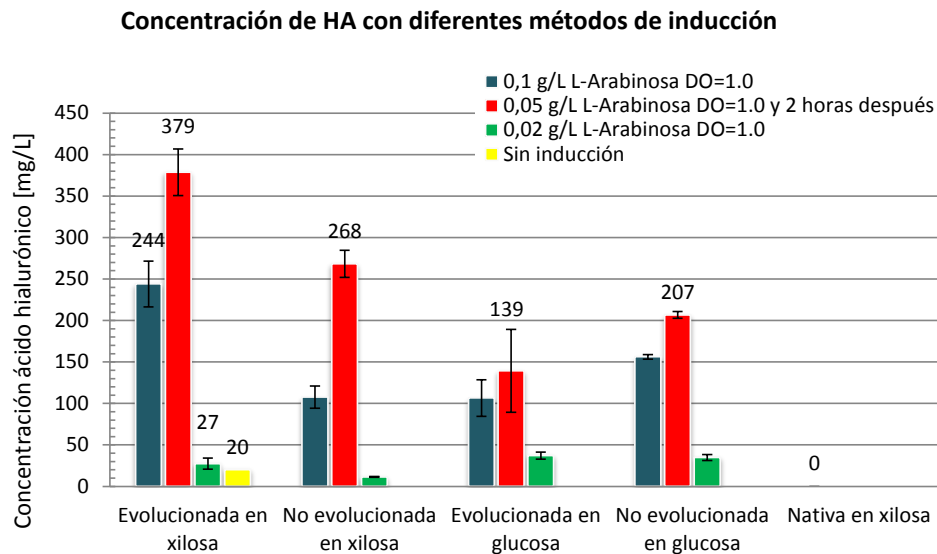


Figura 4.16: Curvas de crecimiento de las 50 horas de cultivo bajo diferentes condiciones de inducción. Las cepas fueron evaluadas bajo 3 condiciones de inducción con L-arabinosa: (1) 0,1 g/L a una D.O. de 1,0, (2) 0,05 g/L a una D.O. de 1,0 y 2 horas después y (3) 0,02 g/L a una D.O. 1,0. Cepas evolucionada en xilosa, no evolucionada en xilosa, evolucionada en glucosa, no evolucionada en glucosa y nativa en xilosa. Medio LB suplementado con $MgCl_2$, 37 °C, 250 RPM, suplemento de azúcar de 10 g/L 2 horas después de la inducción y de 6 g/L a las 24 horas de cultivo.

En la Figura 4.16 se puede apreciar que la cepa evolucionada en xilosa fue la que presenta una mayor densidad celular final entre las recombinantes, en las 3 condiciones evaluadas (sobre los 3 g/L). Además, se ve una gran diferencia entre el crecimiento en xilosa y glucosa de la cepa evolucionada, siendo mayor en xilosa. También se observa una diferencia entre las cepas evolucionada y no evolucionada en xilosa, siendo mayor el peso seco final para la primera, como se esperaba.

Finalmente, se midió la concentración de HA en todas las muestras en HPLC, obteniéndose los resultados que se muestran en la figura 4.17 a continuación.

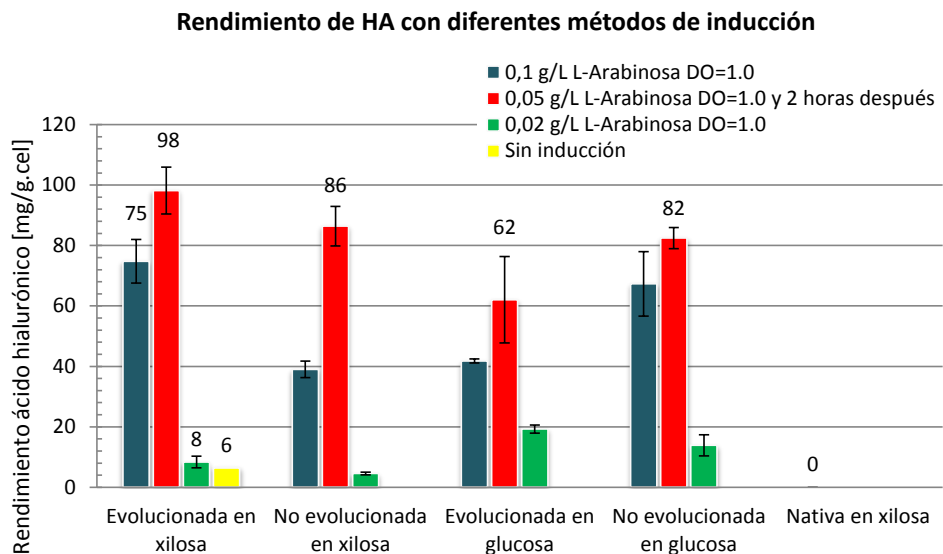


n=2

Figura 4.17: Concentración de HA en los cultivos de las cepas evolucionada en xilosa, no evolucionada en xilosa, evolucionada en glucosa, no evolucionada en glucosa y nativa en xilosa. Las cepas fueron evaluadas bajo 3 condiciones de inducción con la adición de L-arabinosa: 0,1 g/L a una D.O. de 1,0, 0,05 g/L a una D.O. de 1,0 y 2 horas después y 0,02 g/L a una D.O. 1,0.

En la Figura 4.17 se observa que la cepa evolucionada en xilosa es la cepa que produce mayor cantidad de HA, con una inducción de 2 adiciones de 0,05 g/L de L-arabinosa (378,6 mg/L). Más aún, la que le sigue es la cepa *Top10:pMBAD-sseAB* en xilosa bajo las mismas condiciones, produciendo un 29,1% menos (268,3 mg/L). En cuanto a las condiciones de inducción, la más efectiva es la inducción de 2 adiciones de 0,05 g/L de L-arabinosa para todos los cultivos que produjeron HA. En particular, para la cepa evolucionada en xilosa, este método de inducción produjo un 55,2% más cantidad de HA que induciendo con una adición de 0,1 g/L de L-arabinosa (244 mg/L). Es claro que la tercera condición evaluada (una inducción de 0,02 g/L de L-arabinosa) no era una buena alternativa, ya que la inducción fue despreciable en todos los casos en comparación con los otros 2 métodos de inducción.

A partir de la concentración celular HA se calculó el rendimiento de HA obtenido en cada caso. Estos resultados se muestran en la Figura 4.18.



n=2

Figura 4.18: Concentración de HA en los cultivos de las cepas evolucionada en xilosa, no evolucionada en xilosa, evolucionada en glucosa, no evolucionada en glucosa y nativa en xilosa. Las cepas fueron evaluadas bajo 3 condiciones de inducción con L-arabinosa: 0,1 g/L a una D.O. de 1,0, 0,05 g/L a una D.O. de 1,0 y 2 horas después y 0,02 g/L a una D.O. 1,0.

A partir de la Figura 4.18 se observa que el mejor método de inducción en cuanto a rendimiento obtenido es con 2 adiciones de 0,05 g/L de L- arabinosa para todas las cepas estudiadas. La cepa que tiene un mejor rendimiento en esta condición es la evolucionada en xilosa, con un rendimiento de 98,2 mg/g.cel, seguida por la cepa no evolucionada en xilosa, con un rendimiento 12 % menor (86,4 mg/g.cel). En particular, para la cepa evolucionada en xilosa, este método de inducción tuvo un rendimiento 31,3 % mayor que induciendo con una única adición de 0,1 g/L de L-arabinosa (74,8 mg/g.cel). Estos resultados se condicen con los obtenidos a partir de la concentración de HA.

Finalmente, a partir de la optimización del tiempo de adición de inductor y su concentración se concluye que el mejor método de inducción corresponde a inducir con 0,05 g/L de L-arabinosa cuando la D.O. se aproximadamente 1,0 y una nueva inducción de las mismas características 2 horas después.

Una posible explicación de porque la inducción con 2 adiciones de L-arabinosa resultó más efectiva que una única adición, siendo que la concentración final de inductor era la misma se describe a continuación. Dada la conformación del promotor AraC que en la presencia de L-arabinosa dimeriza cuando 2 moléculas de este azúcar se unen a los sitios afines, podría ser que la segunda adición

de inductor rompa el estado de equilibrio alcanzado después de la primera adición de inductor, uniéndose a los sitios AraC de vectores que no se encontraban inducidos anteriormente. No se ha encontrado nada en la literatura al respecto, por lo que un estudio acabado a nivel molecular es necesario para concluir si este supuesto es cierto, lo que se cuenta con una hipótesis interesante para estudios posteriores.

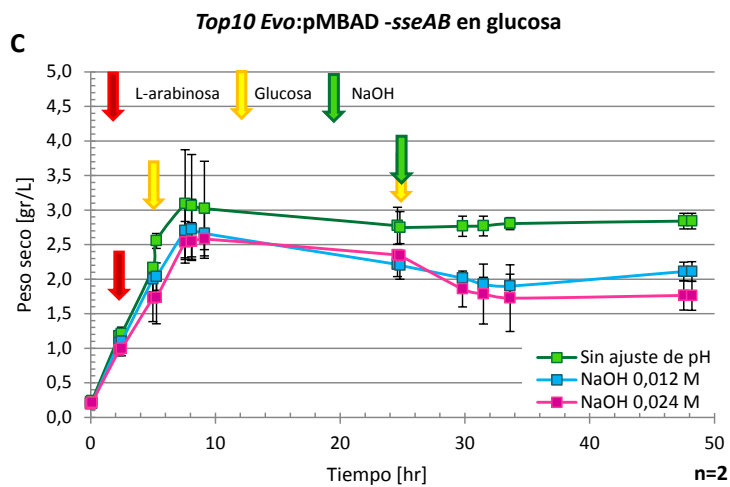
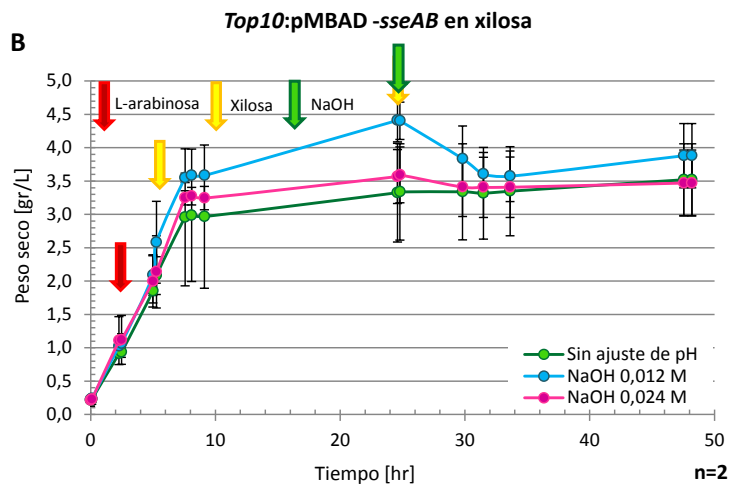
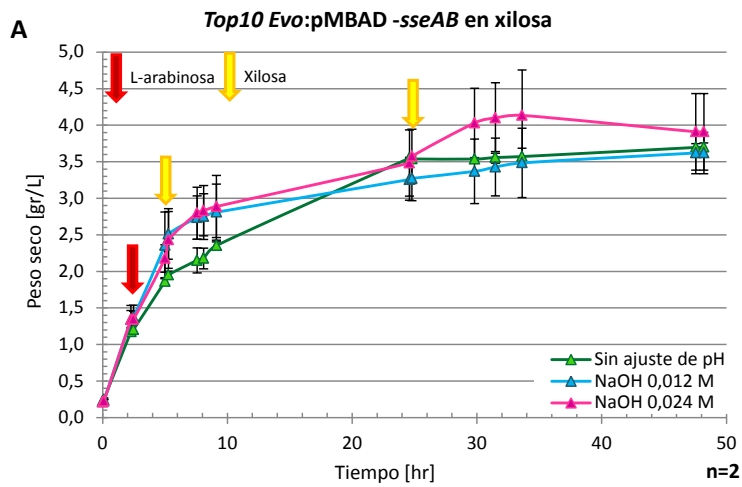
Un detalle de los valores obtenidos se presenta en el Anexo P. Además, en este Anexo se encuentran la curva de calibración, los cálculos relacionados para los resultados presentados y los cromatogramas.

4.5.2 Ajuste de pH

La selección del método de ajuste de pH involucra la adición de base (NaOH) a las 24 horas de cultivo. Este método se consideró debido a que el ácido hialurónico puede provocar una disminución del pH del cultivo por tratarse de un ácido y ser liberado al medio extracelular a medida que es producido.

La selección del método de ajuste de pH requirió numerosos experimentos. Se probaron diferentes métodos en los que se varió la concentración de la solución de NaOH y la concentración final de NaOH para el cultivo. En principio se utilizó una solución de NaOH 1 M para alcanzar una concentración final de 0,05 y 0,1 subiendo el pH desde 5 a 8 y 8,5 aproximadamente. En estas condiciones, los cultivos presentaban una disminución abrupta de la absorbancia, por lo que se infiere que un cambio así de brusco del pH conlleva muerte celular. Se realizaron variaciones de las condiciones anteriores con similares resultados, hasta determinar que al adicionar una solución de NaOH 1 M para alcanzar concentraciones finales de 0,012 y 0,024 M no provoca un decrecimiento de biomasa general. Los cambios de pH no fueron medidos en cada uno de los cultivos debido a que conservar la esterilidad era fundamental. Sin embargo, se trabajó con 2 cultivos independientes para este fin a los que se les adicionaron las mismas cantidades de NaOH evaluadas y se les midió el pH. Éste varió desde 5,5-5,8 aumentando a 6,4-7,0 aproximadamente. Los resultados de los 2 últimos experimentos se muestran a continuación.

El primer resultado obtenido consiste en las diferentes curvas de crecimiento para comparar los efectos del ajuste de pH y las diferencias entre las cepas evaluadas. Estas curvas se muestran en la Figura 4.19.



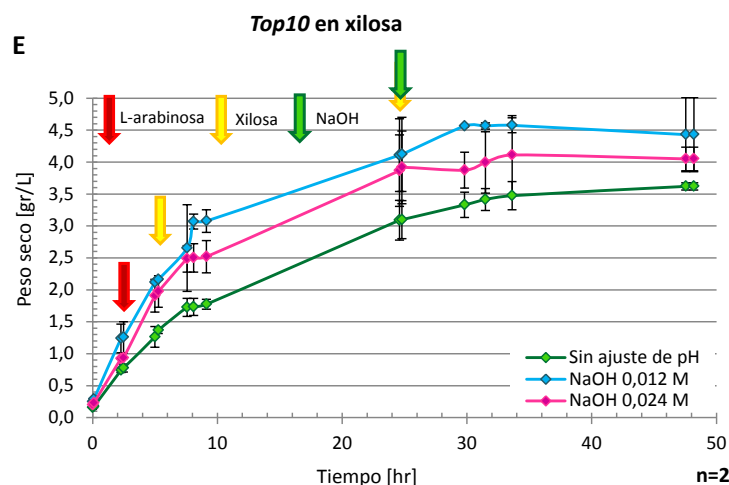
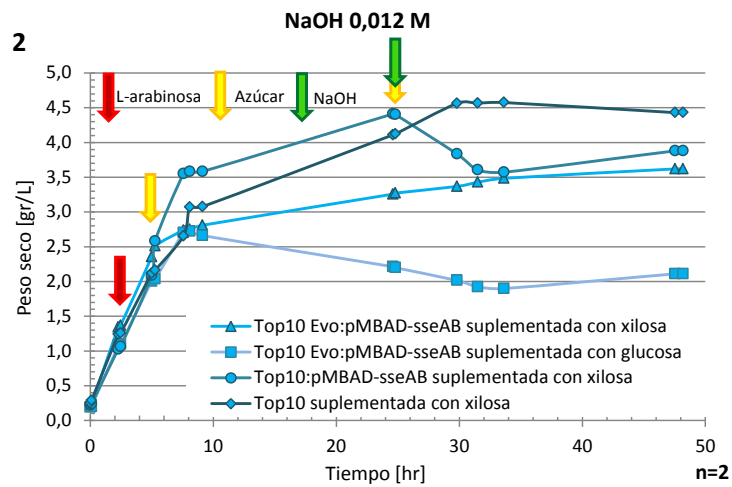
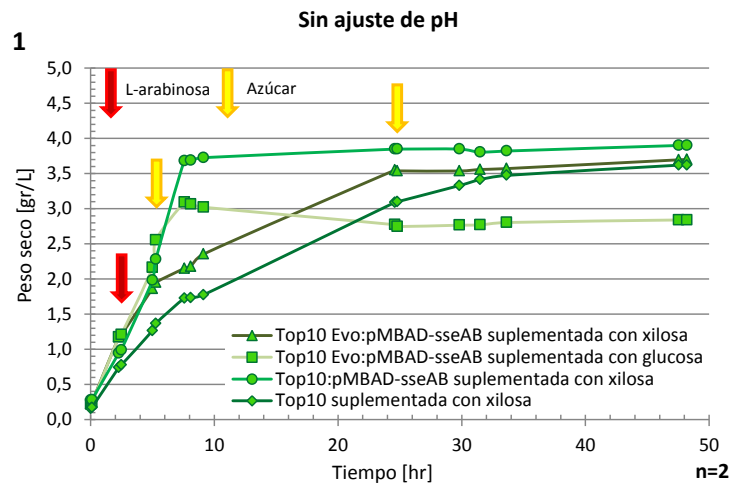


Figura 4.19: Curvas de crecimiento de las 50 horas de cultivo bajo diferentes condiciones de ajuste de pH. Cepas (A) evolucionada en xilosa, (B) no evolucionada en xilosa, (C) evolucionada en glucosa y (E) nativa en xilosa. Las cepas fueron evaluadas bajo 3 condiciones de de ajuste de pH: sin ajuste, con NaOH 0,012 M a las 24 horas de cultivo y con NaOH 0,024 M a las 24 horas de cultivo. Medio LB suplementado con MgCl₂, 37 °C, 250 RPM, inducción con la adición de 0,1 g/L de L- arabinosa, suplemento de azúcar de 10 g/L 2 horas después de la inducción y de 6 g/L a las 24 horas de cultivo.

De la Figura 4.19 se puede observar que no hay un efecto general en cuanto a la adición de NaOH en todas las cepas evaluadas sobre la velocidad específica de crecimiento, ya que dependiendo del cultivo y sus condiciones, se observa un aumento o decaimiento de la pendiente de la curva una vez se adiciona la base. En particular, para la cepa evolucionada en xilosa, se podría suponer que un ajuste de pH es favorable, debido a que no se observa un efecto negativo del NaOH sobre la velocidad de crecimiento. Una posible explicación a este fenómeno es que una alta concentración de HA acidifique el medio, viéndose el cultivo favorecido por la adición de la base al subir el pH. Sin embargo, en el caso de la cepa nativa, la que no produce HA, tampoco se observa un efecto negativo sobre la velocidad específica de crecimiento al agregar el NaOH. Esto no se condice con lo anterior, ya que esta cepa no produce ácido hialurónico, el que podría aumentar la acidez del medio.

Otro factor que es posible evaluar, corresponde al comportamiento de las diferentes cepas bajo las mismas condiciones de ajuste de pH. Estas curvas de crecimiento se muestran en la Figura 4.20.



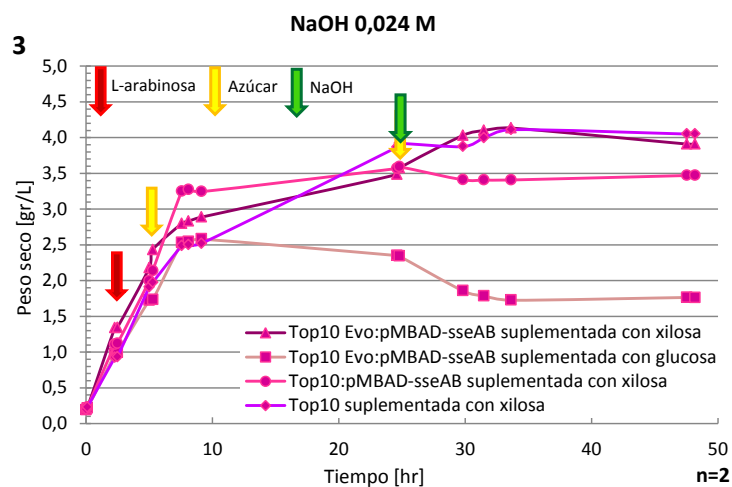


Figura 4.20: Curvas de crecimiento bajo diferentes condiciones de ajuste de pH. Las cepas fueron evaluadas bajo 3 condiciones de ajuste de pH: (1) Sin ajuste, (2) con NaOH 0,012 M a las 24 horas de cultivo y (3) con NaOH 0,024 M a las 24 horas de cultivo. Cepas evolucionada en xilosa, no evolucionada en xilosa, evolucionada en glucosa y nativa en xilosa. Medio LB suplementado con $MgCl_2$, 37 °C, 250 RPM, inducción con la adición de 0,1 g/L de L- arabinosa, suplemento de azúcar de 10 g/L 2 horas después de la inducción y de 6 g/L a las 24 horas de cultivo.

De la Figura 4.20 se puede observar que al adicionar NaOH el peso seco de células en algunos casos aumenta y para otros casos disminuye, por lo que no se observa un efecto general debido a determinado ajuste de pH. Sin embargo, se puede inferir que la adición de NaOH perturba el crecimiento celular, ya que en el caso del tratamiento sin ajuste de pH, la curva de crecimiento no presenta cambios a las 24 horas, en cambio los otros tratamientos sí. Esto puede implicar, que la adición abrupta de NaOH puede ser un estrés para el cultivo, por lo que es el caso de tratarse de cultivos batch podría ser mejor no intervenirlos de esta forma.

Finalmente, se midió la concentración de HA en todas las muestras en HPLC, obteniéndose resultados que se muestran en la Figura 4.21 a continuación.

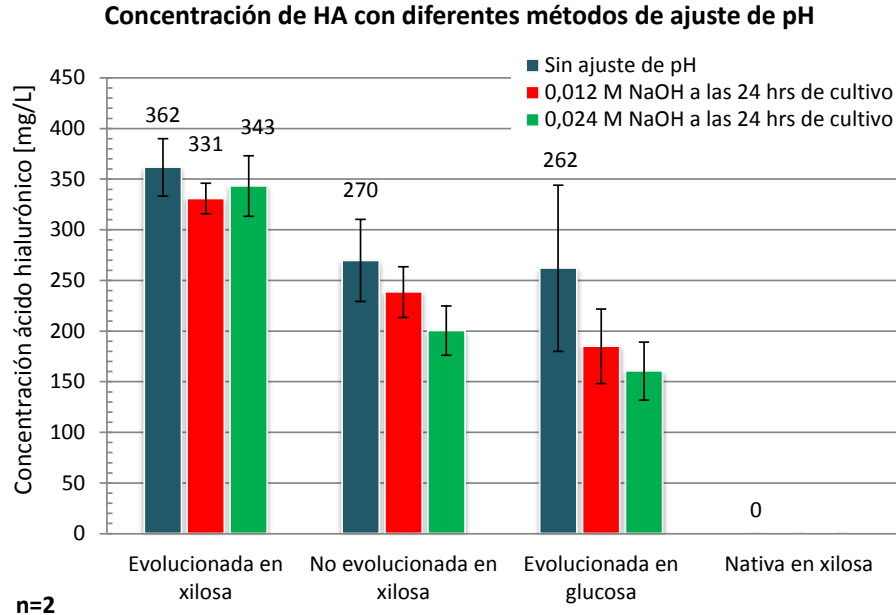


Figura 4.21: Concentración de HA en los cultivos de las cepas evolucionada en xilosa, no evolucionada en xilosa, evolucionada en glucosa y nativa en xilosa. Las cepas fueron evaluadas bajo 3 condiciones de ajuste de pH: sin ajuste, con NaOH 0,012 M a las 24 horas de cultivo y con NaOH 0,024 M a las 24 horas de cultivo.

En la Figura 4.21 se observa que la cepa evolucionada en xilosa fue la cepa que produjo mayor cantidad de HA (361,6 mg/L sin ajuste de pH), como se esperaba. Esta cepa sin ajuste de pH produce un 25,4 % más de HA que la cepa no evolucionada en xilosa. Comparando las mismas cepas para los casos con 0,012 y 0,024 M de NaOH, la cepa evolucionada en xilosa produce un 27,9 % y un 41,6 % más que la no evolucionada en xilosa, respectivamente, siendo la cepa evolucionada en xilosa la que produce mayores cantidades de HA en todas las condiciones probadas. Además, se puede apreciar que todas las cepas productoras de HA presentan mayores concentraciones de HA en los casos en los que no se ajustó el pH. En el caso de la cepa evolucionada en xilosa, el cultivo sin ajuste de pH produjo un 8,5 % y 5,1 % más HA que los cultivos con 0,012 y 0,024 M de NaOH respectivamente. Estas diferencias no son significativas, sin embargo se puede inferir que un ajuste de pH en estas condiciones no es favorable para el cultivo. Cabe destacar que en el caso que menos impacto negativo tuvo el ajuste de pH fue en el de la cepa evolucionada en xilosa, lo que se puede deber a la mayor cantidad de HA, por ende un menor pH, al tratarse de un ácido.

A partir de la concentración celular HA se calculó el rendimiento de HA obtenido en cada caso. Estos resultados se muestran en la Figura 4.22.

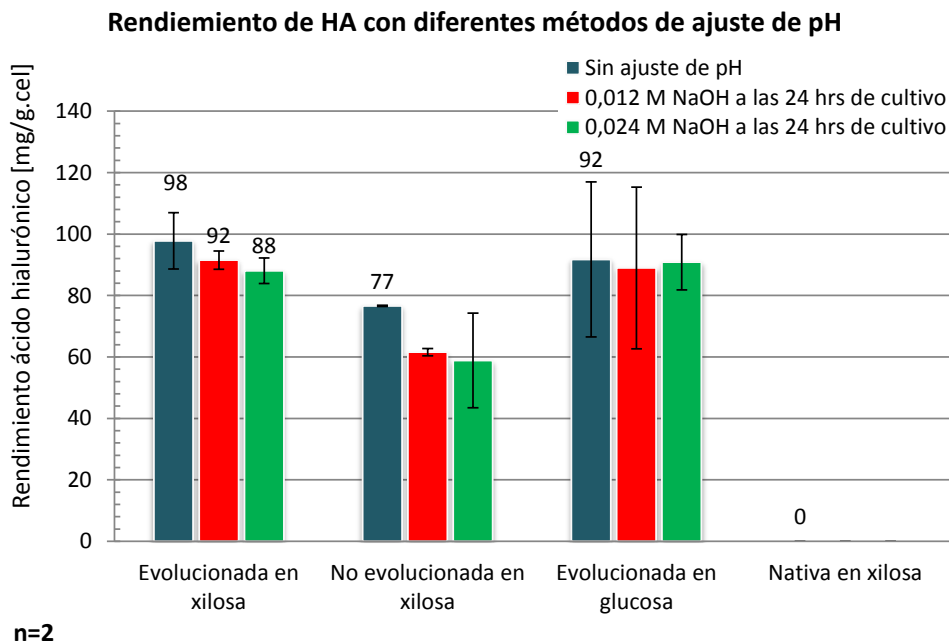


Figura 4.22: Rendimiento de HA en los cultivos de las cepas evolucionada en xilosa, no evolucionada en xilosa, evolucionada en glucosa y nativa en xilosa. Las cepas fueron evaluadas bajo 3 condiciones de ajuste de pH: sin ajuste, con NaOH 0,012 M a las 24 horas de cultivo y con NaOH 0,024 M a las 24 horas de cultivo.

En la Figura 4.22 se observa que la cepa evolucionada en xilosa es la cepa que tiene un mayor rendimiento de HA (97,8 mg/g.cel sin ajuste de pH). La cepa no evolucionada en xilosa tiene un rendimiento 21,6 % mayor que la cepa no evolucionada en xilosa (sin ajuste de pH). Comparando la cepa evolucionada en xilosa con respecto a los casos con 0,012 y 0,024 M de NaOH, esta cepa produce un 6,4 % y un 10 % menos para dichos casos, respectivamente. Es importante destacar que para los casos con ajuste de pH, la cepa evolucionada en xilosa presenta los mejores rendimientos en comparación con las otras cepas.

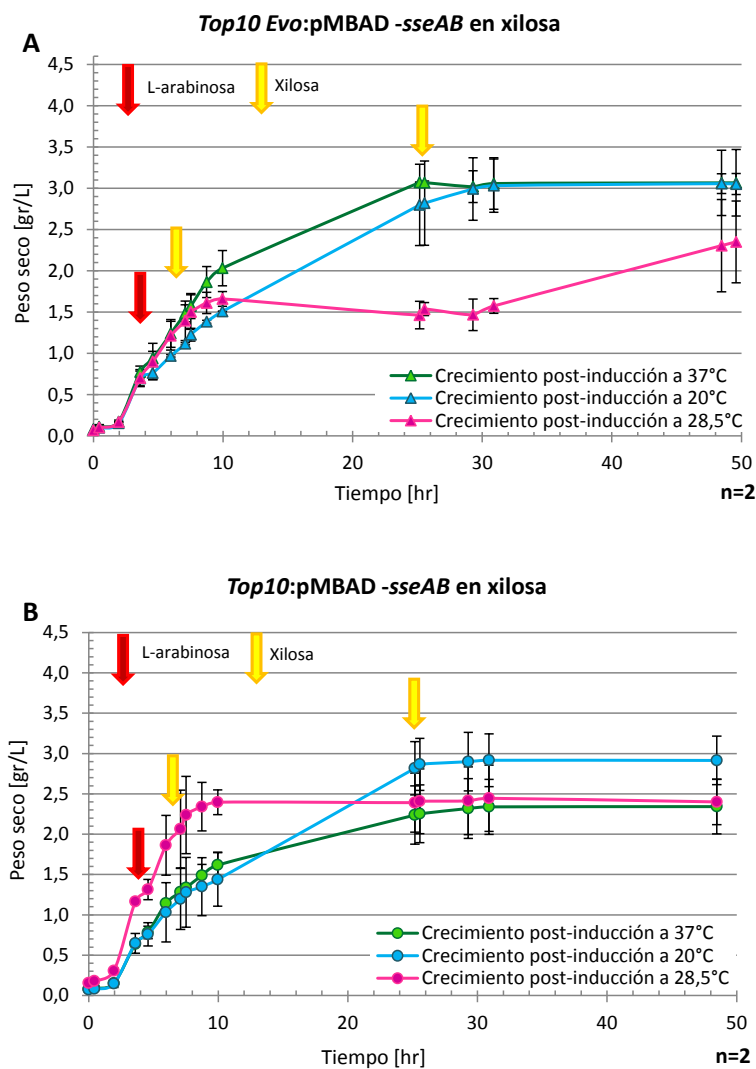
Con estos resultados se observa en términos generales que los tratamientos de ajuste de pH evaluados no generan importantes diferencias en las concentraciones y rendimientos. En conclusión, se puede inferir que el ajuste de pH puede ser favorable para cultivos que producen HA debido al efecto acidificante del producto generado. Sin embargo, es importante considerar que la adición discreta de NaOH puede ser un estrés para el cultivo, por lo que la mejor medida si se quiere controlar el pH es contar con un controlado en tiempo real. De no ser así, lo mejor es no ajustar el pH.

Un detalle de los valores obtenidos se presenta en la Anexo P. Además, en este Anexo se encuentran la curva de calibración y los cálculos relacionados para los resultados presentados.

4.5.3 Temperatura de Crecimiento Post-inducción

La selección de temperatura de crecimiento post-inducción se realizó con 2 experimentos independientes. A continuación se muestran los resultados de estos experimentos.

El primer resultado obtenido consiste en las diferentes curvas de crecimiento para comparar los efectos de la temperatura de crecimiento post-inducción sobre el crecimiento celular y las diferencias entre las cepas evaluadas. Estas curvas se muestran en la Figura 4.23.



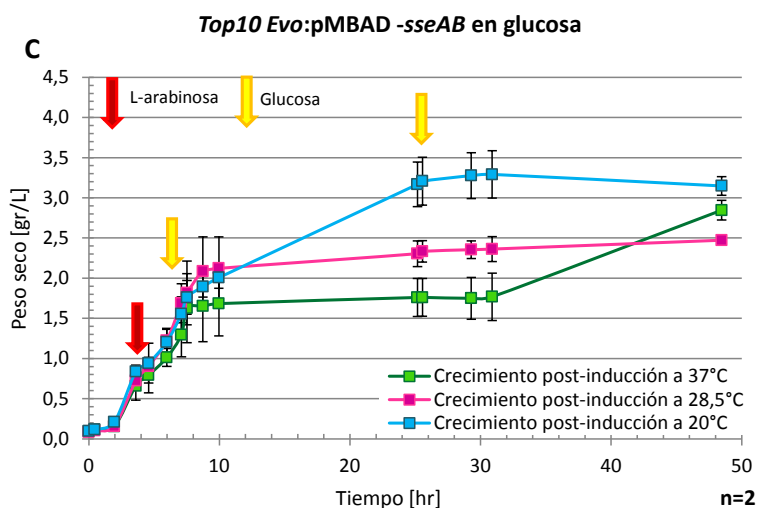
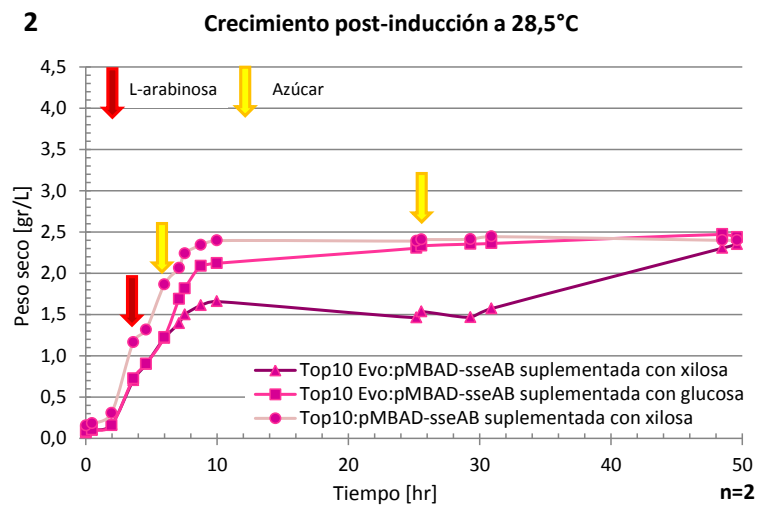
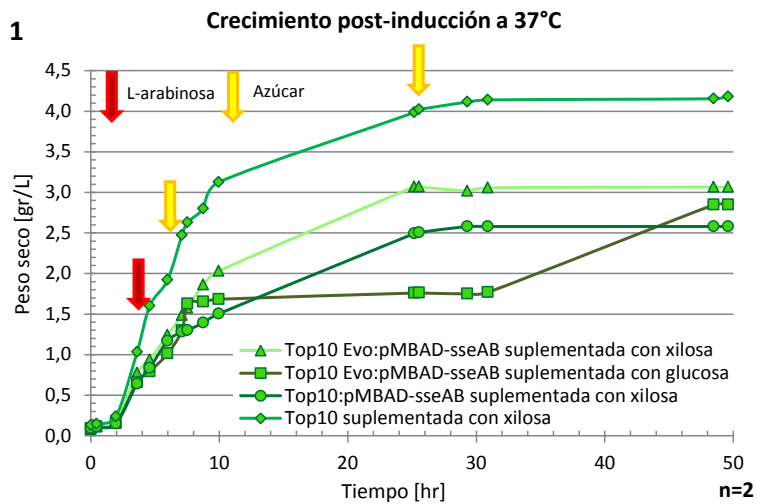


Figura 4.23: Curvas de crecimiento bajo diferentes temperaturas de crecimiento post-inducción. Cepas (A) evolucionada en xilosa, (B) no evolucionada en xilosa y (C) evolucionada en glucosa. Las cepas fueron evaluadas bajo 3 temperaturas de crecimiento post-inducción con L-arabinosa: 37 °C, 28,5 °C y 20 °C. Medio LB suplementado con MgCl₂, 250 RPM, inducción con la adición de 0,1 g/L de L- arabinosa, suplemento de azúcar de 10 g/L 2 horas después de la inducción y de 6 g/L a las 24 horas de cultivo.

De la Figura 4.23 no se puede inferir fácilmente un efecto general de la temperatura de crecimiento post-inducción sobre la velocidad específica de crecimiento. Es interesante notar que con una inducción a 20 °C se logra un mayor peso seco de células final. Esto se puede deber a que las células disminuyen su metabolismo en general, disminuyendo la tasa de muerte. Además, se aprecia que en el caso de la inducción a 28,5°, todas las cepas muestran una disminución de la velocidad de crecimiento después de la inducción. Una explicación para ello puede ser que la célula priorice la expresión recombinante, mermando el crecimiento celular. De ser esta la explicación, se debería presentar una concentración más alta de HA en esta condición.

Otro factor que es posible evaluar, corresponde al comportamiento de las diferentes cepas bajo las mismas condiciones de inducción. Estas curvas de crecimiento se muestran en la Figura 4.24.



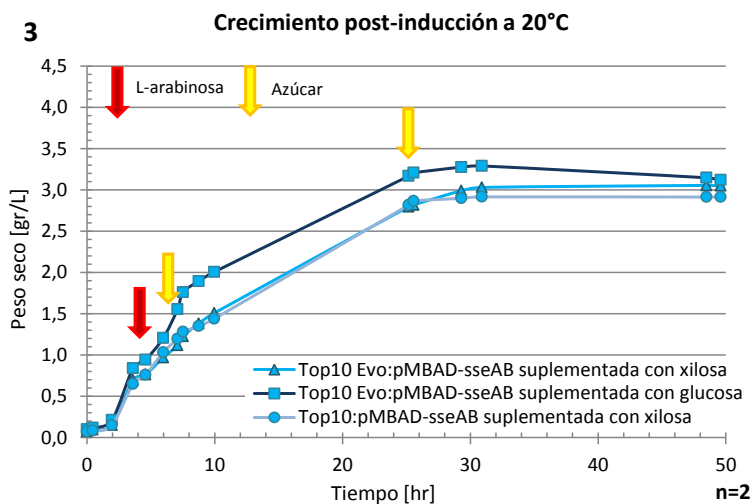


Figura 4.24: Curvas de crecimiento bajo diferentes temperaturas de inducción. Las cepas fueron evaluadas bajo 3 temperaturas de crecimiento post-inducción: (1) 37 °C, (2) 28,5 °C y (3) 20 °C. Cepas evolucionada en xilosa, no evolucionada en xilosa y evolucionada en glucosa. Medio LB suplementado con MgCl₂, 250 RPM, inducción con la adición de 0,1 g/L de L- arabinosa, suplemento de azúcar de 10 g/L 2 horas después de la inducción y de 6 g/L a las 24 horas de cultivo.

En la Figura 4.24 se puede apreciar que las cepas inducidas a 28,5 °C (3) no llegan a una muy alta concentración celular (2,5 g/L aproximadamente). En este caso, la cepa evolucionada en xilosa presentó la menor concentración celular después de la inducción. Es posible que sea efecto de que la célula priorice la expresión recombinante, al crecimiento celular. En cuanto a las cepas inducidas a 20 °C no presentan grandes diferencias, mostrando un crecimiento regular y sostenido hasta las 28 horas aproximadamente, y luego un aparente largo estado estacionario. Una posible explicación a este fenómeno es que a baja temperatura las bacterias se dupliquen a una baja tasa similar a la tasa de decaimiento, teniendo un largo estado estacionario. Esto explicaría porque no hay diferencias entre las cepas transformantes, al no haber mayor expresión recombinante.

Finalmente, se midió la concentración de HA en todas las muestras en HPLC, obteniéndose resultados que se muestran en la Figura 4.25 a continuación.

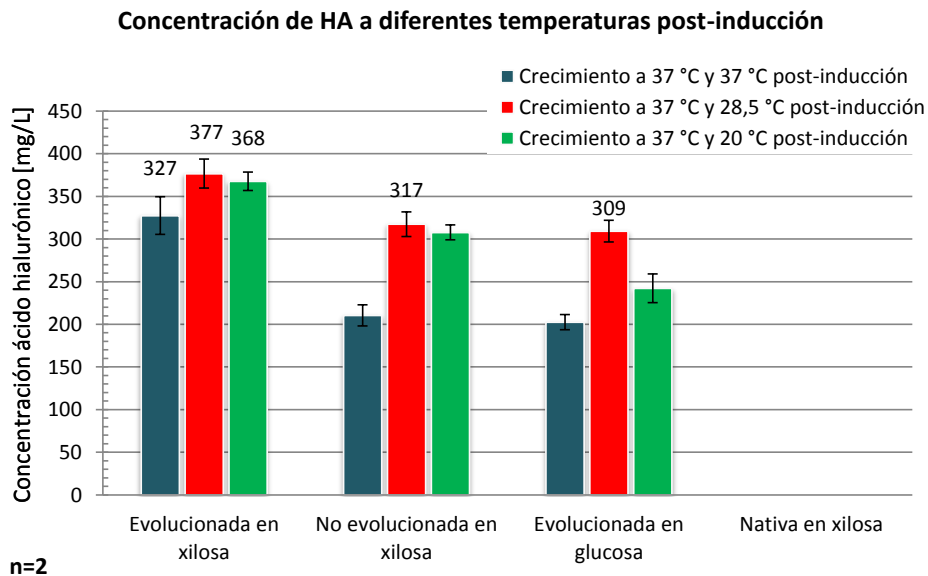


Figura 4.25: Concentración de HA en los cultivos de las cepas evolucionada en xilosa, evolucionada en glucosa, no evolucionada en xilosa y nativa en xilosa. Las cepas fueron evaluadas bajo 3 temperaturas de crecimiento post-inducción: 37 °C, 28,5 °C y 20 °C.

A partir de la Figura 4.25 se observa que la cepa evolucionada en xilosa es la cepa que produce mayor cantidad de HA en cualquiera de las 3 temperaturas de crecimiento post-inducción evaluadas. Además, se observa que a una temperatura de crecimiento post-inducción de 28,5 °C se logra la mayor concentración de HA para todas las cepas productoras de HA. A esta temperatura de crecimiento post-inducción (28,5 °C) se pueden concluir un par de cosas relevantes: la cepa evolucionada en xilosa produce un 17,9 % más de HA (376,78 mg/L) que la misma cepa en glucosa (309,2 mg/L), y produce un 15,8 % más de HA que la cepa no evolucionada en xilosa (317,4 mg/L). Por otro lado, la cepa evolucionada en xilosa con una temperatura de crecimiento post-inducción a 28,5 °C produce sólo un 2,4 % más de HA que esta misma cepa con una temperatura de crecimiento post-inducción 37 °C. Si bien esto puede parecer un resultado poco promisorio, es de gran relevancia ya que el poder crecer las células a baja temperatura implica un ahorro energético especialmente importante si esto se quiere escalar a cultivos industriales de grandes volúmenes.

A partir de la concentración celular HA se calculó el rendimiento de HA obtenido en cada caso. Estos resultados se muestran en la Figura 4.26.

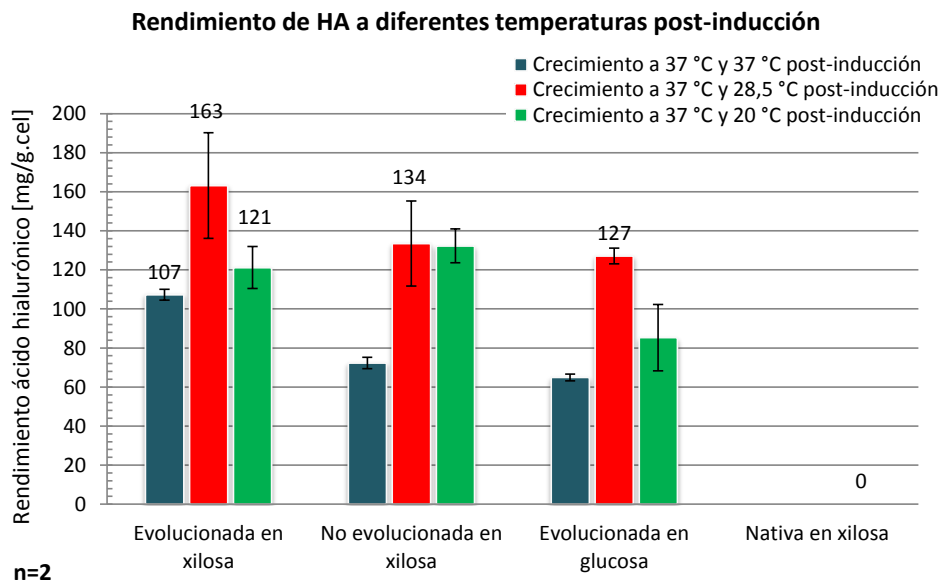


Figura 4.26: Rendimiento de HA en los cultivos de las cepas evolucionada en xilosa, no evolucionada en xilosa, evolucionada en glucosa y nativa en xilosa. Las cepas fueron evaluadas bajo 3 temperaturas de crecimiento post-inducción: 37 °C, 28,5 °C y 20 °C.

En la Figura 4.26 se observan los diferentes rendimientos obtenidos a partir de los cultivos estudiados a diferentes temperaturas de inducción. Debido a que los pesos secos de células finales son muy similares entre las diferentes cepas para una temperatura de crecimiento post-inducción en particular, los resultados comparativos obtenidos en general son muy similares a los correspondientes a concentración de HA: El mayor rendimiento lo tiene la cepa evolucionada en xilosa para las 3 temperaturas evaluadas. El mayor rendimiento se observa con una temperatura de crecimiento post-inducción de 28,5 °C en en todas las cepas evaluadas. La cepa evolucionada en xilosa presenta un mayor rendimiento con una temperatura de crecimiento post-inducción de 28,5 °C. De hecho, su rendimiento en estas condiciones (163,2 mg/g.cel) es un 25,7% mayor que con una temperatura post-inducción de 37 °C (107,3 mg/g.cel). Finalmente, se observa que la cepa evolucionada en xilosa a una temperaturas de crecimiento post-inducción de 28,5 °C tiene un rendimiento 18,2% mayor que la cepa no evolucionada en xilosa (127,1 mg/g.cel).

En conclusión, a partir de los resultados recientemente presentados, la temperatura de crecimiento post-inducción que presenta mayor producción y rendimiento de HA para todas las cepas es la de 28,5 °C, lo que además permitiría un ahorro energético relevante en el proceso de producción de de HA en grandes volúmenes a nivel industrial.

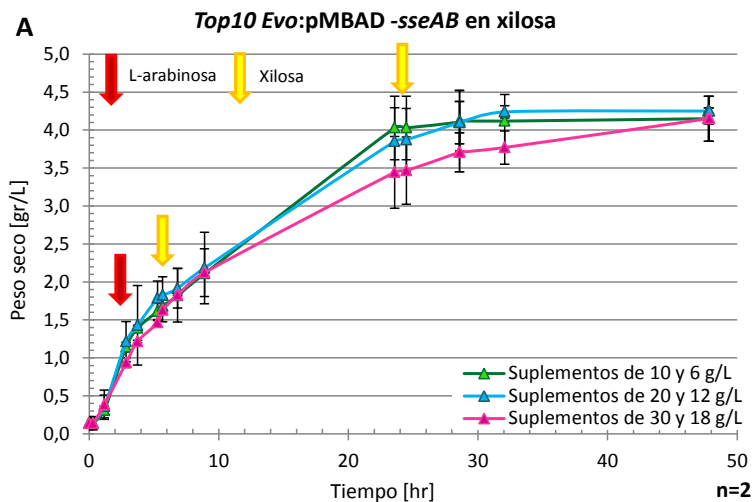
Un detalle de los valores obtenidos a partir de la optimización de la temperatura de crecimiento post-

inducción se presenta en el Anexo P. Además, en este Anexo se encuentran la curva de calibración y los cálculos relacionados para los resultados presentados.

4.5.4 Concentración de Xilosa Suplementada

En la literatura se ha utilizado como método para adicionar fuente de carbono al cultivo, un primer suplemento de azúcar para alcanzar una concentración de 10 g/L 2 horas después de la inducción y de 6 g/L a las 24 horas de cultivo como en el trabajo de Yu y Stephanopoulos (2008). Se decidió estudiar si una mayor concentración de fuente de carbono puede conllevar una mayor producción de HA, por lo que se estudió una concentración igual a la anterior, una igual al doble y otra al triple. Este experimento se realizó en 2 ocasiones. A continuación se muestran los resultados de estos experimentos.

A partir de los experimentos realizados, el primer resultado obtenido consiste en las diferentes curvas de crecimiento para comparar los efectos de las diferentes concentraciones de suplemento de azúcar sobre el crecimiento celular y las diferencias entre las cepas evaluadas. Estas curvas se muestran en la Figura 4.27.



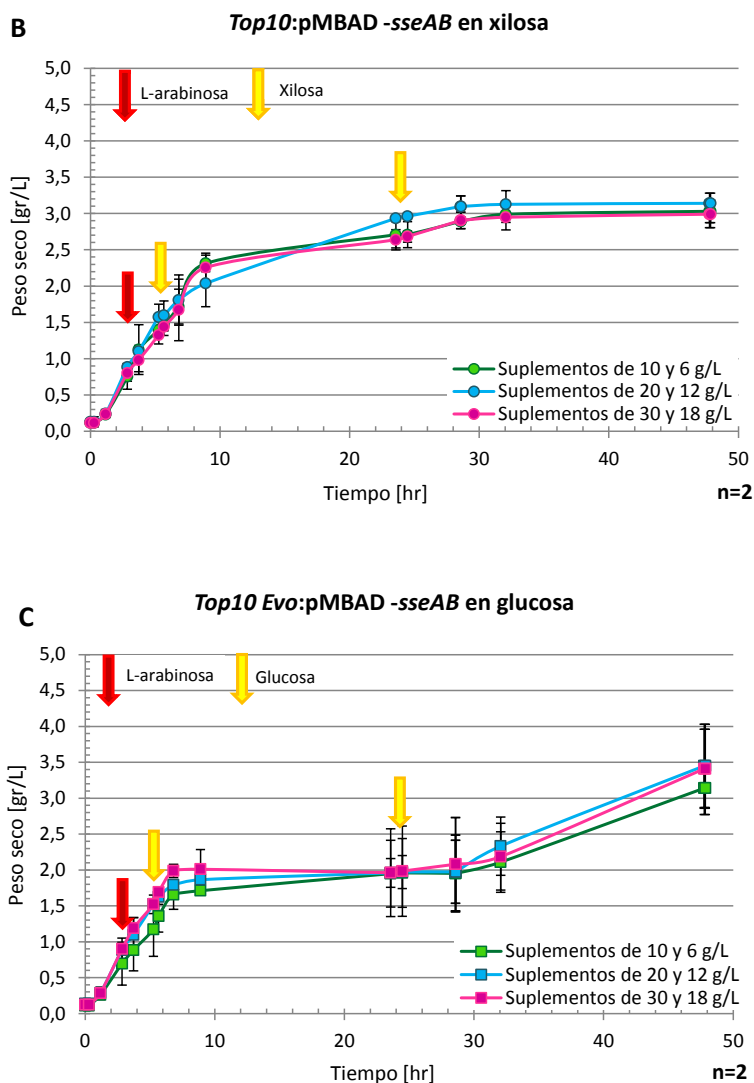


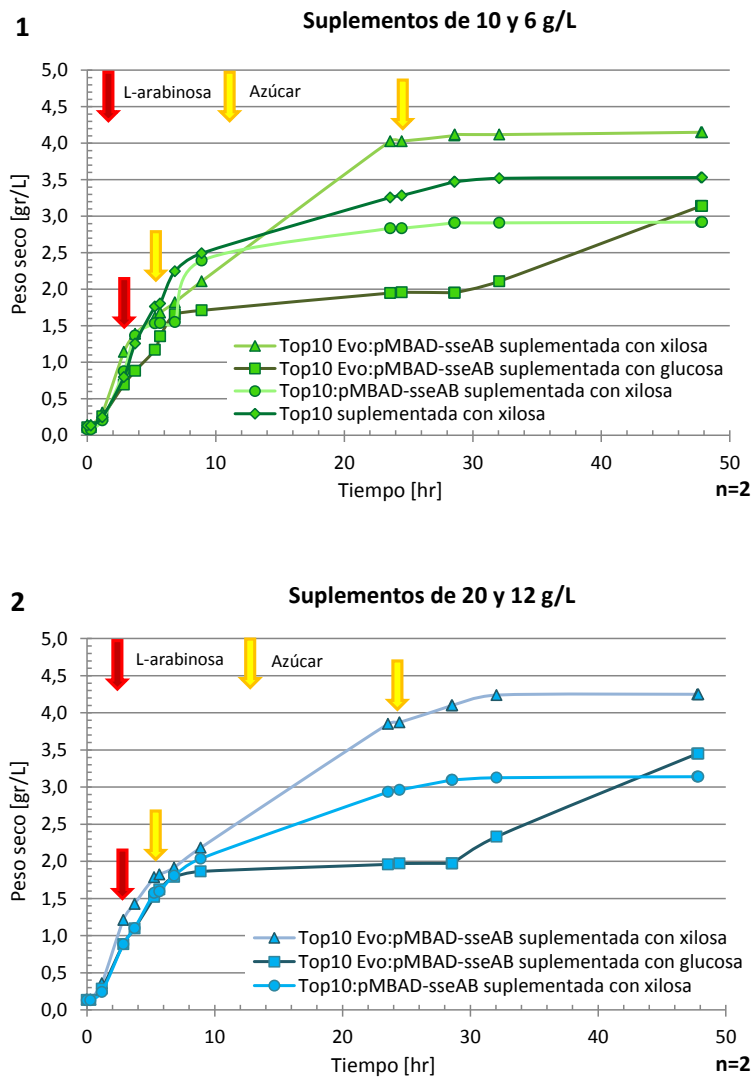
Figura 4.27: Curvas de crecimiento bajo diferentes concentraciones de suplemento de xilosa. Cepas (A) evolucionada en xilosa, (B) no evolucionada en xilosa y (C) evolucionada en glucosa. Las cepas fueron evaluadas bajo diferentes concentraciones de azúcar suplementada 2 horas después de la inducción y a las 24 horas de cultivo: 10 y 6 g/L, 20 y 12 g/L; y 30 y 18 g/L respectivamente. Medio LB suplementado con MgCl₂, 37 °C, 250 RPM, inducción con la adición de 0,1 g/L de L- arabinosa.

De la Figura 4.27 se puede observar que las curvas de crecimiento fueron muy distintas dependiendo del azúcar suplementado, viendo un decaimiento de la biomasa antes del segundo suplemento, en el caso de la glucosa. Este fenómeno se puede observar fuertemente también en el caso de la optimización de pH, y en menor medida en las otras optimizaciones también. Diversas hipótesis pueden surgir a partir de esta observación, pero la más interesante es que se puede inferir que la xilosa es una mejor fuente de carbono que la glucosa para estas bacterias, al mostrar un menor

retardo en su aprovechamiento al observar las curvas de crecimiento. El fenómeno de que la velocidad de crecimiento disminuya al suplementar la glucosa al cultivo puede ser explicado a partir de la inhibición que se produce frente una alta concentración de glucosa-6-fosfato sobre las hexoquinasas, proteínas transportadoras de glucosa (Devlin, 2004).

En cuanto a las diferentes concentraciones de suplemento no se ve un efecto notable de forma transversal en el crecimiento.

Otro factor que es posible evaluar, corresponde al comportamiento de las diferentes cepas bajo las mismas condiciones de suplementación de azúcar. Estas curvas de crecimiento se muestran en la Figura 4.28.



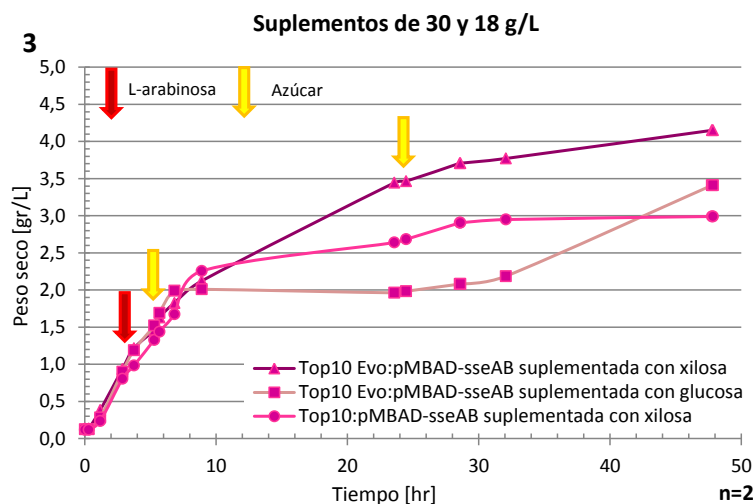


Figura 4.28: Curvas de crecimiento bajo diferentes concentraciones de suplemento. Las cepas fueron evaluadas bajo 3 concentraciones de suplemento (2 horas después de la inducción y a las 24 horas de cultivo): (1) 10 y 6 g/L, (2) 20 y 12 g/L y (3) 30 y 18 g/L. Cepas evolucionada en xilosa, no evolucionada en xilosa, evolucionada en glucosa y nativa en xilosa. Medio LB suplementado con $MgCl_2$, 37 °C, 250 RPM, inducción con la adición de 0,1 g/L de L- arabinosa.

En la Figura 4.28 se puede ver claramente el diferente comportamiento de las cepas evaluadas. En primer lugar destaca la cepa evolucionada en xilosa con un crecimiento sostenido y alcanzando el mayor peso seco en las 3 condiciones evaluadas. También es posible nuevamente notar el comportamiento de la cepa evolucionada en glucosa y la disminución de la velocidad de crecimiento después del primer suplemento de glucosa.

La cepa evolucionada llega a un peso seco de células seca notablemente más alto en comparación con la cepa no evolucionada, tanto con xilosa como con glucosa suplementada (4,3 g/L y 3,2 g/L en promedio respectivamente). Además, la cepa evolucionada llega a un mayor peso seco de células siendo en xilosa que con glucosa (4,3 g/L y 3,7 g/L en promedio respectivamente). Estos resultados no son tan evidentes en los resultados anteriores, pero es posible ver que en general se logran mayores concentraciones finales de biomasa en el caso de las cepas suplementadas con xilosa, lo que resulta muy interesante en cuanto a que se puede inferir que la bacteria *E. coli Top10*, y quizás todas las *E. coli* tienen un crecimiento más rápido en xilosa que en glucosa.

Luego, se midió la concentración de HA en todas las muestras en HPLC, obteniéndose resultados que se muestran en la Figura 4.29 a continuación.

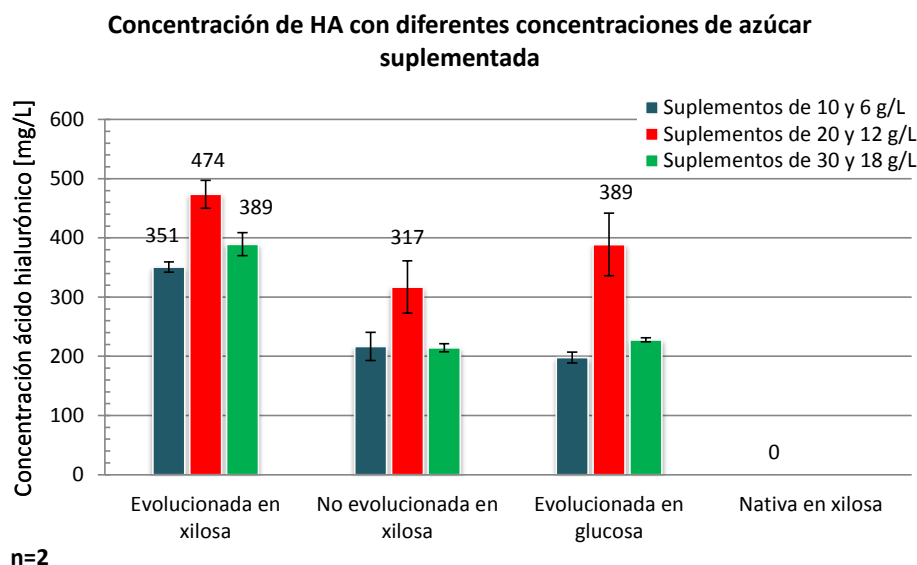


Figura 4.29: Concentración de HA en los cultivos de las cepas evolucionada en xilosa, no evolucionada en xilosa, evolucionada en glucosa y nativa en xilosa. Las cepas fueron evaluadas bajo 3 concentraciones de suplemento (2 horas después de la inducción y a las 24 horas de cultivo): (1) 10 y 6 g/L, (2) 20 y 12 g/L y (3) 30 y 18 g/L.

En la Figura 4.29 se observa que la cepa evolucionada en xilosa es la cepa que produce mayor cantidad de HA en cualquiera de las 3 concentraciones de suplemento evaluadas. Además, se observa que con suplementos de 20 y 12 g/L se logra la mayor concentración de HA para todas las cepas productoras. La cepa evolucionada en xilosa produce un 21,8 % más de HA (473,8 mg/L) que la misma cepa en glucosa (351,7 mg/L), y esta misma cepa en xilosa produce un 33,1 % más de HA que la cepa no evolucionada en el mismo azúcar (317,1 g/L).

Por otro lado, la cepa evolucionada en 20 y 12 g/L de xilosa produce 17,8 % más de HA que esta misma cepa en 30 y 18 g/L de xilosa, y 25,9 % más de HA que esta misma cepa en 10 y 6 g/L de xilosa. Para las otras cepas también se obtiene como resultado que con suplementos de 20 y 12 g/L de azúcar se obtienen las mayores concentraciones de HA, luego con suplementos de 30 y 18 g/L y las menores concentraciones de HA con suplementos de 10 y 6 g/L. Con este resultado se puede concluir que la mejor concentración de suplementos corresponde a 20 y 12 g/L de azúcar para cualquier cepa. En la literatura no se ha visto un experimento de características similares para comparar estos resultados, por lo este trabajo presenta los primeros pasos para mejorar esta técnica de suplementación de fuente de carbono.

A partir de la concentración celular HA se calculó el rendimiento de HA obtenido en cada caso. Estos resultados se muestran en la Figura 4.30.

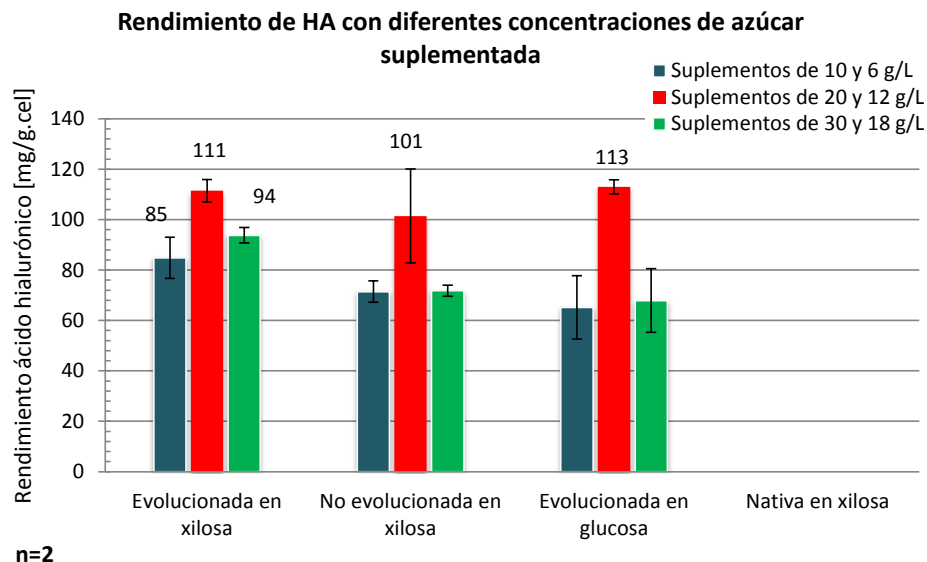


Figura 4.30: Rendimiento de HA en los cultivos de las cepas evolucionada en xilosa, no evolucionada en xilosa, evolucionada en glucosa y nativa en xilosa. Las cepas fueron evaluadas bajo 3 concentraciones de suplemento (2 horas después de la inducción y a las 24 horas de cultivo): (1) 10 y 6 g/L, (2) 20 y 12 g/L y (3) 30 y 18 g/L.

A partir de la Figura 4.30 se observan los diferentes rendimientos obtenidos a partir de los cultivos estudiados suplementados con diferentes concentraciones. Para todas las cepas evaluadas se obtiene un mayor rendimiento con suplementos de 20 y 12 g/L de azúcar. Debido a que el peso seco final en el caso de la cepa evolucionada en glucosa es notablemente más bajo en el caso de la no evolucionada, se obtienen rendimientos similares para ambas cepas suplementadas con 20 y 12 g/L de azúcar (113 y 111,5 mg/g.cel, respectivamente). La cepa evolucionada en xilosa con suplementos de 20 y 12 g/L tiene un rendimiento 15,8 % mayor que la misma cepa con suplementos de 30 y 18 g/L (93,8 mg/g.cel) y 23,9 % mayor que la misma cepa con suplementos de 10 y 6 g/L (84,8 mg/g.cel). A partir de estos resultados se concluye que con suplementos de 20 y 12 g/L se obtienen los mejores rendimientos para todas las cepas, siendo éste el mejor método de suplementación de azúcar.

Un detalle de los valores obtenidos a partir de la optimización de la concentración de sustrato se presenta en el Anexo P. Además, en este Anexo se encuentran la curva de calibración y los cálculos relacionados para los resultados presentados.

4.5.5 Comparación Condiciones Optimizadas y Basales

Un resumen de los rendimientos de HA obtenidos con los experimentos anteriores se muestra en la tabla 4.1.

Tabla 4.1: Rendimientos de ácido hialurónico obtenidos de los experimentos: tiempo de adición de inductor y su concentración, ajuste de pH, temperatura de crecimiento post-inducción y concentración de azúcar suplementada.

Rendimiento de HA mg/g.cel	Tiempo de adición de inductor y su concentración			Ajuste de pH			Temperatura de crecimiento post- inducción			Concentración de azúcar suplementada		
	1 adición de 0,1 g/L L- arabinosa	2 adiciones de 0,05 g/L L-arabinosa	1 adición de 0,02 g/L L-arabinosa	Sin ajuste	Concentración final 0,012 M NaOH	Concentración final 0,024 M NaOH	37 °C	28,5 °C	20 °C	Adición de 10 g/L y 6 g/L de azúcar	Adición de 20 g/L y 12 g/L de azúcar	Adición de 30 g/L y 18 g/L de azúcar
Cepa												
Evolucionada en xilosa	75	98	8	98	92	88	107	163	121	85	111	94
No evolucionada en xilosa	39	86	5	77	62	59	72	134	132	71	101	72
Evolucionada en glucosa	42	62	19	92	89	91	65	127	85	65	113	68
No evolucionada en glucosa	67	82	14									
Nativa en xilosa	0			0	0	0			0	0		

Dados los resultados anteriores, se seleccionaron las condiciones que dieron mayores rendimientos de HA como las condiciones optimizadas. A continuación se resumen las condiciones basales y las condiciones optimizadas seleccionadas.

Condiciones basales:

- ◇ Inducción con la adición de 0,1 g/L de L-arabinosa a una D.O. de al menos 0,8.
- ◇ Temperatura de crecimiento post-inducción de 37 °C.
- ◇ Sin ajuste de pH.
- ◇ Adición de suplemento para alcanzar una concentración de 10 g/L de xilosa 2 horas después de la inducción y de 6 g/L de xilosa a las 24 horas de cultivo.

Condiciones optimizadas:

- ◇ Inducción con 0,05 g/L a una D.O. de 1,0 y 2 horas después.
- ◇ Temperatura de crecimiento a 37 °C y 28,5 °C post-inducción.
- ◇ Sin ajuste de pH.
- ◇ Adición de suplemento para alcanzar una concentración de 20 g/L de xilosa 2 horas después de la inducción y de 12 g/L de xilosa a las 24 horas de cultivo.

Se realizaron cultivos de la cepa evolucionada en las condiciones optimizadas y las condiciones basales. Además, se hizo un cultivo de la no evolucionada en las condiciones optimizadas para compararla con la cepa evolucionada. Estos cultivos se realizaron en triplicado. Las curvas de crecimiento obtenidas se muestran en la Figura 4.31.

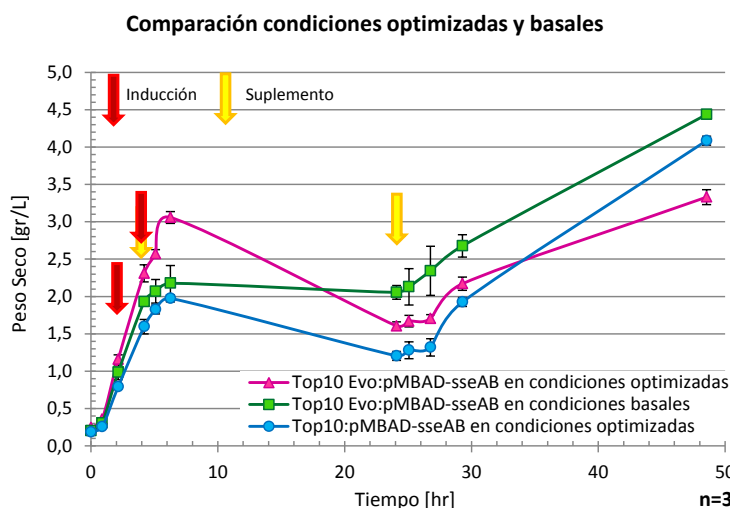


Figura 4.31: Curvas de crecimiento bajo las condiciones optimizadas y basales. Cepas evolucionada en xilosa en condiciones optimizada y basales, y cepa no evolucionada con xilosa en condiciones optimizadas. Medio LB, 200 RPM. Condiciones basales: inducción con la adición de 0,1 g/L de L-arabinosa a una D.O. de 1,0, temperatura de crecimiento post-inducción de 37 °C, sin control de pH, adición de suplemento para alcanzar una concentración de 10 g/L de xilosa 2 horas después de la inducción y de 6 g/L de xilosa a las 24 horas de cultivo. Condiciones optimizadas: inducción con 0,05 g/L de L-arabinosa a una D.O. de 1,0 y 2 horas después, temperatura de crecimiento a 37 °C y 28,5 °C post-inducción, sin control de pH, adición de suplemento para alcanzar una concentración de 20 g/L de xilosa 2 horas después de la inducción y de 12 g/L de xilosa a las 24 horas de cultivo.

En la Figura 4.31 se observa que las curvas de crecimiento presenta algunas diferencias. La primera de ellas es el caso del cultivo de la cepa evolucionada en condiciones basales (verde) no tiene un decaimiento importante de la biomasa a las 24 horas de cultivo, en cambio, las cepas no evolucionada y evolucionada sí presentan este decaimiento de biomasa, tal como se había observado en las optimizaciones anteriores la que se atribuye a la disminución de la temperatura de crecimiento (ver la optimización de la temperatura de crecimiento post-inducción). En cuanto a la velocidad específica de crecimiento, en las primeras horas de cultivo se puede observar que las curvas que presentan mayor pendiente corresponden a la cepa evolucionada, tal como se esperaba. Además, el peso seco final es mayor para los cultivos en condiciones basales (4,4 g/L en promedio), en comparación con los cultivos en condiciones optimizadas (cepa evolucionada 3,3 g/L y no evolucionada

4,1 g/L en promedio). Esta diferencia se condice con lo observado anteriormente en la optimización de temperatura de crecimiento post-inducción.

A continuación se estimaron las concentraciones y rendimientos de ácido hialurónico para cada uno de los cultivos. Los valores obtenidos se muestran en la figura 4.32.

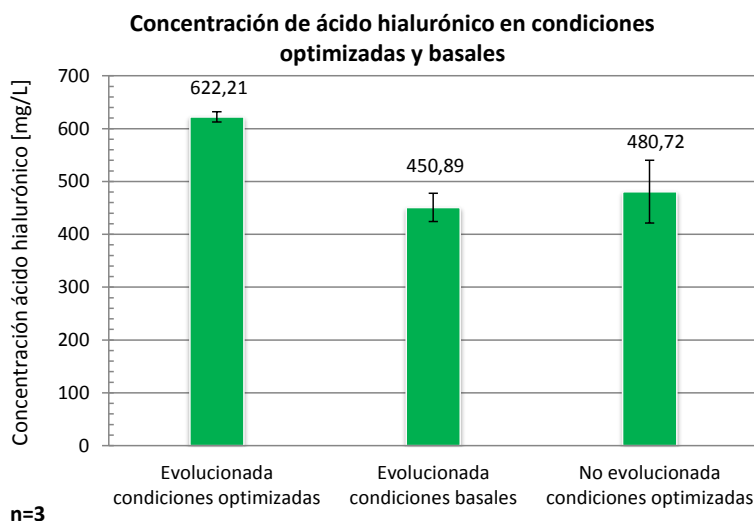


Figura 4.32: Concentración de HA en los cultivos. Cepas *Top10 Evo:pMBAD-sseAB* en xilosa en condiciones optimizada y basales, y cepa *Top10:pMBAD-sseAB* con xilosa en condiciones optimizadas.

A partir de la Figura 4.32 se observa que en las condiciones optimizadas se obtiene una producción un 27,5 % mayor de HA en comparación con las condiciones basales para la cepa evolucionada (622,2 y 450,9 mg/L respectivamente). Más aún, la cepa evolucionada en condiciones optimizadas produce un 22,7 % más de HA que la cepa no evolucionada en las mismas condiciones (480,7 mg/L). Estos resultados muestran que las condiciones optimizadas en conjunto favorecen la producción de HA en comparación con las condiciones basales. Además, se puede concluir que la cepa evolucionada tiene una mayor producción de HA que la no evolucionada.

Finalmente, se calcularon los rendimientos obtenidos los que se muestran en la Figura 4.33.

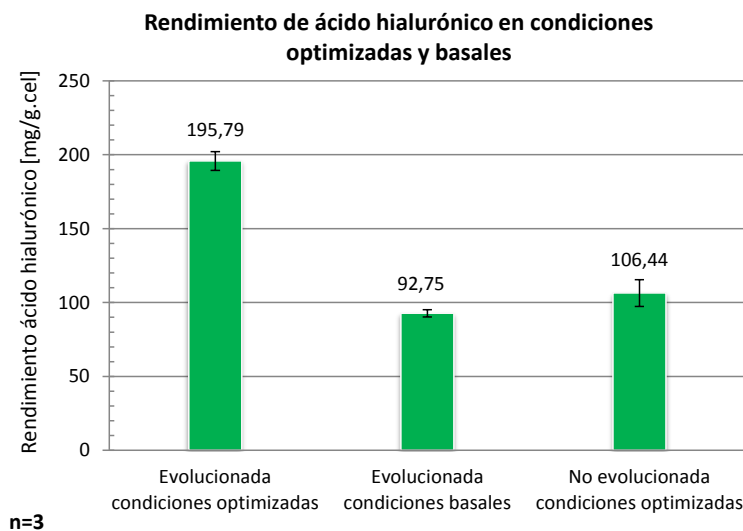


Figura 4.33: Rendimiento de HA en los cultivos. Cepa evolucionada en condiciones optimizada y basales, y cepa no evolucionada en condiciones optimizadas

A partir de la Figura 4.33 se observan los diferentes rendimientos obtenidos a partir de los cultivos estudiados. Los resultados obtenidos son aún más llamativos que los anteriores, donde se observa que con las condiciones basales se obtiene un rendimiento de HA un 52,6 % menor que con las condiciones optimizadas para la cepa evolucionada (92,6 y 195,8 mg/g.cel, respectivamente). En cuanto a la cepa no evolucionada en condiciones optimizadas, ésta tiene un rendimiento de HA (106,4 mg/g.cel) un 45,6 % menor que la cepa evolucionada en las mismas condiciones.

Con estos resultados se corrobora lo afirmado anteriormente acerca de que las condiciones de cultivo optimizadas favorecen la producción de HA, obteniendo concentraciones y rendimientos un 27,5 y 52,6 % mayores, respectivamente.

En cuanto al peso molecular del HA obtenido, es posible hacer una comparación del peso molecular del HA recombinante con el peso molecular del HA estándar utilizado, a partir de los tiempos de residencia obtenidos. Esto es posible porque la columna de exclusión molecular utilizada genera picos para cada muestra la que se puede relacionar con su peso molecular al interpolar entre muestras de distintos pesos moleculares y con la misma concentración. En términos generales, un mayor tiempo de residencia implica un menor peso molecular. En este trabajo sólo se tenía un estándar de HA cuyo peso molecular era de $1,63 \times 10^6$ kDa (Vuletić et al., 2010). Los tiempos de residencia obtenidos para este estándar promediaron los 17,01 min (con una desviación estándar de 0,38). Las muestras de HA obtenidas de los cultivos promediaron un tiempo de residencia de 17,70 min (con una desviación estándar de 0,19). La diferencia de estos tiempos implica que el peso molecular

del HA recombinante es menor al peso molecular del HA estándar. Según las especificaciones del proveedor de la columna (Shodex, 2014), una variación desde 1,2 hasta 2×10^6 kDa presenta una disminución del tiempo de residencia 30 min. Siendo así, se concluye que el peso molecular del HA recombinante es ligeramente inferior a los $1,63 \times 10^6$ kDa, ya que una diferencia de menos de un minuto en el tiempo de residencia en estas condiciones implica que el peso molecular del HA recombinante es cercano al peso molecular del HA estándar.

Es importante mencionar que las concentraciones y rendimientos de HA obtenidos son mayores a los observados en la literatura en cultivos de *E. coli* en diferentes medios y con diferentes fuentes de carbono. En particular en el trabajo de (Yu y Stephanopoulos, 2008) en medio LB se llegó a una concentración de HA de 190 mg/L, en el trabajo de (Jongsareejit et al., 2009) en medio LB se llegó a una concentración de HA de 32,5 g/L y en el trabajo de Yu y Stephanopoulos (2008) en medio LB se llegó a una concentración de HA de 260 g/L. Según estos resultados, las concentraciones logradas en este trabajo superan con creces lo visto en la literatura, siendo un 139,2 % más altas que el mejor de los casos anteriores. Un caso en que se logró una concentración de HA notablemente más alta es en el trabajo de (Mao et al., 2007) en medio LB suplementado con ácido glucurónico, logrando una concentración de 3,8 g/L. Esto tiene sentido siendo que se está suplementando con uno de los precursores del polímero, favoreciendo esta reacción y eliminando gran parte de la carga metabólica de la célula.

Un detalle de los valores obtenidos a partir de la optimización de suplemento de xilosa se presenta en el Anexo P.

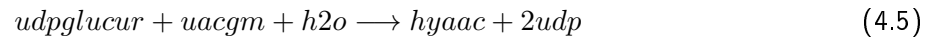
4.6 Construcción y Análisis de Flujo a Partir de un Modelo a Escala Genómica

En este capítulo se muestra el GSM construido y sus principales características. Además, se realizó un FBA para analizar el comportamiento de los flujos metabólicos al comparar las cepas productoras de HA *E. coli Top10* nativa y evolucionada, y su comportamiento con xilosa o manosa como fuentes de carbono. Como control se utilizó una cepa no evolucionada transformada con el vector pMBAD-*sseAB* modificado al cual se le ha escindido un fragmento que contiene gran parte del gen codificante para la enzima HAS.

4.6.1 Construcción del Modelos a Escala Genómica

El GSM construido se basó en el GSM de la cepa *E. coli K12 MG1655* publicado el año 2011, iJO1366. Este modelo cuenta con 1.366 genes, 2.251 reacciones metabólicas y 1.136 metabolitos. Se ha demostrado por diferentes modelamientos que es una representación confiable del fenotipo de

la *E. coli* y es el modelo más completo de esta cepa hasta ahora (Orth et al., 2011). Este modelo incluye las reacciones de ingreso y degradación de xilosa y manosa. Este aspecto es fundamental dado que son las fuentes de carbono estudiadas. Además, incluye las reacciones de síntesis de UDP-D-glucuronato y UDP-N-acetilglucosamina, los precursores de ácido hialurónico. La síntesis de ácido hialurónico, considerando sus monómeros, se describe a continuación:



donde:

udgglucur es UDP-D-glucuronato

uacgm es UDP-N-acetilglucosamina

h₂o es agua

hyaac es ácido hialurónico

udp es UDP

Una representación de las vías centrales de las cepas recombinante productoras de ácido hialurónico *Top10 Evo:pMBAD-sseAB* y *Top10:pMBAD-sseAB* se muestra en la figura 4.34.

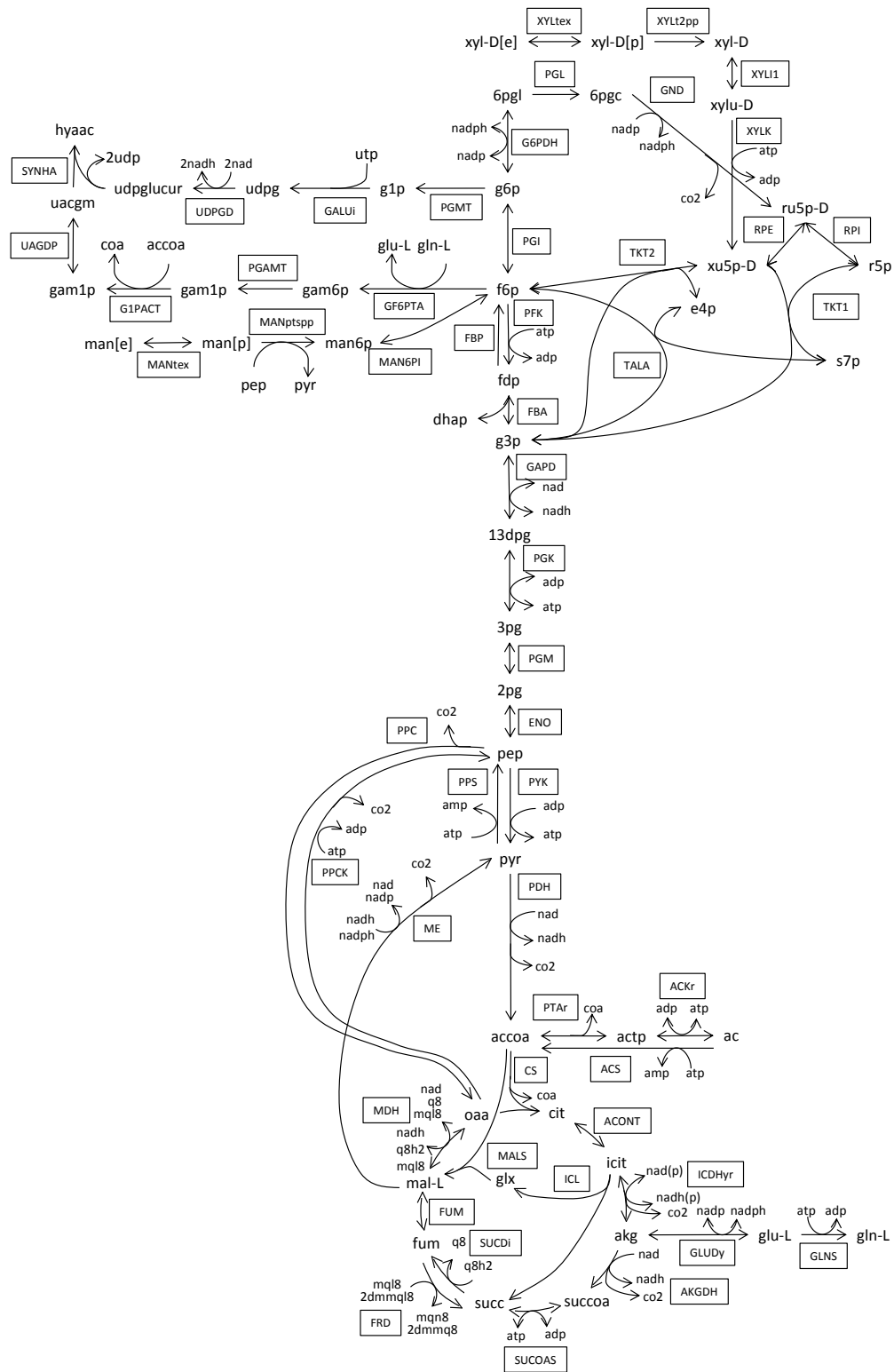


Figura 4.34: Representación del metabolismo central de las cepas recombinantes productoras de ácido hialurónico.

Un detalle de la nomenclatura utilizada se encuentra en el Anexo P.3.

4.6.2 Obtención de Datos de Entrada para el Análisis de Balance de Flujos

Se realizaron cultivos batch en medio definido R2 suplementado con xilosa o manosa para calcular los flujos de consumo de xilosa, generación de biomasa y producción de HA. Las cepas y condiciones evaluadas fueron:

- ◇ Cepa evolucionada en xilosa
- ◇ Cepa no evolucionada en xilosa
- ◇ Cepa control en xilosa
- ◇ Cepa evolucionada en manosa
- ◇ Cepa no evolucionada en manosa

La cepa evolucionada se trabajó en duplicado. Primero que todo se definió el intervalo de tiempo a considerar ya que es fundamental que la cepa se encuentre durante su crecimiento exponencial para poder suponer un estado pseudo-estacionario. Las curvas de crecimiento se muestran en las Figuras 4.35 y 4.36.

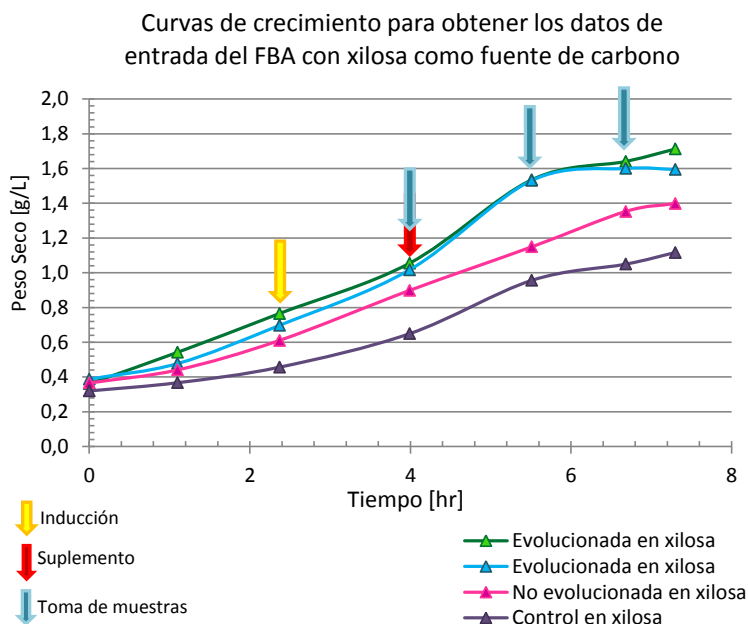


Figura 4.35: Curvas de crecimiento de las cepas *Top10 Evo:pMBAD-sseAB*, *Top10:pMBAD-sseAB* y *Top10:pMBAD Control* crecidas en medio R2 con xilosa, 37 °C, 200 RPM.

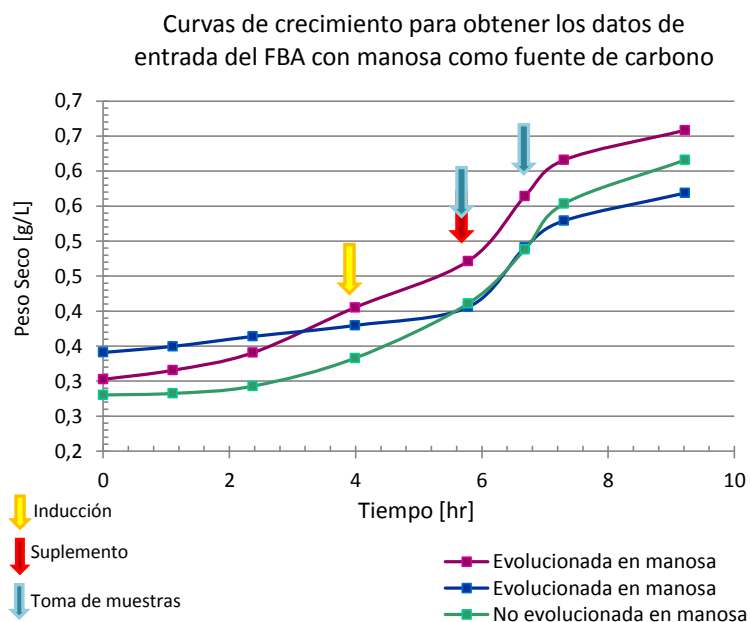


Figura 4.36: Curvas de crecimiento de las cepas *Top10* *Evo:pMBAD-sseAB* y *Top10:pMBAD-sseAB* crecidas en medio R2 con manosa, 37 °C, 200 RPM.

A partir de las curvas de crecimiento anteriores se definieron los intervalos para determinar los flujos. En el caso de las cepas crecidas en xilosa se definió el intervalo entre las 4 y 5,5 horas de cultivo como el intervalo en crecimiento exponencial para todas las cepas. En el caso de las cepas crecidas en manosa el intervalo que cumple con estas características se definió el que corresponde entre las 5,8 y 6,7 horas de cultivo. La selección de diferentes intervalos de tiempo se debe a que los crecimientos exponenciales se presentaron en tiempos diferentes, y éste el un criterio fundamental para la estimación de los flujos metabólicos.

Los flujos obtenidos se muestran en la figura 4.37.

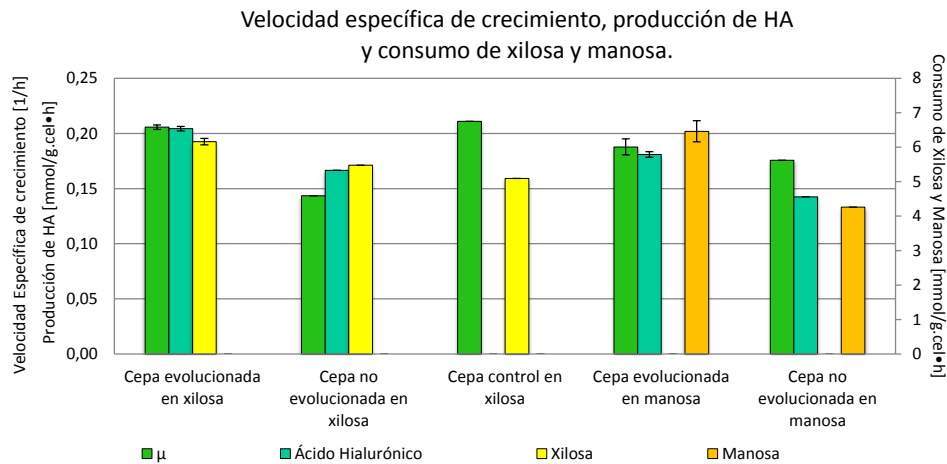


Figura 4.37: Velocidad específica de crecimiento y flujos de HA, xilosa y manosa obtenidos a partir de los cultivos de la cepa evolucionada (en duplicado), no evolucionada y no evolucionada control en medio R2 con xilosa, y las cepas evolucionada (en duplicado) y no evolucionada en medio R2 con manosa.

De estos flujos se puede inferir que la cepa evolucionada produce mayor cantidad de HA que la no evolucionada, además de producir más biomasa. También se observa que para una mayor producción de HA (y biomasa) requiere menores flujos de consumo de xilosa en comparación con el flujo de consumo de manosa, siendo el uso de xilosa como fuente de carbono más eficiente para esta cepa. En cuanto a la cepa no evolucionada, se observa que si bien se produce más HA a partir de xilosa, es más eficiente su producción a partir de manosa ya que requiere un menor consumo de este azúcar, comparativamente. Esto comprueba que hay diferencias entre las cepas evaluadas en cuanto a la eficiencia con que degradan las 2 fuentes de carbono en cuestión. Es así como se puede corroborar el cambio metabólico logrado a partir de la ALE. Por otro lado, la cepa no evolucionada control consume menos xilosa y produce más biomasa, lo que es lo esperado debido a que no se requiere carbono para la producción de HA, teniendo una menor carga metabólica. Es importante mencionar que el control utilizado contiene el plasmidio modificado por lo que existe cierta carga metabólica asociado a éste. Los valores específicos de los flujos obtenidos se presentan en la tabla P.2.

Tabla 4.2: Flujos metabólicos de consumo de xilosa o manosa, producción de biomasa y velocidad específica de crecimiento de las cepas evolucionada, no evolucionada y no evolucionada control.

		Flujo [mmol/g.cel•h]			Velocidad Específica de Crecimiento μ [1/h]
		Xilosa	Manosa	HA	Biomasa
Xilosa	Top10 Evo: pMBAD- sseAB (1)	6,1600		0,2043	0,2057
	Top10 Evo: pMBAD- sseAB (2)	6,0282		0,2073	0,2209
	Top10: pMBAD- sseAB	5,4768		0,1665	0,1435
	Top10: pMBAD Control	5,0922			0,2111
Manosa	Top10 Evo: pMBAD- sseAB (1)		6,2447	0,1791	0,1827
	Top10 Evo: pMBAD- sseAB (2)		6,6790	0,1827	0,1929
	Top10: pMBAD- sseAB		4,2621	0,1426	0,1756

4.6.3 Análisis de Balance de Flujos de las Cepas Evolucionada y No Evolucionada con un Modelo a Escala Genómica

El Análisis de Balance de Flujos (FBA) se realizó en Matlab con el Toolbox de COBRA. Un detalle del código utilizado se encuentra en el Anexo P.3. En este balance se limitan los flujos de entrada, pudiendo ingresar a la célula solo los compuestos que están presentes en el medio R2, que corresponden a sales y metales traza. Los flujos específicos calculados, consumo de xilosa y de manosa, y producción de HA, además de las velocidades específicas de crecimiento, son incorporadas en el modelo. Además, se vio en la literatura que en cultivo aeróbicos se produce lactato y el mínimo de fuente de carbono que se pierde en este flujo es del 10 % (Farmer. y Liao, 1997). Según esto se consideró un flujo de acetato igual al 10 % del flujo de consumo de fuente de carbono.

Se procede a verificar que los flujos obtenidos en general sean razonables (del orden de las decenas a lo más, excluyendo aquellas reacciones que presentan *loops* los que son difíciles de eliminar, por lo que se omiten). A continuación se presentan los flujos (distintos de 0) obtenidos para las vías centrales mostradas en la figura 4.34. Para la cepa evolucionada en xilosa y en manosa se muestran los flujos netos obtenidos. Para las otras cepas en xilosa se muestran las diferencias porcentuales con respecto a los flujos de la cepa evolucionada. Para esta última cepa en manosa, se muestra la diferencia porcentual con respecto a los flujos de su cultivo en xilosa, y para la cepa no evolucionada en manosa, se muestran las diferencias porcentuales con respecto a los flujos de la cepa evolucionada en el mismo azúcar. Estos resultados se resumen en la tabla 4.3.

Tabla 4.3: Flujos metabólicos de las reacciones del metabolismo central de *E. coli* obtenidos a partir de los FBA realizados. Cepas evolucionada, no evolucionada y no evolucionada control en xilosa y manosa.

Reacciones	Cepas						Reacciones	Cepas					
	A)	B) No	C)	D)	E) No	A)		B) No	C)	D)	E) No		
	Evolucionada en xilosa	evolucionada en xilosa	Control en xilosa	Evolucionada en manosa	Evolucionada en manosa	evolucionada en manosa		Evolucionada en xilosa	evolucionada en xilosa	Control en xilosa	Evolucionada en manosa	Evolucionada en manosa	evolucionada en manosa
Flujo [mmol/g.cel*h]	Diferencia con A	Diferencia con A	Flujo [mmol/g.cel*h]	Diferencia con A	Diferencia con D	Flujo [mmol/g.cel*h]	Diferencia con A	Diferencia con A	Flujo [mmol/g.cel*h]	Diferencia con A	Diferencia con D		
μ [1/h]	0,21	-33%	-1%	0,19	-12%	-6%	FUM	5,76	-13%	-13%	8,75	52%	44%
RPE	-2,21	-11%	-16%	-0,14	-94%	-6%	PTAr	0,62	-11%	-17%	0,65	5%	-34%
RPI	-2,20	-11%	-16%	-0,14	-94%	-6%	ACKr	-0,62	-11%	-17%	-0,65	5%	-34%
TALA	2,01	-11%	-18%	-0,04	-102%	-6%	ACS	0,12	-5%	3%	0,11	-9%	-6%
TKT1	2,02	-11%	-18%	-0,03	-102%	-6%	ICL	0,00	0%	0%	0,55	-	-6%
TKT2	1,93	-11%	-19%	-0,11	-106%	-6%	MALS	0,00	-5%	3%	0,55	299385%	-6%
PGI	-0,24	-16%	-83%	-0,22	-11%	-19%	XYLt2pp	6,16	-11%	-17%	0,00	-100%	-
GAPD	8,88	-11%	-11%	11,68	32%	-36%	XYLtex	6,16	-11%	-17%	0,00	-100%	-
PGK	-8,88	-11%	-11%	-11,68	32%	-36%	XYLI1	6,16	-11%	-17%	0,00	-100%	-
PGM	-8,54	-11%	-12%	-11,37	33%	-37%	XYLK	6,16	-11%	-17%	0,00	-100%	-
ENO	8,54	-11%	-12%	11,37	33%	-37%	MANtex	0,00	0%	0%	6,46	-	-34%
PPS	0,09	-5%	3%	0,08	-9%	0%	MANptspp	0,00	0%	0%	6,46	-	-34%
PYK	4,29	-13%	-16%	0,00	-	0%	MAN6PI	0,00	0%	0%	6,46	-	-34%
PPC	0,60	-5%	3%	0,00	-	0%	GLUDy	-1,72	-5%	27%	-1,57	-9%	-6%
PDH	10,29	-15%	-22%	16,46	60%	-47%	GLNS	0,56	-10%	-35%	0,51	-10%	-12%
MDH	5,76	-13%	-13%	9,30	61%	-41%	GF6PTA	-0,24	-18%	-93%	0,19	-11%	-20%
CS	5,78	-13%	-13%	8,77	52%	-44%	PGAMT	0,21	-18%	-93%	-0,19	-11%	-20%
ACONTa	5,78	-13%	-13%	8,77	52%	-44%	G1PACT	0,20	-18%	-93%	0,19	-11%	-20%
ACONTb	5,78	-13%	-13%	8,77	52%	-44%	UAGDP	0,22	-18%	-93%	0,19	-11%	-20%
ICDHyr	5,78	-13%	-13%	8,22	42%	-46%	PGMT	-0,22	-16%	-83%	-0,22	-11%	0%
AKGDH	5,55	-13%	-13%	8,01	44%	-47%	GALUi	0,22	-18%	-97%	0,19	-11%	0%
SUCOAS	-1000,00	0%	-100%	-1000,00	0%	0%	UDPGD	0,22	-18%	-100%	0,18	-11%	0%
SUCDi	36,17	-13%	-15%	8,56	-76%	-44%	SYNHA	0,20	-18%	-100%	0,18	-11%	-21%
FRD	30,55	-13%	-15%	0,00	-100%	0%							

Desde la tabla 4.3 se puede inferir con respecto a distintas vías parte de la red metabólica expuesta.

Primero se observa el grupo de reacciones relacionadas con la PPP (RPE-TKT2). Se puede ver una clara tendencia a un mayor flujo de estas vías en el caso de la cepas cuya fuente de carbono es xilosa. Esto tiene sentido ya que la xilosa es metabolizada por medio de esta vía, no así la manosa. En cuanto a la diferencia entre las cepas, la evolucionada presenta un flujo un 11 % mayor de estas vías en comparación con la no evolucionada y un 16 % mayor con respecto a la cepa no evolucionada control, en adelante cepa control. La diferencia entre la evolucionada y la no evolucionada se asocia a que gracias a la ALE realizada, metaboliza mejor la xilosa. La diferencia con la cepa control se debe a lo mismo, además de que al no producir HA sus requerimientos son más bajos.

En cuanto a las vías centrales de la glicólisis (PGI-PYK) se puede ver una clara tendencia a un mayor flujo de estas vías en el caso de la cepas cuya fuente de carbono es manosa. Tal como se justificó en el caso de las PPP, la cepas crecidas en manosa utiliza esta vía para el ingreso del azúcar en cuestión. En cuanto a la diferencia entre las cepas, se sigue observando la tendencia anterior donde la cepa evolucionada presenta los mayores flujos tanto para las cepas en xilosa como manosa. En cuanto a las cepas en manosa, la cepa evolucionada presenta flujos 36 % mayores que

la cepa no evolucionada. Esto da cuenta que el ALE produjo también efectos positivos en cuanto a la capacidad de la cepa de metabolizar manosa, además de xilosa.

El ciclo de ácidos tricarboxílicos (ciclo TCA) (CS-FUM) muestra las mismas características que la glicólisis: mayores flujos en las cepas crecidas en manosa que en las crecidas en xilosa, y en cuanto a la diferencia entre cepas, la evolucionada tiene flujos un 13 % mayores que las cepas no evolucionada y control en xilosa, y un 44 % mayores que la no evolucionada en manosa. Esto se condice nuevamente con lo afirmado acerca de las mejoras logradas en la ALE.

El ciclo del glioxilato (ICL-MALS) es utilizado débilmente únicamente en el caso de la las cepas crecidas en manosa.

El consumo de xilosa, como se ha visto experimentalmente, es mayor en la cepa evolucionada un 11 % y 17 % en comparación con las cepas no evolucionada y control, respectivamente. Además, es menor en esta última, aunque su velocidad específica de crecimiento es mayor. Esto se debe a que no requiere xilosa para producir HA. Este mismo resultado se ven en cuanto al consumo de manosa: en la cepa evolucionada un 34 % mayor en comparación con la cepa no evolucionada.

Luego, están las reacciones que producen los precursores de ácido hialurónico: UDP-N- acetilglucosamina y UDP-D- glucuronato (GLUDy-UDPGD). La diferencia entre los flujos de la cepa evolucionada y la cepa no evolucionada es de un 18 % mayor en xilosa y un 20 % mayor en manosa, en el caso de la evolucionada. Estas diferencias son prácticamente las mismas a las diferencias que hay en la reacción SYNHA, la de síntesis de HA. Este resultado confirma que estas son las vías utilizadas por el modelo para la producción de los precursores de HA, y que éstos no son requeridos mayormente por otros procesos. Esto se confirma al observar los flujos de estas reacciones en la cepa control, los que son un 93 % menores a los de la cepa evolucionada. Finalmente, se confirma nuevamente que la diferencia entre el crecimiento en xilosa y manosa es de un 11 % mayor en xilosa para la cepa evolucionada.

Con el análisis anterior se pueden concluir ciertos elementos interesantes: La xilosa es metabolizada por *E. coli* por medio de la vía de las PPP y la manosa directamente por medio de la glicólisis. El crecimiento en manosa aumenta el flujo de las reacciones vinculadas con el ciclo TCA. Los precursores del HA son producidos naturalmente por *E. coli*, desde vías que se vinculan con la glicólisis. En cuanto a las cepas, se confirmó que la cepa evolucionada tiene mejoras metabólicas en comparación con la cepa no evolucionada gracias a la ALE. Estas mejoras permite que los flujos asociados a las PPP, la glicólisis y el ciclo TCA sean mayores tanto para el consumo de xilosa como el de manosa. Estos flujos son mayores en un 12 % durante el consumo de xilosa y un 29 % durante el consumo de manosa, en promedio.

Adicionalmente, se puede inferir que las diferencias entre la cepa evolucionada y la no evolucionada se deben relacionar con vías centrales, ya que los cambios se aprecian bajo el consumo de xilosa y también bajo el consumo de manosa. Esto implica que el cambio provocado por el ALE no se produjo específicamente en vías asociadas al transporte de xilosa, ya que en ese caso no hubiera habido ninguna diferencia en los flujos de las cepas evolucionada y no evolucionada en manosa. Además, las diferencias entre las cepas evolucionadas y no evolucionadas tuvieron impacto en la velocidad específica de crecimiento y también favoreció la producción de HA en ambas fuentes de carbono. Considerando que tanto el HA como la biomasa utilizan las vías relacionadas con los precursores de HA, se infiere que la diferencia entre la cepa evolucionada y la no evolucionada debe estar en vías anteriores a la síntesis de precursores de HA. Es así como se infiere que la ALE afectó alguna enzima de la glicólisis, ya que esta vía impacta tanto la síntesis de los precursores de HA y el crecimiento de biomasa, además de ser la vía por la cual las *E. coli* utilizan las fuentes de carbono, en particular la xilosa y la manosa. El análisis de la secuencia de los genes relacionados con las enzimas de la glicólisis de la cepa evolucionada sería necesario para comprobar lo anterior es un prometedor trabajo futuro propuesto.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

El objetivo del presente trabajo fue optimizar las condiciones de cultivo para la producción de ácido hialurónico en *E.coli* recombinante a partir de xilosa y manosa como fuentes de carbono. Para cumplir el objetivo propuesto se realizó una Evolución Adaptativa de Laboratorio (Adaptive Laboratory Evolution, ALE) a la bacteria nativa para favorecer el consumo de xilosa. Luego, esta bacteria fue transformada con el gen *hasA* para producir ácido hialurónico (Hyaluronic Acid, HA) creando la bacteria *Top10 Evo:pMBAD-sseAB*, y fueron optimizadas las condiciones de su cultivo en cuatro aspectos: tiempo de adición de inductor y su concentración, ajuste de pH, temperatura de crecimiento post-inducción y concentración de azúcar suplementada. La concentración de HA fue medida mediante HPLC. Finalmente, se realizó un Análisis de Balance de Flujos (Flux Balance Analysis, FBA) para identificar los cambios metabólicos generados en la cepa nativa gracias a la ALE.

El ALE realizado tuvo una duración de 48 días. Como resultado se obtuvo que la velocidad específica de crecimiento en xilosa de la cepa *E. coli Top10* aumentó un 36%: de 0,25 [h^{-1}] a 0,33 [h^{-1}].

A partir de la optimización realizada, se determinó que un mayor rendimiento de HA se obtiene al hacer 2 adiciones de inductor al cultivo. Anteriormente en la literatura se había observado este fenómeno, pero nunca en una expresión recombinante de proteína asociada a un vector regulado con el promotor P_{BAD} , correspondiente al del presente trabajo. Una temperatura de crecimiento post-inducción de 28,5 °C y la adición de xilosa a una concentración final de 20 g/L 2 horas después de la inducción y de 12 g/L a las 24 horas de cultivo presentaron los mejores rendimientos para todas las cepas.

Finalmente, las condiciones de cultivo seleccionadas fueron: inducción con 2 adiciones de 0,05 g/L de L-arabinosa, temperatura de crecimiento post-inducción de 28,5 °C y concentración de azúcar suplementada de 20 g/L después de la inducción y 12 de g/L a las 24 horas de cultivo. El rendimiento de HA obtenido en estas condiciones fue de 195,8 mg/g.cel, más del doble del obtenido en condiciones basales, cuyo rendimiento fue de 92,6 mg/g.cel. Se obtuvo concentraciones y rendimientos de HA algo mayores a los observados en la literatura en cultivos de *E. coli* en diferentes medios y con diferentes fuentes de carbono (sin suplementar precursores específicos del HA).

Con el FBA realizado se verificó que los precursores del HA son producidos desde vías que se

vinculan con la glicólisis. En cuanto a las cepas recombinantes, con el FBA fue posible corroborar que la cepa evolucionada tenía mejoras metabólicas en comparación con la cepa no evolucionada gracias a la ALE. Estas mejoras permitieron que los flujos asociados a las PPP, la glicólisis y el ciclo TCA fueran mayores en la cepa evolucionada en un 12 % y 29 % en promedio durante el consumo de xilosa y manosa, respectivamente. Además, dado que las diferencias observadas entre las cepas evolucionada y no evolucionada se observaron tanto en xilosa como en manosa, y permitió una mayor producción de HA y de biomasa, se infirió que la ALE impactó alguna enzima de la glicólisis.

BIBLIOGRAFÍA

- O. Akinterinwa y P. Cirino. Heterologous expression of d-xylulokinase from *Pichiastipitis* enables high levels of xylitol production by engineered *Escherichia coli* growing on xylose. *Metabolic Engineering*, 11:48–55, 2009.
- D. Alcántara-Díaz, M. Brena-Valle, y J. Serment-Guerrero. Divergent adaptation of *Escherichia coli* to cyclic ultraviolet light exposures. *Mutagenesis*, 19:349354, 2004.
- I. Ansmant y Y. Motorin. Optimisation of expression and purification of the recombinant yol066 (rib2) protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chromatography B*, 786:187–195, 2003.
- S. Atsumi, T. Wu, I. Machado, W. Huang, P. Chen, M. Pellegrini, y J. Liao. Evolution, genomic analysis, and reconstruction of isobutanol tolerance in *Escherichia coli*. *Molecular Systems Biology*, 6:449, 2010.
- M. Aucoin, V. McMurray-Beaulieu, F. Poulin, E. Boivin, J. Chen, F. Ardelean, M. Cloutier, Y. Choi, C. Miguez, y M. Jolicoeur. Identifying conditions for inducible protein production in *E. coli*: combining a fed-batch and multiple induction approach. *Microbial Cell Factories*, 5:27, 2006.
- P. Bajpai. Biorefinery in the pulp and paper industry. *Elsevier*, First edition, 2013.
- S. Becker, A. Feist, M. Mo, G. Hannum, B. Palsson, y M. Herrgard. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the cobra toolbox. *Nature Protocols*, 2:727–738, 2007.
- W. Bentley, N. Mirjalili, D. Andersen, R. Davis, y D. Kompala. Plasmid-encoded protein: the principal factor in the metabolic burden associated with recombinant bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, 35:668–681, 1990.
- A. Bjerre, A. Bjerring, T. Fernqvist, A. Ploger, y A. Skammelsen. Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 49:568–577, 1996.

- I. Blaby, B. Lyons, E. Wroclawska-Hughes, G. Phillips, Pyle. T., S. Chamberlin, S. Benner, T. Lyons, V. Crécy-Lagard, y E. Crécy. Experimental evolution of a facultative thermophile from a mesophilic ancestor. *Applied and Environmental Microbiology*, 78:144–155, 2012.
- B. Bornstein, S. Keating, A. Jouraku, y M. Hucka. Libsbml: An api library for sbml. *Bioinformatics*, 24:880–881, 2008.
- Brenda. The comprehensive enzyme information system. <http://www.brenda-enzymes.org>, consulta: 8 de Noviembre, 2011.
- Business-Chile. La industria forestal de chile. <http://www.businesschile.cl/es/noticia/forestal/la-industria-forestal-de-chile>, consulta: 24 de Junio, 2014.
- Business-Wire. Global hyaluronic acid viscosupplementation market to grow to \$2.4 billion by 2016. <http://technews.tmcnet.com/news/2012/02/28/6150152.htm/>, consulta: 8 de Noviembre, 2011.
- P. Charusanti, T. Conrad, E. Knight, K. Venkataraman, N. Fong, B. Xie, Y. Gao, y B. Palsson. Genetic basis of growth adaptation of *Escherichia coli* after deletion of *pgi*, a major metabolic gene. *PLoS Genetics*, 6:1001186, 2010.
- J. Choi, K. Keum, y S. Lee. Amplifying the cellular reduction potential of *Streptococcus zooepidemicus* production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 100:33–41, 2003.
- T. Conrad, M. Frazier, A. Joyce, B. Cho, E. Knight, N. Lewis, R. Landick, y B. Palsson. Rna polymerase mutants found through adaptive evolution reprogram *Escherichia coli* for optimal growth in minimal media. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107:20500–20505, 2010.
- T. Conrad, N. Lewis, y B. Palsson. Microbial laboratory evolution in the era of genome-scale science. *Molecular Systems Biology*, 7:1–11, 2011.
- T. Cooper, D. Rozen, y R. Lenski. Parallel changes in gene expression after 20,000 generations of evolution in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100:1072–1077, 2003.
- V. Cortínez. Comparación de pretratamientos en residuos forestales para la producción de bioetanol de segunda generación: hidrólisis ácida y líquidos iónicos. *Tesis de Magíster, en Ciencias de la Ingeniería mención Química, Universidad de Chile*, 2010.

- L. Cuervo, J. Folch, y R. Quiroz. Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *Biotecnología*, 13:11–25, 2009.
- E. Dekel y U. Alon. Optimality and evolutionary tuning of the expression level of a protein. *Nature*, 436:588–592, 2005.
- T. Devlin. Bioquímica: Libro de texto con aplicaciones clínicas. *Reverte*, Cuarta Edición. 1.248 páginas, 2004.
- M. Dragosits y D. Mattanovich. Adaptive laboratory evolution principles and applications for biotechnology. *Microbial Cell Factories*, 12:64, 2013.
- M. Dragosits, V. Mozhayskiy, S. Quinones-Soto, J. Park, y I. Tagkopoulos. Evolutionary potential, cross-stress behavior and the genetic basis of acquired stress resistance in *Escherichia coli*. *Molecular Systems Biology*, 9:643, 2013.
- W. Farmer. y J. Liao. Reduction of aerobic acetate production by *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:3205, 1997.
- J. Fasher, T. Laurent, y U. Laurent. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*, 242:27–33, 1997.
- X. Feng, Y. Xu, Y. Chen, y Y. Tang. Integrating flux balance analysis into kinetic models to decipher the dynamic metabolism of *Shewanella oneidensis* mr-1. *PLoS Computational Biology*, 8:1–11, 2012.
- S. Fong, A. Joyce, y B. Palsson. Parallel adaptive evolution cultures of *Escherichia coli* lead to convergent growth phenotypes with different gene expression states. *Genome Research*, 15:1365–1372, 2005.
- S. Frazier, K. Roodhouse, D. Hourcade, y L. Zhang. The quantification of glycosaminoglycans: A comparison of hplc, carbazole, and alcian blue methods. *Open Glycoscience*, 1:31–39, 2008.
- W. Fu, O. Gudmundsson, G. Paglia, G. Herjólfsson, O. Andrésson, B. Palsson, y S. Brynjólfsson. Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. *Applied and Environmental Microbiology*, 97:2395–2403, 2013.
- R. Gonzalez, B. A. Andrews, Molitor & J., y J. A. Asenjo. Metabolic analysis of the synthesis of high levels of intracellular human sod in *Saccharomyces cerevisiae* rhsod 2060 411 sga122. *Biotechnology and Bioengineering*, 82:152–169, 2003.

- H. Goodarzi, B. Bennett, S. Amini, M. Reaves, A. Hottes, y J. Rabinowitz. Tavazoie s: Regulatory and metabolic rewiring during laboratory evolution of ethanol tolerance in *E. coli*. *Molecular Systems Biology*, 6:378, 2010.
- T. Horinouchi, K. Tamaoka, C. Furusawa, N. Ono, S. Suzuki, T. Hirasawa, T. Yomo, y H. Shimizu. Transcriptome analysis of parallel-evolved *Escherichia coli* strains under ethanol stress. *BMC Genomics*, 11:579, 2010.
- R. Ibarra, J. Edwards, y B. Palsson. *Escherichia coli* k-12 undergoes adaptive evolution to achieve in silico predicted optimal growth. *Nature*, 420:186–189, 2002.
- Invitrogen. pbad topo ta expression kit: Five-minute cloning of taq polymerase amplified pcr products for regulated expression in *E. coli*. *United States. Version N. Invitrogen Corporation*, pages 25–196, 2004.
- L. Jiang, S. Li, Y. Hu, Q. Xu, y H. Huang. Adaptive evolution for fast growth on glucose and the effects on the regulation of glucose transport system in *Clostridium tyrobutyricum*. *Biotechnology and Bioengineering*, 109:708–718, 2012.
- P. Jonasson, S. Liljeqvist, P. Nygren, y S. Stahl. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 35:91–105, 2012.
- P. Jones, R. Van Bogelen, y C. Neidhardt. Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, pages 2092–2095, 1987.
- B. Jongsareejit, A. Bhumiratana, M. Morikawa, y S. Kanaya. Cloning of hyaluronan synthase (szhas) gene from streptococcus zooepidemicus in *Escherichia coli*. *Science Asia*, 33:63–69, 2009.
- B. Lavaracka, G. Griffinb, y D. Rodmanc. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. *Biomass and Bioenergy*, 5:5367–5380, 2002.
- D. Lee y B. Palsson. Adaptive evolution of *Escherichia coli* k-12 mg1655 during growth on a nonnative carbon source, l-1,2-propanediol. *Applied and Environmental Microbiology*, 76:4158–4168, 2010.
- S. Lee y H Chang. High cell density cultivation of *Escherichia coli* w using sucrose as a carbon source. *Biotechnology Letters*, 15:971–974, 1993.

- H. Lilie, E. Schwarz, y R. Rudolph. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 9:497–501, 1998.
- L. Liu, Y. Liu, J. Li, G. Du, y J. Chen. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges and perspectives. *Microbial Cell Factories*, 10:99, 2011.
- Z. Mao, Shin H., y R. Chen. A recombinant e. coli bioprocess for hyaluronan synthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 84:389–395, 2007.
- M. Merino, B. Andrews, y J. A. Asenjo. Stoichiometric model and metabolic flux analysis for *Leptospirillum ferrooxidans*. *Biotechnology and Bioengineering*, 107:696–706, 2010.
- Millenium-Research-Group. Global hyaluronic acid market to grow to \$2.5 billion by 2017. <http://mrg.net/News-and-Events/Press-Releases/Hyaluronic-Acid-Market-012813.aspx#sthash.ngV3uOGZ.dpuf/>, consulta: 25 de Junio, 2014.
- J. Minty, A. Lesnefsky, F. Lin, Y. Chen, T. Zaroff, A. Veloso, B. Xie, C. McConnell, R. Ward, y D. Schwartz. Evolution combined with genomic study elucidates genetic bases of isobutanol tolerance in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 10:18, 2011.
- P. Moisset, D. Vaisman, A. Cintolesi, J. Urrutia, I. Rapaport, B. A. Andrews, y J. A. Asenjo. Continuous modeling of metabolic networks with gene regulation in yeast and in vivo determination of rate parameters. *Biotechnology and Bioengineering*, 109:2325–2339, 2012.
- L. Notley-McRobb y T. Ferenci. The generation of multiple co-existing malregulatory mutations through polygenic evolution in glucose-limited populations of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1:45–52, 1999.
- Novagen. pet system manual. *TB055 10th Edition Rev. B0403. Estados Unidos-Canadá-Alemania-Reino Unido. EMD Biosciences, Inc.*, pages 1–68, 2003.
- Novagen. Competent cells: User protocol. *TB009 Rev. F0104. Estados Unidos-Canadá-Alemania-Reino Unido. EMD Biosciences, Inc.*, pages 1–23, 2004.
- Novagen. Wizard genomic dna purification kit. *Technical Manual TM050, Part 9FB022. Estados Unidos-Canadá-Alemania-Reino Unido.*, 2010.
- K. Ohgrena, R. Burab, J. Saddlerb, y G. Zacchia. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. *Bioresource Technology*, 98:2503–2510, 2007.

- J. Orth, T. Conrad, J. Na, J. Lerman, H. Nam, A. Feist, y B. Palsson. A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism-2011. *Molecular Systems Biology*, 7:1–9, 2011.
- B. Palsson. Adaptive laboratory evolution. *Microbe*, 6:2, 2011.
- R. Parés y A. Juárez. Bioquímica de los microorganismos. *Editorial Reverte*, page 404 páginas, 1997.
- B. Pope y H. Kent. High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 24:536–537, 1996.
- V. Portnoy, M. Herrgard, y B. Palsson. Aerobic fermentation of d-glucose by an evolved cytochrome oxidase-deficient *Escherichia coli* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 74:7561–7569, 2008.
- V. Portnoy, D. Bezdán, y K. Zengler. Adaptive laboratory evolution - harnessing the power of biology for metabolic engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 22:590–594, 2011.
- S. Quan, J. Ray, Z. Kwota, T. Duong, G. Balázsi, T. Cooper, y R. Monds. Adaptive evolution of the lactose utilization network in experimentally evolved populations of *Escherichia coli*. *PLoS Genetics*, 8:1002444, 2012.
- L. Reyes, M. Almario, J. Winkler, M. Orozco, y K. Kao. Visualizing evolution in real time to determine the molecular mechanisms of n-butanol tolerance in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 14:579–590, 2012.
- M. Riehle, A. Bennett, R. Lenski, y A. Long. Evolutionary changes in heatinducible gene expression in lines of *Escherichia coli* adapted to high temperature. *Physiological Genomics*, 14:47–58, 2003.
- R. Rogers y K. Seddon. Ionic liquids-solvents of the future? *Science*, 302:792–793, 2003.
- G. Rosano y E. Ceccarelli. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5:1–17, 2014.
- B. Rudolph, K. Gebendorfer, J. Buchner, y J. Winter. Evolution of *Escherichia coli* for growth at high temperatures. *Journal of Biological Chemistry*, 285:19029–19034, 2010.
- S. Sahdev, S. Khattar, y K. Saini. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 307:249–264, 2008.

- J. Schellenberger, R. Que, R. Fleming, I. Thiele, J. D. Orth, A. Feist, D. Zielinski, A. Bordbar, N. Lewis, S. Rahmanian, J. Kang, D. Hyduke, y B. Palsson. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the cobra toolbox v2.0. *Nature Protocols*, 6:1290 – 1307, 2011.
- A. Schulz y W. Schumann. hrca, the first gene of the *Bacillus subtilis* dnaK operon encodes a negative regulator of class i heat shock genes. *Journal of Bacteriology*, 178:1088, 1996.
- G. Sezonov, D. Joseleau-Petit, y R. D’Ari. Escherichia coli physiology in luria-bertani broth. *Journal of Biochemistry*, 35:368–370, 2007.
- Shodex. Hyaluonic acid was analyzed using ohpak sb805 hq. <http://www.shodex.net/index.php?seitenid=1&applic=134y/>, consulta: 10 de Julio, 2014.
- S. Sleight y R. Lenski. Evolutionary adaptation to freeze-thaw-growth cycles in *Escherichia coli*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 80:370–385, 2007.
- D. Stoebel, K. Hokamp, M. Last, y C. Dorman. Compensatory evolution of gene regulation in response to stress by *Escherichia coli* lacking rpos. *PLoS Genetics*, 5:1000671, 2009.
- B. Stolz, M. Huber, Z. Markovic-Housley, y Ernis B. The mannose transporter of *Escherichia coli*. structure and function of the iiab subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 268:27094–27099, 1993.
- Bitter T. y Muir H. A modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical Biochemistry*, 4:330–334, 1962.
- R. Taylor, D. Walker, y R. McInnes. *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid dna preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Res.*, 21:1677–1678, 1993.
- O. Tenaillon, A. Rodríguez-Verdugo, R. Gaut, P. McDonald, A. Bennett, Long. A., y B. Gaut. The molecular diversity of adaptive convergence. *Metabolic Engineering*, 335:457–461, 2012.
- A. Varki, R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, P. Stanley, C. Bertozzi, G. Hart, y M. Etzle. Essentials of glycobiology. *Cold Spring Harbor (NY)*, 2nd edition, 1999.
- T. Vuletić, S. Dolanski, T. Ivek, Grgicin D., y S. Tomić. Structure and dynamics of hyaluronic acid semidilute solutions: a dielectric spectroscopy study. *Physical Review E*, 82, 2010.
- A. Wang. Pharmaceutical grade hyaluronis acid will reach 800 million u.s. dollars global market. <http://www.ideamarketers.com/>, consulta: 25 de Junio, 2012.

- C. Weikert, U. Sauer, y J. Bailey. Use of a glycerol-limited, long-term chemostat for isolation of *Escherichia coli* mutants with improved physiological properties. *Microbiology*, 143:1567–1574, 1997.
- T. Yamada y T. Kawasaki. microbial synthesis of hyaluronan and chitin: New approaches. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99:521–528, 2005.
- T. Yamazaki, W. Lee, C. Arrowsmith, D. Muhandiram, y L. Kay. A suite of triple resonance nmr experiments for the backbone assignment of ^{15}n , ^{13}c , ^2h labeled proteins with high sensitivity. *Journal of the American Chemical Society*, 26:11655–11666, 1994.
- H. Yu y G. Stephanopoulos. Metabolic engineering of *Escherichia coli* biosynthesis of hyaluronic acid. *Metabolic Engineering*, 10:24–32, 2008.

A.1 Cepas

A.1.1 *Escherichia coli Top10*

La cepa *E. coli Top10* consiste en una *E. coli DH5 α* que posee ciertos atributos adicionales que permiten una transformación más eficiente. Es comúnmente utilizada para la expresión *in vivo* de genes foráneos. La cepa *DH5 α* consiste en una *E. coli* que ha sido modificada para que pueda ser transformada eficientemente y sea apta para procedimientos de ADN recombinante. Estas características son (Taylor et al., 1993):

- ◊ La mutación endA1 inactiva las endonucleasas intracelulares que degradan el ADN plasmidial.
- ◊ La mutación hsdR17 elimina la endonucleasa del sistema de modificación de restricción EcoKI, por lo que el ADN que no posee la metilación EcoKI no es degradado.
- ◊ $\Delta\Delta(\text{lacZ})\text{M15}$ corresponde a la ausencia del alelo del aceptor alfa necesario para diferenciar las colonias que poseen el inserto de interés (blancas) de las que no lo tienen (azules).
- ◊ La mutación recA1 elimina la recombinación homóloga. Esto impide la delección del gen de interés y la multimerización del plasmidio.
- ◊ La mutación glnV44 permite que no se produzcan las mutaciones amber.

Las características adicionales de las *E. coli Top10* son (Novagen, 2004):

- ◊ La mutación hsdR para la eficiente transformación de ADN no metilado desde amplificaciones mediante PCR.
- ◊ La mutación mcrA para la eficiente transformación de ADN genómico metilado.

Genotipo: F- mcrA $\Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC})$ $\phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M15}$ $\Delta\text{lac?74}$ recA1 araD139 $\Delta(\text{ara-leu})$ 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG λ -.

A.1.2 *E. coli Rosetta (DE3)*

Derivada de la cepa *E. coli BL21*, la *E. coli Rosetta (DE3)* es una bacteria diseñada para la expresión de proteínas que contienen codones cuyo uso es poco frecuente en *E. coli*. Esta cepa provee tARNs para la traducción de 7 codones (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC y CGG) en un plasmidio compatible resistente a cloranfenicol (cam). El *DE3* indica que esta bacteria posee una copia cromosomal del gen de la ARN Polimerasa T7 controlado por un promotor lacUV5, por lo que la expresión de este gen es inducida por IPTG. Esta cepa es adecuada para la producción de proteínas cuyo gen esta clonado en un vector pET (Novagen, 2004). Para más detalles de este mecanismo ir a la sección 1.2.2 (pET22).

Genotipo: F-ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3) pRARE2 (CamR).

A.2 Vectores

A.2.1 Vector de expresión pET22

El vector de expresión pET22 es un vector de bajo número de copias (≈ 40 copias por bacteria) y posee como marcador de selección un gen que confiere resistencia a ampicilina. Además, la expresión del gen de interés se encuentra bajo el promotor T7lac que es inducible por IPTG. Por esto el uso de este vector necesita de un huésped que exprese la ARN Polimerasa T7, como las *E. coli (DE3)*, en particular la *Rosetta (DE3)*. Un esquema de lo anterior se muestra en la Figura A.1.

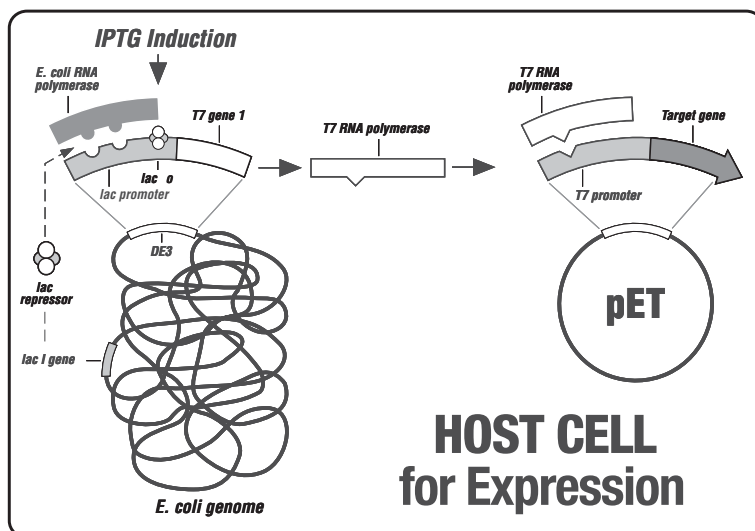


Figura A.1: Esquema del sistema de control del promotor T7 Lac. La inducción por IPTG permite la transcripción de T7 ARN Polimerasa, la que transcribe el gen de la proteína recombinante de interés, bajo la inducción del mismo compuesto, IPTG (Novagen, 2003).

La secuencia de este vector y sus características se pueden ver en la Figura A.2.

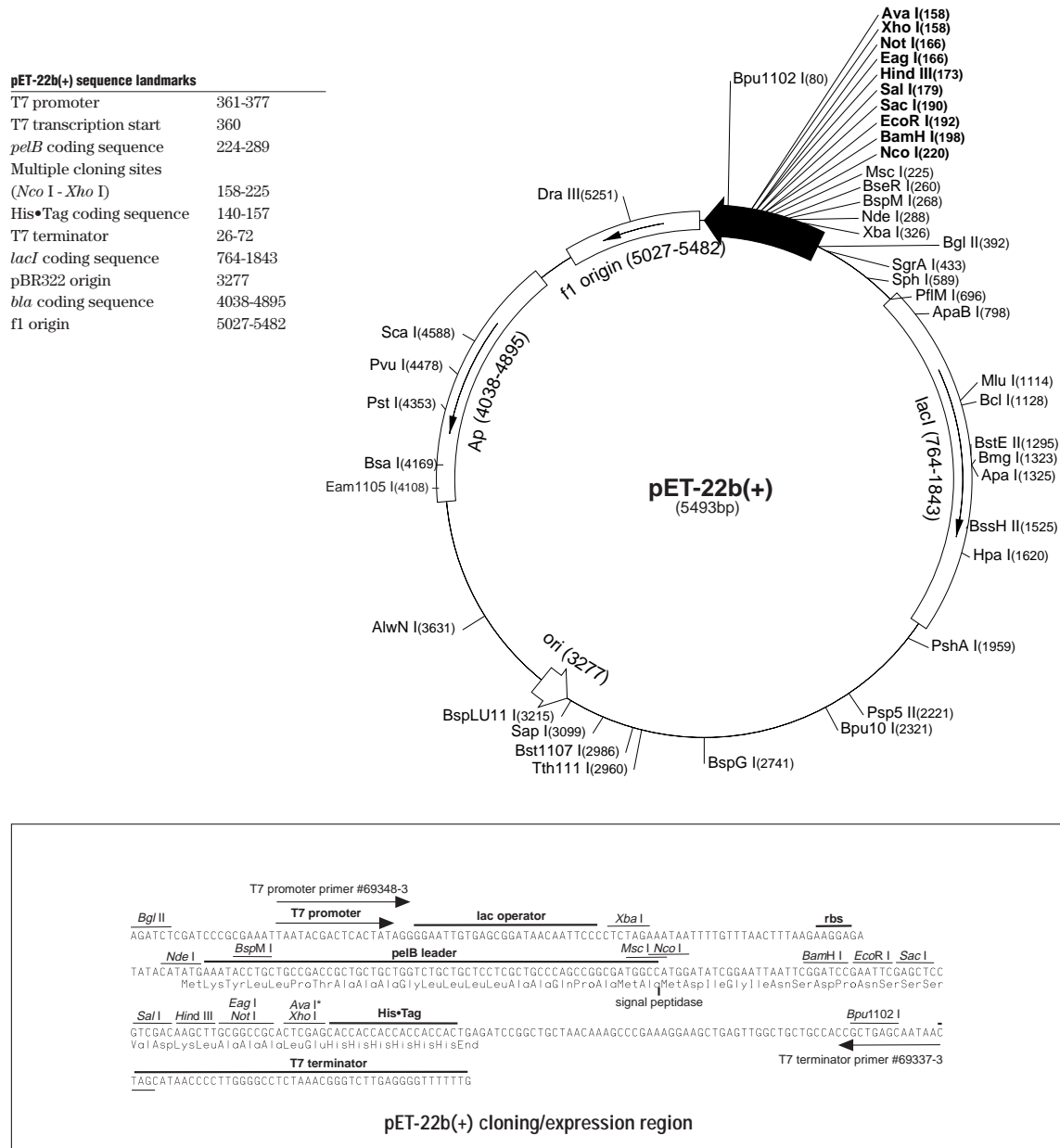


Figura A.2: Vector de expresión pET22 (Novagen, 2003).

A.2.2 Vector de expresión pBAD y su versión pMBAD

El vector de expresión pBAD de 4, Kb que contiene el promotor *araBAD*, el que es inducido por L-arabinosa y el gen *araC* para dicho proceso. Posee un sitio de unión de ribosomas optimizado, ATG como codón de inicio y un sitio de multiclonamiento. Tiene las secuencias para adición de

polihistidinas (6X His Tag). Estas y más características se pueden observar en la imagen del plasmidio en la Figura A.3.

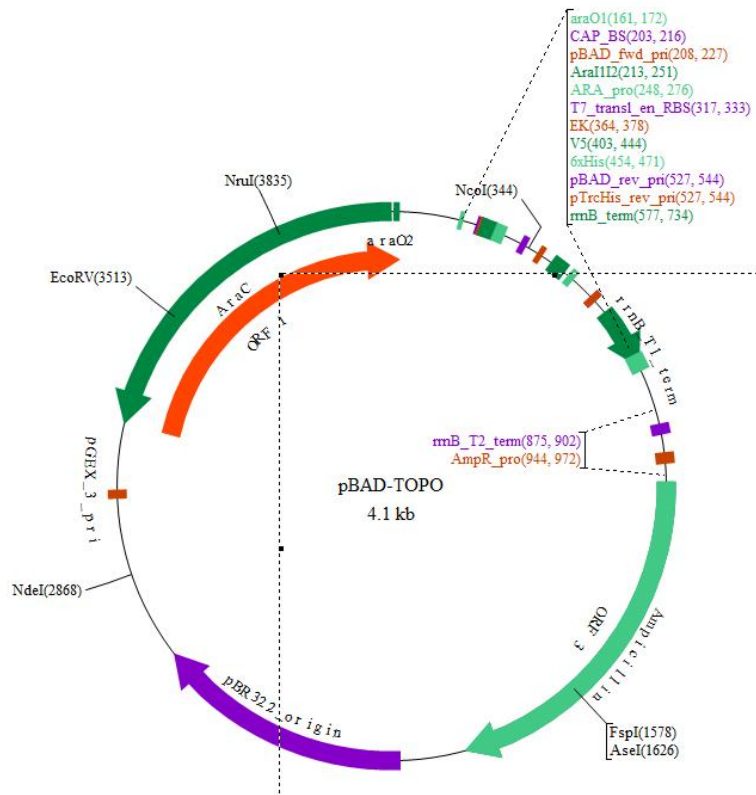


Figura A.3: Esquema del vector pBAD (Invitrogen, 2004).

A este vector se le hicieron numerosas modificaciones: incorporación de un fragmento de 62 bases con el sitio de multiclonamiento XbaI-BamHI-StuI-KpnI-SacI-EcoRI-HindIII, delección de los sitios de reconocimiento a la enteroquinasa, de clonamiento TOPO y la secuencia epítopo V5. Este vector fue llamado finalmente pMBAD (Yu y Stephanopoulos, 2008). La secuencia de este vector se encuentra en el Anexo B.

SECUENCIAS GÉNICAS Y SECUENCIACIÓN**B.1 Vector pMBAD**

La secuencia del vector pMBAD se muestra a continuación: 4.086 pb

```
TCTAGAGCGA AGGCCTTCCG GTACCGAACG AGCTCGGAGG AATTCTCCCA AGCTTCGGTC ATCATCACCA TCACCATTGA
GTTTAAACGG TCTCCAGCTT GGCTGTTTTG GCGGATGAGA GAAGATTTTC AGCCTGATAC AGATTAAATC AGAACGCAGA
AGCGGTCTGA TAAAACAGAA TTTGCCTGGC GGCAGTAGCG CGGTGGTCCC ACCTGACCCC ATGCCGAACT CAGAAAGTGAA
ACGCCGTAGC GCCGATGGTA GTGTGGGGTC TCCCCATGCG AGAGTAGGGA ACTGCCAGGC ATCAAATAAA ACGAAAGGCT
CAGTCGAAAG ACTGGGCCTT TCGTTTTATC TGTTGTTTGT CGGTGAACGC TCTCCTGAGT AGGACAAATC CGCCGGGAGC
GGATTTGAAC GTTGCGAAGC AACGGCCCCG AGGGTGGCGG GCAGGACGCC CGCCATAAAC TGCCAGGCAT CAAATTAAGC
AGAAGGCCAT CCTGACGGAT GGCCTTTTTG CGTTTCTACA AACTCTTTTT GTTTATTTTT CTAATACAT TCAAATATGT
ATCCGCTCAT GAGACAATAA CCCTGATAAA TGCTTCAATA ATATTGAAAA AGGAAGAGTA TGAGTATCA ACATTTCCGT
GTCGCCCTTA TTCCCTTTTT TCGCGCATT TGCCTTCTG TTTTGTCTCA CCCAGAAACG CTGGTGAAAG TAAAAGATGC
TGAAGATCAG TTGGGTGCAC GAGTGGGTTA CATCGAAGT GATCTCAACA GCGGTAAGAT CTTGAGAGT TTTGCCCCCG
AAGAACGTTT TCCAATGATG AGCACTTTTA AAGTTCGTCT ATGTGGCGCG GTATTATCCC GTGTGACGC CGGGCAAGAG
CAACTCGGTC GCCGCATACA CTATTCTCAG AATGACTTGG TTGAGTACTC ACCAGTCACA GAAAAGCATC TTACGGATGG
CATGACAGTA AGAGAATTAT GCAGTGCTGC CATAACCATG AGTGATAACA CTGCGGCCAA CTACTTCTG ACAACGATCG
GAGGACCGAA GGAGCTAACC GCTTTTTTGC ACAACATGGG GGATCATGTA ACTCGCCTTG ATCGTTGGGA ACCGGAGCTG
AATGAAGCCA TACCAAACGA CGAGCGTGAC ACCACGATGC CTGTAGCAAT GGCAACAACG TTGCGCAAAC TATTAAGTGG
CGAACTACTT ACTCTAGCTT CCCGGCAACA ATTAATAGAC TGGATGGAGG CGGATAAAGT TGCAGGACCA CTTCTGCGCT
CGGCCCTTCC GGCTGGCTGG TTTATTGCTG ATAAATCTGG AGCCGGTGAG CGTGGGTCTC GCGGTATCAT TGCAGCACTG
GGGCCAGATG GTAAGCCCTC CCGTATCGTA GTTATCTACA CGACGGGGAG TCAGGCAACT ATGGATGAAC GAAATAGACA
GATCGCTGAG ATAGGTGCCT CACTGATTAA GCATTGGTAA CTGTCAGACC AAGTTTACTC ATATATACTT TAGATTGATT
TAAAACCTTA TTTTAAATTT AAAAGGATCT AGGTGAAGAT CCTTTTTGAT AATCTCATGA CAAAATCCC TTAACGTGAG
TTTTCGTTCC ACTGAGCGTC AGACCCCGTA GAAAAGATCA AAGGATCTTC TTGAGATCCT TTTTTCTGC GCGTAATCTG
CTGCTTGCAA AAAAAAAAAAC CACCGCTACC AGCGGTGGTT TGTTTGCCGG ATCAAGAGCT ACCAACTCTT TTTCCGAAGG
TAACTGGCTT CAGCAGAGCG CAGATACCAA ATACTGTCT TCTAGTGTAG CCGTAGTTAG GCCACCACTT CAAGAAGTCT
GTAGCACCGC CTACATACCT CGCTCTGCTA ATCCTGTTAC CAGTGGCTGC TGCCAGTGGC GATAAGTCGT GTCTTACCGG
GTTGGACTCA AGACGATAGT TACCGGATAA GCGCAGCGG TCGGGTGAA CGGGGGGTTT GTGCACACAG CCCAGCTTGG
AGCGAACGAC CTACACCGAA CTGAGATACC TACAGCGTGA GCTATGAGAA AGCGCCACGC TTCCCGAAGG GAGAAAGGCG
```

GACAGGTATC CGGTAAGCGG CAGGGTCGGA ACAGGAGAGC GCACGAGGGA GCTTCCAGGG GGAAACGCCT GGTATCTTTA
TAGTCCTGTC GGGTTTCGCC ACCTCTGACT TGAGCGTCGA TTTTGTGAT GCTCGTCAGG GGGGGGAGC CTATGGAAAA
ACGCCAGCAA CGCGGCCTTT TTACGGTTC TGGCCTTTTG CTGGCCTTTT GCTCACATGT TCTTTCCTGC GTTATCCCT
GATTCTGTGG ATAACCGTAT TACCGCCTTT GAGTGAGCTG ATACCGCTCG CCGCAGCCGA ACGACCGAGC GCAGCGAGTC
AGTGAGCGAG GAAGCGGAAG AGCGCTGAT GCGGTATTTT CTCCTTACGC ATCTGTGCGG TATTTACAC CGCATATGGT
GCACTCTCAG TACAATCTGC TCTGATGCCG CATAGTTAAG CCAGTATACA CTCCGCTATC GCTACGTGAC TGGGTCAATG
CTGCGCCCCG ACACCCGCCA ACACCCGCTG ACGCGCCCTG ACGGGCTTGT CTGCTCCCGG CATCCGCTTA CAGACAAGCT
GTGACCGTCT CCGGGAGCTG CATGTGTCAG AGGTTTTTAC CGTCATCACC GAAACGCGCG AGGCAGCAGA TCAATTCGGC
CGCGAAGGCG AAGCGGCATG CATAATGTGC CTGTCAAATG GACGAAGCAG GGATTCTGCA AACCCATGC TACTCCGTCA
AGCCGTCAAT TGTCTGATTC GTTACCAATT ATGACAACTT GACGGCTACA TCATTCACCT TTTCTTCACA ACCGGCACGG
AACTCGCTCG GGCTGGCCCC GGTGCATTTT TTAATATCCC GCGAGAAATA GAGTTGATCG TCAAAACCAA CATTGCGACC
GACGGTGGCG ATAGGCATCC GGGTGGTGCT CAAAAGCAGC TTCGCCTGGC TGATACGTTG GTCCTCGCGC CAGCTTAAGA
CGCTAATCCC TAACTGCTGG CGGAAAAGAT GTGACAGACG CGACGGCGAC AAGCAAACAT GCTGTGCGAC GCTGGCGATA
TCAAAATTGC TGTCTGCCAG GTGATCGCTG ATGTACTION AAGCCTCGCG TACCCGATTA TCCATCGGTG GATGGAGCGA
CTCGTTAATC GCTTCCATGC GCCGCAGTAA CAATTGCTCA AGCAGATTTA TCGCCAGCAG CTCCGAATAG CGCCCTTCCC
CTTGCCCGCG GTTAATGATT TGCCCAAACA GGTCGCTGAA ATGCGGCTGG TCGCTTCAT CCGGGCGAAA GAACCCCGTA
TTGGCAAATA TTGACGGCCA GTTAAGCCAT TCATGCCAGT AGGCGCGCGG ACGAAAGTAA ACCCACTGGT GATACCATTC
GCGAGCCTCC GGATGACGAC CGTAGTGATG AATCTCTCCT GCGGGGAACA GCAAATATC ACCCGGTCGG CAAACAAAT
CTCGTCCCTG ATTTTTCACC ACCCCCTGAC CGCGAATGGT GAGATTGAGA ATATAACCTT TCATTCCCAG CGGTCCGTCC
ATAAAAAAT CGAGATAACC GTTGGCCTCA ATCGGGCTTA AACCCGCCAC CAGATGGGA TTAAACGAGT ATCCGGCAG
CAGGGGATCA TTTTGGCCTT CAGCCATACT TTTCACTC CCGCCATTCA GAGAAGAAAC CAATTGTCCA TATTGCATCA
GACATTGCCG TCACTGCGTC TTTTACTGGC TCTTCTCGCT AACCAAACCG GTAACCCCGC TTATTAAG CATTCTGTAA
CAAAGCGGGA CCAAAGCCAT GACAAAAACG CGTAACAAAA GTGTCTATAA TCACGGCAGA AAAGTCCACA TTGATTATTT
GCACGGCGTC ACACCTTGCT ATGCCATAGC ATTTTATCC ATAAGATTAG CGGATCCTAC CTGACGCTTT TTATCGCAAC
TCTCTACTGT TTCTCCATAC CCGTTTTTTG GGCTAGAAAT AATTTGTTT AACTTTAAGA AGGAGATATA CATACCCATG

B.2 Gen HasA de de *Streptococcus equisimilis*

TTTATCTAAA TATGTATCTA TTTGGAACAT CAACTGTAGG AATTTATGGA GTAATATTAA TAACCTATCT AGTTATTAAA
CTTGATTAT CTTTCCTTTA TGAGCCATTT AAAGGAAAGC CACATGACTA TAAAGTTGCT GCTGTAATTC CTTCTTATAA
TGAAGATGCC GAGTCATTAT TAGAACTCT TAAAAGTGTG TTAGCACAGA CCTATCCGTT ATCAGAAATT TATATTGTTG
ATGATGGGAG TTCAAACACA GATGCAATAC AATTAATTGA AGAGTATGTA AATAGAGAAG TGGATATTTG TCGAAACGTT
ATCGTTCACC GTTCCCTTGT CAATAAAGGA AAACGCCATG CTCAAGCGTG GGCATTTGAA AGATCTGACG CTGACGTTTT
TTTAAACGTA GATTCAGATA CTTATATCTA TCCAAATGCC TTAGAAGAAC TCCTAAAAAG CTTCAATGAT GAGACGTTTT
ATGCTGCAAC AGGACATTTG AATGCTAGAA ACAGACAAAC TAATCTATTA ACGCGACTTA CAGATATCCG TTACGATAAT
GCCTTTGGGG TGGAGCGTGC TGCTCAATCA TTAACAGGTA ATATTTAGT TTGCTCAGGA CCATTGAGTA TTTATCGACG

TGAAGTGATT ATTCCTAACT TAGAGCGCTA TAAAAATCAA ACATTCCTAG GTTTACCTGT TAGCATTGGG GATGATCGAT
 GTTTAACAAA TTATGCTATT GATTTAGGAC GCACTGTCTA CCAATCAACA GCTAGATGTG ATACTGATGT ACCTTTCCAA
 TAAAAAGTT ATTTAAAGCA ACAAATCGA TGGAATAAAT CTTTTTTTAA AGAATCTATT ATTTCTGTTA AAAAAATCT
 TTCTAATCCC ATCGTTGCCT TATGGACTAT TTTGGAAGTC GTTATGTTTA TGATGTTGAT TGTCGCAATT GGAATCTTT
 TGTTTAATCA AGCTATTCAA TTAGACCTTA TAAACTTTT TGCCTTTTAA TCCATCATCT TTATCGTTGC TTTATGTCGT
 AATGTTTCATT ATATGATCAA ACATCCTGCT AGTTTTTTGT TATCTCCTCT GTATGGAATA TTACTTGT TTGTCTTACA
 GCCCCTAAAA CTTTATTCTT TATGCACCAT TAAAAATACG GAATGGGGAA CACGTAAAAA GGTCCTATT TTAAATAA

B.3 Gen HasA de *Streptococcus pyogenes* y Partidores

- ◇ Partidores para el primer PCR (para generar el fragmento para clonación)

Dirección 5'-3'

- Primer forward: SPHasAfwr
 GAATATCGAGGTCCCTGTCTTTCAAGG
 $T_m = 59,7 \text{ }^\circ\text{C}$
 No forma estructuras secundarias

- Primer reverse: SPHasArev
 TCCAACATATCCTGATCCAGCAACTGC
 $T_m = 59,7 \text{ }^\circ\text{C}$
 No forma estructuras secundarias

- ◇ Partidores para el segundo PCR (para generar el fragmento para expresión)

Dirección 5'-3'

- Primer forward: HasAfwr
 GCC **CATATG**CCTATTTTAAAAAACTTTAATTGTTTTATCCT
 $T_m = 54,2 \text{ }^\circ\text{C} / 59,8 \text{ }^\circ\text{C}$
 Sí forma estructuras secundarias
 Sitio de restricción: **NdeI**

- Primer reverse: HasArev
CTCGAGTTATTTAAAAATAGTGACCTTTTACGTGTTC
 $T_m = 54,1 \text{ }^\circ\text{C} / 60,2 \text{ }^\circ\text{C}$
 Sí forma estructuras secundarias
 Sitio de restricción: **XhoI**

Se hicieron nuevos partidores ya que los anteriores no tenían suficientes bases en el extremo 5' para la correcta actividad de las enzimas de restricción.

- o Partidor forward: HasAfwr2

GAGGTGTG **CATATG** CCTATTTTTTAAAAAACTTTAATTG

T_m : 67,4 °C / 69,4 °C

Sitio de restricción: **NdeI**

- o Partidor forward: HasArev2

TCGATG **CTCGAG** TTATTTAAAAATAGTGACCTTTTTA

T_m : 65,1 °C / 69 °C

Sitio de restricción: **XhoI**

Cursivas: No se aparean con secuencia del gen. El efecto es que la T_m de los primeros 5 ciclos es menor que la T_m de los siguientes ciclos.

A continuación se encuentra la secuencia del gen HasA destacada en rojo. En verde y amarillo están destacados los partidores o la secuencia complementaria dentro de la secuencia del gen. En verde los partidores para generar el fragmento de clonación y en amarillo los partidores para generar el fragmento para la expresión.

TTTATTA AAA ATATTTCTAT GACTAGTTGA CATTACCCCT TATTTATATT **AGAATATCGA** **GGTCCTGTC TTTCAAGG** AA
 ATTA AAAAAG AAAGAGGTGT AATTG **TGCCT ATTTTTAAAA AAACCTTAAT TGTTTTATCC T** TTATTTTTT TGATATGTAT
 CTGATTTAT CTA AATATGT ATCTATTTGG AACATCAACT GTAGGAATTT ATGGAGTAAT ATTAATAACC TATCTAGTTA
 TTA AACTTGG ATTATCTTTC CTTTATGAGC CATTAAAGG AAAGCCACAT GACTATAAAG TTGCTGCTGT AATTCCTTCT
 TATAATGAAG ATGCCGAGTC ATTATTAGAA ACTCTTAAAA GTGTGTTAGC ACAGACCTAT CCGTTATCAG AAATTTATAT
 TGTTGATGAT GGGAGTTCAA ACACAGATGC AATACAATTA ATTGAAGAGT ATGTAAATAG AGAAGTGGAT ATTTGTCGAA
 ACGTTATCGT TCACCGTTCC CTTGTCAATA AAGGAAAACG CCATGCTCAA GCGTGGGCAT TTGAAAGATC TGACGCTGAC
 GTTTTTTTAA CCGTAGATTC AGATACTTAT ATCTATCCAA ATGCCTTAGA AGAACTCCTA AAAAGCTTCA ATGATGAGAC
 AGTTTATGCT GCAACAGGAC ATTTGAATGC TAGAAACAGA CAACTAATC TATTAACGCG ACTTACAGAT ATCCGTTACG
 ATAATGCCTT TGGGGTGGAG CGTGCTGCTC AATCATTAAC AGGTAATATT TTAGTTTGCT CAGGACCATT GAGTATTTAT
 CGACGTGAAG TGATTATTCC TAACTTAGAG CGCTATAAAA ATCAAACATT CCTAGGTTTA CCTGTTAGCA TTGGGGATGA
 TCGATGTTTA ACAAATTATG CTATTGATTT AGGACGCACT GTCTACCAAT CAACAGCTAG ATGTGATACT GATGTACCTT
 TCCAATTA AAAGTTATTTA AAGCAACAAA ATCGATGGAA TAAATCTTTT TTAAAGAAT CTATTATTTT TGTTAAAAA
 ATTCTTTCTA ATCCCATCGT TGCCTTATGG ACTATTTTCG AAGTCGTTAT GTTTATGATG TTGATTGTCG CAATTGGGAA
 TCTTTTGT TT AATCAAGCTA TTCAATTAGA CTTTATTA AAA CTTTTGCT TTTTATCCAT CATCTTATC GTTGCTTTAT
 GTCGTAATGT TCATTATATG ATCAAACATC CTGCTAGTTT TTTGTTATCT CCTCTGTATG GAATATTACA CTGTTTGTGTC

TTACAGCCCC TAAAACTTTA TTCTTTATGC ACCATTAAAA ATACGGAATG GG GAACACGTAAAAAGGTCA CTATTTTAA ATAA TATGTG
CATCGAGTAG TTAGAGAAGG AGTAATTTTA TGAAAATA GC AGTTGCTGGATCAGGATATG TTGGA TTATC

B.4 Secuenciación

Para mandar a secuenciar vectores se envía una muestra de 20 μL del producto de miniprep a MacroGen junto con la información de qué partidores (y sus secuencias) utilizar para dicha secuenciación. Los partidpres utilizados varían segun el plasmidio utilizado. En general se utilizan partidores genéricos. En este trabajo se usaron los siguientes partidores:

- ◇ Vector pET22: T7 forward y T7 terminator
- ◇ Vectop pMBAD: pBAD forward y pBAD reverse

APLICACIONES DEL ÁCIDO HIALURÓNICO

C.1 Aplicaciones del HA en la medicina

- ◇ Prevención de adhesiones post–operatorias en cirugías abdominal y pélvica
- ◇ Varias aplicaciones en las cirugías oculares y durante el periodo post-operatorio
- ◇ Sustituto de humor vítreo
- ◇ Lubricante fisiológico
- ◇ Tratamiento de la artritis
- ◇ Tratamiento del dolor para la osteoartritis
- ◇ Tratamiento de la piel seca y escamosa durante la xerosis y la dermatitis atópica
- ◇ Medicina regenerativa (reparación de tejido principalmente en tratamientos post–operatorios)
- ◇ Curación de heridas (principalmente en heridas crónicas producidas por la diabetes)
- ◇ Marcador de tumores (cáncer de prótata y de mamas)
- ◇ Mediador de la respuesta inmunológica (inductor de la respuesta inflamatoria)

C.2 Aplicaciones del HA en la cosmética

- ◇ Eliminació de arrugas (inyecciones para rellenar tejidos blandos)
- ◇ Aumento de labios
- ◇ Remoción de cicatrices
- ◇ Hidratación de la piel (proliferación de queratinocitos y síntesis de colágeno)

SOLUCIONES STOCK Y BUFFERS**D.1 Stock Ampicilina (amp)**

Para obtener un stock de ampicilina de 100 mg/mL se disuelven 100 mg de este antibiótico en 1 mL de agua Milli-Q. Posteriormente se esteriliza mediante filtración con jeringa y filtro milipore guardándolo en un tubo anteriormente esterilizado. Conservar a -20 °C.

D.2 Stock Cloranfenicol (cam)

Para obtener un stock de cloranfenicol de 100 mg/mL se disuelven 100 mg de este antibiótico en 1 mL de agua Milli-Q. Posteriormente se esteriliza mediante filtración con jeringa y filtro milipore guardándolo en un tubo anteriormente esterilizado. Conservar a -20 °C.

D.3 Stock IPTG 0,5 M

Para obtener un stock de IPTG 0,5 M se disuelven 119,19 mg de IPTG (PM 238,3 g/mol) en 1 mL de agua Milli-Q. Posteriormente se esteriliza mediante filtración con jeringa y filtro milipore guardándolo en un tubo anteriormente esterilizado. Conservar a -20 °C.

D.4 Stock L-arabinosa 0,1 M

Para obtener un stock de L-ara de 100 mg/ml se disuelven 100 mg de L-ara en 1 mL de agua Milli-Q. Posteriormente se esteriliza mediante filtración con jeringa y filtro milipore guardándolo en un tubo anteriormente esterilizado. Conservar a -20 °C.

D.5 Stock ADN genómico (gADN)

Los 5 μg de ADN genómico de *Streptococcus pyogenes* *MIGAS* fueron diluidos en 20 μL de Tris 10 mM estéril, pH 7. Se obtuvo una solución de una concentración de 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. La solución anterior se diluyó 10 y 100 veces. Conservar a -20 °C.

Stock 1: 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Stock 2: 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Stock 3: 2,5 $\text{ng}/\mu\text{L}$

D.6 Stock dNTPs

Se hizo una solución con 1 μL de cada dNTP (dATP, dTDP, dCTP y dGTP) de una concentración 1 M y se completó un volumen de 100 μL con agua Milli-Q, logrando una concentración final de 10 mM. Conservar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

D.7 Stock Partidores

SPHasArev: 31 nm con 155 μL de agua Milli-Q se obtuvo una solución 200 μM .

SPHasAfwr: 25,4 nm con 127 μL de agua Milli-Q se obtuvo una solución 200 μM .

HasArev: 33,3 nm con 166,5 μL de agua Milli-Q se obtuvo una solución 200 μM .

HasAfwr: 32,5 nm con 162,5 μL de agua Milli-Q se obtuvo una solución 200 μM .

HasAfwr2: 41,5 nm con 207,5 μL de agua Milli-Q se obtuvo una solución 200 μM .

Para obtener una solución de stock de una concentración 10 μM de tomaron 10 μL y se agregaron 190 μL de agua Milli-Q para cada uno de los partidores. Conservar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

D.8 Stock Glicerol

En un tubo Eppendorf de 1,5 mL estéril se vierten 250 μL de cultivo y 750 μL de glicerol 80 % para hacer un stock glicerol de 1 mL de células. Conservar a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

D.9 Stock BSA 10X

En un tubo Eppendorf de 0,6 mL estéril se vierten 10 μL de BSA 100X y 90 μL de agua estéril. Conservar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

D.10 Buffer Tris 10 mM

Para preparar 100 mL del buffer se diluyeron 0,121 g de Tris en 100 mL de agua Milli-Q. Se ajustó el pH en 7,5 con HCl. Posteriormente el buffer fue autoclavado para su esterilización. Conservar a temperatura ambiente.

D.11 Glicerol 10 %

Para preparar 1 L del glicerol 10 % se disuelven 100 mL de glicerol en 900 mL de agua Milli-Q. Posteriormente la solución fue autoclavada para su esterilización. Conservar a temperatura ambiente.

D.12 Solución 0.1 M CaCl₂

Para preparar 1 L del Solución 0,1 M CaCl₂ se disuelven 17,4 mg de CaCl₂*2H₂O en 1 L de agua Milli-Q. Posteriormente la solución fue autoclavada para su esterilización. Conservar a temperatura ambiente.

D.13 Solución 0,1 M CaCl₂ / 15 % Glicerol

Para preparar 1 L del Solución 0,1 M CaCl₂ / 15 % Glicerol se disuelven 17,4 mg de CaCl₂*2H₂O en 850 mL de agua Milli-Q y 150 mL de glicerol. Posteriormente la solución fue autoclavada para su esterilización. Conservar a temperatura ambiente.

D.14 Buffer Fosfato de Sodio pH 7,2

Para preparar 200 mL del buffer se diluyeron 5,126 g de disodium hydrogen orthophosphate y 1,546 g de sodium dihydrogen orthophosphate en agua Milli-Q hasta completar los 200 mL. Se ajustó el pH en 7,2 con HCl y NaOH. Posteriormente el buffer fue autoclavado para su esterilización. Conservar a temperatura ambiente.

D.15 Buffer Fosfato de Sodio Urea 8 M

Para preparar 100 mL del buffer se diluyeron 48,48 g urea en buffer fosfato de sodio pH 7,2 hasta completar los 100 mL. Conservar a temperatura ambiente.

E.1 Medios Luria Bertani

E.1.1 Medio Luria Bertani (LB)

Para la preparación de 1 L de medio LB se requiere:

- ◇ 10 g de Triptona
- ◇ 5 g de extracto de levadura
- ◇ 10 g de NaCl

Se disuelve agua Milli-Q hasta completar 1 L, posteriormente se esteriliza mediante autoclavado. Almacenar a temperatura ambiente.

E.1.2 Medio LB Agar

Para la preparación de 100 mL de medio LB Agar se requiere:

- ◇ 1 g de triptona
- ◇ 0,5 g de extracto de levadura
- ◇ 1 g de NaCl
- ◇ 1,5 g de agar

Se disuelve agua Milli-Q hasta completar 100 mL, posteriormente se esteriliza mediante autoclavado. Almacenar a temperatura ambiente.

E.1.3 Placas con Medio LB Agar

Derretir medio LB agar y dejar enfriar hasta unos 50 °C aproximadamente. Bajo mechero agregar antibióticos, según corresponda. Distribuir en placas Petri estériles (20 mL de medio cada una aproximadamente). Dejar enfriar bajo el mechero, sellar con parafilm y conservar a 4 °C.

E.2 Medio Definido R

Para la preparación de 1 L de medio R se hace lo siguiente:

1. Preparar una solución de sales.

- ◇ 4 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
- ◇ 13,5 gr de KH_2PO_4
- ◇ 1,85 gr de Ácido Cítrico* H_2O
- ◇ 1,4 gr de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Se disuelve en agua Milli-Q hasta completar 890 mL, posteriormente se esteriliza mediante autoclavado. Almacenar a 4 °C hasta por 2 meses.

2. Prepara la solución con fuente de carbono.

10X gr de xilosa/manosa para una concentración final de X % de xilosa/manosa

Se disuelve en agua Milli-Q hasta completar 100 mL y se filtra. Almacenar a 4 °C por un par de días. Se contamina fácilmente.

3. Prepara una solución de Metales Traza.

Para la preparación de 200 mL de Metales Traza se requiere:

- ◇ 1 M HCl
- ◇ 2 gr de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- ◇ 0,23 gr de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- ◇ 0,2 gr de $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- ◇ 0,061 gr de $\text{MnSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$
- ◇ 0,046 gr de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$
- ◇ 0,04 gr de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- ◇ 0,02 gr de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$

Se disuelve en agua Milli-Q hasta completar 200 mL, posteriormente se esteriliza mediante autoclavado. Envolver en aluminio (sensible a la luz). Almacenar a temperatura ambiente por tiempo indefinido.

4. Finalmente, se mezclan en condiciones estériles:

- ◇ 890 mL de la solución de sales
- ◇ 100 mL de la solución con fuente de carbono
- ◇ 10 mL de la solución de metales traza.

E.3 Medio Definido R2

Este medio se basa en el medio R, pero diluido en el doble de volumen. Para la preparación de 1 L de medio R2 se hace lo siguiente:

1. Preparar una solución de sales.

- ◇ 2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
- ◇ 6,75 gr de KH_2PO_4
- ◇ 0,925 gr de Ácido Cítrico* H_2O
- ◇ 0,7 gr de $\text{MgSO}_4*7\text{H}_2\text{O}$

Se disuelve en agua Milli-Q hasta completar 895 mL, posteriormente se esteriliza mediante autoclavado. Almacenar a 4 °C hasta por 2 meses.

2. Prepara la solución con fuente de carbono.

10X gr de xilosa manosa para una concentración final de X % de xilosa/manosa

Se disuelve en agua Milli-Q hasta completar 100 mL y se filtra. Almacenar a 4 °C por un par de días. Se contamina fácilmente.

3. Prepara una solución de Metales Traza.

Para la preparación de 200 mL de Metales Traza se requiere:

- ◇ 1 M HCl
- ◇ 2 gr de $\text{FeSO}_4*7\text{H}_2\text{O}$
- ◇ 0,23 gr de $\text{ZnSO}_4*7\text{H}_2\text{O}$
- ◇ 0,2 gr de $\text{CuSO}_4*7\text{H}_2\text{O}$
- ◇ 0,061 gr de $\text{MnSO}_4*1\text{H}_2\text{O}$
- ◇ 0,046 gr de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7*10\text{H}_2\text{O}$
- ◇ 0,04 gr de $\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}$
- ◇ 0,02 gr de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$

Se disuelve en agua Milli-Q hasta completar 200 mL, posteriormente se esteriliza mediante autoclavado. Envolver en aluminio (sensible a la luz). Almacenar a temperatura ambiente por tiempo indefinido.

4. Finalmente, se mezclan en condiciones estériles:
 - ◇ 895 mL de la solución de sales
 - ◇ 100 mL de la solución con fuente de carbono
 - ◇ 5 mL de la solución de metales traza.

E.4 Medio Definido M9

Para preparar 1 L de medio M9 se procede como sigue:

1. En una botella hacer una solución de sales con:
 - ◇ 12,8 g Na_2HPO_4
 - ◇ 3,0 g KH_2PO_4
 - ◇ 0,5 g NaCl
 - ◇ 1,0 g NH_4Cl
2. Llevar hasta 950 mL con agua milli-q y ajustar pH a 7,4 con NaOH .
3. Autoclavar. Conseravr a 4 °C.
4. Disolver los siguientes compuestos en 5-10 mL de agua Milli-Q:
 - ◇ 2,0 g glucose
 - ◇ 0,4940 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 - ◇ 0,0152 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 - ◇ 0,0100 g Tiamina
 - ◇ 0,0100 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
5. Filtrar con filtro con poros de 0,22 μm en condiciones estériles y vertir en las sales autoclavadas.
6. Completar el volumen hasta 1 L con agua Milli-Q autoclavada.

E.5 Medios Selectivos

Para hacer el medio selectivo agregar de las soluciones de stock:

- ◇ Crecimiento de *E. coli Top10*: sin antibiótico.
- ◇ Crecimiento de *Rosetta (DE3)*: 1 μL de cam por mL de cultivo (concentración final 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
- ◇ Cepa trasformada con pMBAD: 1 μL de amp por mL de cultivo (concentración final 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
- ◇ Cepa trasformada con pET22: 1 μL de amp por mL de cultivo (concentración final 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

CULTIVOS Y CURVAS DE CRECIMIENTO

F.1 Crecimiento de Inóculos

- ◇ Picar una colonia seleccionada a partir de una placa en forma estéril. Alternativamente, picar un stock glicerol de forma estéril.
- ◇ Depositar la punta con en medio estéril con antibiótico adecuado
- ◇ Dejar crecer overnight a 37 °C y 200 RPM.

F.2 Construcción de Curva de Crecimiento

F.2.1 Preparación

- ◇ Autoclavar un tubo de centrifuga por cultivo.
- ◇ Alternativamente (dependiendo del volumen) utilizar tubos falcon estériles de 50 mL (a lo más 40 mL de cultivo).

F.2.2 Medir Absorbancias

- ◇ Prender espectrofotómetro y setear la longitud de onda en 600 nm.
- ◇ Retirar los cultivos del shaker.
- ◇ Sacar 0,5 mL del cultivo en condiciones estériles y verter en una cubeta para la medición de absorbancia.
- ◇ Agregar 0,5 mL de agua a cada cubeta.
- ◇ Hacer esto 2 veces por cultivo.
- ◇ Invertir un vez cada cubeta con sellada con parafilm.
- ◇ Medir la absorbancia de cada cubeta. Si ésta es de más de 0,85, diluir y volver a medir.
- ◇ Calcular absorbancia según dilución.

- ◇ Repetir este proceso cada 2 hr (aproximadamente) en un principio, y cada 1 hr (aproximadamente) cuando se alcance el crecimiento exponencial.
- ◇ Graficar datos Absorbancia vs Tiempo.
- ◇ A partir del gráfico, definir cuándo se alcanza el estado estacionario y detener el cultivo dejándolo en hielo.

F.2.3 Determinación de Peso Seco

- ◇ Pesar tubos.
- ◇ Medir un volumen fijo por cultivo (ej: 40 mL).
- ◇ Verter en tubos.
- ◇ Centrifugar por 5 min a 10.000 g.
- ◇ Secar a 80 °C con la parte superior cubierta por gasa.
- ◇ Una vez eliminado todo el sobrenadante, que las células estén totalmente secas, pesar nuevamente.
- ◇ La diferencia entre el peso de los tubos con células y sin células corresponde al peso de las células.
- ◇ A partir del volumen trabajado se calcula [g cel / mL] en peso seco.

F.2.4 Construcción de Curva de Crecimiento

- ◇ A partir de la última absorbancia medida, se le asocia de forma lineal el peso seco obtenido.
- ◇ A cada absorbancia se le calcula la concentración celular.
- ◇ Graficar datos Concentración Celular vs Tiempo.

EVOLUCIÓN ADAPTATIVA DE LABORATORIO

El procedimiento realizado para la ALE se detalla a continuación:

- ◇ Trabajar con cepa de expresión nativa: *E. coli TOP10* (Invitrogen).
- ◇ Crecer en medio definido R2 con xilosa como fuente de carbono en un reactor B-Biostat (2 % p/v de fuente de carbono), en condiciones aeróbicas.
- ◇ Se monitorea oxigenación, pH, agitación y temperatura.
- ◇ Crecer inóculo overnight a 37 °C, 200 RPM.
- ◇ Inocular en reactor estéril con medio definido.
- ◇ Operar de forma continua a 37 °C, 200 RPM, pH 6,8, pO₂ sobre 40 %.
- ◇ Una vez alcanzada una D.O. $\approx 0,6$ se alimenta con medio fresco y con un flujo de salida igual al de entrada con el que se descarta parte del cultivo para mantener un volumen constante. Se procura mantener el crecimiento exponencial de la cepa. Para ello se tienen todos los nutrientes y oxígeno en exceso y con una D.O. constante bajo 0,5 (esto se regula con el flujo).
- ◇ Una vez a la semana sacar el 90 % del cultivo y volver al volumen inicial con medio fresco.
- ◇ Repetir este proceso durante el mayor tiempo posible (se recomienda que sea la menos 3 semanas y ojalá 2 meses aproximadamente para lograr unas 700 generaciones).
- ◇ Monitorear D.O. para asegurar que se permanezca en crecimiento exponencial. Si la D.O. aumenta baj condiciones constantes, se aumenta el flujo trabajado (se aumento la velocidad específica máxima de crecimiento del cultivo).
- ◇ Medir cada 2 o 3 días la concentración de fuente de carbono en el medio para asegurar que esta no sea un limitante.
- ◇ Guardar stocks glicerol cada 2 ó 3 días por si hubiera contaminación para retomar el cultivo anterior.

PREPARACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

H.1 Transformación de células mediante Shock Térmico

- ◇ Dejar en hielo tubos de 1,5 mL con 20 μ L de células a transformar suspendidas uniformemente.
- ◇ Agregar 1 μ L de solución de ADN directamente en las células. Mezclar gentilmente.
- ◇ Dejar en hielo por min.
- ◇ Calentar los tubos por exactamente 30 segundos a 42 °C sin agitar.
- ◇ Dejar los tubos en hielo por 2 min.
- ◇ Agregar 80 μ L de medio SOC a temperatura ambiente.
- ◇ Incubar por 1 hr a 37 °C agitando a 250 RPM.
- ◇ Plaquear en medio selectivo.
- ◇ Asegurarse que la placa absorba el cultivo vertido.
- ◇ Incubar las placas a 37 °C durante toda la noche boca abajo y posteriormente se conservar a 4 °C.

H.2 Preparación de células termocompetentes

- ◇ Inocular con células en 4 mL de medio LB en un tubo estéril bajo mechero.
- ◇ Dejar crecer durante la noche a 37 °C a 200 RPM.
- ◇ Inocular un matraz con 100 mL de medio LB estéril con 1 mL del inóculo anterior.
- ◇ Luego de 1,5 a 3 hr medir la D.O. hasta llegar a una D.O. de 0,3 a 0,4.
- ◇ Enfriar en hielo por 10 min. De ahora en adelante mantener en hielo.
- ◇ Verter en un tubo de centrifuga bajo mechero.

- ◇ Centrifugar por 3 min a 6.000 RPM.
- ◇ Descartar sobrenadante y gentilmente resuspender en 10 mL de solución 0,1 M de CaCl_2 .
- ◇ Incubar en hielo por 20 min.
- ◇ Centrifugar por 3 min a 6.000 RPM.
- ◇ Descartar sobrenadante y gentilmente resuspender en 5 mL de solución 0,1 M de CaCl_2 / 15 % glicerol.
- ◇ Alicuotar en volúmenes de 200 μL bajo mechero.
- ◇ Conservar a $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

SEPARACIÓN FRACCIONES CELULARES

I.1 Obtención de Fracciones Celulares Totales

Para 100 mL de cultivo:

- ◇ Centrifugar los 100 mL a 7.000 g por 10 min. De aquí se obtiene la fracción extracelular (1) que corresponde al sobrenadante.
De aquí en adelante se trabaja con el pellet (células).
- ◇ Resuspender el pellet en 10 mL (10 % del volumen) de HEPES 10 mM, Sacarosa 20 %, pH 8. Esta solución se contamina fácilmente, así que preparar en el momento.
- ◇ Una vez resuspendidas, agregar EDTA 0,5 M hasta llegar a una concentración de 1 mM. Para 10 mL, 20 μ L de la solución.
- ◇ Agitar suavemente en hielo por 5 min (posiblemente necesario que sean 10 min)
- ◇ Centrifugar 10 min a 10.000 g a 4 °C. El lavado (2) se obtiene del sobrenadante.
En adelante se trabaja con el pellet.
- ◇ Resuspender en 10 mL (10 % del volumen total) de MgCl₂ 5 mM.
- ◇ Centrifugar a 10.000 g por 10 min a 4 °C. Del sobrenadante se obtiene el periplasma (3). Este pellet es blando, por lo que se debe sacar el sobrenadante con cuidado.
En adelante se trabaja con el pellet.
Recomendación: Congelar a -80 °C y luego descongelar a 37 °C.
- ◇ Resuspender en 10 mL (10 % del volumen total) de buffer apropiado para la enzima (buffer fosfato de sodio pH 7,2 en caso de la Hialuronan Sintasa).
- ◇ Sonicar 5 veces por 30 seg en hielo. Si se calienta sonicar por periodos más cortos y hacer más ciclos.
- ◇ Centrifugar por 30 min a 10.000 g. Del sobrenadante se obtiene la fracción soluble (4) que corresponde al citoplasma.
En adelante se trabaja con el pellet.

◇ Resuspender en 10 mL (10 % del volumen total) de Urea 8 M.

◇ Centrifugar 1 hora a 10.000 g.

Descartar pellet que corresponde al debris celular. El sobrenadante corresponde a la fracción insoluble (5).

* Ninguna solución es necesario que se autoclave o filtre, sólo en el caso que se quiera preparar un stock. Sólo la solución con sacarosa no se puede preparar stock.

Todas las fracciones a excepción de la con urea se calientan por 5 min a 100 °C para evitar el efecto de proteasas u otros factores que puedan degradar las proteínas presentes.

J.1 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

La separación electroforética de proteínas en condiciones desnaturalantes se realizó en una cámara vertical MiniProtean II (Bio-Rad Laboratories Inc., CA-USA).

Limpiar los vidrios con etanol y se dejan secar. Luego, se armar la cámara y se verter agua. Deja unos 15 min para verificar que no haya filtraciones. De haberlas se repite este proceso. Después, preparar el gel separador.

Reactivos del gel separador 12,5 %:

- ◇ Acrilamida Bisacrilamida 29:1 1,58 mL
- ◇ Tampón Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,4 % 0,95 mL
- ◇ Agua destilada 1,27 mL
- ◇ PSA 10 % 20 μ L
- ◇ TEMED 2 μ L

* Lo último que se incorpora son el PSA y TEMED ya que son los compuestos que polimerizan el gel.

Verter el gel separador en la cámara y agregar 100 μ L de butanol, y dejar secar a temperatura ambiente por aproximadamente 30 min. Preparar el gel concentrador.

Reactivos del gel concentrador:

- ◇ Acrilamida Bisacrilamida 29:1 0,17 mL
- ◇ Tampón Tris-HCl 0,5 M pH 8,8, SDS 0,4 % 0,25 mL
- ◇ Agua destilada 0,58 mL
- ◇ PSA 10 % 7,5 μ L

◇ TEMED 1,25 μ L

Eliminar el butanol con papel secante, verter en la cámara el gel concentrador y colocar peineta de tamaño deseado. Dejar secar por aproximadamente 30 min. Depositar el gel en la cámara, llenarla de tampón de corrida Tris-glicina-SDS (Tris 25 mM, Glicina 192 mM y SDS 0,1 % p/v) y retirar peineta.

Mezclar las muestras en proporción 4:1 con tampón de carga 5X (Tris-HCl 60 mM, glicerol 25 % v/v, SDS 2 % p/v, 2-mercaptoetanol 14,4 mM y azul de bromofenol 0,1 % p/v pH 6,8), darles un shock térmico a 100 °C por 5 minutos y se centrifugar por 1 min a 13.000 RPM. Cargar las muestras en gel de poliacrilamida junto con 5 μ L del estándar de peso molecular preteñido de proteínas (Fermentas). La electroforesis se realiza bajo voltaje constante de 200 V (fuentes de poder Power Pac 1000 de Bio-Rad Laboratories Inc., CA-USA). La corrida demora 40 min. Una vez finalizada, retirar el gel cuidadosamente e incubar por al menos 1 hr (se recomienda overnight) con solución de tinción Coomasie (45 % metanol, 10 % ácido acético, 45 % agua destilada y 1 g de azul de Coomasie). Luego, desteñir con una solución de destinción (45 % metanol, 10 % ácido acético, 45 % agua destilada) para que sólo permanezcan teñidas las bandas de proteína en el gel. El lavado puede durar desde 2 horas en adelante. Una vez desteñido el gel, fotografiar. Conservar en la misma solución de destinción a temperatura ambiente.

J.2 Electroforesis en Gel de Agarosa

Se utilizó una cámara horizontal Horizon-58 (Gibco-BRL Life Technologies, Inc., MA-USA).

Para preparar 100 mL de gel de agarosa al X % p/v se mezclan 100 mL de tampón TAE 1X: Tris-Acetato-EDTA (Tris 40 mM, acetato 20 mM y EDTA 1 mM) y X g de agarosa. Se derriten y se espera a que baje su temperatura a 50 °C. Se agregan 5 μ L de bromuro de etidio 0,2 μ g/mL. El gel se vierte en la cámara y se deja secar por 30 min aproximadamente. Poner el gel en la cámara y llenarla de tampón TAE 1X.

Mezclar las muestras en proporción 5:1 con tampón de carga 6X (glicerol 30 % p/v y azul de bromofenol 0,25 % p/v) y cargar en el gel junto con 7 μ L de un estándar de peso molecular 1 Kb DNA ladder (Fermentas). Correr la electroforesis a un voltaje constante de 40 u 80 V (fuente de poder Model 500 de BRL Life Technologies, Inc., MD-USA). Correr entre 30 y 60 min. Una vez terminada la electroforesis fotografiar el gel sobre un transiluminador UV.

Utilizar geles de 0,8 % p/v para ADN genómicos y 1 % p/v para fragmentos entre 1.000-2.000 pb.

PURIFICACIÓN DE ADN**K.1 Purificación de productos de PCR usando el kit QIAquick (QIAquick PCR Purification Kit Protocol)**

- ◇ Agregar 5 volúmenes de Buffer PB a 1 volumen del producto de PCR y mezclar.
- ◇ Colocar la columna QIAquick spin en un tubo de 2 mL.
- ◇ Para unir el ADN, colocar la muestra en la columna y centrifugar entre 30 y 60 seg.
- ◇ Descartar el flujo que paso a través de la columna y poner la columna en el mismo tubo de 2 mL.
- ◇ Para lavar, agregar 0,75 mL del buffer PE a la columna y centrifugar entre 30 y 60 seg.
- ◇ Descartar el flujo que paso a través de la columna y poner la columna en el mismo tubo de 2 mL. Centrifugar por 1 min.
- ◇ Colocar la columna en un tubo de centrifuga de 1,5 mL nuevo.
- ◇ Para eluir el ADN agregar 50 μ L de Buffer EB o agua en el centro de la membrana de la columna y centrifugar por 1 min.

K.2 Miniprep: Purificación de ADN plasmidial usando el kit QIAprep (Spin Miniprep Kit y una microcentrífuga)

- ◇ Resuspender pellet bacteriano en 250 μ L de Buffer P1 y trasferir a un tubo de microcentrifuga.
- ◇ Agregar 250 μ L de Buffer P2 y mezclar vigorosamente invirtiendo el tubo 4-6 veces.
- ◇ Agregar 250 μ L de Buffer N3 y mezclar inmediata y vigorosamente invirtiendo el tubo 4-6 veces.
- ◇ Transferir los sobrenadantes del paso anterior a la columna QIAprep por descarte o con una pipeta.
- ◇ Centrifugar 30-60 segundos. Descartar el flujo que paso a través de la columna.

- ◇ Recomendado: Lavar la columna con 0,5 mL de Buffer PB y centrifugar por 30-60 seg. Descartar el flujo que paso a través de la columna.
- ◇ Lavar la columna con 0,75 mL de Buffer PE y centrifugar por 30-60 seg.
- ◇ Descartar el flujo que paso a través de la columna y centrifugar 1 min adicional.
- ◇ Colocar la columna en un nuevo tubo de microcentrifuga de 1,5 mL. Para eluir el ADN agregar 50 μ L de Buffer EB. Dejarlo reposar por 1 min y centrifugar 1 min.

* Todos los pasos de centrifugación se realizan a 13.000 RPM a menos que mencione una velocidad específica.

K.3 Purificación de productos de fragmentos de ADN usando el kit QIAEX II (QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol)

- ◇ Escindir la banda de ADN del gel de agarosa con un escarpelo limpio.
- ◇ Verter en un tubo de 1.5 mL limpio.
- ◇ Pesar el gel cortado y agregar 3 volúmenes de Buffer QX1 a 1 volumen de gel para fragmentos entre 100 y 4.000 pb. En caso de fragmentos más largos agregar también 2 volúmenes de agua.
- ◇ Resuspender QIAEX II vortexiando por 30 seg. Agregar a la muestra 10 μ l de QIAEX II si hay menos de 2 μ g de ADN. Agregar 30 μ l si hay entre 2 y 10 μ g de ADN. Por cada 10 μ g de ADN adicionales agregar 30 μ l de QIAEX II.
- ◇ Colocar la columna QIAquick spin en un tubo de 2 mL.
- ◇ Para unir el ADN, colocar la muestra en la columna y centrifugar entre 30 y 60 seg.
- ◇ Descartar el flujo que paso a través de la columna y poner la columna en el mismo tubo de 2 mL.
- ◇ Para lavar, agregar 0.75 mL del buffer PE a la columna y centrifugar entre 30 y 60 seg.
- ◇ Descartar el flujo que paso a través de la columna y poner la columna en el mismo tubo de 2 mL. Centrifugar por 1 min.
- ◇ Colocar la columna en un tubo de centrifuga de 1,5 mL nuevo.
- ◇ Para eluir el ADN agregar 50 μ L de Buffer EB o agua en el centro de la membrana de la columna y centrifugar por 1 min.

MEDICIÓN DEL ÁCIDO HIALURÓNICO**L.1 Concentrar Ácido Hialurónico (Bracke et al., 1985; Yu, 2008)**

Para concentrar 200 mL de cultivo:

- ◇ Interrumpir la fermentación adicionando ácido tricloroacético 100 % saturado hasta alcanzar una concentración del 5 % (10 mL de ácido). Esto ayuda a la separación de las células del caldo, además de ayudar la separación del HA.
- ◇ Centrifugar por 10 min a 7.000 g para obtener sobrenadante (propuesto).
- ◇ Diluir el sobrenadante en 0,1 % p/v de dodecilsulfato sódico (SDS) (0,2 g de SDS) e incubar 10 min a temperatura ambiente para liberar HA encapsulado.
- ◇ Precipitar HA adicionando 2 volúmenes de etanol (400 mL) e incubar a 4 °C por 1 h (no agitar).
- ◇ Centrifugar a 3.000 RPM por 20 min a temperatura ambiente. Descartar sobrenadante. Este precipitado puede ser conservado indefinidamente a 4 °C.
- ◇ Resuspender en 1 volumen de NaCl 0,1 M (200 mL) por 10 min.
En esta etapa se recomienda resuspender en 5 mL de NaCl 0,1 M para concentrar debido al a baja concentración de HA de la muestra.

* Si concentración anterior no funciona considerar filtración (Chong & Nielsen, 2003).

L.2 Ensayo de Carbazol Modificado (Bitter & Muir, 1962)

- ◇ Colocar un tubo Eppendorf 2,0 mL en hielo.
- ◇ Agregar 0,25 ml de muestra y 1,5 mL de Sodium Tetraborate*10H₂O 0,025 M en ácido sulfúrico.
- ◇ Mezclar gentilmente en un principio, luego vigorosamente manteniendo la baja temperatura.

- ◇ Calentar los tubos por 10 min en agua hirviendo y dejar enfriar a temperatura ambiente (Recomendación: congelar los tubos hasta $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y luego dejar que lleguen a temperatura ambiente).
- ◇ Agregar $50\text{ }\mu\text{L}$ del carbazol 0,125 % en etanol o metanol puro (estable por 12 semanas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la oscuridad).
- ◇ Mezclar nuevamente y hervir por 15 min.
- ◇ Enfriar a temperatura ambiente.
- ◇ Medir absorbancia a 530 nm .

* Hacer los estándares con diferentes concentraciones de carbazol porque en teoría no hay suficiente carbazol para que reaccione con la cantidad de glucuronolactona presente: $50\text{ }\mu\text{L}$ de carbazol 0,125 %, son $0,0625\text{ }\mu\text{g}$; con un PM de $167,21\text{ g/mol}$, son $3,738 \times 10^{-13}\text{ mmol}$; $0,25\text{ mL}$ de glucuronolactona a $40\text{ }\mu\text{g/mL}$ son $10\text{ }\mu\text{g}$; con un PM de $176,12\text{ g/mol}$, son $5,678 \times 10^{-5}\text{ mmol}$. Son 8 órdenes de diferencia. Considerar utilizar hasta $0,25\text{ mL}$ a una concentración de $40\text{ }\mu\text{g/mL}$ para curva estándar.

M.1 Medición de la concentración de xilosa mediante HPLC

Para las cromatografías se utilizaron los elementos y condiciones siguientes:

- ◇ Columna: Shodex SUGAR SP0810
- ◇ Condiciones:
 - Elución: Agua Milli-Q.
 - Flujo: 0,6 mL/min.
 - Detector: RI.
 - Temperatura autosampler: 18 °C.
 - Temperatura horno: 70 °C.
 - Volumen de inyección: 5 μ L.
 - Polaridad: (+).
 - Concentración de estándares: 0 - 20 g/L de xilosa o manosa.

PROGRAMAS Y SOLUCIONES DE PCR**N.1 PCR de Colonias**

- ◇ Recomendado: Transferir las colonias de interés con una punta estéril desde la placa de transformación a otra placa con el medio de cultivo adecuado, para conservar una copia de las colonias de interés.
- ◇ La misma punta es depositada en un tubo Eppendorf con 30 μL de agua estéril.
- ◇ Repetir este proceso para cada colonia.
- ◇ Aplicar un shock térmico a 100 °C durante 10 min.
- ◇ Utilizar este producto como la solución de ADN para la solución de PCR que se muestra a continuación:

Por cada 100 μL de solución de PCR:

Agua estéril	6,5 μL
Buffer 5X GoTaq	4 μL
MgCl ₂ (25 mM)	1,6 μL
dNTPs (10 mM)	0,1 μL
Partidor forward (10 μM)	1 μL
Partidor reverse (10 μM)	1 μL
GoTaq Polimerasa (5 U/ μL)	0,5 μL
ADN	5 μL
Volumen final	20 μL

- ◇ Realizar un PCR con el programa que corresponda.
- ◇ Verificar los productos mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 40 v.

N.2 PCR con GoTaq Polimerasa

N.2.1 Soluciones

Solución 1

Por cada 100 μL de solución de PCR:

Agua estéril	28 μL
Buffer 5X GoTaq	20 μL
MgCl ₂ (25 mM)	20 μL
dNTPs (10 mM)	2 μL
Partidor forward (10 μM)	10 μL
Partidor reverse (10 μM)	10 μL
GoTaq Polimerasa (5 U/ μL)	2 μL
pADN	2 μL
Volumen final	100 μL

N.2.2 Programas

Ciclo 1

1. 95 °C 5 min
2. 95 °C 1 min
3. T_a 30 seg
4. 72 °C 1,5 min
5. Volver a 2 29 veces
6. 72 °C 10 min
7. 4 °C ∞

Programa DANIVAI1

Ciclo 1 Amplificación con T_a= 54 °C.

N.3 PCR con KOD Hot Start Polimerasa

N.3.1 Soluciones

Solución 1

Por cada 100 μL de solución de PCR:

Agua estéril	39 μL
Buffer 10X	10 μL
dNTPs (25 mM)	2 μL
MgSO ₄ (25 mM)	4 μL
Partidor forward (10 μM)	4 μL
Partidor reverse (10 μM)	4 μL
ADN polimerasa KOD Hot Start	2 μL
gADN (2,5 ng/ μL)	35 μL
Volumen final	100 μL

Solución 2

Por cada 100 μL de solución de PCR:

Agua estéril	64 μL
Buffer 10X	10 μL
dNTPs (25 mM)	2 μL
MgSO ₄ (25 mM)	4 μL
Partidor forward (10 μM)	4 μL
Partidor reverse (10 μM)	4 μL
ADN polimerasa KOD Hot Start	2 μL
ADN	10 μL
Volumen final	100 μL

N.3.2 Programas

Ciclo 1

1. 95 °C 2 min
2. 94 °C 40 seg
3. T_a °C 40 seg
4. 72 °C 35 seg
5. Volver a 2 29 veces
6. 70 °C 15 min
7. 4 °C ∞

Ciclo 2

1. 95 °C 2 min
2. 94 °C 40 seg
3. T_{a1} °C 40 seg
4. 72 °C 60 seg
5. Volver a 2 5 veces
6. 94 °C 40 seg
7. T_{a2} °C 40 seg
8. 72 °C 35 seg
9. Volver a 6 24 veces
10. 70 °C 15 min
11. 4 °C ∞

Programa DANIVAI1

Ciclo 1 Gradiente $T_a=45$ °C, 47,8 °C, 54,7 °C, 59,4 °C y 63,6 °C.

Programa DANIVAI2

Ciclo 1 Amplificación con $T_a=64$ °C

Programa DANIVAI2

Ciclo 2 Amplificación $T_{a1}=50$ °C/ $T_{a2}=54$ °C.

DIGESTIÓN Y LIGACIÓN

Ñ.1 Doble digestión con enzimas de restricción *XhoI* y *NdeI*

pADN	5 μL
<i>XhoI</i>	0,3 μL
<i>NdeI</i>	0,3 μL
BSA 100X	1 μL
Buffer Neb4 10X	2 μL
Agua estéril	5,9 μL
Volumen final	11,4 μL

Incubar por 1,5 horas a 37 °C.

Ñ.2 Ligación a vector pET22

Vector pET22	3,5 μL
Gen HasA	2 μL
Buffer ligación 5X	2 μL
T4 DNA Ligase	1 μL
Agua estéril	1,5 μL
Volumen final	10 μL

Incubar por 16 horas a 4 °C.

CÁLCULO DE CONCENTRACIÓN Y RENDIMIENTO DE ÁCIDO HIALURÓNICO

O.1 Concentración en función del volumen de cultivo

- ◇ Medir concentración de HA de cada muestra.
- ◇ En caso de tener duplicado o triplicado por cultivo, promediar y calcular desviación estándar.
- ◇ Calcular a partir de la concentración de HA de la muestra, la concentración de HA obtenida en el cultivo, por litro de cultivo (considerar diluciones).
- ◇ Hacer un gráfico de barras de estos valores para comparar las condiciones y cepas.

O.2 Rendimiento en función de la concentración celular

- ◇ Medir concentración de HA de cada muestra.
- ◇ En caso de tener duplicado o triplicado por cultivo, promediar y calcular desviación estándar.
- ◇ Calcular a partir de la concentración de HA de la muestra, la concentración de HA obtenida en el cultivo, por litro de cultivo.
- ◇ A partir de la curva de crecimiento y el volumen del cultivo, calcular el la concentración de células secas obtenido.
- ◇ Dividir la concentración de HA y la concentración de células secas (se obtienen los mg de HA por gramo de célula seca).
- ◇ Hacer un gráfico de barras de estos valores para comparar las condiciones y cepas.

TABLAS Y FIGURAS ADICIONALES

P.1 Curvas de crecimiento de cepas *Top10* y *Top10 Evo* después del ALE

Tabla P.1: D.O. y Velocidades específicas de crecimiento máximas (μ_{max}) de las cepas evolucionada y no evolucionada en xilosa (triplicado con desviaciones estándar) y en glucosa.

Curvas de Crecimiento

Hora	Tiempo [h]	Concentración células [gr/L]							
		Medio R2+Xilosa						Medio R2+Glucosa	
		Cepa Evolucionada			Cepa no evolucionada			Evol.	No evol.
		1	2	3	1	2	3		
0:00:00	0,00				0,4	0,38	0,36		
10:48:00	0,27	0,37	0,34	0,33	0,43	0,41	0,39	0,39	0,45
12:08:00	1,60	0,56	0,5	0,5	0,64	0,61	0,59	0,59	0,73
13:49:00	3,28	0,86	0,78	0,78	1,02	0,98	0,92	0,97	1,16
15:14:00	4,70	1,33	1,22	1,19	1,48	1,4	1,32	1,46	1,69
17:01:00	6,48	2,45	2,21	2,2	2,21	2,1	1,97	2,5	2,62
18:36:00	8,06	3,77	3,4	3,45	3,4	3,32	3,1	4,08	3,71

Velocidad Especifica de Crecimiento

Δt [h]	Velocidad específica de crecimiento [1/h]							
	Medio R2+Xilosa						Medio R2+Glucosa	
	Cepa evolucionada			Cepa no evolucionada			Evol.	No evol.
	1	2	3	1	2	3		
3,2	0,327	0,327	0,324	0,242	0,239	0,238	0,295	0,255
	Promedio							
	0,326			0,24			0,295	0,255
	Diferencia con evolucionada							
	-			36%			-	16%

P.2 Optimización

En esta sección se adjuntan los gráficos de las curvas de calibración de la concentración de HA medida a través de HPLC. También se adjuntan las tablas de valores obtenidos, de las cuales se extrajeron los resultados y gráficos presentados en este trabajo.

P.2.1 Optimización de la concentración y el tiempo de inducción

A continuación se presentan la curva de calibración de HA y los datos obtenidos a partir de ella, para obtener las concentraciones de este HA en las distintas muestras. Los cromatogramas correspondientes a los estándares y muestras se pueden observar al final de esta sección.

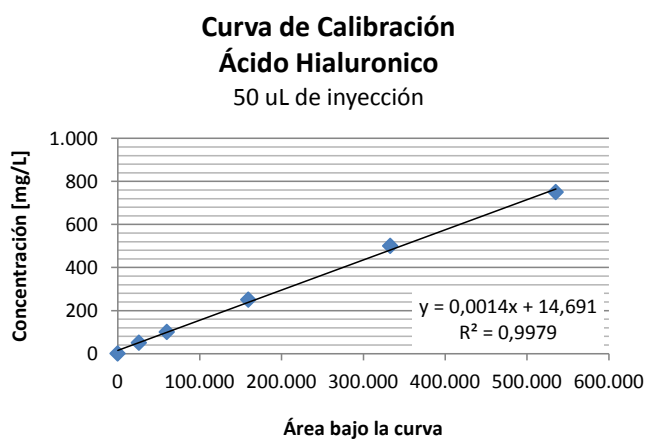


Figura P.1: Curva de calibración de ácido hialurónico a partir de estándares medidos con HPLC. El coeficiente de correlación es de 0,9979.

Tabla P.2: Flujos metabólicos de consumo de xilosa o manosa, producción de biomasa y velocidad específica de crecimiento de las cepas *Top10 Evo:pMBAD-sseAB*, *Top10:pMBAD-sseAB* y *Top10:pMBAD Control*.

		Flujo [mmol/g.cel•h]			Velocidad Específica de Crecimiento μ [1/h]
		Xilosa	Manosa	HA	Biomasa
Xilosa	Top10 Evo: pMBAD- sseAB (1)	6,1600		0,2043	0,2057
	Top10 Evo: pMBAD- sseAB (2)	6,0282		0,2073	0,2209
	Top10: pMBAD- sseAB	5,4768		0,1665	0,1435
	Top10: pMBAD Control	5,0922			0,2111
Manosa	Top10 Evo: pMBAD- sseAB (1)		6,2447	0,1791	0,1827
	Top10 Evo: pMBAD- sseAB (2)		6,6790	0,1827	0,1929
	Top10: pMBAD- sseAB		4,2621	0,1426	0,1756

Tabla P.3: Muestras y resultados del experimento 1 obtenidos a partir del HPLC. Las concentraciones fueron extrapoladas de la curva de calibración. (A) Cepa evolucionada suplementada con xilosa, (B) cepa evolucionada suplementada con glucosa, (C) cepa no evolucionada suplementada con xilosa, (D) cepa no evolucionada suplementada con glucosa y (E) cepa nativa. (1) Inducción con 0,1 [g/L] de L- arabinosa una D.O.=1,0, (2) Inducción con 0,05 [g/L] de L- arabinosa una D.O.=1,0 y 2 horas después y (3) Inducción con 0,02 [g/L] de L- arabinosa una D.O.=1,0.

Muestra	Tiempo de residencia	Área	Concentración [mg/L]	Concentración con factor dilución (0,6) [mg/L]
A1	17,77	256.707,60	374,082	224,4
A2	18,076	416.509,50	597,804	358,7
A3	17,612	16.539,90	37,847	22,7
A4	17,69	13.455,10	33,528	20,1
B1	17,29	97.666,90	151,425	90,9
B2	17,39	113.206,40	173,180	103,9
B3	17,26	37.126,70	66,668	40,0
C1	18,188	106.443,50	163,712	98,2
C2	17,867	295.164,40	427,921	256,8
C3	17,43	3.575,90	19,697	11,8
D1	17,47	173.144,00	257,093	154,3
D2	17,445	232.064,40	339,581	203,7
D3	17,337	33.879,10	62,122	37,3
E1		0,00	0	0,0
E2		0,00	0	0,0
E3		0,00	0	0,0

* Ácido Hialurónico precipitado a partir de 10 mL de cultivo y disuelto en 6 mL de NaCl.

Tabla P.4: Muestras y resultados del experimento 2 obtenidos a partir del HPLC. Las concentraciones fueron extrapoladas de la curva de calibración. (A) Cepa evolucionada suplementada con xilosa, (B) cepa evolucionada suplementada con glucosa, (C) cepa no evolucionada suplementada con xilosa, (D) cepa no evolucionada suplementada con glucosa y (E) cepa nativa. (1) Inducción con 0,1 [g/L] de L- arabinosa una D.O.=1,0, (2) Inducción con 0,05 [g/L] de L- arabinosa una D.O.=1,0 y 2 horas después y (3) Inducción con 0,02 [g/L] de L- arabinosa una D.O.=1,0.

Muestra	Tiempo de residencia	Área	Concentración [mg/L]	Con factor dilución (0,6)* [mg/L]
A1	17,76	284.563,40	439,241	263,5
A2	17,85	434.543,50	664,211	398,5
A3	17,96	27.364,50	53,443	32,1
A*	17,75	15.536,50	35,701	21,4
B1	17,75	127.465,50	203,594	122,2
B2	17,01	185.746,20	291,015	174,6
B3	17,05	29.475,20	56,609	34,0
C1	17,95	121.755,90	195,030	117,0
C2	17,61	302.764,80	466,543	279,9
C3	17,00	3.982,10	18,369	11,0
D1	17,01	167.325,70	263,385	158,0
D2	17,95	224.685,40	349,424	209,7
D3	17,75	27.564,60	53,743	32,2
E1		0,00	12,396	0,0
E2		0,00	12,396	0,0
E3		0,00	12,396	0,0

* Ácido Hialurónico precipitado a partir de 10 mL de cultivo y disuelto en 6 mL de NaCl.

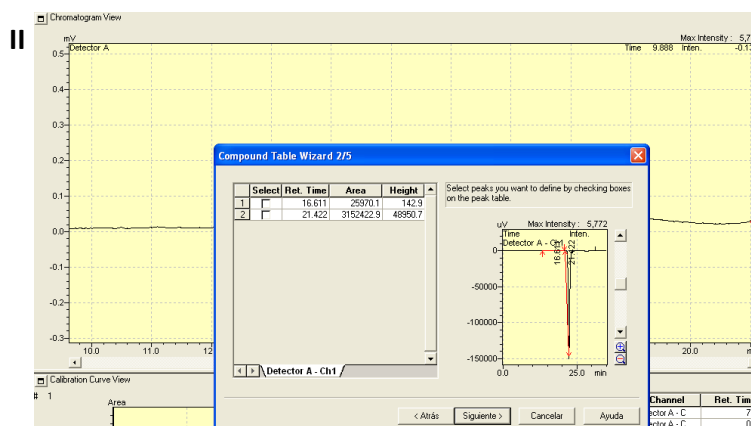
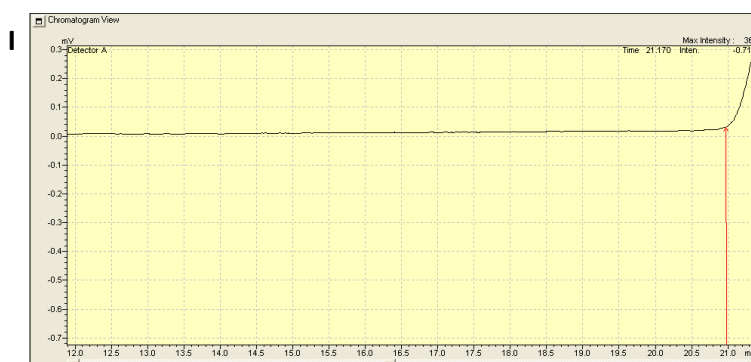
Tabla P.5: Cepas y concentración de HA de sus cultivos del experimento 1.

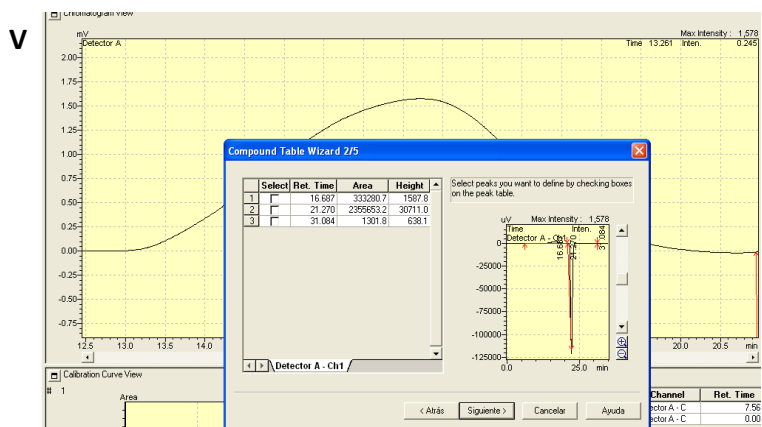
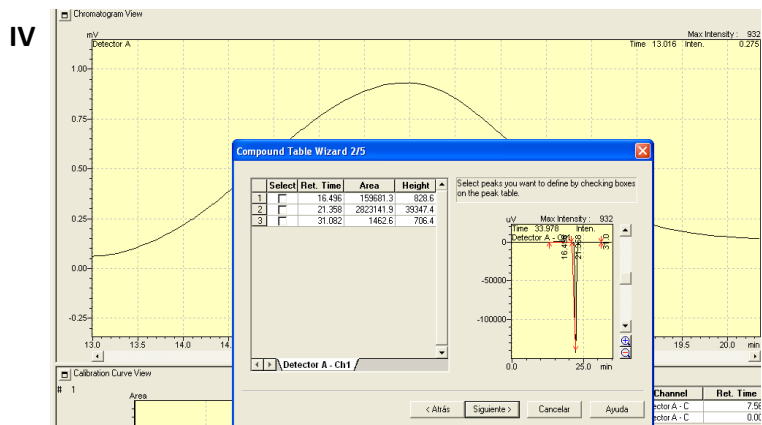
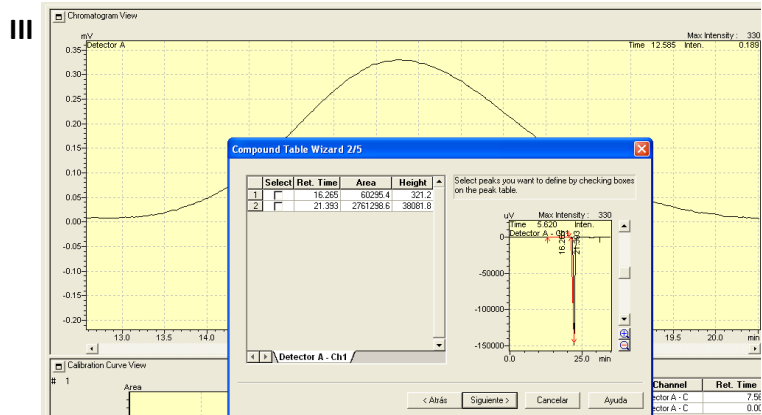
Cepa	Concentración Ácido Hialurónico [mg/L]			
	0,1 g/L L-Arabinosa OD=1.0	0,05 g/L L-Arabinosa OD=1.0 y 2 horas después	0,02 g/L L-Arabinosa OD=1.0	Sin inducción
Cepa evolucionada suplementada con xilosa	224,642	358,683	22,708	20,120
Cepa evolucionada suplementada con glucosa	90,855	103,908	40,001	
Cepa no evolucionada suplementada con xilosa	98,227	256,753	11,818	
Cepa no evolucionada suplementada con glucosa	154,256	203,749	37,273	
Cepa nativa suplementada con xilosa	0	0	0	

Tabla P.6: Cepas y concentración de HA de sus cultivos del experimento 2.

Cepa	Concentración Ácido Hialurónico [mg/L]			
	0,1 g/L L-Arabinosa DO=1.0	0,05 g/L L-Arabinosa DO=1.0 y 2 horas después	0,02 g/L L- Arabinosa DO=1.0	Sin inducción
Cepa evolucionada suplementada con xilosa	263,5	398,53	32,07	21,4
Cepa evolucionada suplementada con glucosa	122,16	174,61	33,97	
Cepa no evolucionada suplementada con xilosa	117,02	279,93	11,02	
Cepa no evolucionada suplementada con glucosa	158,03	209,65	32,25	
Cepa nativa suplementada con xilosa	0,00	0,00	0,00	

A continuación se presentan los cromatogramas de la curva de calibración y de los cultivos del experimento 1.





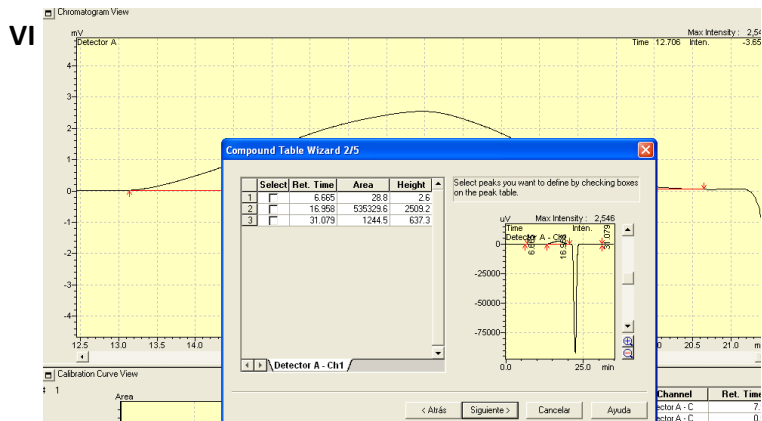
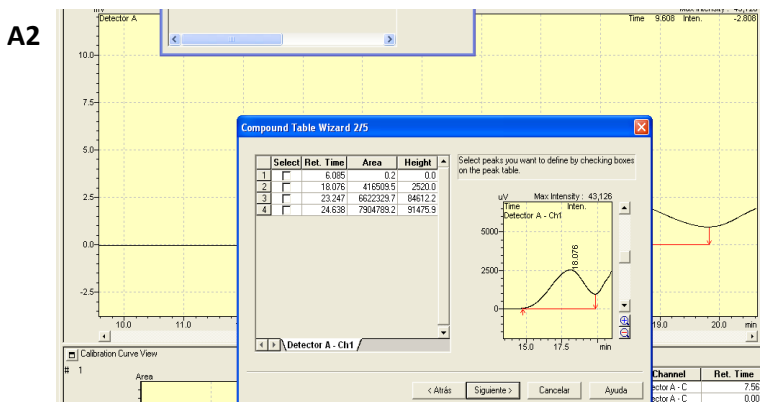
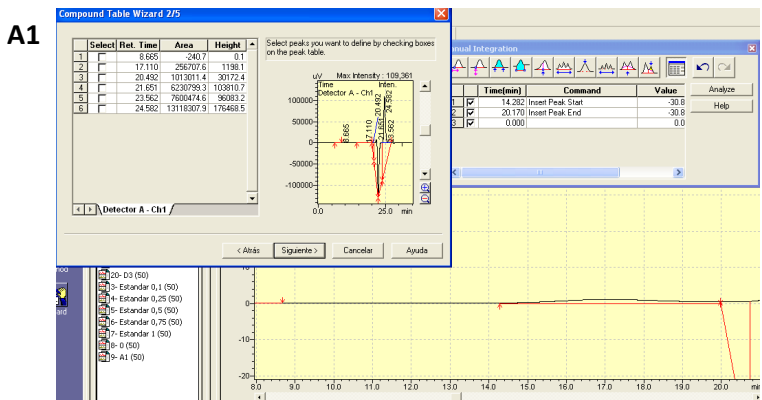
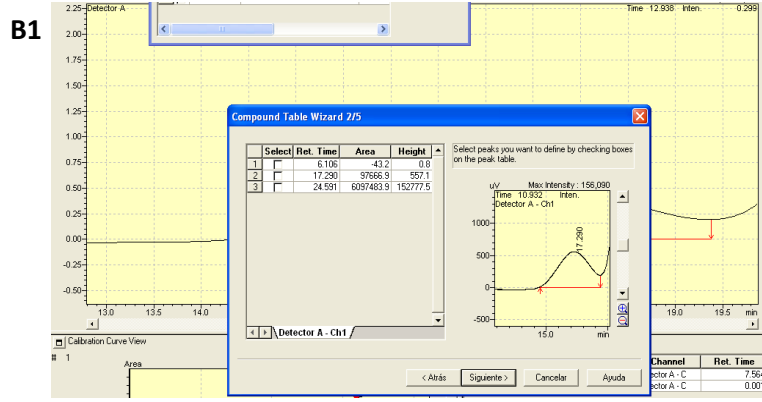
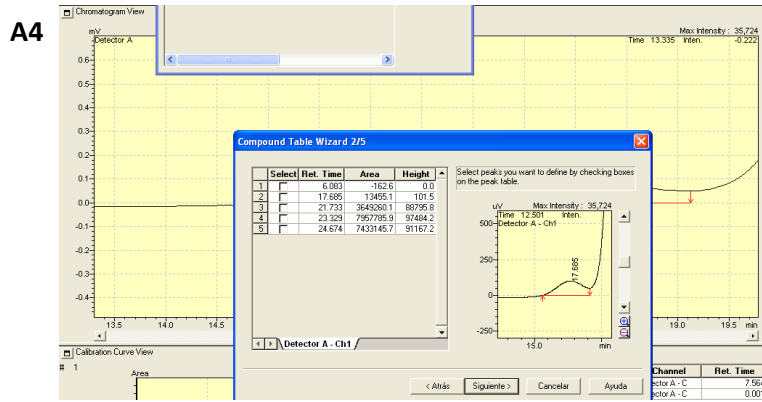
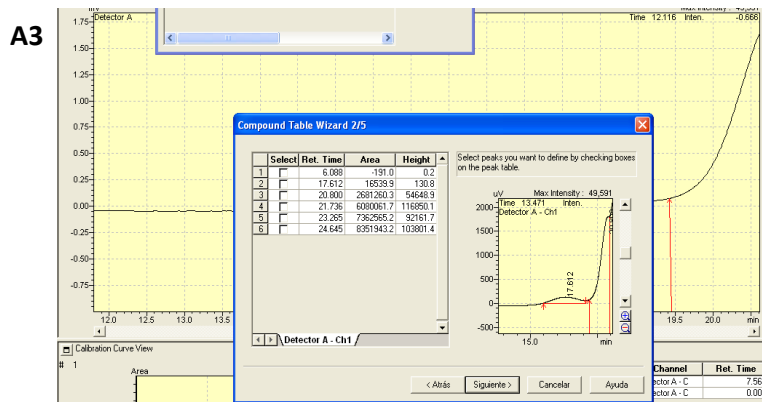
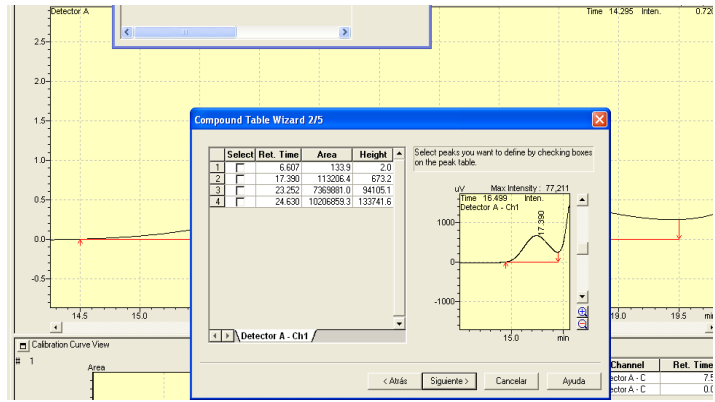


Figura P.2: Cromatogramas obtenidos a partir de los estándares de HA. (I) 0 [mg/L], (II) 50 [mg/L], (III) 100 [mg/L], (IV) 250 [mg/L], (V) 500 [mg/L] y (VI) 750 [mg/L].

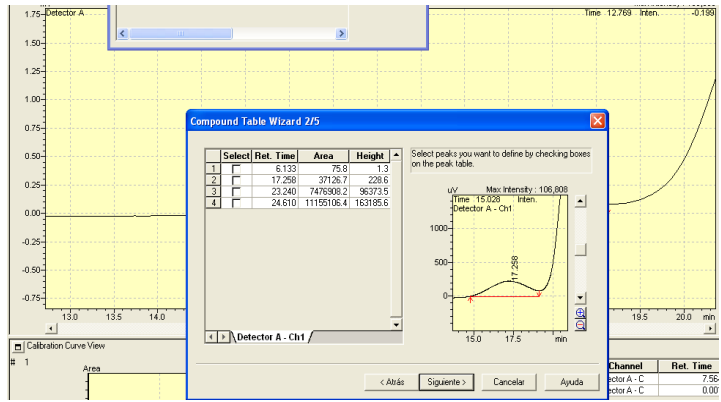




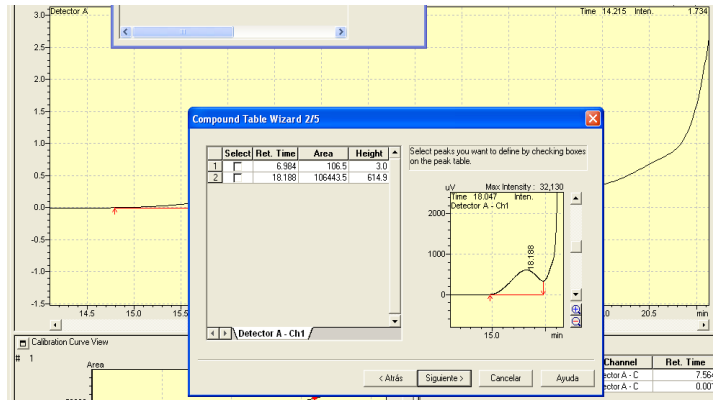
B2



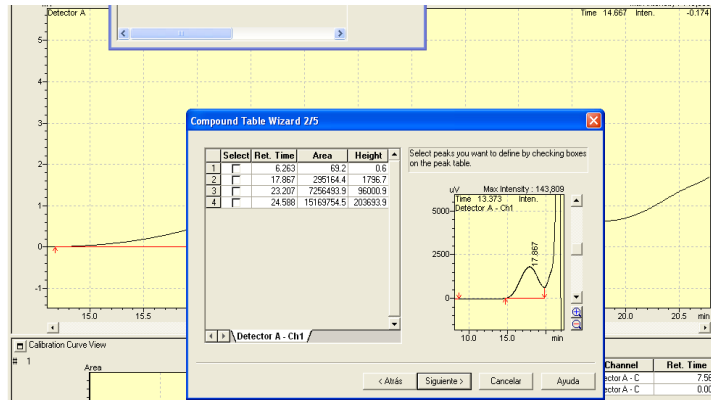
B3



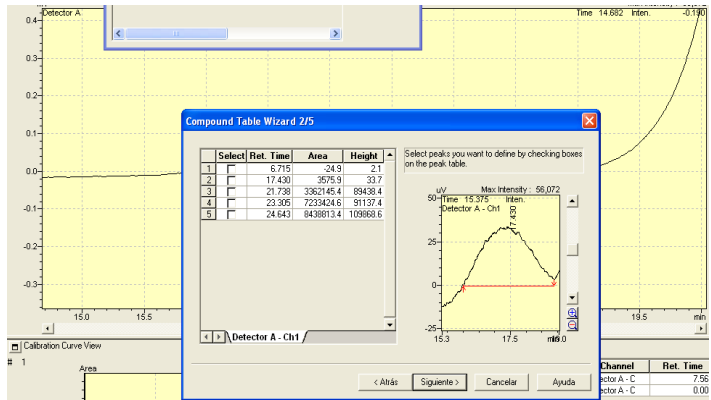
C1



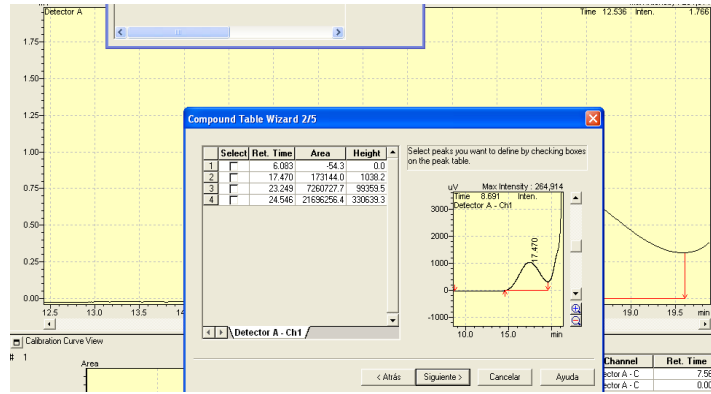
C2



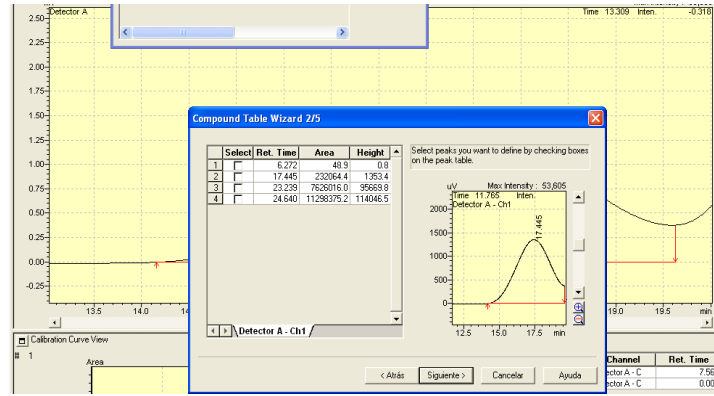
C3



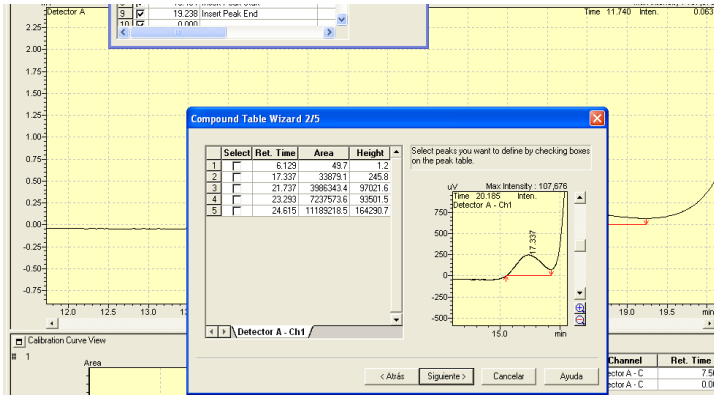
D1



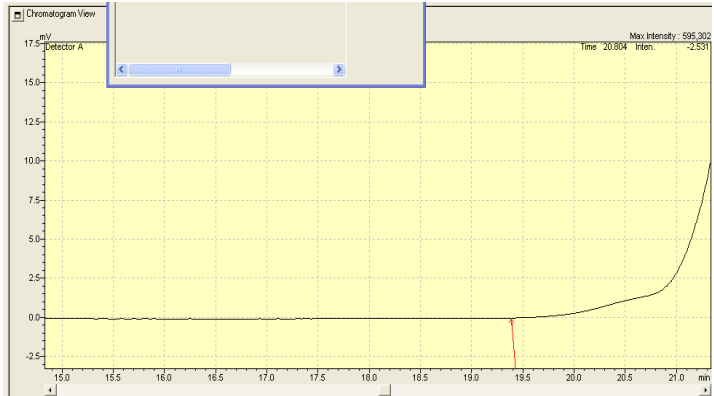
D2



D3



E1



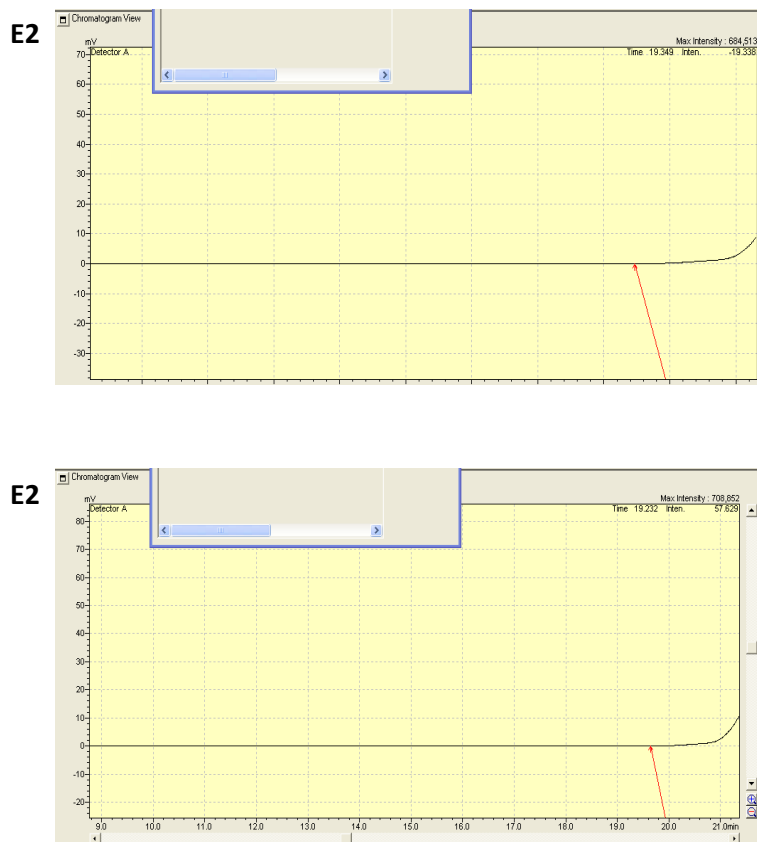


Figura P.3: Cromatogramas obtenidos a partir de las muestras. (A) Cepa evolucionada suplementada con xilosa, (B) cepa evolucionada suplementada con glucosa, (C) cepa no evolucionada suplementada con xilosa, (D) cepa no evolucionada suplementada con glucosa y (E) cepa nativa. (1) Inducción con 0,1 [g/L] de L- arabinosa una OD=1,0, (2) Inducción con 0,05 [g/L] de L- arabinosa una OD=1,0 y 2 horas después y (3) Inducción con 0,02 [g/L] de L- arabinosa una OD=1,0.

P.2.2 Optimización de ajuste de pH

A continuación se presentan la curva de calibración de HA y los datos obtenidos a partir de ella, para obtener las concentraciones de este HA en las distintas muestras. Los cromatogramas correspondientes a los estándares y muestras se pueden observar al final de esta sección.

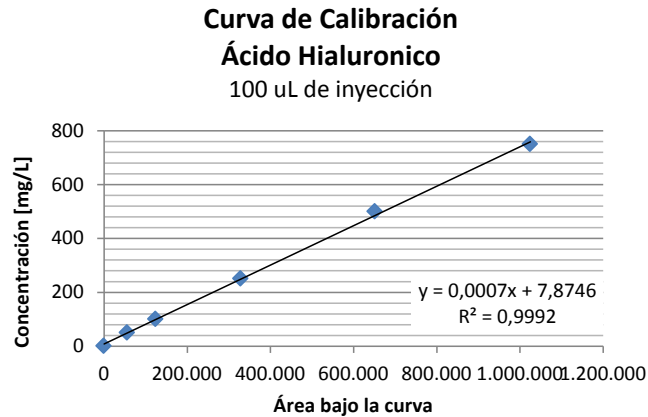


Figura P.4: Curva de calibración de ácido hialurónico a partir de estándares medidos con HPLC. El coeficiente de correlación es de 0,9992.

Tabla P.7: Muestras y resultados obtenidos del experimento 1 a partir del HPLC. Las concentraciones fueron extrapoladas de la curva de calibración. (A) Cepa evolucionada suplementada con xilosa, (B) cepa evolucionada suplementada con glucosa, (C) cepa no evolucionada suplementada con xilosa, (D) cepa no evolucionada suplementada con glucosa y (E) cepa nativa. (1) Sin ajuste, (2) con NaOH 0,012 M a las 24 horas de cultivo y (3) con NaOH 0,024 M a las 24 horas de cultivo.

Muestra	Tiempo de residencia	Área	Concentración [mg/L]	Con factor dilución (0,8) [mg/L]
A1	18,18	670.342,00	477,11	381,7
A2	18,21	598.553,50	426,86	341,5
A3	18,122	639.415,10	455,47	364,4
B1	17,89	560.300,50	400,09	320,1
B2	17,58	365.360,60	263,63	210,9
B3	17,70	491.634,70	352,02	281,6
C1	17,932	521.617,50	373,01	298,4
C2	17,74	383.223,60	276,13	220,9
C3	17,77	316.111,20	229,152	183,3
E1		0,00	7,875	0,0
E2		0,00	7,875	0,0
E3		0,00	7,875	0,0

* Ácido Hialurónico precipitado a partir de 10 mL de cultivo y disuelto en 8 mL de NaCl.

Tabla P.8: Muestras y resultados obtenidos del experimento 2 a partir del HPLC. Las concentraciones fueron extrapoladas de la curva de calibración. (A) Cepa evolucionada suplementada con xilosa, (B) cepa evolucionada suplementada con glucosa, (C) cepa no evolucionada suplementada con xilosa, (D) cepa no evolucionada suplementada con glucosa y (E) cepa nativa. (1) Sin ajuste, (2) con NaOH 0,012 M a las 24 horas de cultivo y (3) con NaOH 0,024 M a las 24 horas de cultivo.

Muestra	Tiempo de residencia	Área	Concentración [mg/L]	Con factor dilución (0,6)* [mg/L]
A1	17,46	347.543,70	569,20	341,5
A2	17,85	325.343,50	533,68	320,2
A3	17,46	327.273,50	536,77	322,1
B1	17,72	204.274,50	339,97	204,0
B2	17,04	157.454,70	265,06	159,0
B3	17,08	137.875,20	233,73	140,2
C1	17,72	242.846,70	401,69	241,0
C2	17,32	258.754,80	427,14	256,3
C3	17,01	218.474,50	362,69	217,6
E1		0,00	13,133	0,0
E2		0,00	13,133	0,0
E3		0,00	13,133	0,0

* Ácido Hialurónico precipitado a partir de 10 mL de cultivo y disuelto en 6 mL de NaCl.

Tabla P.9: Cepas y concentración de HA de sus cultivos del experimento 1.

Cepa	Concentración Ácido Hialurónico [mg/L]		
	Sin ajuste de pH	0,012 M NaOH a las 24 h de cultivo	0,024 M NaOH a las 24 h de cultivo
Cepa evolucionada suplementada con xilosa	381,69	341,49	364,37
Cepa evolucionada suplementada con glucosa	320,07	210,9	281,62
Cepa no evolucionada suplementada con xilosa	298,41	220,9	183,32
Cepa nativa suplementada con xilosa	0		

Tabla P.10: Cepas y concentración de HA de sus cultivos del experimento 2.

Cepa	Concentración Ácido Hialurónico [mg/L]		
	Sin ajuste de pH	0,012 M NaOH a las 24 hrs de cultivo	0,024 M NaOH a las 24 hrs de cultivo
Cepa evolucionada suplementada con xilosa	341,5	320,21	322,062
Cepa evolucionada suplementada con glucosa	203,98	159,04	140,240
Cepa no evolucionada suplementada con xilosa	241,01	256,28	217,615
Cepa nativa suplementada con xilosa	0,00	0,00	0,000

P.2.3 Optimización de la temperatura de inducción

A continuación se presentan la curva de calibración de HA y los datos obtenidos a partir de ella, para obtener las concentraciones de este HA en las distintas muestras. Los cromatogramas correspondientes a los estándares y muestras se pueden observar al final de esta sección.

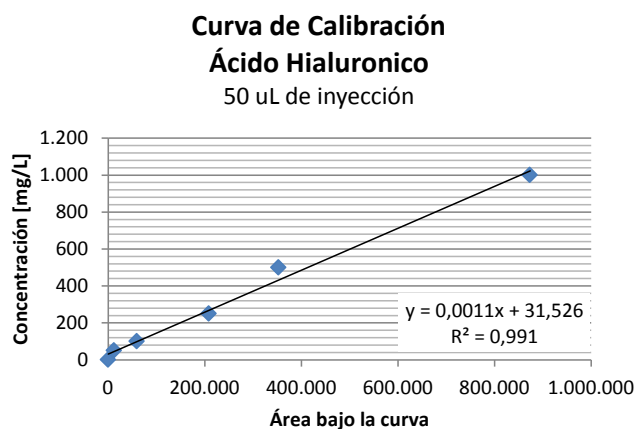


Figura P.5: Curva de calibración de ácido hialurónico a partir de estándares medidos con HPLC. El coeficiente de correlación es de 0,991.

Tabla P.11: Muestras y resultados obtenidos a partir del HPLC. Las concentraciones fueron extrapoladas de la curva de calibración. (A) Cepa evolucionada suplementada con xilosa, (B) cepa evolucionada suplementada con glucosa, (C) cepa no evolucionada suplementada con xilosa y (E) cepa nativa suplementada con xilosa. Inducción a (1) 37°C, (2) 20°C y (3) 28,5°C.

Muestra	Tiempo de residencia	Área	Concentración*
A1	17,542	312.583,30	375,37
A2	17,579	283.153,60	342,99
A3	18,16	324.821,80	388,83
B1	23,06	202.467,90	254,24
B2	18,12	161.297,40	208,95
B3	16,46	260.552,40	318,13
C1	17,11	256.707,60	313,90
C2	17,77	170.758,10	219,36
C3	18,076	269.133,30	327,57
E1		0,00	0,00

* No hubo dilución porque el ácido hialurónico precipitado a partir de 10 mL de cultivo fue disuelto en 10 mL de NaCl.

Tabla P.12: Muestras y resultados obtenidos en el experimento 1 a partir del HPLC. Las concentraciones fueron extrapoladas de la curva de calibración. (A) Cepa evolucionada suplementada con xilosa, (B) cepa evolucionada suplementada con glucosa, (C) cepa no evolucionada suplementada con xilosa y (E) cepa nativa suplementada con xilosa. Inducción a (1) 37°C, (2) 20°C y (3) 28,5°C.

Cepa	Concentración Ácido Hialurónico [mg/L]		
	Inducción a 37°C	Inducción a 20°C	Inducción a 28,5°C
Cepa evolucionada suplementada con xilosa	375,37	342,99	388,83
Cepa evolucionada suplementada con glucosa	254,24	208,95	318,13
Cepa no evolucionada suplementada con xilosa	313,90	219,36	327,57
Cepa nativa suplementada con xilosa	0		

* No hubo dilución porque el ácido hialurónico precipitado a partir de 10 mL de cultivo fue disuelto en 10 mL de NaCl.

Tabla P.13: Cepas y concentración de HA de sus cultivos del experimento 1.

Cepa	Concentración Ácido Hialurónico [mg/L]		
	Inducción a 37°C	Inducción a 20°C	Inducción a 28,5°C
Cepa evolucionada suplementada con xilosa	375,37	342,99	388,83
Cepa evolucionada suplementada con glucosa	254,24	208,95	318,13
Cepa no evolucionada suplementada con xilosa	313,90	219,36	327,57
Cepa nativa suplementada con xilosa	0		

Tabla P.14: Cepas y concentración de HA de sus cultivos del experimento 2.

Cepa	Concentración Ácido Hialurónico [mg/L]		
	Sin ajuste de pH	0,012 M NaOH a las 24 hrs de cultivo	0,024 M NaOH a las 24 hrs de cultivo
Cepa evolucionada suplementada con xilosa	360,1	311,89	364,656
Cepa evolucionada suplementada con glucosa	230,25	196,23	300,349
Cepa no evolucionada suplementada con xilosa	301,65	201,65	307,170
Cepa nativa suplementada con xilosa	0,00		

P.2.4 Optimización de concentración de xilosa suplementada

A continuación se presentan la curva de calibración de HA y los datos obtenidos a partir de ella, para obtener las concentraciones de este HA en las distintas muestras. Los cromatogramas correspondientes a los estándares y muestras se pueden observar al final de esta sección.

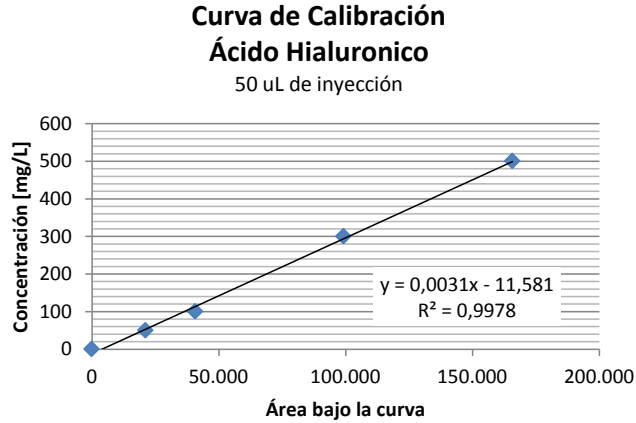


Figura P.6: Curva de calibración de ácido hialurónico a partir de estándares medidos con HPLC. El coeficiente de correlación es de 0,9978.

Tabla P.15: Muestras y resultados obtenidos en el experimento 2 a partir del HPLC. Las concentraciones fueron extrapoladas de la curva de calibración. (A) Cepa evolucionada suplementada con xilosa, (B) cepa evolucionada suplementada con glucosa, (C) cepa no evolucionada suplementada con xilosa y (E) cepa nativa suplementada con xilosa. Suplementos de: (1) 10 y 6 g/L, (2) 20 y 12 g/L y (3) 30 y 18 g/L.

Muestra	Tiempo de residencia	Área	Concentración [mg/L]*
A1	19,08	107.458,60	344,70
A2	19,58	154.477,80	490,46
A3	19,823	117.470,80	375,74
B1	19,583	62.174,60	204,32
B2	19,58	133.765,80	426,25
B3	18,813	68.972,20	225,39
C1	18,26	60.713,80	199,79
C2	19,99	108.650,00	348,40
C3	17,201	63.908,50	209,70
E1		0,00	0,01

* No hubo dilución porque el ácido hialurónico precipitado a partir de 10 mL de cultivo fue disuelto en 10 mL de NaCl.

Tabla P.16: Cepas y concentración de HA de sus cultivos.

Cepa	Concentración Ácido Hialurónico [mg/L]		
	Inducción a 37°C	Inducción a 20°C	Inducción a 28,5°C
Cepa evolucionada suplementada con xilosa	375,37	342,99	388,83
Cepa evolucionada suplementada con glucosa	254,24	208,95	318,13
Cepa no evolucionada suplementada con xilosa	313,90	219,36	327,57
Cepa nativa suplementada con xilosa	0		

P.2.5 Comparación condiciones optimizadas y basales

A continuación se presentan la curva de calibración de HA y los datos obtenidos a partir de ella, para obtener las concentraciones de este HA en las distintas muestras. Los cromatogramas correspondientes a los estándares y muestras se pueden observar al final de esta sección.

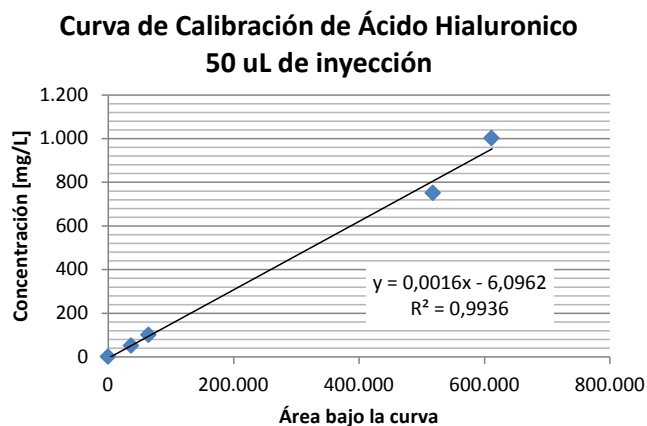


Figura P.7: Curva de calibración de ácido hialurónico a partir de estándares medidos con HPLC. El coeficiente de correlación es de 0,9936.

Tabla P.17: Muestras y resultados obtenidos a partir del HPLC. Las concentraciones fueron extrapoladas de la curva de calibración. (EVO) Cepa evolucionada suplementada con xilosa en condiciones optimizadas, (BASAL) cepa evolucionada suplementada con xilosa en condiciones basales y (NO EVO) cepa no evolucionada suplementada con xilosa en condiciones optimizadas.

Muestra	Tiempo de residencia	Área	Concentración [mg/L]	Con factor dilución (2) [mg/L]*
EVO 1	17,58	201.664,00	316,57	633,13
EVO 2	17,64	197.043,90	309,17	618,35
EVO 3	17,55	196.042,20	307,57	615,14
BASAL 1	17,67	145.267,80	226,33	452,66
BASAL 2	17,60	152.792,60	238,37	476,74
BASAL 3	17,64	136.075,40	211,62	423,25
NO EVO 1	17,55	167.651,10	262,15	524,29
NO EVO 2	18,05	132.828,00	206,43	412,86
NO EVO 3	17,99	161.623,20	252,50	505,00

* La muestra fue diluida porque el ácido hialurónico precipitado a partir de 10 mL de cultivo fue disuelto en 20 mL de NaCl.

P.3 Modelo a Escala Genómica

P.3.1 Metabolitos y reacciones de las vías centrales de la cepa recombinante

Tabla P.18: Metabolitos de la vías centrales de la cepa recombinante.

METABOLITOS			
13dpg	3-Phospho-D-glyceroyl phosphate	icit	Isocitrate
2dmmq8	2-Demethylmenaquinone 8	mal-L	L-Malate
2dmmql8	2-Demethylmenaquinol 8	man	D-Mannose
2pg	D-Glycerate 2-phosphate	man6p	D-Mannose 6-phosphate
3pg	3-Phospho-D-glycerate	mq18	Menaquinol 8
6pgc	6-Phospho-D-gluconate	mqn8	Menaquinone 8
6pgl	6-phospho-D-glucono-1,5-lactone	nad	Nicotinamide adenine dinucleotide
ac	Acetate	nadh	Nicotinamide adenine dinucleotide - reduced
accoa	Acetyl-CoA	nadp	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
acgam1p	N-Acetyl-D-glucosamine 1-phosphate	nadph	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate - reduced
acon-C	cis-Aconitate	nh4	Ammonium
actp	Acetyl phosphate	oaa	Oxaloacetate
adp	ADP	pep	Phosphoenolpyruvate
akg	2-Oxoglutarate	pi	Phosphate
amp	AMP	ppi	Diphosphate
atp	ATP	pyr	Pyruvate
cit	Citrate	q8	Ubiquinone-8
co2	CO2	q8h2	Ubiquinol-8
coa	Coenzyme A	r5p	alpha-D-Ribose 5-phosphate
e4p	D-Erythrose 4-phosphate	ru5p-D	D-Ribulose 5-phosphate
f6p	D-Fructose 6-phosphate	s7p	Sedoheptulose 7-phosphate
fdp	D-Fructose 1,6-bisphosphate	succ	Succinate
fum	Fumarate	succoa	Succinyl-CoA
g1p	D-Glucose 1-phosphate	uacgam	UDP-N-acetyl-D-glucosamine
g3p	Glyceraldehyde 3-phosphate	udp	UDP
g6p	D-Glucose 6-phosphate	udpg	UDPglucose
gam1p	D-Glucosamine 1-phosphate	udpglucr	UDP-D-glucuronate
gam6p	D-Glucosamine 6-phosphate	utp	UTP
glu-L	L-Glutamate	xu5p-D	D-Xylulose 5-phosphate
glx	Glyoxylate	xyl-D	D-Xylose
h	H+	xylu-D	D-Xylulose
h2o	H2O	[e]	extracelular
hyaac	Ácido hialurónico	[p]	periplasmático

Tabla P.19: Reacciones de la vías centrales de la cepa recombinante.

Reacciones			
G6PDH	$g6p + nadp \rightleftharpoons 6pgl + h + nadph$	FRD2	$fum + mql8 \rightarrow mqn8 + succ$
PGL	$6pgl + h2o \rightarrow 6pgc + h$	FRD3	$2dmmql8 + fum \rightarrow 2dmmq8 + succ$
GND	$6pgc + nadp \rightarrow co2 + nadph + ru5p-D$	FUM	$fum + h2o \rightleftharpoons mal-L$
RPE	$ru5p-D \rightleftharpoons xu5p-D$	MDH	$mal-L + nad \rightleftharpoons h + nadh + oaa$
RPI	$r5p \rightleftharpoons ru5p-D$	MDH2	$mal-L + q8 \rightarrow oaa + q8h2$
PGI	$g6p \rightleftharpoons f6p$	MDH3	$mal-L + mqn8 \rightarrow mql8 + oaa$
PFK	$atp + f6p \rightarrow adp + fdp + h$	MOX	$mal-L + o2 \rightleftharpoons h2o2 + oaa$
FBP	$fdp + h2o \rightarrow f6p + pi$	PTAr	$accoa + pi \rightleftharpoons actp + coa$
TALA	$g3p + s7p \rightleftharpoons e4p + f6p$	ACKr	$ac + atp \rightleftharpoons actp + adp$
TKT1	$r5p + xu5p-D \rightleftharpoons g3p + s7p$	ACS	$ac + atp + coa \rightarrow accoa + amp + ppi$
TKT2	$e4p + xu5p-D \rightleftharpoons f6p + g3p$	ICL	$icit \rightarrow glx + succ$
GAPD	$g3p + nad + pi \rightleftharpoons 13dpg + h + nadh$	MALS	$accoa + glx + h2o \rightarrow coa + h + mal-L$
PGK	$3pg + atp \rightleftharpoons 13dpg + adp$	XYLt2pp	$h[p] + xyl-D[p] \rightarrow h + xyl-D$
PGM	$2pg \rightleftharpoons 3pg$	XYLtex	$xyl-D[e] \rightleftharpoons xyl-D[p]$
ENO	$2pg \rightleftharpoons h2o + pep$	XYLI1	$xyl-D \rightleftharpoons xylu-D$
PPS	$atp + h2o + pyr \rightarrow amp + 2 h + pep + pi$	XYLK	$atp + xylu-D \rightarrow adp + h + xu5p-D$
PYK	$adp + h + pep \rightarrow atp + pyr$	MANtex	$man[e] \rightleftharpoons man[p]$
PPC	$co2 + h2o + pep \rightarrow h + oaa + pi$	MANptspp	$pep + man[p] \rightarrow man6p + pyr$
PPCK	$atp + oaa \rightarrow adp + co2 + pep$	MAN6PI	$man6p \rightleftharpoons f6p$
PDH	$coa + nad + pyr \rightarrow accoa + co2 + nadh$	GLUDy	$glu-L + h2o + nadp \rightleftharpoons akg + h + nadph + nh4$
ME1	$mal-L + nad \rightarrow co2 + nadh + pyr$	GLNS	$atp + glu-L + nh4 \rightarrow adp + gln-L + h + pi$
ME2	$mal-L + nadp \rightarrow co2 + nadph + pyr$	PGMT	$g1p \rightleftharpoons g6p$
CS	$accoa + h2o + oaa \rightarrow cit + coa + h$	GALUi	$g1p + h + utp \rightarrow ppi + udpg$
ACONTa	$cit \rightleftharpoons acon-C + h2o$	UDPGD	$h2o + 2 nad + udpg \rightarrow 3 h + 2 nadh + udpglcur$
ACONTb	$acon-C + h2o \rightleftharpoons icit$	GF6PTA	$f6p + gln-L \rightarrow gam6p + glu-L$
ICDHyr	$icit + nadp \rightleftharpoons akg + co2 + nadph$	PGAMT	$gam1p \rightleftharpoons gam6p$
AKGDH	$akg + coa + nad \rightarrow co2 + nadh + succoa$	G1PACT	$accoa + gam1p \rightarrow acgam1p + coa + h$
SUCOAS	$atp + coa + succ \rightleftharpoons adp + pi + succoa$	UAGDP	$acgam1p + h + utp \rightarrow ppi + uacgam$
SUCDi	$q8 + succ \rightarrow fum + q8h2$	SYNHA	$udpglcur + uacgam + h2o \rightarrow hyaac + 2 udp$

P.3.2 Código de Matlab

```

initCobraToolbox;
gurobi_setup
%% Leer modelo
model = readCbModel('msb201165-s3.xml'); % Lee el modelo

%% Inicialmente flujos de intercambio igual a 0. Compuestos del medio R2 distinto de 0 (en exceso, lb -1000)
[selExc, selUpt] = findExcRxns(model); % selExc es 1 o -1 si es rxn de intercambio (E.
for i=1:length(model.rxns) % si selExc o selExc es 1 o -1 entonces es de
    if selExc(i,1)==1 || selExc(i,1)==-1 % Fijar todas las reacciones Ex con una lower
        model=changeRxnBounds(model,model.rxns(i,1),0,'l');
    end
end
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(74,1),-1000,'l'); % Calcio x
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(81,1),-1000,'l'); % Citrato x
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(82,1),-1000,'l'); % Cloruro x
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(85,1),-1000,'l'); % CO2 x
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(95,1),-1000,'l'); % Cu+2 x
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(96,1),-1000,'l'); % Cu+ x
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(127,1),-1000,'l'); % Hierro +2 x
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(128,1),-1000,'l'); % Hierro +3 x
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(185,1),-1000,'l'); % H+ x
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(187,1),-1000,'l'); % Agua x
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(187,1),-1000,'l'); % Peróxido de hidrógeno x
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(187,1),-1000,'l'); % Ac. sulfídrico x
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(206,1),-1000,'l'); % Potasio x
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(212,1),-1000,'l'); % Leucina x
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(233,1),-1000,'l'); % Magnesio x
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(237,1),-1000,'l'); % Manganeso x
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(239,1),-1000,'l'); % Molibdato x
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(241,1),-1000,'l'); % Óxido de nitrógeno
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(242,1),-1000,'l'); % Sodio x
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(244,1),-1000,'l'); % Ammonio x
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(247,1),-1000,'l'); % Nitric oxide
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(252,1),-20,'l'); % Oxígeno x
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(263,1),-1000,'l'); % Fosfato x
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(289,1),-1000,'l'); % Dióxido de azufre
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(290,1),-1000,'l'); % Óxido de azufre
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(291,1),-1000,'l'); % Sulfato x
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(300,1),-1,'l'); % Tiamina x
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(332,1),-1000,'l'); % Zinc x

%model=changeRxnBounds(model,model.rxns(547,1),0,'b'); % Evitar loop (producción y consumo de acetato
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(81,1),0,'b'); % No hay citrato en el medio
%% Fuera el medio (por defecto están en el modelo, si se sacan no hay crecimiento)
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(76,1),-0.01,'l'); % Cob(I)alamine
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(86,1),-0.1,'l'); % Cobalto
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(245,1),-0.01,'l'); % Ni+2
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(284,1),-0.01,'l'); % Selenato
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(288,1),-0.01,'l'); % Selenito
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(313,1),-0.01,'l'); % Tungstato

%% Agregar reacción de síntesis de HA y de transporte
UDPgluc=model.mets(1010,1); % udpglucur[c] UDP-D-glucuronate
UDPNacetil=model.mets(994,1); % uacgam[c] UDP N-acetyl-glucosamine
H2O=model.mets(580,1); % Agua
UDP=model.mets(1003,1); % UDP
HyaAcid='X'; % HA

```

Figura P.8: Código utilizado en matlab para las simulaciones.

<pre> metsRXN=[UDFgluc;UDFNacetil;H2O;HyaAcid;UDP]; stoichcoeffs=[-1 -1 -1 1 2]; [model]=addReaction(model,'SYNHA',metsRXN,stoichcoeffs,false); metsRXN2=HyaAcid; stoichcoeffs2=-1; [model]=addReaction(model,'EX_HA',metsRXN2,stoichcoeffs2,false); model.metFormulas(1806) = 'C14H23NO11'; </pre>	<pre> % lista de meta % coeficientes estequiometricos de los metaboli % agrega reaccion % lista de metabolitos en la reaccion % coeficientes estequiometricos de los metabolito </pre>
<pre> %% Solución del modelo con xilosa model=changeRxnBounds(model,'EX_xyl-D(e)',-6.16,'b'); model=changeRxnBounds(model,'EX_glc(e)',0,'b'); model=changeRxnBounds(model,'EX_ac(e)',0.616,'b'); model=changeRxnBounds(model,'ACKr',-0.616,'b'); model=changeRxnBounds(model,'SYNHA',0.2042,'b'); model=changeRxnBounds(model,'Ec_biomass_iJO1366_WT_53p95M',0.2057,'b'); model = changeObjective(model,'Ec_biomass_iJO1366_WT_53p95M'); % model = changeObjective(model,'EX_o2(e)'); solutionxyl = optimizeCbModel(model,'max'); fprintf('\nLa velocidad especifica de crecimiento en xilosa es: %d [1/hr]\n',solutionxyl.f) </pre>	<pre> % Se fija como fuente de carbono a la Xilosa c % 10% de pérdida en acetato % Se fija como fuente de carbono a la Xilosa c % Maximizar biomasa % Fijar como objetivo maximizar consumo de O2 </pre>
<pre> %% Solución del modelo con manosa model=changeRxnBounds(model,'EX_man(e)',-4.2621,'b'); model=changeRxnBounds(model,'EX_xyl-D(e)',0,'b'); model=changeRxnBounds(model,'EX_glc(e)',0,'b'); model=changeRxnBounds(model,'EX_ac(e)',0.42621,'b'); model=changeRxnBounds(model,'ACKr',0.42621,'b'); model=changeRxnBounds(model,'SYNHA',0.1426,'b'); model=changeRxnBounds(model,'Ec_biomass_iJO1366_WT_53p95M',0.1756,'b'); model = changeObjective(model,'Ec_biomass_iJO1366_WT_53p95M'); % model = changeObjective(model,'EX_o2(e)'); solutionxyl = optimizeCbModel(model,'max'); fprintf('\nLa velocidad especifica de crecimiento en xilosa es: %d [1/hr]\n',solutionxyl.f) </pre>	<pre> % Manosa a 18.5 mmol/(gDW h) % Se fija como fuente de carbono a la Xilosa c % 10% de pérdida en acetato % Se fija como fuente de carbono a la Xilosa c % Maximizar biomasa % Fijar como objetivo maximizar consumo de O2 </pre>

Figura P.9: Código utilizado en matlab para las simulaciones (continuación).

CULTIVO TIPO BATCH Y CONTINUO DE *ESCHERICHIA COLI*

El cultivo batch consiste en un sistema cerrado donde son crecidas células, con un volumen de medio nutritivo fijo y bajo condiciones ambientales específicas en términos de pH, temperatura, nivel de oxigenación, etc. Si el cultivo se realiza en un reactor, estos parámetros se determinan a partir de un controlador que regula los flujos de tampón, antiespumante, agua de la chaqueta térmica y también la agitación. Otra opción es realizar el cultivo batch en un matraz donde el control de estas variantes es más difícil o inexistente y en general se trabaja con volúmenes menores. El cultivo tipo batch no tiene alimentación, por lo que el medio es el que contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de la biomasa (fuente de carbono, nitrógeno, ciertas sales y oligoelementos). Los microorganismos se ingresan al reactor en forma de inóculo, que corresponde a un pequeño volumen de microorganismos previamente crecidos en un tubo de ensayo o matraz, obtenidos de una placa o directamente de un stock en glicerol.

Los cultivos batch muestran una dinámica que presenta en un principio la fase *lag*, la que corresponde al periodo en que los microorganismos generan la batería enzimática y los co-factores necesarios para la replicación celular. Luego, sin limitación de sustrato, el cultivo crece a velocidad específica máxima de crecimiento, por lo que esta fase es llamada la fase de crecimiento exponencial. Una vez que se acaba el sustrato, el cultivo pasa a la fase estacionaria, periodo en el que el crecimiento de la biomasa cesa. Finalmente, habiéndose agotado todos los recursos, las células pasan a la fase de muerte o decaimiento. Un esquema de lo descrito recientemente se muestra en la Figura Q.1.

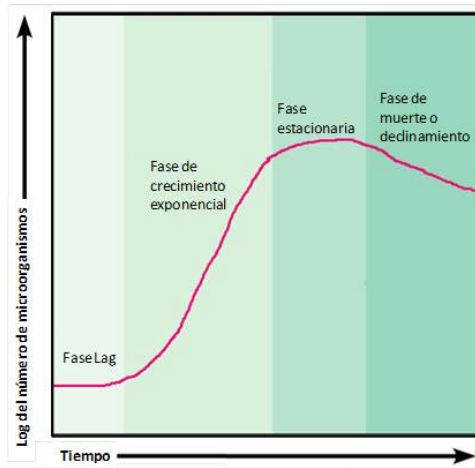


Figura Q.1: Crecimiento de un cultivo batch.

El crecimiento de la bacteria *E. coli* durante el periodo exponencial, como lo define la ecuación a continuación:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (\text{Q.1})$$

donde:

X : Densidad celular [gr/L]

t : Tiempo [h]

μ : Velocidad específica de crecimiento [$1/h$]

Durante el crecimiento exponencial, la velocidad específica de crecimiento μ es constante y máxima, conocida como μ_{max} . Es así como se deriva la siguiente expresión:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} X \quad (\text{Q.2})$$

$$\frac{dX}{X} = \mu_{max} dt \quad (\text{Q.3})$$

Para un intervalo pequeño de tiempo, es posible aproximar la expresión anterior a:

$$\ln(X) - \ln(X_0) = \mu_{max} \Delta t \quad (\text{Q.4})$$

$$\mu_{max} = \frac{\ln(X) - \ln(X_0)}{\Delta t} \quad (\text{Q.5})$$

donde:

X_0 : Densidad celular en el tiempo inicial [gr/L]

μ_{max} : Velocidad específica de crecimiento máxima [$1/h$]

Con la ecuación Q.5 es posible estimar la velocidad específica de crecimiento máxima de *E. coli* a partir de una curva de crecimiento. Es importante notar que la absorbancia es proporcional a la densidad celular, por lo que indiferentemente se puede utilizar este atributo como medida de concentración celular para este cálculo.

Por otro lado, el cultivo continuo de células se realiza comúnmente en un reactor con controlador, al igual que en el cultivo batch, pero su diferencia consiste en que tiene una entrada y una salida adicional. La entrada se utiliza para el ingreso de medio fresco (y compuestos adicionales como inductor y antibiótico en caso de ser necesario) y la salida consiste en cultivo (medio, células, productos generados, etc.). Con este mecanismo es posible mantener las células en crecimiento exponencial dada la disponibilidad de compuestos gracias a la entrada descrita. La salida sirve de monitoreo y para regular el volumen trabajado. Si el volumen del cultivo y los flujos de entrada y salida se mantienen constantes, la velocidad específica de crecimiento obtenida también. Estos parámetros que se diseñan y/o controlan se describen a continuación Parés y Juárez (1997):

$$D = \frac{F}{V} \quad (\text{Q.6})$$

y

$$\mu = D \quad (\text{Q.7})$$

donde:

D : Tasa de dilución [$1/h$]

F : Flujo de entrada y salida del cultivo [L/h]

V : Volumen del cultivo [L]

La velocidad específica de crecimiento puede considerarse como máxima si se cumplen las siguientes condiciones: medio de cultivo perfectamente agitado, cultivo homogéneo, propiedades del cultivo prácticamente constantes (a altas concentraciones de sustrato) y que todos los componentes del medio estén en exceso. De esta forma se obtiene que:

$$\mu_{max} = D \quad (\text{Q.8})$$

Así es posible estimar la velocidad específica de crecimiento máxima de un cultivo continuo en particular.

La imagen de un reactor y su respectivo controlador se muestra en la Figura Q.2.



Figura Q.2: Reactor con cotrolador.