

Producción de poli(3-hidroxibutirato) a partir de una cepa de *Escherichia Coli* modificada por medio del uso del transposón como conductor genético

Tatiana Zúñiga Burgos

Abstract

Biopolymers are compounds that have attracted great interest from the biotechnology field, because of their physicochemical similarities with petroleum derivate polymers. Macro production of this biomaterial may replace artificial polymeric compounds, leading to a remarkable reduction/modification of the environmental impacts that are associated with the production and consume of plastics. However, there have been found many obstacles in the chain production of bioplastics that must be carried on in order to achieve the above. In the case of bacteria like *Ralstonia Eutropha H16* (*Cupriavidus Necator H16*), poly(3-hydroxybutyrate) production occurs at very low rates, which decreases substantially the efficiency of the process. Therefore, this project pretends to produce poly(3-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia Coli* through the use of transposons as genetic conductors. This measure intends to decrease plasmids use in the production process of biopolymers and thereby, to control the use and discharge of antibiotics in wastewater as an environmental correction.

Resumen

Los biopolímeros son compuestos que han despertado un gran interés en el campo biotecnológico, debido a sus similares facultades fisicoquímicas con respecto a los polímeros derivados del petróleo. Su producción a nivel macro puede llegar a reemplazar en gran medida dichos compuestos poliméricos, conllevando a una reducción y/o modificación sustancial de los impactos ambientales asociados a la producción y consumo de los plásticos. No obstante, son varios los obstáculos encontrados en la cadena de producción de bioplásticos, que deben ser sobrellevados para lograr lo anterior. En el caso de las bacterias como *Ralstonia Eutropha H16* (*Cupriavidus Necator H16*), la producción de poli(3-hidroxibutirato) ocurre a tasas bastante bajas, lo cual disminuye la eficiencia del proceso considerablemente. Dado lo anterior, el presente proyecto pretende producir poli(3-hidroxibutirato) a partir de la clonación de una cepa de *Escherichia Coli*, a través del uso de transposones como conductores genéticos. Dicha medida tiene la intención de disminuir la implementación de plásmidos en el proceso de producción de biopolímeros y con ello, controlar el uso y vertimiento de antibióticos al agua residual como medida de corrección ambiental.

Palabras clave: Transposón, *Ralstonia Eutropha H16*, *E. Coli*, Poli(3-hidroxibutirato), Ácidos grasos volátiles, Agua Residual.

Introducción

El plástico es un compuesto que se utiliza para fabricar un gran número de productos, lo que hace de este un material versátil para varios propósitos [1]. Esto se debe a que los polímeros sintéticos pueden ser modificados estructuralmente de forma sencilla para tener distintas formas y texturas, según las necesidades de cada producto [2]. Sin embargo, un aspecto negativo de los plásticos es su lenta degradación, una vez que estos se convierten en residuos sólidos dado su alto peso y gran estructura molecular; lo anterior en consecuencia genera una acumulación de residuos poliméricos en las grandes ciudades [1]. Asimismo, un factor adicional al problema del uso de los polímeros sintéticos es su bajo costo de producción, el cual puede hacer que el aprovechamiento físico que incluye procesos de reciclaje

y reutilización de estos compuestos sea en la mayoría de los casos, aún más costoso que su manufactura a partir de materia prima virgen.

Por otro lado, las grandes poblaciones siguen produciendo enormes cantidades de agua residual doméstica e industrial, teniendo esta última, un tratamiento considerablemente más complejo. Por lo cual cada vez se hace más necesario buscar formas alternativas de manejo que permitan integrar ambas situaciones (Acumulación de residuos poliméricos/Agua residual industrial) de forma complementaria.

Dada la problemática general planteada, es fundamental encontrar soluciones contundentes que sean capaces de mitigar los impactos ambientales generados por el uso de los polímeros sintéticos y la descarga de aguas

residuales industriales. Investigaciones de la última década han enfocado sus esfuerzos a la comprensión y ejecución de los procesos de producción de biopolímeros. Se ha descubierto que estos biomateriales tienen la estructura necesaria para reemplazar plásticos como el polipropileno, polietileno y poliestireno [3]; y pueden ser producidos por varios organismos (plantas, bacterias, levaduras y animales) [2]. Por ejemplo, los polihidroxialcanoatos (PHA) son compuestos poliméricos totalmente biodegradables que son producidos por un gran número de bacterias, entre ellas, *Ralstonia Eutropha H16* la cual es capaz de producir una cantidad considerable de polihidroxibutirato (P(3HB)) en forma de gránulos dentro de su citoplasma, tomando como sustrato los ácidos grasos volátiles provenientes de un agua residual industrial pre tratada, lo cual genera una integración de las situaciones expuestas anteriormente.

No obstante, la tasa de producción de P(3HB) por parte de *R. eutropha H16* ocurre a tasas relativamente lentas, por lo cual el presente proyecto pretende aumentar las tasas de producción de biopolímero a través de cepas modificadas, utilizando como sustrato los ácidos grasos volátiles producidos específicamente a raíz de un tren de tratamiento de un agua residual industrial “proveniente” de una fábrica de lácteos, el cual incluye un sistema de bioreactores con ultrafiltración [4].

Marco Teórico

Como se ha mencionado, la investigación científica basada en la producción de biopolímeros promete ser una alternativa eficiente para mitigar los impactos ambientales relacionados con el desecho de residuos sólidos poliméricos de origen artificial. Asimismo sucede con las aguas residuales industriales, las cuales aumentan en cantidad y complejidad, por lo que los tratamientos de estas se encuentran abrumados y saturados al punto de disminuir su eficacia y calidad en los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR).

Siendo así, se plantea la medida propuesta en el proyecto como una alternativa que integra ambas problemáticas en su metodología. Lo anterior sin embargo, requiere del conocimiento de conceptos que involucran áreas como la Biología Molecular, la Microbiología y la Ingeniería Ambiental, entre otras. En la primera y segunda de ellas, se encuentra toda la información relacionada con la clonación genética del

ADN, a partir del que se obtendrán las cepas modificadas.

Todo parte principalmente del genoma de *Ralstonia Eutropha H16* (Cupriavidus Necator H16), el cual contiene los genes que le atribuyen a esta bacteria la capacidad de producir biopolímero a partir de varios sustratos. La identificación de dichos genes denominados como phbCAB (phbA β -ketoacyl-CoA thiolase [5], phbB acetoacetyl-CoA reductase [6] y phbC PHB polymerase [7]) ha sido verificada por un gran número de investigadores, y permite hoy en día realizar manipulaciones genéticas que conlleven finalmente a la producción a nivel macro de este polímero biodegradable [8]. Adicionalmente, se ha encontrado que las tasas a las que *R. eutropha H16* produce P(3HB) son bastante bajas, lo que representa un problema para los costos de producción y operación principalmente. De esta forma, se pretende tomar nuevas medidas con el objetivo de “agilizar el proceso”.

Dado lo anterior, se mostrarán los conceptos básicos que permiten tener una base teórica que soporte la metodología que plantea el proyecto:

- Plásmidos

Son moléculas de ADN de doble cadena que pueden replicarse independientemente del ADN cromosomal y pueden transportar genes; existen naturalmente, sin embargo se han producido versiones comerciales que son más convenientes, para propósitos asociados a la Ingeniería genética. El mayor atributo de los plásmidos es que pueden transferir la resistencia a los antibióticos a otras células.

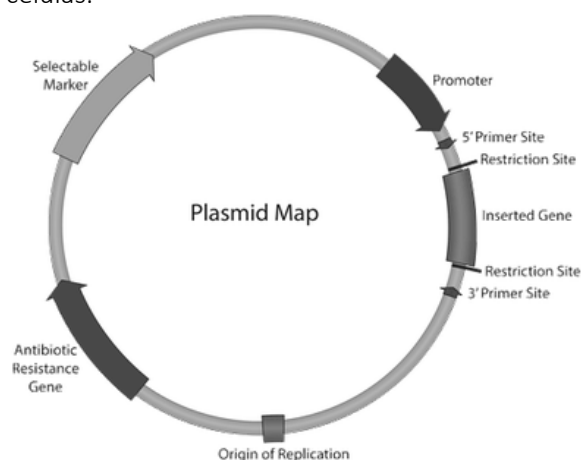


ILUSTRACIÓN 1: MAPA REPRESENTATIVO DE UN PLÁSMIDO [9]

Adicionalmente, como se observa en la ilustración anterior, todos los plásmidos cuentan con unos sitios específicos que permiten que estos puedan ser manipulados para varios objetivos [9]:

- Origen de replicación
- Gen de resistencia a antibióticos
- Sitio de clonación múltiple (MCS por sus siglas en inglés)
- Inserto (ADN foráneo)
- Región promotora
- Marcador selectivo

- Clonación a través del uso de Plásmidos comerciales
Es un proceso que se ha sido utilizado con éxito, dada la característica de los plásmidos de tener resistencia a algunos antibióticos. Consiste principalmente en formar una relación simbiótica entre la célula receptora y el plásmido, en la que la célula obtiene dicha resistencia a los antibióticos en el caso de hospedar en su citoplasma al plásmido [10].

No obstante, sucede que la aplicación de proyectos que utilizan este método conlleva a problemas de salud pública asociados a los efectos de los antibióticos provenientes de seres humanos, vertimientos y otras actividades en las aguas residuales [11].

- Transposones

Son segmentos discretos de ADN que son capaces de llevar a cabo inserciones aleatorias en los genomas de las células, por lo que se les llama también "genes saltarines" [12]; se encuentran naturalmente en el genoma de todo organismo.

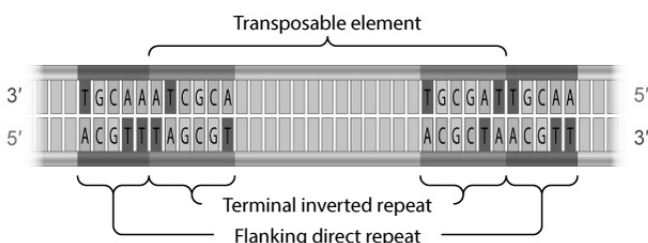


ILUSTRACIÓN 2: ESQUEMA BÁSICO DE UN TRANSPOSÓN [13]

Dadas sus características, los transposones pueden ser utilizados para realizar injertos de genes foráneos directamente en el genoma de una célula

receptora, lo cual es mucho más conveniente si se observa desde una perspectiva ambiental y operacional. Lo anterior se afirma debido a que como se ha discutido, el utilizar transposones en vez de plásmidos para propósitos genéticos elimina la problemática asociada al vertimiento de antibióticos al agua, y también, los costos asociados al uso de dichos fármacos.

- Clonación a través del uso de Transposones

Corresponde a un método distinto a través del cual se cumple con el objetivo principal de introducir un segmento de ADN conocido en una célula foránea, pero con el uso de transposones. Estos permiten introducir genes directamente en el genoma de una bacteria, lo cual es ideal, ya que se integra la información de los genes al ADN bacteriano de forma que las células receptoras expresan los genes foráneos como si fuesen propios.

Materiales y Métodos

A continuación se presentan los materiales y métodos implementados durante el proyecto.

A. Obtención del Operón phbCAB

Investigaciones pasadas de este proyecto lograron identificar el operón phbCAB [14] (4097 bp), a partir de revisiones bibliográficas que permitieron identificar las secuencias genómicas de los tres genes de interés involucrados en la producción de poli(3-hidroxibutirato (phbCAB)_[2].

Asimismo, se estableció el diseño de los primers de acuerdo con la secuencia complementaria del operón, con el fin de que este pueda ser amplificado a partir del genoma de *R. eutropha* H16:

Forward Primer (31 bp)

5'-ATGAATTCATAGTGACGGCAGAGACAATC-3'

Reverse Primer (29 bp)

5'-ACCCGGGCAACAAGGCACTAAGAAAAGCG-3'

Siendo así, el procedimiento adscrito a la obtención del operón se describe de la siguiente forma:

1. Elaboración de medio LB sólido (Ver ARCHIVO _1_).
2. Inoculación e Incubación de *R. eutropha* H16

Se realiza de acuerdo con los estándares prácticos microbiológicos. Una vez se lleve a cabo el inóculo, las cajas deben incubarse a 30° C durante un tiempo mínimo de 48 horas.

3. Medición del OD600

Sirve para identificar la densidad óptica de un cultivo bacteriano con un espectro de 600 nm; en este caso es necesario para conocer el nivel de maduración de las células al momento de realizar la extracción del ADN de *R. eutropha H16*. Este procedimiento se lleva a cabo a través de un espectrofotómetro (En el laboratorio se cuenta con el “NanoDrop 2000c”). Para revisar forma de uso y calibración del equipo, ver ARCHIVO _2_).

4. Extracción de ADN de *R. eutropha H16*

Después de lograr un valor del OD600 deseado (3-5), es factible realizar el proceso de extracción de ADN de la bacteria. Este se lleva a cabo a través del kit “PowerSoil DNA Isolation Kit” de la marca MO BIO (Para revisar protocolo, ver referencia [15]).

Para verificar que la extracción haya sido completada con éxito, se mide la concentración del producto (ADN), a través del espectrofotómetro, en el caso del laboratorio disponible, el equipo que cumple con esta función es el “NanoDrop 2000c” (Concentraciones iguales o mayores 50 ng/μL son aceptables).

5. Amplificación del Operón

Se lleva a cabo mediante PCR (Polymerase Chain Reaction). La polimerasa seleccionada es la Ex Taq TaKaRa Polymerase de la marca CLONTECH, ya que es de alta resolución y tiene un margen de error suficientemente pequeño, necesario para asegurar el producto (Para revisar el protocolo de la polimerasa, ver referencia [16]).

La mezcla se realiza en un eppendorf de 1.5 o 2 mL y posteriormente es distribuida en los tubos de PCR, los cuales son introducidos en el termociclador y se corre el protocolo (previamente programado) llamado “Ex taq TaKaRa”.

- Verificación

Una vez que el termociclador haya terminado de correr el protocolo, se debe elaborar un gel de electroforesis para revisar que se haya amplificado el operón, el cual

tiene aproximadamente 4000 pares de bases (Ver ARCHIVO _3_).

6. Purificación del producto (Operón)

Se realiza con el fin de aislar impurezas y reactivos asociados al proceso de amplificación, mediante el kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” de la marca PROMEGA (Para revisar protocolo, ver referencia [17]). Seguido de esto se puede realizar un gel de electroforesis para verificar que la banda (4000 bp) sigue en el producto, y cuantificar el producto en el NanoDrop 2000c.

B. Extracción del plásmido

El objetivo del uso del plásmido es aportar el promotor que permitirá a los genes involucrados en el operón (phbCAB) expresarse una vez se encuentren dentro de *Escherichia Coli*. Este debe ser seleccionado cuidadosamente según las necesidades y cualidades específicas para cada caso. Como menciona Bojacá, el plásmido seleccionado para el proyecto es “pETBlue-1” debido a que posee las características requeridas por el proceso [18]:

- Es un vector comercial para expresión en *E. Coli*.
- Tiene un promotor fuerte que es regulable con lactosa (lo cual es conveniente ya que el sustrato del producto de este proyecto son los AGV's producidos, a partir del tratamiento de agua residual industrial proveniente de procesos de elaboración de lácteos, donde la lactosa es un compuesto importante).
- Posee dos sitios de restricción que no están disponibles en el operon phbCAB (Ver Ilustración1).
- No tiene ningún tag (en el N o C terminal).
- Posee la facultad de selección de los transformantes.
- Tiene un alto número de copias y bajo peso molecular. [18]

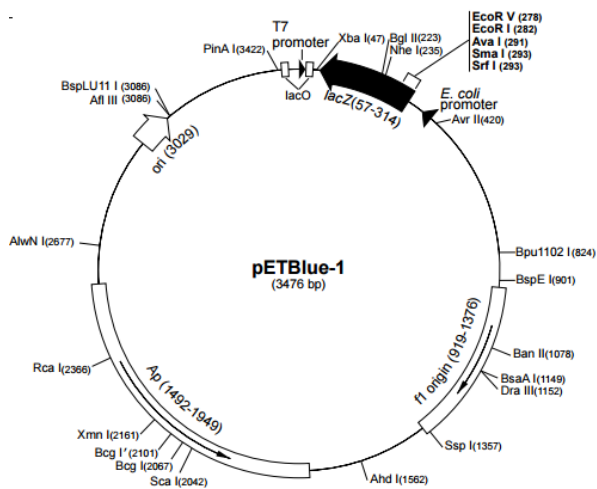


ILUSTRACIÓN 3: MAPA DEL VECTOR (PETBLUE-1) [19]

Una vez fue seleccionado, el ADN plasmídico debe ser extraído de *E. Coli* para su posterior uso. En el presente caso los pasos a seguir fueron los siguientes:

1. Elaboración de medio LB+Ampicilina líquido (Ver ARCHIVO _1_)
2. Inoculación e Incubación de *E. Coli* portadora de pETBlue-1

Se lleva a cabo de acuerdo con los estándares prácticos microbiológicos. *E. Coli* mantendrá a pETBlue-1 dentro de su organismo con el fin de adquirir resistencia a la ampicilina, y de esta forma crecer en el medio elaborado anteriormente. Una vez se haya realizado el inóculo, los tubos de vidrio deben ser incubados a 37°C durante un tiempo mínimo de 24 horas.

3. Medir OD600
4. Extracción del ADN plasmídico

La extracción del ADN de pETBlue-1 se ejecuta a partir del kit "Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System" de la marca PROMEGA (Para revisar protocolo, ver referencia [20]).

Una vez realizada, es necesario medir la concentración del producto (ADN) con el fin de garantizar su funcionalidad en los siguientes procesos. Lo anterior se lleva a cabo en el "NanoDrop 2000c" (Una concentración igual o mayor a 50 ng/uL es aceptable).

No obstante, en el caso de observar concentraciones muy pequeñas tras repetir el procedimiento en varias ocasiones, se recomienda introducir a pETBlue-1 en la cepa 5-Alpha provista por NEB, con el fin de generar una mayor cantidad de copias del plásmido y con ello

obtener una mayor concentración de ADN plasmídico en la extracción de ADN. Para revisar el protocolo del método anterior, ver referencia [21]).

C. Unión del Operón con el promotor

Como se mencionó anteriormente el uso de pETBlue-1 está enlazado a la necesidad de unir el fragmento de interés, a un promotor que controle la iniciación de la transcripción de los genes del operón. El proceso necesario para lograrlo es el siguiente:

1. Digestión del operón y pETBlue-1 con las enzimas de restricción "EcoRI" y "SmaI"

En el proceso de amplificación del operón se añadieron a los extremos de este, los sitios de restricción correspondientes a las enzimas "EcoRI" y "SmaI", en los primers diseñados para la amplificación del operón phbCAB. Al tratarse de una doble digestión, el protocolo a seguir es el perteneciente al kit "FastDigest" de la marca THERMOSCIENTIFIC, el cual permite hacer digestiones múltiples (Para revisar protocolos, ver referencias [22] y [23], respectivamente).

Una vez realizada la digestión, se debe verificar el éxito de esta mediante la elaboración de un gel de electroforesis donde se espera obtener:

- Operón digerido (≈4000 bp)
- pETBlue-1 digerido (≈ 3460 bp)

En el caso del plásmido se espera ver en el gel dos bandas de diferente tamaño, una de 11 bp y otra de aproximadamente 3460 bp, por lo cual es necesario hacer un corte de la banda de mayor tamaño (que es la que tiene el promotor).

Posteriormente se purifica la banda extraída con el kit "Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System" de la marca PROMEGA, y por último se realiza la cuantificación de la concentración del producto en el "NanoDrop 2000c". Lo anterior para verificar que el operón tenga una concentración tres veces mayor que la del plásmido, y con ello evitar que pETBlue-1 se recircule.

2. Ligación del operón y pETBlue-1

Una vez se obtienen los fragmentos digeridos, estos deben ser ligados con el fin de unir los genes al promotor de pETBlue-1. Para ello se utiliza el protocolo de la enzima “ADN Ligasa T4” de la marca NEB (Para revisar protocolo, ver referencia [24]).

Seguido de esto se elabora un gel de electroforesis para verificar la longitud del fragmento, y en el caso de observar dos bandas, se debe aislar y purificar el fragmento con el kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” de la marca PROMEGA, el cual se espera que tenga una longitud de 7500 bp.

3. Amplificación del operón unido al promotor

Se realiza por medio de PCR, con el fin de obtener un amplicon que contenga los genes phbCAB unidos a un promotor que les permita expresarse. Siendo así se diseñó un forward primer distinto al anterior, que contemple la secuencia, de manera que esta incluya al promotor:

PHB promoter / Forward primer (31 bp)

5'-GGCCGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGG-3'

Luego, con el fin de verificar el éxito del procedimiento, se elabora un gel de electroforesis donde se espera observar una banda con un tamaño de 4500 bp aproximadamente, y posteriormente se purifica el producto de la PCR con el kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” de la marca PROMEGA.

D. Enlace del Operón+promotor con el Transposón

Como se mencionó anteriormente, el propósito principal del proyecto es utilizar transposones en vez de plásmidos para el proceso de clonación, por lo que se obtuvo el kit “EZ-Tn5™ Custom Transposome Construction Kits” de la marca epicentre®, el cual tiene protocolos diseñados para procedimientos *in vitro* e *in vivo*. En este caso el proceso se realiza *in vivo* (Para revisar protocolo, ver referencia [25]).

Extracción del transposón

Como el kit indica, el transposón viene dentro de un plásmido, lo cual significa debe ser aislado de este para su posterior uso:

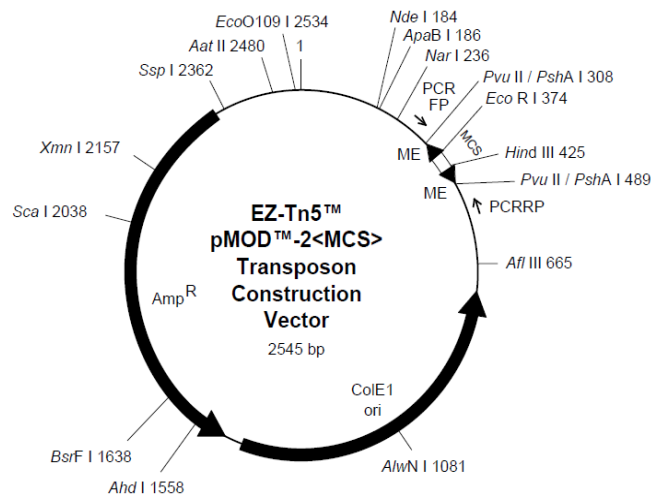


ILUSTRACIÓN 4: PLÁSMIDO QUE CONTIENE AL TRANSPOSÓN [25]

- Digestión enzimática con “AlwN1”
Se realiza con el fin de abrir el plásmido que contiene al transposón, y es necesario para poder amplificarlo posteriormente. La enzima de restricción “AlwN1” es obtenida de la marca NEB (Para revisar protocolo, ver referencia [26]).

Luego se debe elaborar un gel de electroforesis donde se espera ver una banda con un tamaño aproximado de 2545 bp. No obstante es posible observar dos bandas que corresponderían al plásmido cerrado y al plásmido abierto (digerido) respectivamente, siendo el plásmido digerido la banda que avanza más en el gel y debe ser aislada (corte de banda) y purificada por medio del kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” de la marca PROMEGA.

- Amplificación del transposón
Seguido de la digestión del plásmido pMOD™-2<MCS> (Ilustración 4) se debe amplificar el transposón contenido en este, a través de PCR. El kit “EZ-Tn5™ Custom Transposome Construction Kits” trae consigo los primers diseñados especialmente para dicha función:

Forward primer (ME Plus 9 – 3' primer):

5'-CTGTCTCTTATACACATCTCAACCATCA-3'

Reverse primer (ME Plus 9 – 5' primer):

5'-CTGTCTCTTATACACATCTCAACCCTGA-3'

Posteriormente, se elabora un gel de electroforesis para observar que el fragmento amplificado sea el correcto, el cual tiene una longitud de 200 bp aproximadamente; y por último se purifica el producto de PCR con el kit "Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System" de la marca PROMEGA.

Unión del operón+promotor con el transposón

Entonces, una vez que se ha extraído el transposón del plásmido, se procede a integrar este con el operón+promotor obtenido anteriormente. El proceso necesario para lograr esto es el siguiente:

1. Digestión del transposón y del operón+promotor con las enzimas de restricción "EcoRI" y "SmaI"

Teniendo en cuenta que tanto el transposón (Ilustración 5) como el operón+promotor poseen los sitios de restricción para dichas enzimas, la digestión se lleva a cabo a través del kit "FastDigest" de la marca THERMOSCIENTIFIC, el cual permite realizar digestiones múltiples.

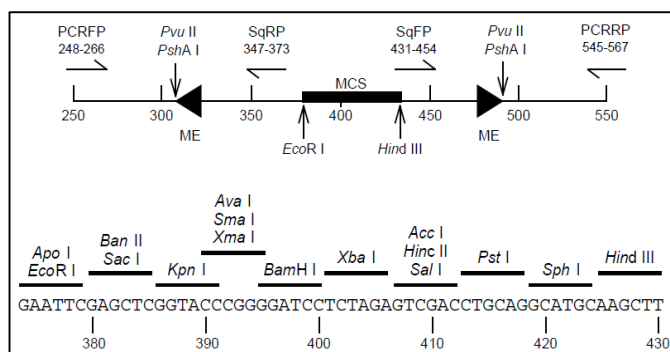


ILUSTRACIÓN 5: SITIOS DE RESTRICCIÓN DEL TRANSPOSÓN

Una vez realizada la digestión, se elabora un gel de electroforesis para verificar que el procedimiento haya funcionado correctamente. En el caso del operón+promotor se espera observar una sola banda con 4500 bp, mientras que para el transposón se espera que aparezcan dos bandas de 19 bp y 160 bp respectivamente. Entonces, se debe aislar y purificar la banda de mayor tamaño por medio del kit "Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System" de la marca PROMEGA.

2. Ligación del transposón y el operón+promotor

Se realiza con la enzima "ADN Ligasa T4" de la marca NEB y permite ligar el transposón con el operón+promotor.

Posteriormente se verifica el proceso por medio de un gel de electroforesis, esperando observar una banda de 4700 bp aproximadamente. En el caso de observar más de una banda, se debe aislar la banda deseada y purificarla con el kit "Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System" de la marca PROMEGA.

E. Formación del Transposoma

Una vez se realiza la inserción del operón en el transposón, es necesario "recircular" el nuevo fragmento con el fin de facilitar el ingreso de este a la célula receptora (*E. Coli BL21*). Lo anterior se logra con la ayuda de la enzima transposasa, la cual al ser activada, genera la "recirculación" del transposón, formando el transposoma (Para revisar protocolo, ver paso número 8 de la referencia [25]).

F. Inserción del Transposoma en *E. Coli*

Seguido de la formación del transposoma, finalmente se procede a hacer la inserción de este en una cepa electrocompetente de *E. Coli* (BL21). El método especificado requiere de los siguientes pasos:

1. Preparación de las células electrocompetentes

Se obtiene con el fin de que las células sean capaces de integrar eléctricamente un material exógeno en su genoma. Para este caso se debe elaborar medio LB líquido y diluir el pre cultivo en el medio como lo indica el protocolo de “Cell projects” (Ver referencia [27]).

2. Electroporación

Luego de preparar las cepas de *E. Coli BL21* para que sean células electrocompetentes, se procede a realizar la electroporación de acuerdo con la referencia [28], el cual explica el procedimiento expuesto por “Cell projects”.

Aquí se espera que dichas células integren al transposoma y que este se adhiera al genoma de la célula con el fin último de que el operón phbCAB pueda expresarse con el promotor que le fue otorgado de pETBlue-1.

3. Verificación

Seguido de la electroporación, es posible realizar una verificación del procedimiento para revisar que haya funcionado con éxito. La anterior se lleva a cabo a través de PCR colonia, el cual es un procedimiento similar al PCR tradicional con la única diferencia de que es practicado sobre la célula y no sobre su ADN. Dicho método realiza por medio de la Ex Taq TaKaRa Polymerase de la marca CLONTECH (Ver referencia [16]).

Posteriormente se realiza un gel de electroforesis, esperando observar una banda que represente un tamaño aproximado de 4700 bp (Transposón+Promotor+Operón).

G. Producción de Poli(3-hidroxibutirato)

Finalmente, teniendo en cuenta que uno de los objetivos del proyecto es realizar un aprovechamiento biológico de las aguas residuales industriales, se utilizó un montaje elaborado previamente por Gustavo Angulo Hoyos, para

realizar el tratamiento de una mezcla de agua y leche descremada (en proporción 70% y 30%, respectivamente) para simular un agua residual industrial de una fábrica de productos lácteos; con el fin de obtener el sustrato a utilizar por las cepas modificadas, el cual corresponde a ácidos grasos volátiles (AGVs). Dicho tratamiento posee las fases que se muestran en el siguiente esquema [4]:

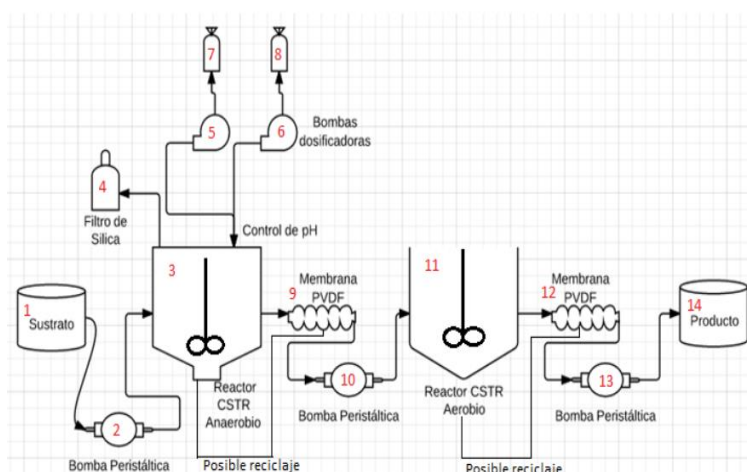


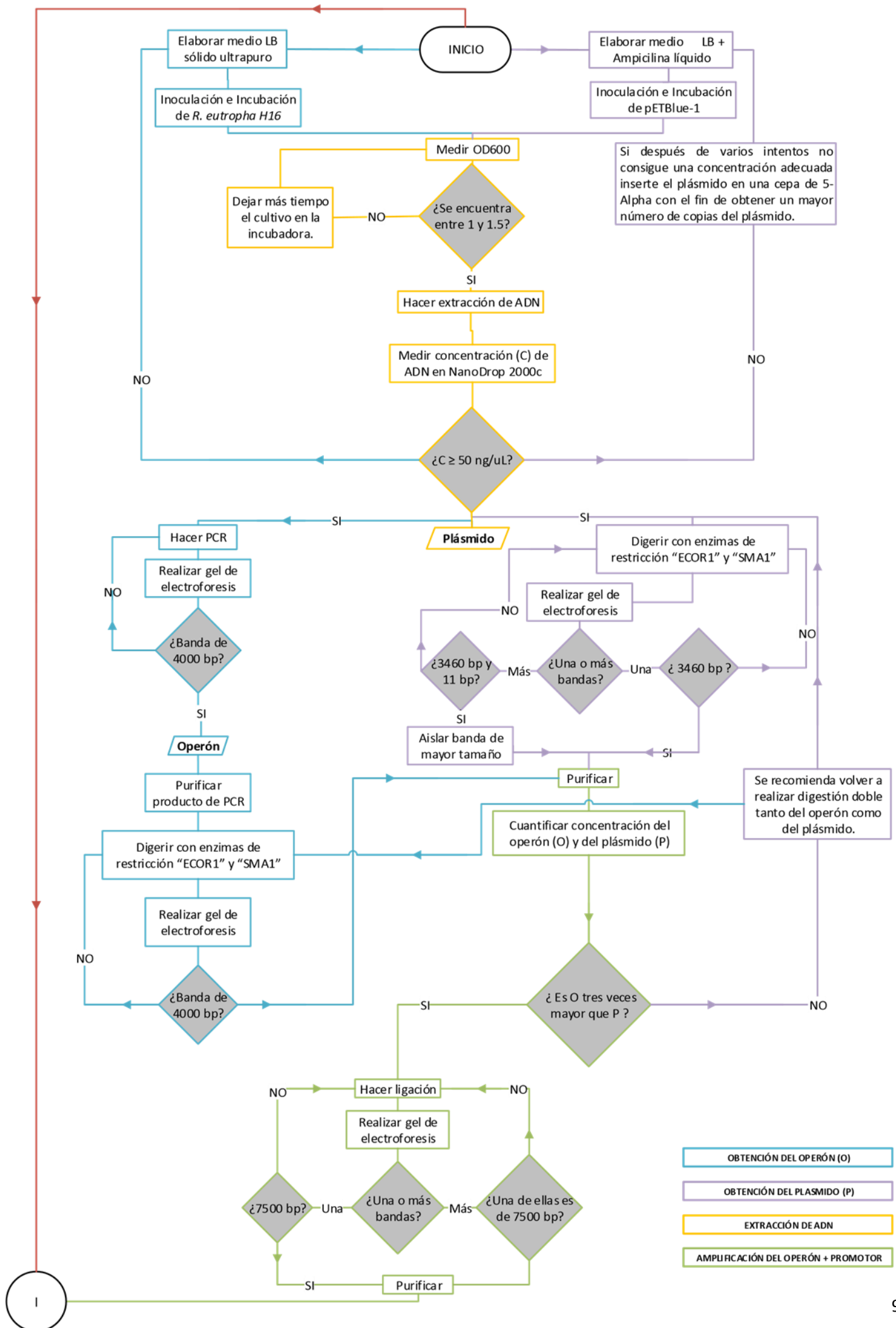
ILUSTRACIÓN 6: ESQUEMA GENERAL DEL SISTEMA DE TRATAMIENTO [4]

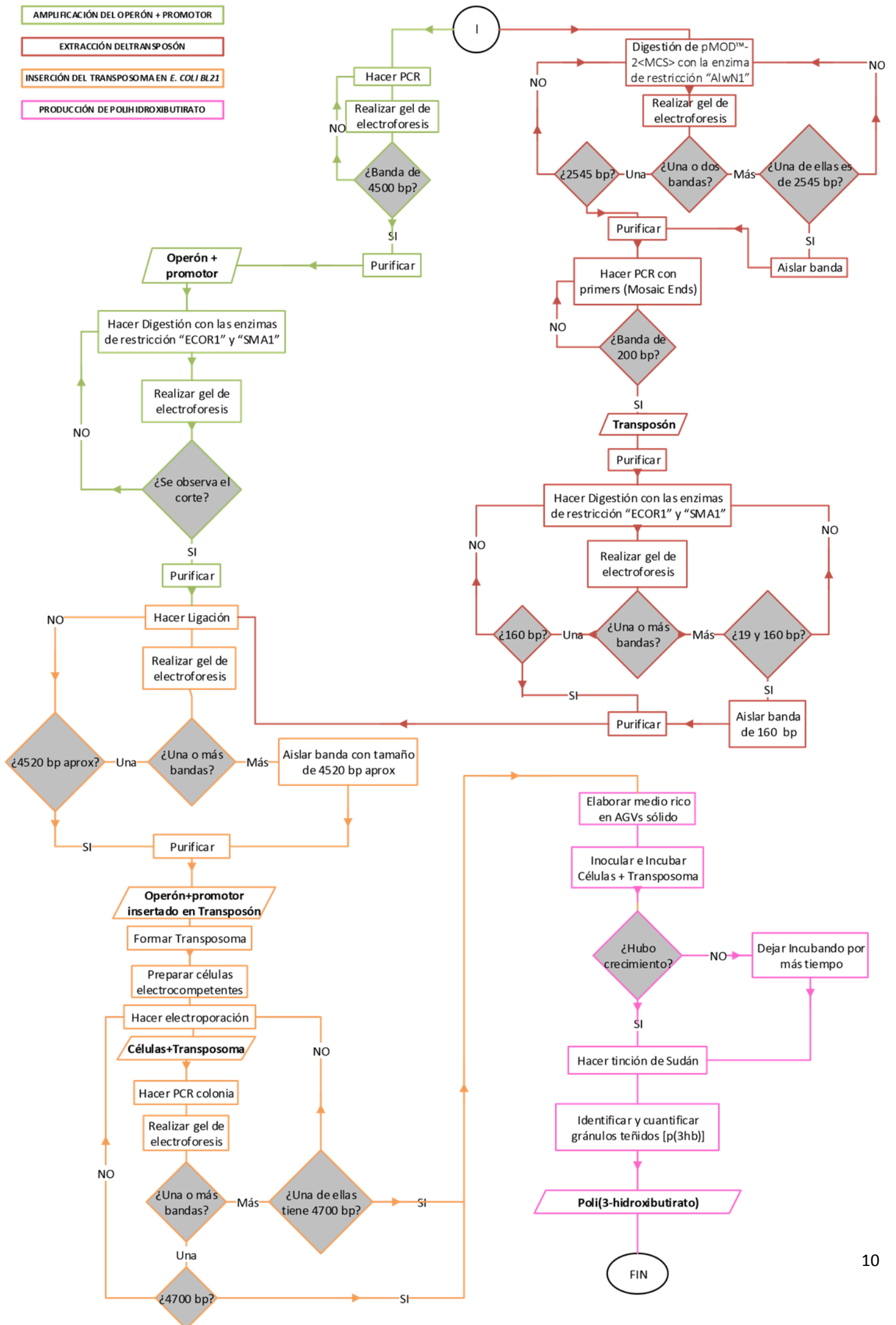
Siendo así, una vez de obtienen los AGVs del tratamiento de agua residual, se procede a:

1. Colocar los ácidos grasos volátiles en tubos de vidrio, inocular e incubar a 37 °C durante un tiempo mínimo de 24 horas. Lo anterior con el objetivo de lograr que las cepas modificadas de *E. Coli* lo tomen como sustrato y produzcan finalmente poli(3-hidroxibutirato); donde se espera un crecimiento granular del producto.
2. Tinción de Sudán

Es el procedimiento que permite identificar los gránulos que corresponden al P(3HB). Se debe elaborar en láminas de vidrio y se pretende identificar en el microscopio con color azul dichos gránulos y posteriormente cuantificarlos (Para revisar procedimiento, ver referencia [29]).

La metodología se presenta resumidamente en el siguiente diagrama de flujo:





Resultados preliminares y Análisis

Teniendo en cuenta la metodología propuesta, se puede decir que los avances alcanzados no permiten concluir ninguna de las fases del proyecto, pero dejan consigo logros de tipo empírico importantes al momento de continuar con la práctica metodológica planteada en este. Lo anterior se debe principalmente a que a lo largo de la implementación de los métodos de laboratorio, hubo errores de tipo humano que deben considerarse en el futuro con el fin de que estos no representen un obstáculo mayor. La principal fuente de error que pudo haber intervenido con el desarrollo del proyecto es discutida a continuación:

Uso de los primers

Al momento de llevar a cabo la PCR que obtendría el operon phbCAB, fueron varias las dificultades que conllevaron a que este procedimiento no tuviera éxito. En los diversos intentos fallidos, se cambiaron distintas variables, entre ellas la polimerasa y con ella el buffer y los dNTPs, el agua estéril, la persona que ejecuta el procedimiento, etc; todo menos los primers.

Siendo así, uno de los errores que se consideró importante en el proceso metodológico, fue la forma de uso de los primers en general. Como bien es sabido, la Biología Molecular es una ciencia que requiere de una gran meticulosidad a la hora de realizar diversos procedimientos, como es el caso de la PCR, donde reactivos como los primers son demasiado vulnerables a fenómenos de contaminación y/o degradación.

Dado lo anterior, una de las recomendaciones para el uso de estos, es que estos sean utilizados a través de viales, es decir que durante la elaboración de la "master mix" de la PCR, no debe tomarse la cantidad requerida de los primers directamente del reactivo original con el fin de evitar de contaminación y/o degradación de estos. Lo anterior no se realizó en la práctica.

Trabajo a seguir

El futuro del proyecto consiste en aplicar la metodología estandarizada en el presente documento, teniendo en cuenta las recomendaciones y análisis de error expuestos en este, como parte de la experiencia

adquirida durante el desarrollo de los métodos A – C₁ (Ver metodología).

De esta forma, se debe tener en cuenta la gran vulnerabilidad que tienen los procesos de Biología Molecular a la contaminación y otros fenómenos asociados a la degradación de los ácidos nucleicos y de los reactivos requeridos en cada proceso. Por lo cual toda medida que pueda tomarse en pro de una mejor esterilización así como de procedimientos más eficientes puede asegurar con mayor certeza, el éxito del proyecto.

Agradecimientos

A mi madre y abuela, Ángela y Francisca, por ser mi guía y apoyo constante durante todo este proceso, y a mi asesora de proyecto de Grado, Johana, por creer en mí y permitirme ser parte de este maravilloso y prometedor proyecto.

Referencias

- [1] V. Urtuvia, P. Villegas, M. González y M. Seeger, «Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates,» *International Journal of Biological Macromolecules*, nº 70, pp. 208-213, 26 Junio 2014.
- [2] C. Reddy, R. Ghai, Rashmi y V. Kalia, «Polyhydroxyalkanoates: an overview,» *Bioresource Technology*, vol. 87, pp. 137-146, 2003.
- [3] J. Yu, «Production of PHA from starchy wastewater via organic acids,» ELSEVIER, Hong Kong, 2001.
- [4] G. Angulo Hoyos, «Manual de Operación y Funcionamiento de un sistema de Bioreactores y Ultrafiltración para la producción de poliésteres del Tipo Polihidroxicarboxilatos (PHAs),» Bogotá, 2015.
- [5] NCBI, «"acetyl-CoA acetyltransferase" (phbA),» 6 Abril 2006. [En línea]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/113866031?report=gbwithparts&from=1559207&to=1560388&RID=82YC7T>.
- [6] NCBI, «"beta-ketoacyl-ACP reductase" (phbB),» 6 Abril 2006. [En línea]. Available:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/113866031?report=gbwithparts&from=1560463&to=1561203&RID=82ZDH>.
- [7] NCBI, «poly-beta-hydroxybutyrate polymerase (phbC),» 2006. [En línea]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/113866031?report=gbwithparts&from=1557353&to=1559122&RID=82YC7T>.
- [8] A. Pohlmann, W. Florian Fricke, F. Reineck, B. Kusian, H. Liesegang, R. Cramm, T. Eitingen, C. Ewering, M. Pötter, E. Schwartz, A. Strittmatter, I. Voss, G. Gottschalk, A. Steinbüchel, B. Friedrich y B. Bowien, «Genome sequence of the bioplastic-producing "Knallgas" bacterium *Ralstonia eutropha* H16,» *Nature Biotechnology*, nº 24, pp. 1257-1262, 10 Septiembre 2006.
- [9] Addgene, «Origin of Molecular Genetics,» [En línea]. Available: <https://www.addgene.org/mol-bio-reference/plasmid-background/>.
- [10] H. Lodish, A. Berk y S. Zipursky, «Section 7.1 DNA Cloning with Plasmid Vectors,» de *Molecular Cell Biology. 4th edition.*, New York, W. H. Freeman, 2000.
- [11] F. Baquero, J. L. Martínez y R. Cantón, «Antibiotics and antibiotic resistance in water environments,» ELSEVIER, Madrid, 2008.
- [12] D. Kitsberg, Z. Chunfang, H. Chy y J. R. Morrison, «Transposon-mediated generation of targeting vectors for the production of gene knockouts,» Australia, 2004.
- [13] L. A. Pray, «Transposons: The Jumping Genes,» 2008. [En línea]. Available: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/transposons-the-jumping-genes-518>.
- [14] NCBI, «Operon phbCAB,» [En línea]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/113866031?report=graph&from=1557325&to=1561421>.
- [15] MO BIO, «PowerSoil DNA Isolation Kit,» [En línea]. Available: <https://mobio.com/media/wysiwyg/pdfs/protocols/12888.pdf>.
- [16] Clontech, «TaKaRa Ex Taq Data Sheet,» [En línea]. Available: http://www.clontech.com/US/Products/PCR/High_Yield_PCR/Ex_Taq_DNA_Polymerase?site=10020:22372:US.
- [17] PROMEGA, «Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System,» [En línea]. Available: <https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/101/wizard%20sv%20gel%20and%20pcr%20clean-up%20system%20protocol.pdf>.
- [18] V. A. Bojacá, «Optimización de cepas por medio de ingeniería genética para la producción de biopolímeros,» Bogotá.
- [19] Merck Millipore, «TB258VM pETBlue™-1 Vector Map,» [En línea]. Available: http://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-CO-Site/es_ES/-/COP/ViewParametricSearch-SimpleOfferSearch?SynchronizerToken=bba2c72abb4130463a84c2a2b9443d93f80e6e132e528c3e091c6e379e38f8e6&search=&TrackingSearchType=SB+-+Search+Box&SearchContextPag.
- [20] PROMEGA, «Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System protocol,» [En línea]. Available: <https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/0/wizard%20plus%20sv%20minipreps%20dna%20purification%20system%20protocol.pdf>.
- [21] New England Biolabs (NEB), «5 Minute Transformation Protocol (C2987H/C2987I),» [En línea]. Available: <https://www.neb.com/protocols/1/01/01/5-minute-transformation-protocol-c2987?device=pdf>.
- [22] Thermo Scientific, «FastDigest EcoRI,» [En línea]. Available: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012438_FastDigest_EcoRI_800uL_UG.pdf.
- [23] Thermo Scientific, «FastDigest SmaI,» [En línea]. Available: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/man>

uals/MAN0012487_FastDigest_Smal_200uL_UG.pdf.

http://www.cellprojects.com/bacterial_application.htm.

- [24] New England Biolabs (NEB), «Ligation Protocol with T4 DNA Ligase (M0202),» [En línea]. Available: <https://www.neb.com/protocols/1/01/01/dna-ligation-with-t4-dna-ligase-m0202?device=pdf>.
- [25] epicentre an Illumina company, «EZ-Tn5 Custom Transposome Construction Kit,» [En línea]. Available: <http://www.epibio.com/docs/default-source/protocols/ez-tn5-custom-transposome-construction-kits.pdf>.
- [26] New England BioLabs (NEB), «Digestion with AlwN1,» [En línea]. Available: <https://www.neb.com/~media/Catalog/All-Products/76F8EF7865F841E193EA7C01BEC5D52C/Datacards%20or%20Manuals/R0514Datasheet-Lot0161211.pdf>.
- [27] Cell projects, «How to Prepare Bacteria for Electroporation,» [En línea]. Available: http://www.cellprojects.com/bacterial_application.htm.
- [28] Cell projects, «Electroporation of E.Coli,» [En línea]. Available: How to Prepare Bacteria for Electroporation.
- [29] «FAT - SUDAN BLACK B-PROPYLENE GLYCOL,» [En línea]. Available: <http://library.med.utah.edu/WebPath/HISTHTML/MANUALS/SUDANF.PDF>.
- [30] NCBI, «National Center for Biotechnology Information,» 6 Abril 2006. [En línea]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/113866031?report=gbwithparts&from=1557353&to=1559122&RID=82YC7T>.
- [31] Clontech TaKaRa, «SapphireAmp® Fast PCR Master Mix,» [En línea]. Available: file:///C:/Users/Tatiana%20Zu%C3%B1iga/Downloads/SapphireAmp_Colony%20PCR_Protocol-At-a-Glance_v2.pdf.

ARCHIVOS

ARCHIVO _1_

Medio LB	Medio LB+Ampicilina																								
Sólido Materiales y Reactivos - Cajas de Petri - Frasco Scott Para 100 mL ($\approx$ 5 cajas de Petri), mezclar los siguientes reactivos en un frasco Scott: <table border="1"> <thead> <tr> <th>Compuesto</th><th>Cantidad</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>NaCl</td><td>1 gr</td></tr> <tr> <td>Tryptona</td><td>1 gr</td></tr> <tr> <td>Extracto de levadura</td><td>0.5 gr</td></tr> <tr> <td>Agar</td><td>2.5 gr</td></tr> <tr> <td>Agua destilada</td><td>Aforar a 100 mL</td></tr> </tbody> </table> Autoclavar y servir en cajas de Petri nuevas.	Compuesto	Cantidad	NaCl	1 gr	Tryptona	1 gr	Extracto de levadura	0.5 gr	Agar	2.5 gr	Agua destilada	Aforar a 100 mL	Sólido Materiales y Reactivos - Cajas de Petri - Frasco Scott Para 100 mL mezclar los siguientes ingredientes en un frasco Scott: <table border="1"> <thead> <tr> <th>Compuesto</th><th>Cantidad</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>NaCl</td><td>1 gr</td></tr> <tr> <td>Tryptona</td><td>1 gr</td></tr> <tr> <td>Extracto de levadura</td><td>0.5 gr</td></tr> <tr> <td>Agar</td><td>2.5 gr</td></tr> <tr> <td>Agua destilada</td><td>Aforar a 100 mL</td></tr> </tbody> </table> Autoclavar, añadir 0.01 gr de ampicilina¹ y luego servir en cajas de Petri nuevas.	Compuesto	Cantidad	NaCl	1 gr	Tryptona	1 gr	Extracto de levadura	0.5 gr	Agar	2.5 gr	Agua destilada	Aforar a 100 mL
Compuesto	Cantidad																								
NaCl	1 gr																								
Tryptona	1 gr																								
Extracto de levadura	0.5 gr																								
Agar	2.5 gr																								
Agua destilada	Aforar a 100 mL																								
Compuesto	Cantidad																								
NaCl	1 gr																								
Tryptona	1 gr																								
Extracto de levadura	0.5 gr																								
Agar	2.5 gr																								
Agua destilada	Aforar a 100 mL																								
Líquido Materiales y Reactivos - Tubos de vidrio de 15 mL - Frasco Scott Para 25 mL ($\approx$ 5 tubos de vidrio), mezclar los siguientes reactivos en un frasco Scott: <table border="1"> <thead> <tr> <th>Compuesto</th><th>Cantidad</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>NaCl</td><td>0.25 gr</td></tr> <tr> <td>Tryptona</td><td>0.25 gr</td></tr> <tr> <td>Extracto de levadura</td><td>0.0625 gr</td></tr> <tr> <td>Agua destilada</td><td>Aforar a 25 mL</td></tr> </tbody> </table> Servir en tubos de vidrio y autoclavar.	Compuesto	Cantidad	NaCl	0.25 gr	Tryptona	0.25 gr	Extracto de levadura	0.0625 gr	Agua destilada	Aforar a 25 mL	Líquido Materiales y Reactivos - Tubos de vidrio de 15 mL - Frasco Scott Para 25 mL mezclar los siguientes reactivos en un frasco Scott: <table border="1"> <thead> <tr> <th>Compuesto</th><th>Cantidad</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>NaCl</td><td>0.25 gr</td></tr> <tr> <td>Tryptona</td><td>0.25 gr</td></tr> <tr> <td>Extracto de levadura</td><td>0.0625 gr</td></tr> <tr> <td>Agua destilada</td><td>Aforar a 25 mL</td></tr> </tbody> </table> Autoclavar, añadir 0.01 gr de ampicilina y luego servir en tubos autoclavados de vidrio de 15 mL.	Compuesto	Cantidad	NaCl	0.25 gr	Tryptona	0.25 gr	Extracto de levadura	0.0625 gr	Agua destilada	Aforar a 25 mL				
Compuesto	Cantidad																								
NaCl	0.25 gr																								
Tryptona	0.25 gr																								
Extracto de levadura	0.0625 gr																								
Agua destilada	Aforar a 25 mL																								
Compuesto	Cantidad																								
NaCl	0.25 gr																								
Tryptona	0.25 gr																								
Extracto de levadura	0.0625 gr																								
Agua destilada	Aforar a 25 mL																								

¹ O hacer stock de 50 mg/mL de Ampicilina y agregar 0.2 mL a 100 mL de medio LB para alcanzar una concentración de 100 ug/mL.

ARCHIVO _2_

Uso y calibración del NanoDrop 2000c

El NanoDrop es un espectrofotómetro de alta eficiencia que debe ser calibrado previamente a su uso de la siguiente forma:

Materiales Y Reactivos

- Micropipeta con capacidad de 10 uL
- HCl 0.5 M
- Agua estéril
- NanoDrop 2000c

Método

1. Aplicar 2 uL de HCl al sitio de lectura y bajar el brazo.
2. Esperar 3 minutos
3. Limpiar e inmediatamente aplicar 2 uL de agua estéril y bajar el brazo.
4. Esperar 3 minutos
5. Repetir pasos 1-4 tres veces.

Posterior a la calibración se procede a utilizar el espectrofotómetro de manera que se introducen 2 uL del eluyente del producto a cuantificar (lo cual corresponde al blanco) y se verifica para que arroje un valor cercano a cero. En el caso de que este valor no sea cercano a cero, se debe repetir la medición del blanco. Luego se mide el producto y se toma el dato de su concentración.

ARCHIVO _3_

A. Gel de electroforesis

Elaboración del gel

Materiales y reactivos

- Erlenmeyer de 100 mL
- Probeta de 100 mL
- Cama
- Peine (Depende de la cantidad de pozos que se van a servir)
- Tensor
- Ojo de pollo
- Agarosa purificada
- TAE buffer 1X nuevo
- Agente intercalante (Diamond DNA ladder de la marca PROMEGA)
- Micropipeta con capacidad de 10 uL

Método

- Colocar y asegurar la cama y el peine en el tensor, luego verificar nivel con el ojo de pollo.
- Realizar mezcla en el Erlenmeyer:

	Cámara grande	Cámara pequeña
Agarosa purificada	0.75 gr	0.35 gr
TAE buffer 1X ²	75 mL	35 mL
Agente Intercalante ³	1 uL	0.5 uL

- Dejar polimerizar durante 35 minutos.

² El TAE buffer viene inicialmente con una concentración de 50X, por lo que este debe ser diluido hasta alcanzar una concentración de 1X.

³ Al mezclar la agarosa con el TAE se debe calentar en el microondas en tandas de 30 segundos, hasta el momento en el que no haya grumos. Luego de esto se aplica el agente intercalante.

Siembra de los pozos y Electroforesis

Materiales y Reactivos

- TAE 1X nuevo o reciclado
- Cámara de electroforesis
- Fuente de poder
- Loading Dye
- Escalera (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder de la marca THERMOFISHER SCIENTIFIC.
- Producto (ADN, PCR, Digestión enzimática, etc.)
- Micropipeta con capacidad de 10 uL
- Barras de Papel Parafilm

Método

- Llenar parcialmente la cámara con TAE buffer 1X.
- Introducir cama en la cámara de electroforesis⁴ y extraer cuidadosamente el peine.
- Terminar de llenar la cámara con TAE buffer 1X, hasta el límite señalado en la cámara. Aplicar 2 uL de Loading Dye por cada pozo requerido en una barra de papel Parafilm.
- Tomar 0,25 uL de la escalera y mezclar (pipeteando) con el Loading Dye dispuesto en el Parafilm.
- Verter mezcla en el pozo designado.
- Repetir procedimiento anterior, esta vez con cada uno de los productos y el Loading Dye.
- Cerrar cámara y conectar a la fuente de poder, la cual debe ser programada para aportar un voltaje de 90 V durante 75 minutos.

B. Revelación del Gel

Materiales y Reactivos

- Transiluminador

Método

Al finalizar el tiempo, se revela el gel mediante la radiación UV a través del transiluminador, donde se comparan los resultados con la escalera. Lo anterior se realiza con el fin de verificar que el segmento amplificado sea correspondiente con el tamaño requerido.

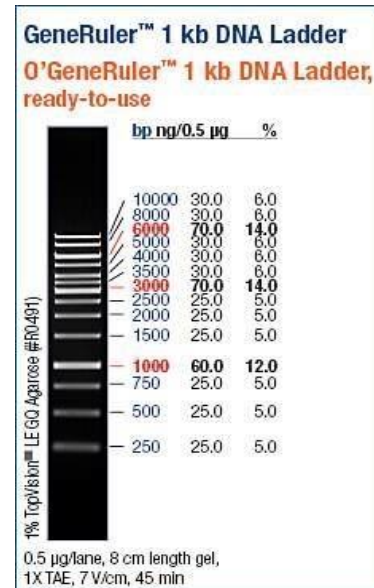


ILUSTRACIÓN 1: GENERULER™ 1 KB DNA LADDER

⁴ La cama debe ser colocada en la cámara de forma que los pozos queden del lado negativo (cable negro), ya que el ADN va a desplazarse desde la carga negativa hacia la carga positiva.