

Producción de PHB a partir de *Escherichia coli* modificada, utilizando ácidos grasos volátiles como sustrato y ácido oleico como inductor del proceso

Tatiana Zúñiga Burgos
Asesora: Johana Husserl, PhD.
Universidad de los Andes

Resumen

Se conocen varios microorganismos, como *Ralstonia eutropha* H16, que son capaces de producir bioplásticos como el polihidroxialcanoato, que son biodegradables y tienen características similares a las de los plásticos derivados del petróleo. Sin embargo, la producción de dichos bioplásticos es bastante costosa, ya que requiere el uso de sustratos costosos, como la glucosa, y el crecimiento de los microorganismos productores es lento y complejo. El presente estudio tiene como objetivo el desarrollo de microorganismos modificados genéticamente (MMG) capaces de utilizar materia orgánica proveniente de aguas residuales y convertirla en bioplástico, sin utilización de antibióticos e inductores comerciales que son comúnmente utilizados para la producción de sustancias de interés con MMGs. Con este propósito, *Escherichia coli* BL21(DE3) Gold fue modificada genéticamente por medio del método CRISPR/Cas9 – λ Red, para incorporar en su genoma los genes asociados a la producción de polihidroxialcanoatos de *Ralstonia eutropha* H16 (*phaA*, *phaB* y *phaC*), con la adición de un promotor (PaldA) que es inducido en presencia de ácido oleico, compuesto presente en las grasas, y un gen de resistencia a tetraciclina como marcador de selección. La cepa resultante del proceso es una contaminación oportuna que además de ser resistente a tetraciclina, es capaz de producir bioplástico en presencia de ácido oleico. Se espera poder identificar e incorporar este microorganismo en un tratamiento anaerobio (piloto) de aguas residuales industriales del sector de producción de lácteos, así también como construir una *E. coli* recombinante que pueda ser también incluida en el estudio piloto.

Palabras clave: PHB, Ácido oleico, Ácidos grasos volátiles, CRISPR/Cas9, λ Red, *Ralstonia eutropha* H16, *E. coli*

Introducción

La materia orgánica presente en las aguas residuales es transformada en ácidos grasos volátiles (AGVs) de cadena corta durante los procesos de biodegradación. Los AGVs que se producen comúnmente incluyen los ácidos acético, butírico y propiónico [1]. Durante el tratamiento anaerobio de las aguas residuales, los AGVs son removidos en un proceso de metanogénesis donde se obtiene un efluente de gas metano (CH₄) que es aprovechado para la generación de energía eléctrica, entre otros usos [2].

Por otro lado es sabido que la bacteria *Ralstonia eutropha* (*Cupriavidus Necator*) H16, en condiciones de exceso de carbono y límite de otros nutrientes como el nitrógeno, es capaz de utilizar AGVs como sustrato para la producción de Poli(3-hidroxibutirato) (PHB), el cual es un biopolímero de tipo polihidroxialcanoato que puede ser utilizado en reemplazo de polímeros derivados del petróleo, tales como el polipropileno (PP), poliestireno (PS) y polietileno (PE) [3] [1]. Sin embargo, estudios revelan que la producción de PHB por parte de *Ralstonia eutropha* H16, en las condiciones mencionadas, puede ser ineficiente debido a su lento crecimiento. Con el fin de mejorar la capacidad de producción biológica de PHB, se han implementado técnicas de clonación en las que se modifican genéticamente cepas de *Escherichia coli* para que estas sean capaces de producir este compuesto más eficientemente [4]. Los ácidos grasos son parte fundamental de la ruta metabólica con la que *E. coli* recombinante produce PHB [5] [6].

E. coli es la bacteria más utilizada para la producción de proteínas recombinantes por su fácil crecimiento en el laboratorio, entre otros [4] [7]. No obstante, en los estudios previos que han utilizado *E. coli* modificada genéticamente para la producción de bioplásticos, la modificación genética ha sido realizada mediante el uso de plásmidos [8]; el uso de plásmidos requiere de la utilización de antibióticos con el fin de mantener la presión de selección necesaria para garantizar que estos sean replicados y expresados en la progenie. [4]. Dado que la utilización a gran escala de antibióticos

es inadecuada, la utilización de plásmidos no es deseable [9], y sería ideal utilizar métodos de modificación genética que integren genómicamente los genes de biosíntesis PHB en *Escherichia coli*.

Uno de los métodos más precisos para integrar genes foráneos al genoma de *E. coli*, es el sistema CRISPR/Cas9 – λ -Red, ya que permite una integración efectiva de largos fragmentos de ADN en un lugar determinado del genoma de *E. coli* como lo demostraron en su estudio Chung y colaboradores [10]. CRISPR es la abreviatura en inglés para “Repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas”, el cual es un sistema de respuesta inmune mediado por ARN guía que tienen los organismos procariotas para protegerse contra ácidos nucleicos foráneos tales como virus o plásmidos [11]. Cas9 es una proteína de tipo nucleasa que ayuda a mediar la modificación genética mediante el clivaje del ADN genómico que da lugar a la reparación y consecuente integración de ADN a través del mecanismo de recombinación homóloga en un lugar específico del genoma bacteriano [12]. Mientras tanto el operón λ -Red del fago lambda es un ayudante que consta de tres genes *gam*, *bet* y *exo*, que juntos incrementan la eficiencia en la recombinación homóloga del ADN a integrar [13].

Se sabe que la integración de ADN para la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* requiere de una secuencia promotora, que es la que regula la transcripción del ADN; una secuencia espaciadora con un sitio de unión del ribosoma (RBS), conocida como la secuencia Shine Delgarno (SD), los genes con sus respectivos codones de inicio y finalización, y extremos homólogos al sitio del genoma donde va a ocurrir la integración [14]. En general, los sistemas de expresión en *E. coli* genéticamente modificada, utilizan promotores híbridos inducibles con isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) [8]. Sin embargo, en aplicaciones a gran escala o dirigidas a productos para el consumo y/o servicio humano, el uso de este reactivo es también indeseable debido a su toxicidad y costo [14] [15]. Promotores inducibles con otro tipo de compuestos son prometedores para la producción de proteínas recombinantes a

gran escala, como es el caso del promotor de la Aldehído deshidrogenasa A en *E. coli* (PaldA), el cual es inducible con ácido oleico. Como Han y colaboradores demostraron en su estudio, este promotor cumple con las condiciones que se requieren en un sistema de expresión: es estrictamente controlado bajo la inducción con ácido oleico, es fuerte, duradero y costo-efectivo [15].

Teniendo en cuenta que el ácido oleico y AGVs son compuestos que se pueden encontrar en los mismos efluentes residuales, tales como aguas residuales urbanas y aguas residuales de la industria de alimentos, el propósito de este estudio es construir una *E. coli* recombinante (vía sistema CRISPR/Cas9 – λ-Red), capaz de producir bioplásticos a partir de AGVs como sustrato y ácido oleico como inductor del sistema. Un clon con estas características podría ser utilizado como parte de un sistema de tratamiento de aguas residuales, con el fin de aprovechar la materia orgánica allí presente para la producción de bioplásticos y de esta forma reducir los costos de producción de PHB [1] [16].

Materiales y Métodos

Cepas de *E. coli* y construcción de plásmidos

Se utilizó la cepa DH5α (*lacZ*-) (New England Biolabs) para el mantenimiento de los plásmidos utilizados en el estudio; mientras que la cepa BL21(DE3) (*lacZ*+) (New England Biolabs) y la cepa BL21(DE3) Gold (*lacZ*+, *tetR*) (Agilent technologies) fueron utilizadas para la expresión del ADN foráneo del plásmido pET-21a(+)-PHB y del sistema CRISPR/Cas9 – λ Red y subsecuente inserción de ADN mediante reparación homóloga directa (HDR), respectivamente. Ambas cepas de *E. coli* fueron cultivadas en medio Luria Bertani (LB) o Agar Triptona de Soya (TSA) con el correspondiente antibiótico.

Los plásmidos utilizados están ilustrados en la Figura 1.A. El plásmido pTKRED de 10726 bp (Addgene # 41062) contiene el origen de replicación pSC101 que es sensible a la temperatura, por lo cual puede ser curado de *E. coli* BL21(DE3) Gold a 42°C. También tiene el gen de resistencia a la espectinomicina (Sm^r) y el operón λ-Red que codifica las proteínas Gam, Beta y Exo, producidas bajo el control del promotor *lacUV5* (*Plac*) inducible con IPTG. pCas9 de 9326 bp (Addgene # 42876) tiene el gen de resistencia al cloranfenicol (Cm^r), el gen que codifica para la producción de la nucleasa, *cas9*, derivada de *S. pyogenes*, y el

tracrRNA. Todos los anteriores son controlados por promotores endógenos. pCRISPR de 2433 bp (Addgene # 42875) tiene el gen de resistencia a la kanamicina (Km^r) y el sitio crRNA, el cual contiene 2 sitios de restricción BsaI; en este sito debe subclonarse el ARN guía para el sitio de modificación en el genoma de *E. coli*. Siguiendo la metodología propuesta por Chung y colaboradores, pCRISPR fue modificado para tener actividad específica en el gen *lacZ* (resultando en la formación de pCRISPR::LacZ, ver Figura 1.C). Esto permite verificar las colonias recombinantes por medio del método “Blue and White screening” (Los oligonucleótidos utilizados en la modificación están listados en la Tabla 1) [10].

pET-21a(+) de 5443 bp (Novagen) es el plásmido en el que se mantiene el fragmento de ADN a integrar genómicamente en *E. coli*. Tiene el gen de resistencia a la ampicilina y se utiliza para evaluar comparativamente la producción de PHB como modelo tradicional de síntesis. El fragmento de ADN a ser insertado en el genoma de *E. coli* fue diseñado a partir del operón de síntesis de PHB de *Ralstonia eutropha* H16, el cual se compone de tres genes en orden *phaCAB* (3850 bp). Como fue demostrado por Hiroe y colaboradores, un orden de los genes distinto al que se encuentra en *Ralstonia eutropha* H16 podría mejorar la eficiencia de producción de PHB, siendo el orden *phaB*, *phaC*, *phaA*, con el que se produce mayor cantidad de bioplástico. [17]. Por esto, el orden *phaBCA* fue utilizado para este estudio. La secuencia promotora (PaldA), espaciadora y el sitio de unión del ribosoma (RBS) (197 bp) fueron seleccionadas a partir del estudio de Han y colaboradores, quienes evaluaron la inducción del promotor de la Aldehído deshidrogenasa A con ácido oleico [15] ; esto se hizo ya que se quería incluir un promotor que fuera inducible con un compuesto que estuviera presente en aguas residuales. Por último se añadió un gen de resistencia a la tetraciclina, derivado del plásmido pACYC184 (1191 bp), como marcador de selección de acuerdo con Chung y colaboradores [10]. El fragmento a integrar tiene aproximadamente 5081 bp y la estructura ilustrada en la Figura 1.B. La secuencia descrita fue sintetizada y subclonada dentro de pET-21a(+), entre los sitios de restricción HindIII y EcoRI respectivamente, como se observa en la Figura 1.C, formando el plásmido pET21a(+)-PHB. Esto con el fin de producir PHB de forma tradicional utilizando un plásmido. El ADN plasmídico fue transformado en *E. coli* DH5α para su mantenimiento y en *E. coli* BL21(DE3) para su expresión y consecuente producción de PHB.

Tabla 1. Pareja de oligonucleótidos con los que se modifica el plásmido pCRISPR para que tenga actividad específica en el gen *lacZ* del genoma de *E. coli* BL21(DE3) Gold. Pareja de primers con los que se amplifica, del plásmido pET-21a(+)-PHB, el fragmento PaldA-*phaBCA-tetR* y se le adicionan los extremos homólogos al gen *lacZ* (lugar donde ocurre la integración del fragmento).

Oligonucleótido	Secuencia	Objetivo		Referencia
LacZ-Fwd	aaacagatgtgctggcgagttgctgtactactacg	Modificación de pCRISPR – pCRISPR::LacZ		[10]
LacZ-Rev	aaacgtaggtagtcacgcaactcgccgcacatct			
Primer	Secuencia	Templado	Tamaño del amplicon	Referencia
petPHB Fwd	tcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaacaaaattgcccgtttgtgaacc	pET21a(+)-PHB	5181 bp	[10]
petPHB Rev	tttgatggaccatttcggcacagccgggaaggcgtgtcttcatccacgcgttcaggctcagggtggccc			

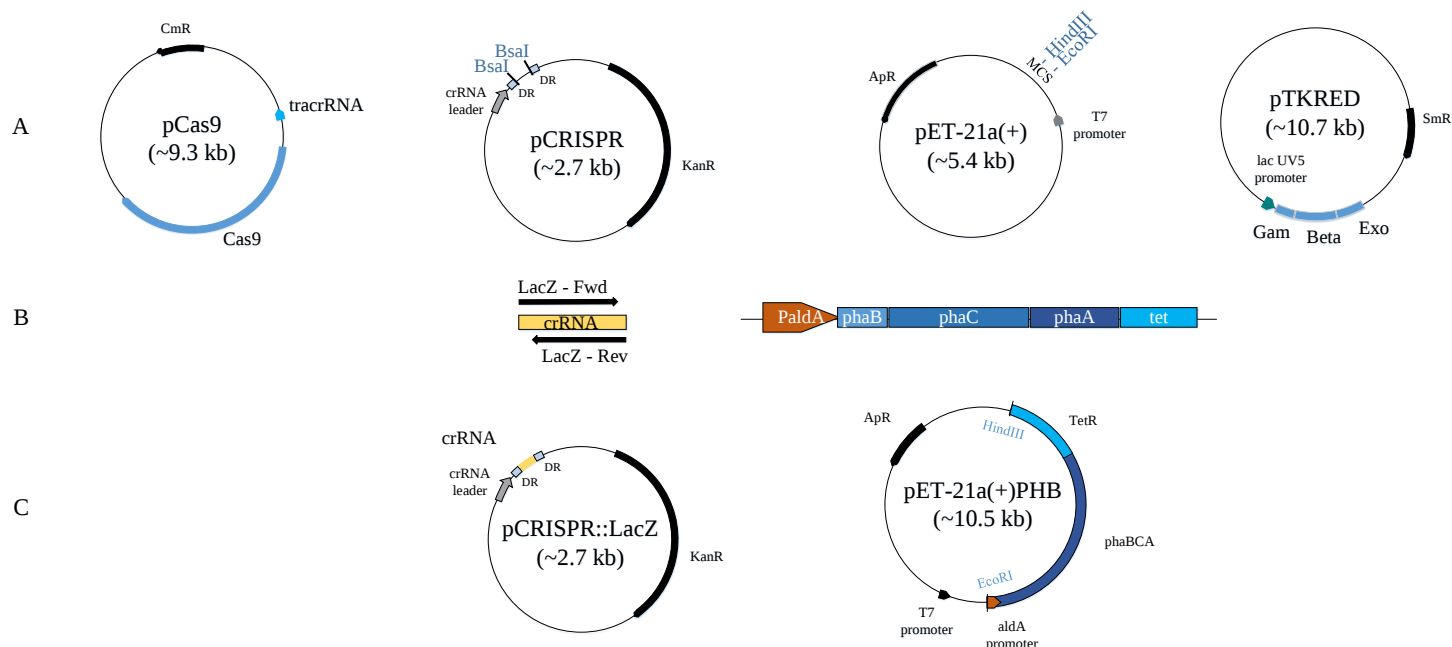


Figura 1. Plásmidos a utilizar en el estudio. A) Plásmidos base: pCas9, pCRISPR, pET-21a(+) y pTKRED. B) Modificaciones a los plásmidos pCRISPR y pET-21a(+): Adición del crRNA o llamado también ARN guía para que pCRISPR tenga actividad específica en el gen *lacZ* de *E. coli* BL21(DE3) Gold, mediante la síntesis de oligos en dirección 5'-3' y viceversa (LacZ-Fwd y LacZ-Rev) que son luego anillados para formar una secuencia doble catenaria, que es posteriormente subclonada en los sitios de restricción BsaI del plásmido pCRISPR, formando pCRISPR::LacZ; Adición del fragmento PaldA-*phaBCA-tetR* (ADN lineal a ser integrado en el gen *lacZ* de *E. coli* BL21(DE3) Gold) al plásmido pET-21a(+), entre los sitios de restricción EcoRI y HindIII, formando pET-21a(+)PHB (Fragmento sintetizado y subclonado por la empresa GENEWIZ New Jersey, USA). C) Plásmidos modificados: pCRISPR::LacZ y pET-21a(+)PHB.

Preparación del ADN lineal por medio de PCR

El fragmento PaldA-*phaBCA-tetR* fue amplificado de pET-21a(+)PHB por PCR utilizando primers de ≈ 70 nt, que se componen de 20 nt complementarios a la secuencia del fragmento PaldA-*phaBCA-tetR* y 50 nt homólogos al gen *lacZ* del genoma de *E. coli* BL21(DE3) Gold (Figura 2), donde se va a hacer la inserción de los genes de interés, como lo indican Chung y colaboradores [10]. Las secuencias de cada primer se encuentran en la Tabla 1, donde la parte subrayada corresponde a los extremos homólogos a *lacZ*. Para la amplificación se utilizó la polimerasa OneTaq (New England Biolabs), ya que no fue posible amplificar el segmento con ninguna de las polimerasas de alta fidelidad disponibles; las condiciones de amplificación fueron: 30s a 94°C, 40 ciclos de 20 s a 94°C, 1:00 min a 45°C y 5:20 min a 68°C, y 10 min a 68°C. Los productos de PCR fueron purificados con el kit Invisorb® Fragment CleanUp (Strattec molecular), para eliminar inespecificidades que pudieran obstaculizar la integración de ADN.



Figura 2. Conformación del ADN lineal a integrar en el genoma de *E. coli* por PCR. Se amplifica el fragmento PaldA-*phaBCA-tetR* y se adicionan extremos homólogos a *lacZ*.

Transformación, recuperación celular y plaqueo

Para la transformación de ADN plasmídico y lineal en *E. coli* se utilizaron células quimiocompetentes, las transformantes se obtuvieron mediante el método de choque térmico. Para hacer presión de selección con antibiótico se utilizaron las siguientes concentraciones individuales o en conjunto: 25 μ g/mL de cloranfenicol (Cm), 100 μ g/mL de ampicilina (Ap), 50 μ g/mL de

E. coli BL21(DE3) Gold

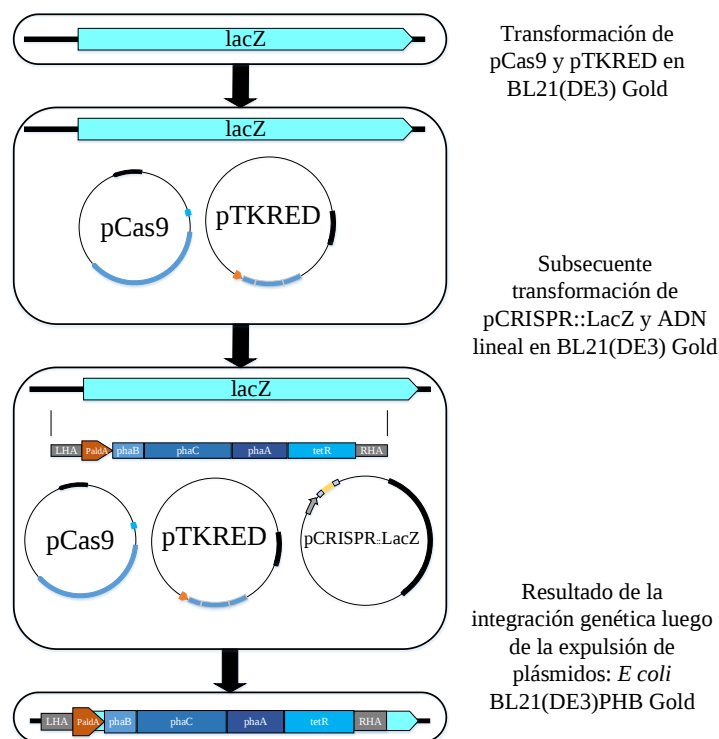


Figura 3. Esquema del proceso de transformaciones realizadas. Primero, *E. coli* BL21(DE3) Gold se prepara competente, y luego de una doble transformación, ésta célula contiene los plásmidos pCas9 y pTKRED. Esta misma célula es preparada competente otra vez para transformar en ella el plásmido pCRISPR::LacZ y el ADN lineal, con el fin de que ocurra la modificación del genoma de *E. coli* BL21(DE3) Gold y ahora contenga el fragmento PaldA-*phaBCA-tetR*.

kanamicina (Km), 50 µg/mL de espectinomicina (Sm) y 15-80 µg/mL de tetraciclina (Tet). Para la inducción de la β-galactosidasa y del operón Red se utilizó IPTG 0.4 mM, y para la detección de la β-galactosidasa (White-Blue screening) se utilizó X-gal (200 µg/mL). Para la introducción e implementación del sistema CRISPR/Cas9 – λ Red en *E. coli* BL21(DE3) Gold, se llevó a cabo primero la transformación de pCas9 y pTKRED en *E. coli* BL21(DE3) Gold competente (ver Figura 3). Se utilizaron 50 ng de cada plásmido, y luego del choque térmico, las células fueron suspendidas en 300 µL de medio SOC a 37°C por dos horas, y plaqueadas en medio LB sólido con Cm/Sm a 37°C por 16 horas. Posteriormente, estas células fueron cultivadas en medio LB con Cm, Sm e IPTG (para inducir la expresión del operón Red); estas células se hicieron quimiocompetentes, y luego se realizó la transformación de 100 ng de pCRISPR::LacZ y 1400 ng del ADN lineal. Para la recuperación, se suspendieron las células en 2 mL de medio SOC, en un tubo falcon de 15 mL por 2.5 horas a 37°C, y fueron plaqueadas en agar TSA con Km/IPTG/X-gal por 24 horas a 37°C [10].

Verificación de la integración de ADN

La integración de ADN en la cepa base de acuerdo con la Figura 3 fue verificada mediante el método “Blue n’ White Screening” como lo hicieron Chung y colaboradores en su estudio [10]. De las cajas de cultivo plaqueadas se aislaron las colonias blancas de las azules, y se cultivaron en medio LB ya que estas son aquellas que sufrieron un clivaje en *lacZ*, ahora denominadas como cepa recombinante. En estas colonias se evalúa la inducción de la expresión y por consiguiente la producción de bioplástico.

Inducción de la expresión del ADN lineal integrado a *E. coli*

Las colonias blancas aisladas fueron cultivadas en medio LB suplementado con ácido oleico a una concentración de 5 g/L con el fin de inducir la expresión de los genes *phaBCA* y la resistencia a tetraciclina, ambos regulados por el promotor de la Aldehído deshidrogenasa A (PaldA) como lo indican Han y colaboradores en su estudio [15], secuencias que componen el ADN lineal integrado a *E. coli* BL21(DE3) Gold (ver Figura 2). La fuente de ácido oleico utilizada fue aceite de oliva extra virgen, el cual se compone aproximadamente en un 80% de ácido oleico [18].

Para evaluar la expresión de las cepas recombinantes, se comparó el crecimiento de la nueva cepa recombinante con su cepa base: *E. coli* BL21(DE3) Gold. El crecimiento se comparó a través de un gradiente de concentración y de una alta concentración constante. El primero a partir de sensidiscos artesanales a los que se transfirieron 60 µL de stock de tetraciclina con concentración de 10 mg/mL, ubicados en el centro del agar LB suplementado con ácido oleico, y el segundo en cajas de agar LB suplementado con ácido oleico y tetraciclina con concentración de 80 µg/mL.

Producción y detección de PHB

Las cepas recombinantes fueron cultivadas en medio LB suplementado con ácido oleico para inducir la producción de PHB, y tetraciclina para prevenir la contaminación del cultivo. Se utilizó

el método de tinción de Negro de Sudán B para verificar la producción de bioplástico, como se ha implementado en estudios anteriores [8].

Las colonias blancas obtenidas fueron cultivadas en medio LB suplementado con ácido oleico y tetraciclina a 37°C y 300 rpm por 16 horas. De cada cultivo se transfirieron 10 µL a cada lámina de vidrio y se esparcieron en la superficie. Las láminas se flamearon y se dejaron secando 10 minutos, y luego se adicionaron un par de gotas del reactivo Negro de Sudán B a cada lámina y se dejaron 10 minutos para que las células absorbieran el colorante. Posteriormente se adicionaron algunas gotas de Xileno a cada lámina con el fin de remover el exceso de Negro de Sudán B e inmediatamente se agregaron gotas de Safranina (colorante de contraste) en la superficie. 10 segundos después se rociaron las láminas con agua destilada para remover el exceso de colorante, se dejaron en la cámara de extracción hasta que se secaran completamente, y se observaron en el microscopio con lente de inmersión [19]. Se utilizaron controles negativos (*E. coli* DH5α, *E. coli* BL21(DE3) Gold) y controles positivos (*E. coli* BL21(DE3) con el plásmido pET-21a(+)(PHB), para evaluar la influencia del ácido oleico en la producción de PHB y su papel como inductor de la misma. Se comparó la producción de PHB con las láminas, en cultivos con y sin la presencia de ácido oleico.

Verificación de la cepa recombinante

Crecimiento en agar selectivo

La cepa recombinante fue sembrada en agar Baird-Parker, medio de cultivo en el cual solo crecen bacterias gram positivas. Como control positivo se sembró *Staphylococcus aureus*. Este medio contiene por litro: 10 gr de triptona, 5 gr de extracto de carne, 1 gr de extracto de levadura, 5 gr de cloruro de litio, 12 gr de glicina, 10 gr de piruvato sódico, 0,1 gr de telurito potásico, 20 gr de agar bacteriológico y 50 mL de emulsión de yema de huevo, y es ajustado a un pH de 6,8 (BD Diagnostic Systems – Heidelberg, Alemania). Las placas fueron incubadas a 37°C por 16 horas.

Prueba de Indol

Como segunda corroboración se realizó la prueba de Indol, con la que se determina la habilidad de un organismo para degradar triptófano y producir indol, y es positiva para *E. coli*. Se prepararon 4 tubos de ensayo con 2,5 mL de caldo triptófano. El caldo triptófano contiene por litro: 15 gr de triptona y 5 gr de cloruro de sodio, debe ser ajustado a pH neutro y autoclavado por 15 minutos. Los tubos fueron inoculados con *E. coli* DH5α y *E. coli* BL21(DE3) Gold como controles positivos, con *Staphylococcus aureus* como control negativo, y con la cepa recombinante. La incubación se realizó a 37°C por 18 horas.

Luego se adicionaron algunas gotas del reactivo de Kovac a cada tubo para observar la reacción positiva indicada por la formación de un anillo rojo en la superficie del cultivo. La reacción negativa forma un anillo amarillo en la superficie del cultivo. El reactivo de Kovac se compone de alcohol isoamilo, p-dimetilaminobenzaldehído y ácido clorhídrico concentrado [20].

Tinción de gram

La tinción de Gram es una técnica que permite diferenciar bacterias gram positivas de bacterias gram negativas. De los cultivos preexistentes de la cepa recombinante, *E. coli* BL21(DE3) Gold y *Staphylococcus aureus*, se tomaron 10 µL, se transfirieron cada uno a una lámina de vidrio, y con un asa se difundió el cultivo a través de la superficie. Se flamearon las láminas hasta que quedaron completamente secas y se adicionaron algunas gotas del colorante Cristal Violeta sobre la superficie. Después de un minuto se rociaron las láminas con agua para remover el residuo de Cristal Violeta que no se había adherido a cada lámina por 5 segundos, y se adicionó Lugol (solución diluida de yodo y yoduro de potasio) para que el Cristal Violeta pudiera fijarse a la pared celular de las bacterias. Luego de un minuto se rociaron las láminas con acetona y a los 3 segundos se adicionó agua. Por último, se agregaron algunas gotas del colorante de contraste Fucsina y se incubaron las láminas por un minuto, para después eliminar excesos con agua por 5 segundos. Cuando las láminas estaban completamente secas, se observaron en el microscopio con lente de inmersión [21].

Evaluación del potencial de las cepas recombinantes para piloto de producción de PHB en el efluente de un reactor anaerobio

Para comparar la supervivencia de la cepa recombinante y *Ralstonia eutropha* H16 en el efluente de un reactor anaerobio disponible en el laboratorio (concentración aproximada de AGVs totales de 3 g/L), cada bacteria fue inoculada en 7 mL del efluente esterilizado por filtración y cultivada a 37°C y 250 rpm por 24 horas, y a 30°C y 250 rpm por 48 horas, respectivamente. El crecimiento fue medido en términos de OD600 en un espectrofotómetro.

Resultados y discusión

CRISPR/Cas9 – λ-Red como herramienta de modificación genómica

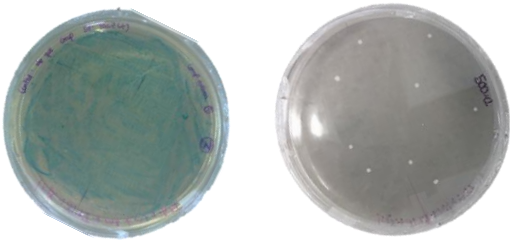


Figura 4. La placa de la izquierda muestra a *E. coli* BL21(DE3) competente, que tiene los plásmidos pCas9 y pTKRED en medio TSA con cloranfenicol, espectinomicina, IPTG y X-gal. Como se observa en la imagen, las células crecieron azules, lo cual demuestra que son *lacZ* positivas. La placa de la derecha muestra las colonias blancas en una de las cajas plaqueadas. Del medio de recuperación (SOC) en el que se encontraban, se sembraron 500 µL.

Para verificar la modificación genética de *E. coli* BL21(DE3) Gold, se utilizó el método de “Blue n’ White Screening”. En este método es posible detectar interrupciones del gen *lacZ* de *E. coli* BL21(DE3) Gold mediante la inducción de la β-galactosidasa con IPTG y el uso del compuesto X-gal. Aquellas células en las que haya ocurrido un clivaje en el gen *lacZ* (a causa del acoplamiento de la nucleasa Cas9 producida por pCas9 y el crRNA sintetizado por pCRISPR::LacZ) crecen blancas, mientras que aquellas en las que *lacZ* no haya sufrido

un clivaje, luego de la implementación del sistema CRISPR/Cas9 – λ-Red, crecen azules.

Las cajas plaqueadas con las transformantes en las que se había implementado el sistema CRISPR/Cas9 – λ-Red en medio LB con kanamicina, IPTG y X-gal, fueron dejadas a 37°C por 16 horas. Junto con estas, se hizo un control para verificar que el X-gal y el IPTG estaban funcionando correctamente y que las *E. coli* BL21(DE3) que ya tenían los plásmidos pCas9 y pTKRED en su citoplasma (Figura 3), responden a estos compuestos creciendo azules, debido a que son *lacZ* positivas. De las 5 cajas plaqueadas, se detectaron 32 colonias blancas (Ver Figura 4), las cuáles fueron aisladas para sus respectivos análisis.

Resistencia a tetraciclina conferida en la integración genómica

Como la *E. coli* BL21(DE3) Gold es resistente a tetraciclina, la evaluación de la resistencia a tetraciclina conferida en la integración del fragmento Palda-*phaBCA*-tetR, se midió como resistencia adicional al antibiótico en la cepa recombinante, es decir, a concentraciones mayores a la que es normalmente utilizada (15 µg/mL).

La resistencia a la tetraciclina por parte de las bacterias consta de cuatro mecanismos descritos hasta ahora, y así mismo hay genes que codifican para uno u otro. Los más comunes son a) Bombas de eflujo transmembranales que expulsan la tetraciclina de la célula y b) Proteínas que protegen el ribosoma, uniéndose a él y removiendo la tetraciclina del RBS, para que este pueda dar inicio a la traducción [22]. Como el gen de resistencia a la tetraciclina de *E. coli* BL21(DE3) Gold y el del fragmento Palda-*phaBCA*-tetR (derivado del plásmido pACYC184) confieren resistencia a través de bombas de eflujo, es posible suponer que hay una resistencia adicional adquirida en la cepa recombinante.

Tabla 2. Prueba de sensidiscos artesanales de tetraciclina. A la izquierda se observa el crecimiento de la cepa base: *E. coli* BL21(DE3) Gold, y a la derecha el crecimiento de la cepa recombinante. En la primera fila se observa el crecimiento normal de cada cepa cuando no hay presión de selección por antibiótico. En la segunda fila se observa el efecto de 600 µg de tetraciclina sobre cada cultivo.

<i>E. coli</i> BL21(DE3) Gold	Cepa recombinante
Sensidisco sin tetraciclina	
Sensidisco con tetraciclina	

En la primera prueba se aplicó un gradiente de concentración desconocido en forma de sensidiscos artesanales, sobre los cuales se aplicaron 600 microgramos de tetraciclina. Como se observa en la

Tabla 2, las colonias de la cepa recombinante generan en apariencia un diámetro más corto que las colonias de la cepa base, lo cual daría indicios de que hay una resistencia adicional a la tetraciclina por parte de éstas.

Tabla 3. Prueba de resistencia a una alta concentración constante de tetraciclina. A la izquierda se encuentra el cultivo de *E. coli* BL21(DE3) Gold y a la derecha, el cultivo de la cepa recombinante. Ambos en agar LB suplementado con ácido oleico y tetraciclina a una concentración de 80 µg/mL.

Resistencia a tetraciclina (80 µg/mL)	
<i>E. coli</i>	Cepa recombinante
BL21(DE3) Gold	
	

En la segunda prueba se comparó el crecimiento de la cepa recombinante y la cepa base a una alta concentración de tetraciclina (80 µg/mL). Se evidenció un crecimiento invasivo en la cepa recombinante y uno restringido en la cepa base, por lo que se establece que hay una aparente resistencia adicional a tetraciclina adquirida posiblemente por la modificación genética. Sin embargo, no es posible hacer una selección a ésta concentración, ya que como se observa en la Tabla 3, *E. coli* BL21(DE3) Gold sigue siendo resistente a esta concentración. A pesar de que ambas pruebas dan indicios de que hay una mayor resistencia a la tetraciclina en las cepas recombinantes, es importante verificar y detectar la producción de bioplástico para evaluar la expresión de la bacteria modificada y el éxito de la misma.

Evidencia de producción de PHB

Variabilidad en la expresión de cada colonia

Para detectar la producción de PHB por parte de la cepa recombinante, las colonias fueron analizadas una a una, dado que a pesar de que todas, por crecer blancas habían sufrido una interrupción en *lacZ*, podrían ser distintas debido al uso de una polimerasa que no es de alta fidelidad (OneTaq) para la conformación del ADN lineal por medio de PCR. Según New England Biolabs (NEB), una polimerasa como la OneTaq tiene una probabilidad de error aproximada por cada 3500 bases [23]. Esto significa que cada copia amplificada puede haber sufrido una mutación, en alguna de las 5200 bases que tiene el ADN lineal de longitud aproximadamente. Mutación que puede incidir en la producción de plástico o en la resistencia a tetraciclina. Las 32 colonias blancas obtenidas fueron cultivadas por 16 horas en medio LB suplementado con ácido oleico para inducir la expresión y consecuente producción de PHB de cada una de ellas. Luego se realizó tinción de Negro de Sudán B de cada uno de los cultivos y se observaron en el microscopio con lente de inmersión. Como control negativo de la producción de PHB se observó la tinción de Negro de Sudán B en *E. coli* DH5α y BL21(DE3) Gold.

Estudios previos han demostrado que la tinción de Negro de Sudán B, es una técnica de tinción lipofílica que tiene una alta sensibilidad para detectar polihidroxialcanoatos [19]. Luego de agregar el

colorante Negro de Sudán B, los gránulos se tiñen de negro. La safranina es el colorante de contraste para el resto de material celular, que hace posible detectar lo que no corresponde con PHB de color rosado. Las láminas de los cultivos de cada colonia mostraron haber teñido de negro lo que correspondería con el PHB acumulado en la membrana de la mayoría de las células de cada lámina, y en los controles negativos no se observó tinción negra, lo cual corrobora el método. Sin embargo, teniendo en cuenta la posible variabilidad debida a mutaciones generadas por la tasa de error de la polimerasa OneTaq (New England Biolabs), se observaron diferencias tanto en forma como en cantidad visible de tinción negra en las láminas de cada colonia aislada (datos no mostrados).

Detección de PHB en la cepa recombinante

Para detectar la producción de PHB de las cepas recombinantes, se hizo un cultivo de la mezcla de todas las colonias. Los controles negativos y positivos, y la mezcla de colonias fueron cultivados en medio LB con y sin ácido oleico, y tetraciclina (30 µg/mL) y ampicilina (de ser necesario) a 37°C y 300 rpm por 16 horas. Posteriormente se realizó tinción de Negro de Sudán B a cada lámina y se observaron en el microscopio con lente de inmersión. Como se muestra en la Tabla 4, la tinción de Negro de Sudán B permite detectar la acumulación de gránulos de PHB, tanto *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido pET-21a(+)-PHB, como en la cepa recombinante, en presencia de ácido oleico; lo cual permite suponer que este compuesto está induciendo la expresión del fragmento y consecuente producción de PHB. Los controles negativos de la producción de PHB no arrojan coloración negra en ambos casos (con y sin ácido oleico), corroborando el método y la técnica utilizada.

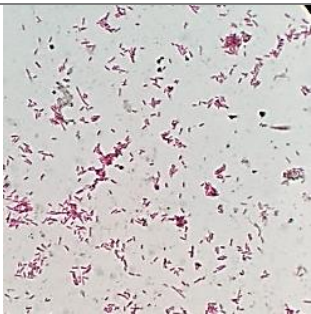
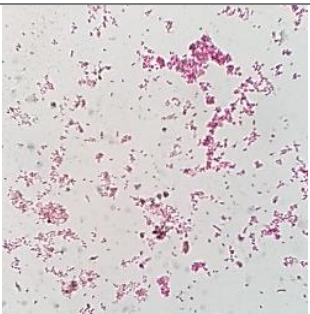
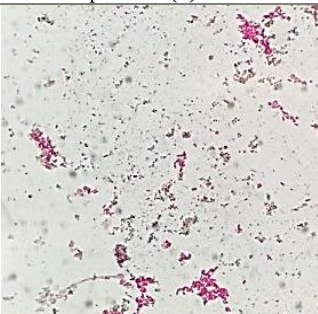
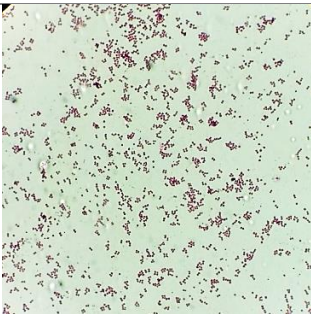
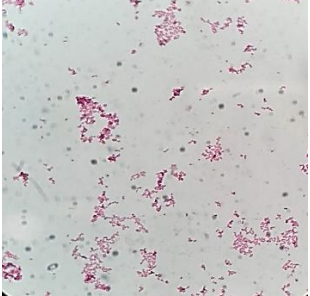
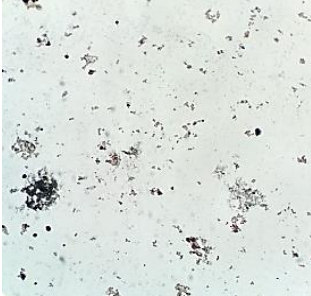
Cepa verificada

Morfología y crecimiento

Cuando se observaron las primeras siembras en agar LB suplementado con ácido oleico, se percibió un crecimiento atípico en aquellas células correspondientes a la cepa recombinante, es decir, de las colonias blancas obtenidas luego de la modificación genómica de la cepa recombinante via CRISPR/Cas9 – λ-Red. Se evidenció un crecimiento seco y masivo, comparado con el crecimiento de las células de la cepa base: *E. coli* BL21(DE3) Gold, en el cuál las colonias se pueden diferenciar unas de otras, y eran más húmedas (ver Tabla 2). Asimismo, en las láminas de tinción de Negro de Sudán B se observó que las células, en el caso de la cepa recombinante, tenían forma de cocos y no de cocobacilos, como es común en *E. coli* (ver Tabla 4).

Ésta diferencia en el crecimiento podría deberse a la acumulación de plástico por parte de la cepa recombinante, o a posibles efectos “off target” generados por el sistema CRISPR/Cas9 – λ-Red. Estudios previos han establecido que *E. coli* puede cambiar de forma temporal o permanentemente. Cuando los cambios son temporales, la forma de *E. coli* se reestablece a partir de la quinta generación, lo cual no fue el caso de la cepa recombinante. Los cambios permanentes en cambio, se generan debido a un daño en los genes de elongación de la cepa recombinante, generando un crecimiento de *E. coli* con forma de cocos o bacilos [24]. Estos últimos son llamados esferoplastos de *E. coli*. Al haber tantas posibles opciones, se decidió descartar si la cepa recombinante es una contaminación con otro microorganismo.

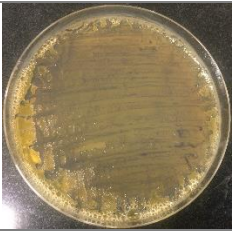
Tabla 4. Fotografías de las láminas con tinción de Negro de Sudán B. En la primera fila se encuentra la tinción de los cultivos sin ácido oleico (sin A.O.) y abajo con ácido oleico (con A.O.) a la derecha se observa la producción de phb por parte de la cepa recombinante y *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido pET-21a(+)-PHB. Como controles negativos, se utilizó *E. coli* DH5α y *E. coli* BL21(DE3) Gold.

	<i>E. Coli</i> DH5A	<i>E. Coli</i> BL21(DE3) GOLD	<i>E. Coli</i> BL21(DE3) pET-21A(+)-PHB	Cepa recombinante
Sin A.O.				
Con A.O.				

Crecimiento en agar selectivo

Como primera corroboración se sembró la cepa recombinante en agar Baird-Parker, el cual es selectivo para bacterias gram positivas, y como control positivo se sembró *Staphylococcus aureus*., bacteria gram positiva. Si la cepa recombinante es realmente *E. coli*, no debe crecer en este agar, ya que este microorganismo pertenece a la familia de las bacterias gram negativas.

Tabla 5. Crecimiento en agar selectivo Baird-Parker de la cepa recombinante Cepa recombinante y de *Staphylococcus aureus*.

<i>Staphylococcus aureus</i>	Cepa recombinante
	

Como se observa en la Tabla 5, la prueba resulta negativa para *E. coli*. En la parte derecha de la tabla se muestra el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (Control positivo), inoculada a través de siembra con rastrillo. A la derecha se encuentra la siembra con asa, de la cepa recombinante. Luego de 16 horas se observó crecimiento en ambas placas indicando que la cepa recombinante posiblemente sufrió contaminación con una bacteria gram positiva y por esto sobrevive en este agar selectivo.

Prueba de Indol

A pesar de que la prueba del agar selectivo Baird-Parker había resultado negativa para *E. coli*, se realizó una segunda corroboración con herramientas bioquímicas. Los distintos métodos de identificación bioquímica de *E. coli*, están basados en su mayoría en el conocido operón lactosa de esta bacteria, y no son convenientes en el caso de este estudio, dado que la modificación genética generada por el sistema CRISPR/Cas9 – λ-Red, interrumpe uno de los genes que componen este operón (*lacZ*). Por esto se realizó la prueba de Indol, basada en el operón triptófano [20]. Esta prueba detecta aquellas bacterias que son capaces de degradar el triptófano al compuesto Indol. Se probaron controles positivos (*E. coli* DH5α y *E. coli* BL21(DE3) Gold) y negativos (*Staphylococcus aureus*), para asegurarse de que los reactivos y la prueba, funcionan correctamente.

Tabla 6. Prueba de Indol. De izquierda a derecha se muestran los resultados de la prueba para *E. coli* DH5α (indol positiva), *E. coli* BL21(DE3) Gold (indol positiva), Cepa recombinante (indol negativa) y *Staphylococcus aureus* (indol negativa).

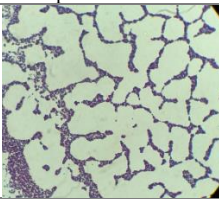
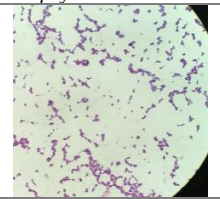
<i>E. coli</i> DH5α	<i>E. coli</i> BL21(DE3) Gold	Cepa recombinante	<i>S. aureus</i>
			

Pasadas las 18 horas de crecimiento de cada cultivo en caldo triptófano, se agregaron algunas gotas del reactivo de Kovac, y se observó la reacción inmediata que da resultado positivo para los controles positivos (coloración roja en la superficie) y viceversa para el control negativo (coloración amarilla en la superficie), demostrando que la prueba funciona correctamente. La Tabla 6 muestra el resultado para la cepa recombinante como indol negativa, lo que indica que ésta no corresponde con *E. coli*.

Tinción de gram

La tercera y última corroboración realizada fue una tinción de gram para verificar que los cultivos de la cepa recombinante son el resultado de una contaminación con una bacteria gram positiva.

Tabla 7. Tinción de gram de cultivos preexistentes de *E. coli* BL21(DE3) Gold como control de gram negativas, *Staphylococcus aureus* como control de gram positivas y la cepa recombinante.

<i>E. coli</i> BL21(DE3) Gold	Cepa recombinante	<i>Staphylococcus aureus</i>
		
Gram negativa	Gram positiva	Gram positiva

La Tabla 7 muestra las láminas con la tinción de gram observadas en el microscopio en lente de inmersión. De izquierda a derecha se encuentra *E. coli* BL21(DE3) Gold, donde se observa la morfología característica de *E. coli*: cocobacilos gram negativos. Luego está la cepa recombinante, en forma de cocos gram positivos, y por último se muestran los cocos gram positivos correspondientes a *Staphylococcus aureus*.

Análisis de error

Luego de haber realizado las pruebas bioquímicas y microbiológicas correspondientes, y analizar los experimentos realizados desde el momento de la modificación genética de *E. coli* BL21(DE3) Gold se concluye que hubo contaminación en el momento del plaqueo de las células recombinantes para su verificación por el método de “Blue n’ White Screening”, ya que como se observa en la Tabla 7, las células de *E. coli* BL21(DE3) Gold competentes (Con los plásmidos pCas9 y pTKRED) corresponden con la morfología y grupo bacteriano de *E. coli*: cocobacilos gram negativos; lo que indica que hasta la primera transformación (ver Figura 3) no había ocurrido contaminación.

Se cree que la bacteria con la que ocurrió la contaminación puede pertenecer al grupo de los Estafilococos (*Staphylococci*), por las similitudes que presentó la llamada cepa recombinante, con *Staphylococcus aureus* (bacteria gram positiva utilizada como control). Sin embargo, no es posible afirmar lo anterior concretamente y es necesario hacer más estudios que permitan establecer a qué microorganismo corresponde la contaminación.

Adicionalmente, hubo dos variables de confusión que hicieron difícil establecer que la cepa recombinante es en realidad una contaminación; a profundizar. La primera de ellas es que esta

bacteria gram positiva resultó ser resistente a altas concentraciones de tetraciclina (incluso más resistente que la cepa base: *E. coli* BL21(DE3) Gold), lo cual mostraba indicios de una resistencia adicional adquirida por la supuesta cepa recombinante, gracias a la modificación genética. Entre las diversas bacterias gram positivas que son resistentes a tetraciclina se encuentran la mayoría de variables de *Staphylococcus* [25] [26]. La segunda variable de confusión en los resultados de la modificación genética, es la aparente producción de bioplástico por parte de esta bacteria en presencia de ácido oleico, como se detectó en la tinción de Negro de Sudán B (ver Tabla 4). Revisando en la literatura se encontró que hay una gran variedad de bacterias gram positivas que son capaces de producir biopolímero bajo distintas condiciones, como el grupo de los Estafilococos; utilizando varias fuentes de carbono como el aceite de oliva (ácido oleico), entre otras [27] [28].

La bacteria aislada es un microorganismo potencial para la producción de PHB con AGV’s residuales como sustrato. El último experimento realizado quería comprobar que el microorganismo correspondiente a la cepa recombinante (ahora bacteria gram positiva desconocida, BG+D) sobrevivía en el efluente del reactor anaerobio disponible en el laboratorio. En este reactor ocurre la acidogénesis de la materia orgánica de un agua residual simulada, proveniente de la industria de productos lácteos. Con esta prueba se buscaba determinar el potencial de la cepa recombinante para ser utilizada en un estudio piloto de aprovechamiento de AGVs residuales como sustrato para la producción de bioplástico.

Para ello se comparó el crecimiento de *Ralstonia eutropha* H16 con el de la BG+D. Como *R. eutropha* H16 tarda en crecer aproximadamente 48 horas (casi el doble que *E. coli*), se dejó en crecimiento por más tiempo. Mientras que en el cultivo de *R. eutropha* H16 no se observó crecimiento alguno en el efluente en 48 horas, la bacteria gram positiva desconocida (BG+D) creció hasta un OD600 de 1,0 en 8 horas (datos no mostrados). Esto muestra que la bacteria aislada puede ser un microorganismo potencial para la realización de un estudio piloto de producción de PHB, con AGVs residuales.

Conclusiones

En resumen, este estudio ha explorado el sistema CRISPR/Cas9 – λ -Red como método de integración genómica de ADN en *E. coli*, para crear una cepa recombinante capaz de producir PHB utilizando AGVs como sustrato y ácido oleico como inductor del proceso. El proyecto fue diseñado y verificado bioinformáticamente para asegurar que produjera las proteínas de síntesis de PHB. A pesar de que todas las medidas de esterilidad fueron tenidas en cuenta, se generó una contaminación en el proceso de construcción del diseño, que conllevó al aislamiento de una bacteria gram positiva, no identificada, que coincidentalmente es resistente a tetraciclina, y aparentemente capaz de producir bioplástico en presencia de ácido oleico.

El diseño debe construirse nuevamente, hasta que sea posible crear la cepa recombinante deseada para hacer pruebas piloto que permitan optimizar los parámetros de producción de PHB, y así lograr los objetivos propuestos por este estudio.

Recomendaciones futuras

Para el diseño del fragmento *PaldA-phaBCA-tetR*, se tomaron las secuencias del promotor, secuencia Shine Delgarno (Con su respectivo RBS) y se ubicó cada gen de forma que el codón de finalización de un gen fuera inmediatamente anterior al codón de inicio del siguiente gen. Lo anterior debido a que se buscaba que el fragmento no tuviera una gran longitud, y esto aumentara la eficiencia de la modificación genómica. Como los organismos procariontes son policistronicos, un operón (secuencia con más de un gen) puede expresarse con la activación de un solo promotor. Asimismo, en este tipo de organismos un solo RBS para un operón es funcional ya que como menciona Parker en su capítulo, cuando el codón de finalización de un gen está ubicado cerca al codón de inicio del siguiente gen del operón, el ribosoma no alcanza a desprenderse del RBS y ocurre una reiniciación de la traducción para el siguiente gen [29].

Sin embargo, estudios han reportado que la eficiencia en la expresión de sistemas de producción de proteínas recombinantes aumenta cuando cada gen del operón tiene su propia secuencia de Shine Delgarno, es decir, un RBS anterior al codón de inicio [30]. Para aumentar la eficiencia en la expresión del sistema diseñado en este estudio (Fragmento *PaldA-phaBCA-tetR*), se recomienda modificar, mediante clonación tradicional el fragmento para que cada gen tenga un RBS. La metodología propuesta se encuentra en el material suplementario.

Agradecimientos

A mis compañeros de laboratorio en general y especialmente a Laura Henao y Sebastián Jaramillo, por su asesoría, apoyo y amistad, este camino ha sido mucho más divertido gracias a todos ustedes. A Miguel muchas gracias por los consejos, hemos mejorado bastante la técnica en el laboratorio. A Joan por motivarme a hacer la maestría y apoyarme hasta el final. A Félix gracias por aprender y entender conmigo “los caminos de la Tesis” con tanta comprensión y amor. A Johana Hussler, mi maestra, mi asesora, mi motivación e inspiración como mujer científica, gracias por enseñarme a creer en mí y a disfrutar el proceso, espero no haberte defraudado. Jamás podré agradecerle lo suficiente. Finalmente, a mi madre Ángela y a mi abuela Francisca, por darme tanto amor y apoyo en todo momento, y ser mi refugio en toda dificultad. Me llevo el aprendizaje y las lecciones de vida que esta experiencia me ha traído.

Referencias

- [1] J. Yu, «Production of PHA from starch wastewater via organic acids,» *Journal of Biotechnology*, vol. 86, pp. 105-112, 2001.
- [2] S. Z. Ahammad y T. R. Sreekrishnan, «Energy From Wastewater Treatment,» de *Bioremediation and Bioeconomy*, Elsevier, 2016, p. 523-536.
- [3] S. L. Riedel, S. Jahns, S. Koenig, M. C. E. Bock, C. J. Brigham, J. Bader y U. Stahl, «Polyhydroxyalkanoates production with *Ralstonia eutropha* from low quality waste animal fats,» *Journal of Biotechnology*, vol. 214, pp. 119-127, 2015.
- [4] S. Y. Lee, K. S. Yim, H. N. Chang y Y. K. Chang, «Construction of plasmids, estimation of plasmid stability, and use of stable plasmids for the production of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli*,» *Journal of biotechnology*, vol. 32, pp. 203-211, 1994.
- [5] S. Y. Lee, Y. K. Lee y H. N. Chang, «Stimulatory Effects of Amino Acids and Oleic Acid on Poly(3-Hydroxybutyric Acid) Synthesis by Recombinant *Escherichia coli*,» *Journal of Fermentation and Bioengineering*, vol. 79, n° 2, pp. 177-180, 1995.
- [6] S. J. Park, J.-i. Choi y S. Y. Lee, «Engineering of *Escherichia coli* fatty acid metabolism for the production of polyhydroxyalkanoates,» *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 36, pp. 579-588, 2005.
- [7] R. Li, H. Zhang y Q. Qi, «The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*,» *Bioresource technology*, vol. 98, pp. 2313-2320, 2007.
- [8] M. Jari, S. R. Khatami, H. Galehdari y M. Shafiei, «Cloning and Expression of Poly 3-Hydroxybutyrate Operon Into *Escherichia coli*,» *Ahvaz*, 2015.
- [9] F. Baquero, J.-L. Martínez y R. Cantón, «Antibiotics and antibiotic resistance in water environments,» *Current opinion in Biotechnology*, vol. 19, pp. 260-265, 2008.
- [10] M.-E. Chung, I.-H. Yeh, L.-Y. Sung, M.-Y. Wu, Y.-P. Chao, I.-S. Ng y Y.-C. Hu, «Enhanced Integration of Large DNA Into *E. coli* Chromosome by CRISPR/Cas9,» *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 114, n° 1, Enero 2017.
- [11] J. D. Sander y J. K. Joung, «CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes,» *Nature Biotechnology*, vol. 32, n° 4, 2014.
- [12] D. Rath, L. Amlinger, A. Rath y M. Lundgren, «The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications,» *Biochimie*, 2015.
- [13] W. Jiang, D. Bikard, D. Cox, F. Zhang y L. A. Marraffini, «CRISPR-assisted editing of bacterial genomes,» *Nature Biotechnology*, vol. 31, n° 3, pp. 233-239, 2013.
- [14] S. C. Makrides, «Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in *Escherichia coli*,» *American Society for Microbiology*, vol. 60, n° 3, pp. 512-538, 1996.
- [15] M.-J. Han, J. W. Lee, S. Y. Lee y J. S. Yoo, «Proteome-Level Responses of *Escherichia coli* to Long-Chain Fatty Acids and

Use of Fatty Acid Inducible Promoter in Protein Production,» *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2008.

- [16] J. Mozejko-Ciesielska y R. Kiewisz, «Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous?,» *Microbiological Research*, vol. 192, pp. 271-282, 2016.
- [17] A. Hiroe, K. Tsuge, C. T. Nomura, M. Itaya y Y. Tsuge, «Rearrangement of Gene Order in the phaCAB Operon Leads to Effective Production of Ultrahigh-Molecular-Weight Poly[(R)-3-Hydroxybutyrate] in Genetically Engineered *Escherichia coli*,» *Applied and Environmental Microbiology*, pp. 3177-3184, 2012.
- [18] C. Massimo, T. Lucio, J. Martínez Álvarez, G. Lercker y G. M. Caramia, «Extra virgin olive oil and oleic acid,» *Nutrición clínica y Dietética Hospitalaria*, vol. 29, nº 3, pp. 12-24, 2009.
- [19] Y. H. Wei, W. C. Chen, C. K. Huang, H. S. Wu, Y. M. Sun, C. W. Lo y O. M. Janarthanan, «Screening and Evaluation of Polyhydroxybutyrate-Producing Strains from Indigenous Isolate *Cupriavidus taiwanensis* Strains,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 12, pp. 252-265, 2011.
- [20] W. Heizmann, P. C. Döller, B. Gutbrod y H. Werner, «Rapid identification of *Escherichia coli* by Fluorocult media and positive indole reaction,» *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 2682-2684, 1988.
- [21] M. Z. Bruckner, «Gram Staining».
- [22] F. Nguyen, A. L. Starosta, S. Arenz, D. Sohmen, D. Alexandra y D. N. Wilson, «Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms,» *Biological Chemistry*, vol. 395, nº 5, pp. 559-575, 2014.
- [23] New England Labs, «Polymerase Fidelity: What is it, and what does it mean for your PCR?,» 2012.
- [24] D. S. Weiss, «*Escherichia coli* Shapeshifters,» *Journal of Bacteriology*, vol. 195, nº 11, pp. 2449-2451, 2013.
- [25] I. Chopra y M. Roberts, «Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance,» *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 65, nº 2, pp. 232-260, 2001.
- [26] K. Trzcinski, B. S. Cooper, W. Hryniewicz y C. G. Dowson, «Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*,» *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 45, pp. 763-770, 2000.
- [27] K. Chaitanya, S. K. Mahmood, K. Rana y N. Sunilkumar, «Biotechnological Production of Polyhydroxyalkanoates by Various Isolates: A Review,» *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*, vol. 3, nº 8, pp. 1-11, 2014.
- [28] R. Verlinden, D. Hill, M. Kenward, C. Williams y I. Radecka, «Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates,» *Journal of Applied Microbiology*, vol. 102, pp. 1437-1449, 2007.
- [29] J. Parker, «Polycistronic mRNA,» de *Encyclopedia of Genetics*, Academic Press, 2001, p. 1496.
- [30] P. Xu, A. Vansiri, N. Bhan y M. A. G. Koffas, «ePathBrick: A Synthetic Biology Platform for Engineering Metabolic Pathways in *E. coli*,» *Synthetic Biology*, pp. 256-266, 2012.

Material suplementario

Tabla 8. Lista de primers diseñados para hacer la modificación al diseño propuesta. Los últimos dos de la lista corresponden al primer ya existente petPHB Fwd, y al primer Reverse que amplifica el nuevo ADN lineal a ser integrado en *E. coli* BL21(DE3), respectivamente. La secuencia subrayada corresponde a los extremos homólogos a *lacZ*.

Primer	Secuencia	Templado	Tamaño del amplicon	Referencia
PaldA-phaB Fwd	attgagaattcaaaattgccgtttgtgaacca	pET21a(+)PHB	950 bp	[17]
PaldA-phaB Rev	tattctagatcagcccatatgcaggcc			
RBSphaCA Fwd	ttatctagaagagagacaatcaatcatggcg	<i>Ralstonia eutropha</i> H16	3060 bp	[17]
RBSphaCA Rev	ttagtgaattcttatttgcgtcgactgcc			
petPHB Fwd*	<u>tcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacaaaaattgccgtttgtgaacc</u>	Fragmento PaldA-phaBCA con RBS	4110 bp	[10]
PaldA-phaBCA Rev	<u>tttgatggaccatttcggcacagccgggaagggtgtgtcttcatccacgcgtatttgcgtcgactgcca</u>			

Con el fin de aumentar la eficiencia del sistema, se recomienda modificar la secuencia del ADN lineal proveniente pET-21a(+)PHB para que cada gen tenga una secuencia para la unión del ribosoma (RBS). Esto se puede lograr, a través de un proceso de clonación tradicional que se muestra esquemáticamente en la Figura 5. La propuesta es la siguiente:

1. Amplificar por PCR (utilizar polimerasa de alta fidelidad), de pET-21a(+)PHB, el promotor de la Aldehído deshidrogenasa A inducible por ácido oleico (PaldA) y el gen *phaB*, utilizando los siguientes primers (Tabla 8), donde las secuencias en negrilla representan los sitios de restricción *EcoRI* y *XbaI*, respectivamente: paldA-phaB Fwd y paldAphaB Rev.
2. De *Ralstonia eutropha* H16, amplificar la secuencia *phaCA* con sus respectivos RBS, de acuerdo con Hiroe y colaboradores [17]. De su estudio se tomaron las secuencias complementarias del primer *Forward* para el gen *phaC* y *Reverse* para el gen *phaA* y se adicionaron los sitios de restricción *XbaI* y *EcoRI*, respectivamente: Fwd RBSphaCA y Rev RBSphaCA (Tabla 8).
3. Digerir ambos productos de PCR con la enzima de restricción *XbaI* y realizar ligación con la enzima Ligasa T4, para obtener el fragmento paldA-phaBCA de aproximadamente 4000 bp, en el que cada gen del operón tiene un RBS.
4. Digerir el producto de ligación y el plásmido pET-21a(+) con la enzima de restricción *EcoRI*.
5. Realizar ligación con la enzima Ligasa T4 del plásmido pET-21a(+) digerido con el fragmento PaldA-phaBCA para formar el vector pET-21a(+)PHB*.

A partir de este nuevo plásmido se deberían seguir todos los pasos, como está descrito en la metodología.

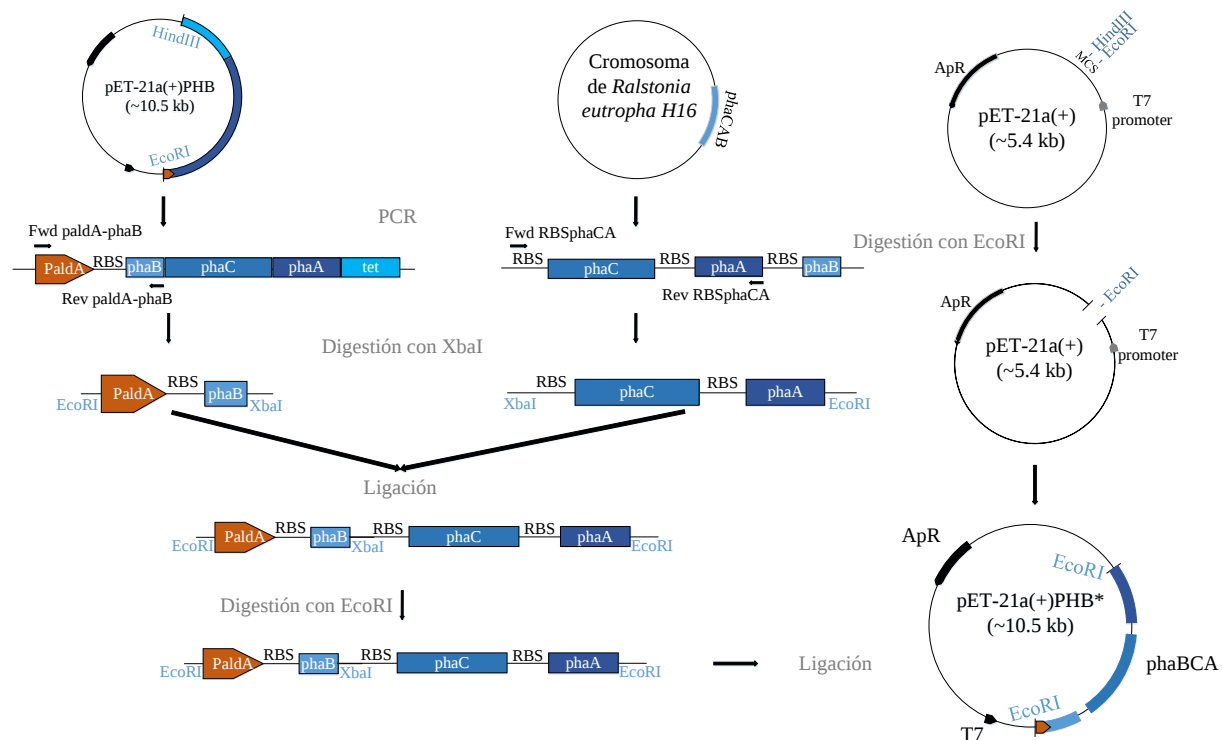


Figura 5. Esquema de la modificación al diseño del fragmento propuesta para aumentar la eficiencia en la expresión y consecuente producción de PHB por parte de la cepa recombinante.