

Universidad ORT Uruguay

Facultad de Ingeniería

Producción de ácido glicérico por
Gluconobacter frateurii
NBRC103465

Entregado como requisito para la obtención del título Licenciado
en Biotecnología

Nicolás Soriano – 222430

Tutoras: Magdalena Ripoll y Ana Paula Mulet

2022

Declaración de autoría

Yo, Nicolás Soriano, declaro que el trabajo que se presenta en esta obra es de mi propia mano.

Podemos asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realice el Trabajo final de carrera;
- Cuando he consultado el trabajo publicado por otros, lo he atribuido con claridad;
- Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente mía;
- En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente, he explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por mí;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Nicolás Soriano

10 de Marzo de 2022

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a mis tutoras, MSc. Magdalena Ripoll y Dra. Ana Paula Mulet, por el apoyo brindado y la buena disposición durante el proyecto.

A la Dra. Lorena Betancor, por haberme presentado la idea y darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo.

A todas las personas del Laboratorio de Biotecnología ORT y el Centro Biotecnológico de Investigación e Innovación, en especial al MSc. Carlos Sanguinetti, por su amabilidad incondicional y excelente disposición frente a cualquier adversidad.

A mis compañeros de trabajo, que siempre me ayudaron para que pueda dedicarle el máximo posible a este proyecto. En especial a Tomás Rodríguez que, sin su paciencia y buena disposición, no hubiera logrado permanecer en ambos lugares.

A mis padres, familia y amigos, que siempre me mantuvieron con ánimo con mucha paciencia y apoyo incondicional.

Resumen

El continuo aumento de la demanda energética a nivel mundial impulsa a la necesidad de reemplazar los combustibles de reservas limitadas por alternativas más sostenibles. El biodiesel es un combustible obtenido a partir de fuentes renovables como aceite vegetal, grasa animal, sebo, y aceite de cocina usado. Debido a su alto costo de obtención, es necesario buscar estrategias de optimización de proceso y reducción de costos para lograr extender su uso. El glicerol, su principal subproducto, puede ser oxidado por catalizadores biológicos en compuestos de alto valor. A través de la producción y comercialización de estos compuestos es posible mejorar la ecuación económica de la industria del biodiesel. Bacterias del género *Gluconobacter* tienen la capacidad de sintetizar ácido glicérico (GA) y dihidroxiacetona (DHA) a partir del glicerol, compuestos químicos de interés para la industria de cosméticos y farmacéutica.

En este trabajo se estudió la biotransformación de glicerol utilizando células en reposo de *Gluconobacter frateurii*, una cepa productora de GA y DHA. El foco principal del trabajo fue en este primer compuesto, debido a su alto valor de mercado y promisoria aplicación. Se buscó optimizar el crecimiento de la bacteria para la generación de inóculos para las reacciones de conversión, reduciendo costos y mejorando la productividad de GA. Con este objetivo, se llevó a cabo una optimización de parámetros del proceso de crecimiento a distintas escalas, a la vez que se probaron estrategias de modificación genética de la cepa en estudio. Estudios de crecimiento con diferentes concentraciones de glicerol inicial (0-100 g/L) en escala de matraces demostraron que es posible reducir en un 70% la concentración de glicerol utilizada en la generación de inóculos para las reacciones de conversión, en comparación a reportes anteriores. Además, se logró escalar exitosamente el crecimiento en un fermentador con 2 litros de medio de cultivo con 30 g/L de glicerol, pudiendo así alcanzar valores de DO_{600nm} mayores a los obtenidos a escala de matraces. La utilización de estas células en reposo libres para ensayos de conversión de glicerol resultó en una producción de GA de $17,3 \pm 1,8$ g/L, valor 1,8 veces mayor al obtenido con células crecidas en las mismas condiciones a escala de matraces. La producción de DHA no presentó diferencias entre las diferentes condiciones de crecimiento.

Asimismo, se estudiaron herramientas genéticas para la sobreexpresión de la subunidad III de mADH (*adhS*), enzima involucrada en la producción de GA. Se logró obtener una cepa recombinante de *Gluconobacter frateurii* NBRC103465 capaz de crecer en kanamicina, con el plásmido de expresión pBBR-*adhS* de la cual no existen precedentes. Además, se generó un diseño para la inserción de un promotor fuerte en la región genómica de *adhS* utilizando tecnología CRISPR. Este diseño permitirá realizar *knock-ins* por medio de la tecnología CRISPR por primera vez en bacterias del género *Gluconobacter*.

Palabras clave

Ácido glicérico, biotransformaciones, dihidroxiacetona, glicerol, *Gluconobacter*, células en reposo.

Abreviaturas

DHA: Dihidroxiacetona

DO: Densidad óptica

GA: Ácido glicérico

PQQ: Pirroloquinolina quinona

HPLC: Por sus siglas en inglés, *High Performance Liquid Chromatography*

bp: Pares de bases

kb: kilo bases

PCR: Por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*

PVP: Polivinilpirrolidona

rpm: Revoluciones por minuto

RBS: Por sus siglas en inglés, *Ribosome Binding Site*

T_m: Temperatura de *melting*

MPM: Marcador de peso molecular

mADH: Alcohol Deshidrogenasa unida a la membrana

AdhA: Subunidad I de la enzima alcohol deshidrogenasa unida a la membrana

AdhB: Subunidad II de la enzima alcohol deshidrogenasa unida a la membrana

adhS: Subunidad III de la enzima alcohol deshidrogenasa unida a la membrana

GDH: Glicerol Deshidrogenasa

ALDH: Aldehído Deshidrogenasa

CRISPR: Por sus siglas en inglés, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

Cas9: Por sus siglas en inglés, *CRISPR associated protein-9*

Wt: Por sus siglas en inglés, *wild type*

Índice

1.	Introducción.....	11
1.1.	Glicerol como subproducto de la industria del biodiesel.....	11
1.2.	Biotransformaciones de glicerol	13
1.3.	Bacterias del género <i>Gluconobacter</i>	14
1.4.	Mejoras en la producción de GA por <i>G. frateurii</i>	16
2.	Objetivos.....	20
3.1.	Objetivo general.....	20
3.2.	Objetivos específicos	20
3.	Metodología.....	21
4.1.	Materiales.....	21
4.1.1.	Material biológico	21
4.1.2.	Reactivos generales	21
4.2.	Métodos	22
4.2.1.	Análisis de crecimiento bacteriano en escala de matraces	22
4.2.2.	Análisis de crecimiento bacteriano en fermentador	22
4.2.3.	Preparación de pellets bacterianos para conversión	23
4.2.4.	Conversión de glicerol a GA por células en reposo	24
4.2.5.	Cuantificación por HPLC	24
4.2.6.	Modelado de la curva de crecimiento bacteriano	24
4.2.7.	Análisis y amplificación de la secuencia del gen <i>adhS</i>	25
4.2.8.	Construcción del vector pBBR- <i>adhS</i>	25
4.2.9.	Transformación de <i>Gluconobacter frateurii</i>	27
4.2.10.	Diseño de construcciones para modificación génica de <i>G. frateurii</i>	28

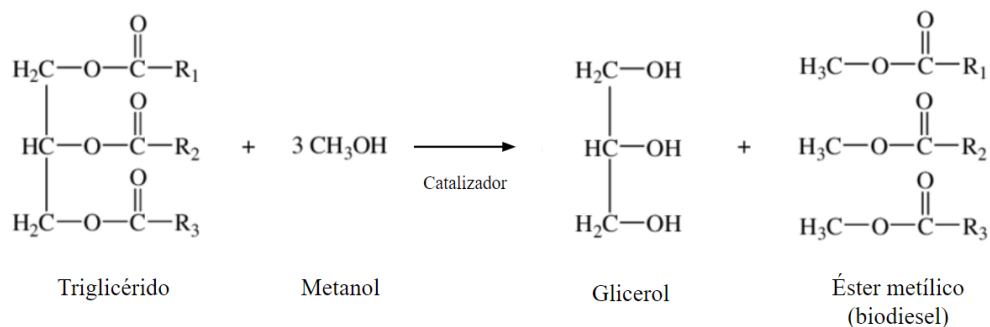
5.	Resultados y discusión	29
5.1.	Mejora del proceso de producción de inóculos	29
5.1.1.	Estudios de crecimiento en matraces.....	30
5.1.2.	Conversiones de glicerol con células en reposo crecidas en matraces	32
5.1.3.	Escalado del crecimiento de inóculos.....	34
5.1.4.	Conversiones de glicerol con células en reposo crecidas en fermentador	35
5.2.	Modificación genética.....	36
5.2.1.	Amplificación del gen adhS	37
5.2.2.	Construcción del vector pBBR-adhS.....	38
5.2.3.	Transformación de <i>G. frateurii</i>	40
5.2.4.	Diseño de construcciones para modificación génica de <i>G. frateurii</i>	42
4.	Conclusiones.....	47
5.	Referencias bibliográficas	49
6.	Anexos	57

Producción de ácido glicérico por *Gluconobacter frateurii* NBRC103465

1. Introducción

1.1. Glicerol como subproducto de la industria del biodiesel

La demanda energética a nivel mundial ha estado en constante crecimiento. Según un reporte de la Administración de Información de Energía de EEUU (EIA), se estima un aumento del 28% de consumo energético entre 2015 y 2040 (1). Actualmente los recursos dominantes para la producción de energía son el petróleo, el carbón, y el gas. Sin embargo, la reserva limitada de estos combustibles impulsa a la necesidad de reemplazarlos por alternativas más sostenibles. Además, estas energías renovables tienen ventajas ambientales como la reducción de gases de efecto invernadero y contaminación. Entre estas alternativas, se destaca el biodiesel. El mismo se puede producir a partir de aceite vegetal puro, grasa animal, sebo, aceite vegetal no comestible y aceite de cocina usado (2). El biodiesel es generado mediante una reacción de transesterificación donde las grasas y los aceites (triglicéridos) reaccionan con un alcohol como el metanol, en presencia de un catalizador, para producir ésteres metílicos de ácidos grasos y glicerol como subproducto (Esquema 1) (3). En comparación con el diésel convencional (gasoil), se tiene una menor producción de monóxido de carbono, humo, y ausencia de sulfuros, con una combustión completa y menor emisión.



Esquema 1. Reacción de transesterificación de un triglicérido, obteniendo biodiesel (ésteres metílicos) y glicerol como productos.

Existe una variedad de leyes y normativas para incentivar el uso de bicomcombustibles a nivel mundial (4). En particular, en Uruguay existe una normativa que fomenta y regula la producción, la comercialización y la utilización del biodiesel, la cual enuncia que se debe mezclar un mínimo de 5% de biodiesel en el gasoil (5). Sin embargo, cabe destacar que uno de los mayores desafíos asociados a la producción de biodiesel es su elevado costo (2). Es por esta razón que la mezcla del mismo con el gasoil resulta indefectiblemente en una suba de precio del combustible. Actualmente se está analizando la posibilidad de dejar de adicionar biodiesel al gasoil con el objetivo de lograr una reducción de precios (6). No obstante, esta decisión puede tener repercusiones en los compromisos ambientales internacionales asumidos por el país. Por esta razón, es de especial interés encontrar alternativas que permitan mitigar los elevados costos de producción de biodiesel.

Un medio para esto es la revalorización de su principal subproducto, el glicerol, del cual se produce aproximadamente 1 tonelada por cada 10 toneladas de biodiesel (7). También conocido como glicerina o propano-1,2,3-triol, el glicerol es un alcohol que presenta múltiples usos en las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria (8). En su forma pura, este líquido transparente, incoloro, inodoro, higroscópico, viscoso y de sabor dulce presenta además la ventaja de no ser tóxico para los seres humanos ni el medio ambiente (7). Sin embargo, el glicerol obtenido luego del proceso de transesterificación para la producción de biodiesel se denomina crudo y posee una pureza del 50-55 % ya que contiene restos de sales, metanol, materia grasa y otros contaminantes (7). El glicerol crudo tiene además un alto costo de purificación, por lo que muchas veces es descartado o utilizado como combustible para calderas industriales. Sin embargo, su descarte genera problemas de contaminación, así como también su proceso de combustión, que lleva a la formación de acroleína, un compuesto altamente tóxico (9).

Un camino hacia la revalorización sería la posibilidad de establecer una biorrefinería, definida como una instalación que integra procesos y equipos de transformación de biomasa (o biotransformación) para producir biocombustibles de transporte, energía y productos químicos a partir de la biomasa (10). Este concepto es análogo a la refinería de petróleo actual, que produce múltiples combustibles y productos derivados del petróleo. En este caso concreto supondría, por ejemplo, la integración de la producción de biodiesel con procesos que permitan la obtención de productos de valor agregado a partir de su

principal subproducto, el glicerol crudo. La empresa estatal Alcoholes del Uruguay (ALUR) cuenta con una capacidad de producción biodiesel que alcanza los 83 millones de litros anuales, lo que se traduce en una elevada producción de glicerol crudo. Esto abre las puertas a una interesante oportunidad de explotación de este residuo para la industria. Potencialmente, mediante la comercialización de estos nuevos productos de valor agregado se podría mejorar la economía de la industria del biodiesel, permitiendo precios más competitivos. Una opción para la obtención de productos de valor agregado a partir de glicerol es a través de su biotransformación.

1.2. Biotransformaciones de glicerol

Las biotransformaciones son procesos de catálisis biológica que utilizan microorganismos enteros o enzimas aisladas (11). En comparación a las reacciones químicas tradicionales, las enzimas son catalizadores “verdes” porque se obtienen de recursos renovables y generalmente son activas en condiciones suaves de temperatura, pH y presión (12). Las enzimas son altamente selectivas, logrando diferenciar entre distintos grupos químicos, posiciones dentro de la molécula, y entre enantiómeros. Además, son altamente eficientes, logrando aumentar las velocidades de reacción hasta 10^8 veces (13). En condiciones *in vitro*, las enzimas pueden catalizar reacciones en circunstancias incluso no aptas para crecimiento celular, lo cual es ventajoso para evitar la ocurrencia de reacciones secundarias que pueden resultar en contaminantes del producto final (12). Sin embargo, el proceso de aislamiento y purificación de una enzima puede ser trabajoso y de alto costo. Además, presentan baja estabilidad fuera de las condiciones óptimas de trabajo y pueden requerir del agregado de cofactores (13).

Por su parte, el uso de microorganismos como catalizadores, presenta la ventaja de proveer el entorno natural de la enzima, mejorando su estabilidad y, en caso de que sea necesario, proporcionando cofactores y regenerándolos eficientemente (12). A su vez, dentro de un microorganismo conviven varias enzimas de una misma vía metabólica, responsables de la transformación de un producto en otro. Esto se presenta como una ventaja en el caso de reacciones que requieran múltiples pasos (14). No obstante, el uso de células en crecimiento como catalizadores presenta como principal desventaja la ocurrencia de reacciones secundarias no deseadas, las cuales llevan a una acumulación de

contaminantes en el producto final (12). El uso de células en reposo puede ser una buena alternativa para evitar estas reacciones. Las células en reposo son microorganismos que no se encuentran en crecimiento, pero son metabólicamente activos. Para obtenerlos, se dejan crecer hasta llegar a una cantidad de biomasa suficiente y, generalmente, se los lava con un buffer para eliminar restos de sustratos y nutrientes no consumidos, así como los metabolitos asociados al crecimiento no deseados. Esto permite una mejor recuperación del producto y facilidad en el procesamiento *downstream*, lo que permite reducir significativamente los costos del proceso asociados a la etapa de purificación (14). Además, las células en reposo pueden tener altos rendimientos de productos en fuentes de carbono, ya que no se utilizan para la producción de biomasa.

Existen varios ejemplos de biotransformaciones de glicerol utilizando microorganismos para obtener una serie de productos con valor agregado (Tabla 1).

Tabla 1. Ejemplos de revalorización del glicerol utilizando microorganismos.

Producto	Microorganismo	Referencia
1,3-propanodiol	Bacterias del género <i>Klebsiella</i> y <i>Clostridium</i>	(15)
Ácido cítrico	<i>Yarrowia lipolytica</i>	(16)
Hidrógeno gas	<i>Rhodospseudomonas palustris</i>	(17)
Biopolímeros	<i>Paracoccus denitrificans</i> y <i>Cupriavidus necator</i>	(18)
Ácido succínico	<i>Basfia succiniciproducens</i>	(19)
Butanol	<i>Clostridium pasteurianum</i>	(20)
DHA	<i>Gluconobacter oxydans</i>	(21)
GA	<i>Gluconobacter frateurii</i>	(22)

En particular se destacan las bacterias del género *Gluconobacter*, las cuales son ampliamente utilizadas en la actualidad para la producción de dihidroxiacetona (DHA) y, más recientemente, para la de ácido glicérico (GA) (22).

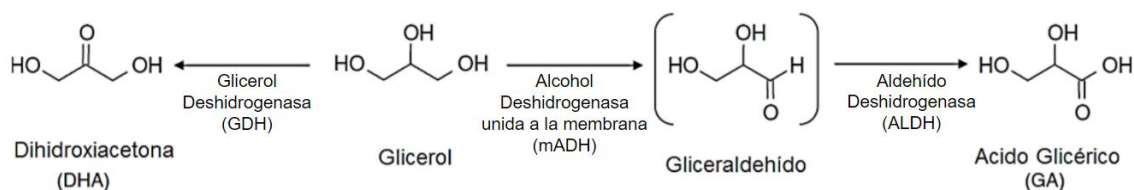
1.3. Bacterias del género *Gluconobacter*

El género *Gluconobacter* es de alto interés biotecnológico debido a su capacidad de producir metabolitos parcialmente oxidados al medio a partir de sustratos como D-

sorbitol, glicerol, D-fructosa y D-glucosa (23). Las especies de este género son bacterias Gram negativas con forma de bastones que pertenecen a la familia *Acetobacteraceae*. Son aerobias estrictas, su condición óptima de crecimiento es 25 – 30 °C y pH 5,5 – 6,0. No presentan ningún efecto patógeno para el humano y otros animales. Sin embargo, son capaces de causar pudrición en manzanas y peras demostrando varios tonos de pardeamiento (21).

Se destacan por el gran número de alcohol y aldehído deshidrogenasas de membrana que poseen, permitiendo la oxidación incompleta de carbohidratos y alcoholes a aldehídos, cetonas y ácidos orgánicos. A su vez, los productos de oxidación son secretados casi completamente al medio (24). Muchas de estas deshidrogenasas de membrana han sido reportadas y caracterizadas, siendo las más notables las deshidrogenasas de glucosa, fructosa, sorbitol y glicerol, que contienen el grupo prostético pirroloquinolina quinona (PQQ) (25). Están unidas a la cadena respiratoria, que transfiere electrones a través de la ubiquinona. Así, los equivalentes reductores derivados de los procesos oxidativos son finalmente transferidos al oxígeno (26).

Entre estas bacterias se destaca *Gluconobacter oxydans*, por ser utilizada ampliamente en la industria para la producción de dihidroxiacetona (DHA) a partir de glicerol con células en crecimiento, un proceso patentado que otorga altos rendimientos (27). La DHA es un compuesto químico generalmente utilizado como agente autobronceante, ya que en contacto con la piel cambia su color a una tonalidad marrón al reaccionar con la queratina produciendo un pigmento llamado melanoidina (28). Si bien se utiliza principalmente como un cosmético, también se puede utilizar como tratamiento para enfermedades como la leucoderma (29). Por otro lado, se ha demostrado que la cepa *Gluconobacter frateurii* NBRC 103465 es capaz de producir ácido glicérico (GA) con altos rendimientos, además de DHA (22). La obtención de estos compuestos es llevada a cabo por dos enzimas, la enzima glicerol deshidrogenasa (GDH), responsable de la producción de DHA a partir de glicerol y la enzima alcohol deshidrogenasa unida a la membrana (mADH), involucrada en la producción de GA (Esquema 2) (30).



Esquema 2. Vía para la conversión de glicerol en ácido glicérico o en dihidroxiacetona por bacterias del género *Gluconobacter*. Adaptado del esquema de Habe y colaboradores (22).

El GA tiene un peso molecular de 106,08 g/mol, posee un pKa 3,55, y es soluble en agua. Se encuentra naturalmente como un fitoquímico en una variedad de plantas como el maní, alcachofa, tomate, manzana, plátano, uva, aunque se desconocen las composiciones enantioméricas y concentraciones. También se encuentra presente en el cuerpo humano como metabolito y sus derivados de fosfato son intermediarios importantes en la vía glucolítica (32). Se ha reportado que tiene actividad estimulante hepática y colessterolítica en perros (33). También acelera la eliminación de etanol y oxidación de acetaldehído en ratas (34). Los ésteres basados en GA también exhiben actividad antitripsina (35), y los nuevos oligoésteres basados en derivados de GA pueden ser útiles para fines farmacéuticos, como los sistemas de administración de fármacos (36). Estos reportes sugieren que el GA es un químico prometedor. Sin embargo, hoy en día resulta un reactivo de costo elevado para su uso en investigación (22). Es por esta razón que resulta de especial interés encontrar alternativas económicas y que otorguen buenos rendimientos para la obtención de este producto.

1.4. Mejoras en la producción de GA por *G. frateurii*

Actualmente existen escasos reportes en la literatura enfocados en la producción de GA. Entre ellos se destaca un estudio realizado por Habe y colaboradores, en el cual se logró obtener 136,5 g/L de GA a partir de 170 g/L de glicerol con *G. frateurii* (22). Este reporte constituye la concentración más elevada de GA alcanzada a la fecha, obtenida mediante biotransformación. Sin embargo, cabe destacar que dicha biotransformación se llevó a cabo con bacterias en crecimiento. Como se mencionó anteriormente, el uso de bacterias en crecimiento presenta desventajas a la hora de la purificación del producto, elevando sus costos de producción y, en consecuencia, su precio en el mercado. Por tanto, continúa siendo necesario explorar opciones que simplifiquen el procesamiento *downstream* del

producto. El uso de células en reposo para la producción de GA se presenta como una alternativa factible para disminuir los pasos de procesamiento *downstream*. Sin embargo, al día de hoy esta estrategia presenta escasos reportes en la literatura (37), con producciones discretas de poca significancia industrial. Es por esta razón que resulta de interés encontrar estrategias para mejorar la productividad de GA con este tipo de catalizadores.

Una de las vías para mejorar la productividad de las células en reposo es mediante la optimización de diferentes parámetros del proceso de biotransformación. Parámetros como la concentración de sustrato inicial, pH, temperatura, aireación o volumen de trabajo pueden influir en la generación de producto y han sido estudiados en reportes anteriores (37). Sin embargo, no existen hasta el momento estudios que se enfoquen en abaratar y optimizar el crecimiento de células de *G. frateurii* para su posterior uso como células en reposo. La optimización de los componentes utilizados durante el crecimiento de las bacterias y la escala a la que se lleva a cabo, pueden impactar directamente en los costos del proceso productivo. Esto da lugar a oportunidades para investigación y mejora.

Otra de las vías que es frecuentemente elegida para el aumento de la generación de producto, es la sobreexpresión de enzimas. Estudios reportados por Zhang y colaboradores mostraron que la sobreexpresión de la subunidad III de mADH (*adhS*) incrementó la producción de GA 7,6 veces en una cepa de *Gluconobacter oxydans* (38). Como se mencionó anteriormente, la mADH es una enzima involucrada en la producción de GA.

Actualmente hay disponible una gran variedad de herramientas moleculares para crear construcciones específicas para la expresión de proteínas en una amplia gama de organismos. Gracias a estas tecnologías y protocolos, la expresión homóloga y heteróloga de genes únicos o incluso de operones completos son métodos confiables para la sobreexpresión génica (39). Además, esta metodología ha sido ampliamente utilizada para la modificación genética de bacterias del género *Gluconobacter* (40)–(42), lo que genera precedentes y facilita su estudio.

Sin embargo, el uso de plásmidos como método de transformación tiene sus desventajas, por ejemplo, la necesidad de utilizar antibióticos para evitar la pérdida de este vector de

expresión. Esto se puede solucionar aplicando técnicas de modificación en el genoma de la bacteria, lo que resulta en una cepa mutante a nivel genómico. Una estrategia para lograr la modificación genómica es el uso de endonucleasas específicas de sitio y reparación específica de sitio. Una de las tecnologías más utilizadas actualmente es el sistema de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR). El sistema CRISPR y la proteína 9 asociada a CRISPR (Cas9) son utilizados ampliamente como herramienta de edición genética en plantas, animales y procariontas (43)–(45). Este sistema se basa en la actividad endonucleasa Cas9, la cual causa una ruptura en ADN en una secuencia específica guiada por el ARN guía (ARNsg). Hasta el momento, existe únicamente un reporte en la literatura de utilización del sistema CRISPR en bacterias del género *Gluconobacter*, en el cual se aplica como sistema de represión de genes (46). Por su parte, la utilización de CRISPR en *Gluconobacter frateurii* no tiene precedentes y su aplicación representa una línea interesante de investigación.

Como fue mencionado previamente, el GA es un compuesto químico promisorio, pero de elevado costo, lo que resulta una limitante para su uso en investigación. El mismo puede ser obtenido a partir de glicerol por síntesis química o a través de biotransformaciones. De esta forma, su producción constituye una alternativa interesante para la valorización del glicerol, subproducto de la industria del biodiesel, impulsando el concepto de biorrefinería.

La síntesis química del GA involucra la oxidación catalítica con metales de los grupos hidroxilo primarios del glicerol (48). Se han reportado ensayos de síntesis química por paladio (Pd) como catalizador obteniendo concentraciones de ácido glicérico de hasta 70 g/L (49), y de hasta 100% de conversión utilizando un catalizador heterogéneo con oro (Au) (50). Aun así, la síntesis química es un proceso no favorable para el medio ambiente, produciéndose altas concentraciones de ácidos minerales como subproductos (48). Además, el elevado costo de los catalizadores metálicos utilizados impacta fuertemente en el precio final del GA.

Por su parte, la producción de GA utilizando bacterias de la especie *G. frateurii* NBRC103465 en reposo resulta prometedora, ya que constituye una opción de producción de GA más limpia, con menores costos asociados al procesamiento *downstream* del producto. La obtención más económica de inóculos para las reacciones

de conversión y el aumento de la producción de GA por parte de la bacteria, que hoy en día se presentan como cuellos de botella para la aplicación de esta tecnología, son el foco de este trabajo de Tesis.

2. Objetivos

3.1. Objetivo general

Optimizar el proceso de crecimiento de *Gluconobacter frateurii* NBRC 103465 y mejorar su producción de ácido glicérico.

3.2. Objetivos específicos

- Reducir la concentración de glicerol utilizada en el proceso de crecimiento de *Gluconobacter frateurii* NBRC 103465.
- Escalar el crecimiento de *Gluconobacter frateurii* NBRC 103465 en un fermentador de escala laboratorio.
- Generar herramientas de modificación genética para la sobreexpresión de la subunidad III de la enzima mADH de *Gluconobacter frateurii* NBRC 103465.

3. Metodología

4.1. Materiales

4.1.1. Material biológico

Las ampollas conteniendo la cepa liofilizada de *Gluconobacter frateurii* NBRC 103465 (en adelante referida como *G. frateurii*) fueron obtenidas del *National Institute of Techlonogy and Evaluation* (NITE) (Tokio, Japón). La cepa de *Escherichia coli* DH5 α (en adelante referida como *E. coli* DH5 α) fue obtenida de *New England Biolabs* (Massachusetts, EEUU). El plásmido pBBR1MCS-2 fue cedido por Kenneth Peterson (*Addgene plasmid #85168*; <http://n2t.net/addgene:85168>; *RRID:Addgene_85168*).

4.1.2. Reactivos generales

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. La D-Glucosa, KH_2O_4 , NaH_2PO_4 , y glicerol fueron obtenidos de *Carlo Erba Reagents* (Val-de-Reuil, Francia). La peptona fue obtenida de *PanReac AppliChem* (Barcelona, España). El extracto de levadura y agar fueron obtenidos de *Oxoid* (Basingstoke, Reino Unido). El $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ fue obtenido de *J.T. Baker* (Pennsylvania, EEUU). Las enzimas de restricción XhoI, HindIII, EcoRI, la fosfatasa Fast AP, la T4 ligasa, el buffer R 10X, *GeneRuler Ladder Mix #SM0331* fueron obtenidos de Thermo Scientific (Massachusetts, EEUU). La Taq polimerasa, la polimerasa *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase*, y los dNTPs fueron obtenidos de New England Biolabs (Massachusetts, EEUU). La sal de ácido D-Glicérico fue obtenida de Sigma Aldrich (Missouri, EEUU). La dihidroxiacetona fue obtenida de Merck (Darmstadt, Alemania). La columna de HPLC Aminex HPX-87C 300 x 7.8 mm se obtuvo de Bio-Rad (California, EEUU). La pre columna para cartuchos Carbo-H 4 x 3.0 mm se obtuvo de Phenomenex (California, EEUU).

4.2. Métodos

4.2.1. Análisis de crecimiento bacteriano en escala de matraces

Se realizaron precultivos a partir de colonias aisladas de *G. frateurii* inoculando 3 mL de medio de crecimiento con glucosa (peptona 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, D-glucosa 5 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L, pH 6,5) y se incubaron en un agitador orbital a 30 °C y 180 rpm por 24 horas.

Estos precultivos se utilizaron para inocular 250 mL de medio de crecimiento (peptona 9 g/L, extracto de levadura 1 g/L, KH₂O₄ 0,9 g/L, K₂HPO₄ 0,1 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L, glicerol 0-100 g/L, pH 6,0) para una concentración final de 0,003 g/L de células. Los ensayos fueron llevados a cabo en matraces de 1 L durante 68 horas a 30°C y 180 rpm. Se tomaron alícuotas periódicamente para analizar su densidad óptica (DO) a una absorbancia de 600 nm en un espectrofotómetro *Shimadzu UVmini 1240*. La concentración bacteriana se calculó a partir de una curva que correlaciona la DO con el peso seco de *G. frateurii* obtenida previamente por el grupo de investigación (Ecuación 1).

$$X \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{(DO_{600nm} + 0.02309) \cdot FD}{4.893} \quad (1)$$

Esta ecuación relaciona la biomasa (X) en gramos por litro con la densidad óptica (DO_{600nm}) y el factor de dilución (FD). Cada experimento se realizó por duplicado.

4.2.2. Análisis de crecimiento bacteriano en fermentador

Se realizaron precultivos siguiendo los pasos de 4.2.1 para desarrollar la biomasa inicial para el precultivo del fermentador.

Se llevó a cabo un precultivo de 250 mL en medio de crecimiento con glicerol (30 g/L glicerol, peptona 9 g/L, extracto de levadura 1 g/L, KH₂PO₄ 0,9 g/L, K₂HPO₄ 0,1 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L, pH 6,0) en matraz de 1 L y se incubó durante 24 horas 30°C y 180 rpm.

En condiciones asépticas, se centrifugó el precultivo a 5000 rpm, 4 °C, durante 15 min y se inoculó un reactor *Sartorius Biostat A* de 5 L, conteniendo 2 L de medio de crecimiento

con glicerol (30 g/L glicerol, peptona 9 g/L, extracto de levadura 1 g/L, KH_2PO_4 0,9 g/L, K_2HPO_4 0,1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, pH 6,0) para una concentración final de 0,036 g/L de células. La fermentación fue llevada a cabo durante 48 horas en las siguientes condiciones: 30 °C, 400 rpm de velocidad de agitación, con una aireación con bomba externa de 0,01 vvm. Se tomaron alícuotas periódicamente para medir en espectrofotómetro la DO a 600 nm. El experimento se llevó a cabo por duplicado.

4.2.3. Preparación de pellets bacterianos para conversión

Para las conversiones con bacterias crecidas en matraces, se realizaron cultivos de *G. frateurii* en 250 mL de cultivo con medio de crecimiento (peptona 9 g/L, extracto de levadura 1 g/L, KH_2PO_4 0,9 g/L, K_2HPO_4 0,1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, pH 6,0) con el agregado de 10, 30, y 100 g/L de glicerol en matraces de 1 L. Los cultivos se dejaron crecer hasta alcanzar una $\text{OD}_{600\text{nm}} = 1,0$. Luego se calculó el volumen correspondiente a 20 mg de peso seco de biomasa de acuerdo a la Ecuación 1 y se centrifugó a 5000 rpm, 4 °C, durante 15 minutos. El *pellet* bacteriano se lavó con una solución buffer de fosfato de sodio/potasio 30 mM (NaH_2PO_4 4,14 g/L, K_2HPO_4 5,23 g/L, pH 7,0), para eliminar el remanente de medio de cultivo de crecimiento. A continuación, se volvió a centrifugar a 5000 rpm, 4 °C, durante 15 minutos, y se descartó el sobrenadante. Los pellets bacterianos fueron almacenados a -20 °C hasta su uso.

Para las conversiones con bacterias crecidas en el fermentador, se realizaron los mismos pasos de generación de inóculo que en el punto 4.2.2. Luego, se inoculó un reactor *Sartorius Biostat A* de 5 L, conteniendo 2 L de medio de crecimiento con glicerol (30 g/L glicerol, peptona 9 g/L, extracto de levadura 1 g/L, KH_2PO_4 0,9 g/L, K_2HPO_4 0,1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, pH 6,0). Las células se dejaron crecer a 30 °C 400 rpm hasta alcanzar una $\text{OD}_{600\text{nm}} = 1,5$. Luego se centrifugó el volumen correspondiente a 20 mg de peso seco de biomasa a 5000 rpm, 4 °C, durante 15 minutos. El *pellet* bacteriano se lavó con una solución buffer de fosfato de sodio/potasio 30 mM (NaH_2PO_4 4,14 g/L, K_2HPO_4 5,23 g/L, pH 7,0), para eliminar el remanente de medio de cultivo de crecimiento. A continuación, se volvió a centrifugar a 5000 rpm, 4 °C, durante 15 minutos, y se descartó el sobrenadante.

4.2.4. Conversión de glicerol a GA por células en reposo

Partiendo de los pellets bacterianos obtenidos en 4.2.3, se realizaron conversiones de glicerol en matraces de 250 mL conteniendo 30 mL de medio de conversión (glicerol 200 g/L). Los matraces se incubaron a 30 °C, 180 rpm durante 78 horas. Se tomaron alícuotas de 0,5 mL periódicamente para su posterior análisis por HPLC. Todas las conversiones se llevaron a cabo por duplicado.

4.2.5. Cuantificación por HPLC

Se prepararon las muestras realizando una centrifugación a 15000 rpm por 5 minutos, y se filtraron con filtro de 0,22 µm previamente inertizado con polivinilpirrolidona (PVP) al 2%. Las muestras fueron analizadas por el equipo *Shimadzu Nexera X2* (Kioto, Japón) para determinar la concentración de glicerol, GA, y DHA. Se utilizó la columna *Aminex® HPX-87C* 300 x 7.8 mm, con una pre columna con cartuchos *SecurityGuard™* 4 x 3.0 mm para columnas *Carbo-H* con un detector de arreglo de diodos. Se utilizó H₂SO₄ 5 mM como fase móvil. La detección se llevó a cabo a 70°C a 210 nm para el GA, 271 nm para la DHA y 190 nm para el glicerol, con un flujo de 0,6 mL/min durante 19 minutos. Los tiempos retención esperados fueron: 13,7 minutos para el GA, 16,7 minutos para la DHA, y 14,7 minutos para el glicerol (Figura A 2). Se realizaron curvas de calibración para los compuestos a analizar. Finalmente, el análisis fue llevado a cabo con el software *LabSolutions® Shimadzu*.

4.2.6. Modelado de la curva de crecimiento bacteriano

Se realizó un ajuste no lineal con el programa *GraphPad Prism* 8.0.1 ajustando los valores de DO siguiendo el modelo de Gompertz (Ecuación 2).

$$Y = Ym * \left(\frac{Y_0}{Ym}\right)^{\exp(-k * X)} \quad (2)$$

Donde Y corresponde a los valores de DO_{600nm}, X al tiempo, Y₀ a la DO_{600nm} inicial, Y_M es la DO_{600nm} máxima. El valor de k queda determinado por la duración de la fase de latencia (punto de inflexión).

4.2.7. Análisis y amplificación de la secuencia del gen adhS

Se realizó una búsqueda del gen adhS en *Ensembl Bacteria* (47) por nombre comparando con el gen reportado por Zhang y colaboradores. (38)

Se diseñaron dos pares de *primers* específicos del gen adhS para *G. frateurii*. Uno de los pares de *primers* para amplificar únicamente el gen (adhS) y otro para amplificar el gen con un sitio de unión al ribosoma (adhS-RBS). Luego se realizó un PCR con la enzima polimerasa de alta fidelidad *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs), a partir de ADN genómico purificado de *G. frateurii*. Las condiciones de ciclado se detallan en la Tabla 2. Los productos de la PCR fueron analizados en una electroforesis en gel de agarosa 1%.

Tabla 2. Condiciones del ciclado para la PCR para amplificar el gen adhS.

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	1 minuto	1
Desnaturalización	95 °C	30 segundos	40
<i>Annealing</i>	64°C	30 segundos	
Extensión	68 °C	30 segundos	
Extensión final	68 °C	10 minutos	1

4.2.8. Construcción del vector pBBR-adhS

A partir de colonias aisladas de *E. coli* DH5 α conteniendo el plásmido pBBR1MCS-2 se realizaron precultivos en 5 mL de medio Luria Bertani (LB) con kanamicina (50 μ g/mL), que fueron incubados a 37 °C, 240 rpm, durante 16 horas. Los precultivos fueron centrifugados y, a partir de los *pellets* bacterianos, se aisló el plásmido con el kit *ZR Plasmid Miniprep – Classic* (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo una digestión de 2 μ g del plásmido durante 2 horas a 37 °C con las enzimas de restricción HindIII (Thermo Scientific) y XhoI (Thermo Scientific), además se agregó la fosfatasa *FastAP* (Thermo Scientific) para desfosforilar los extremos y evitar la recircularización del plásmido. Luego el plásmido linealizado fue corrido en un gel de agarosa 0,8% y purificado con el kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). A continuación, se realizaron ligaciones del plásmido con los insertos adhS y adhS-RBS. Las ligaciones se realizaron con 100 ng de plásmido y una relación 3:1

plásmido-inserto utilizando la ligasa *T4 DNA Ligase* (Thermo Scientific). Se incubaron a temperatura ambiente por 1 hora y luego a 4 °C durante 16 horas.

A continuación, se descongelaron alícuotas de *E. coli* DH5 α electrocompetentes en hielo. Se mezclaron las células con 5 μ L de ADN. Seguido, se transfirió la mezcla a una cubeta de electroporación fría de 1 mm de ancho y se realizó el pulso Ec1 (1,8 kV) en el electroporador *MicroPulser* (Bio Rad). Inmediatamente, se agregó 1 mL de medio LB y se recuperaron las células a 37 °C durante 1 hora con agitación. Las células transformadas fueron cultivadas en medio LB agar suplementado con kanamicina 50 μ g/mL y se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

Para determinar que colonias contienen el plásmido con el inserto deseado, se realizó una PCR a partir de colonia. Las condiciones de ciclado están detalladas en la Tabla 3. Se utilizaron los *primers* de la amplificación de *adhS* y *adhS-RBS* (Tabla 4), la ADN polimerasa *Taq DNA Polymerase*, y las colonias como ADN molde. Los productos de la PCR fueron analizados en una electroforesis en gel de agarosa 1%.

Para confirmar la presencia del inserto en la construcción de las colonias positivas, se llevó a cabo un ensayo con enzimas de restricción. Se realizaron precultivos en 5 mL de medio LB con kanamicina (50 μ g/mL), fueron incubados a 37 °C, 240 rpm, durante 16 horas. Los precultivos fueron centrifugados y, a partir de los *pellets* bacterianos, se aisló el plásmido con el kit *ZR Plasmid Miniprep – Classic*. Se llevaron a cabo digestiones dobles con los pares de enzimas EcoRI y XhoI; HindIII y XhoI; y digestiones simples con EcoRI, XhoI, y HindIII. Las digestiones fueron llevadas a cabo en *Buffer R* (Thermo Scientific) durante 2 horas a 37 °C. Los productos de la digestión fueron analizados en una electroforesis en gel de agarosa 1%. Además, se realizó una secuenciación por Sanger para verificar la integridad del plásmido, seguido de un alineamiento realizado en BLAST de NCBI.

Tabla 3. Condiciones del ciclado para la PCR a partir de colonias bacterianas.

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Ruptura celular y Desnaturalización del ADN	95 °C	1 minuto	1

Desnaturalización	95 °C	30 segundos	40
<i>Annealing</i>	60 °C	30 segundos	
Extensión	68 °C	30 segundos	
Extensión final	68 °C	5 minutos	1

4.2.9. Transformación de *Gluconobacter frateurii*

Para la obtención de células electrocompetentes de *G. frateurii*, se realizó una adaptación del protocolo de Mostafa y colaboradores (70). Se realizaron cultivos a partir de colonias aisladas de *G. frateurii* inoculando 3 mL de medio de crecimiento con glucosa (peptona 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, D-glucosa 5 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L, pH 6,5) y se incubaron en un agitador orbital a 30 °C, 180 rpm por 24 horas. Luego, estos cultivos fueron diluidos 1:10 en un volumen de 25 mL de medio de crecimiento con glucosa para ser incubados hasta alcanzar una DO_{600nm} = 0,5 - 0,8. Inmediatamente, fueron transferidos a tubos de centrífuga y se incubaron en hielo por 15 minutos. A continuación, se centrifugaron las células a 2700 g, 4 °C, durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron las células en 10 mL de solución *buffer* HEPES 1 mM pH 7,0 frío y se volvieron a centrifugar a 2700 g, 4 °C, durante 10 minutos; esta etapa de lavado se repitió en las mismas condiciones. Luego, se resuspendieron las células en 5 mL de glicerol 10% frío y fueron centrifugadas nuevamente a 2700 g, 4 °C, durante 10 minutos, y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se resuspendieron las células en 0,5 mL de glicerol 10% frío, y se realizaron alícuotas de 65 µL en tubos de 0,5 mL. Las alícuotas fueron congeladas rápidamente con nitrógeno líquido y fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso.

Se descongelaron alícuotas de *G. frateurii* electrocompetentes en hielo y se mezclaron con 0,5 ng/µL y 5 ng/µL del plásmido pBBR1-adhS. Seguido, se transfirió la mezcla a una cubeta de electroporación fría de 1 mm de ancho y se realizó un pulso de 2,0 kV durante 5 ms en el electroporador. Inmediatamente, se agregó 1 mL de medio de crecimiento con glucosa y se recuperaron las células a 30 °C, 180 rpm, durante 1 hora. Finalmente, las células transformadas fueron cultivadas en medio de crecimiento con glucosa agar suplementado con kanamicina 50 µg/mL durante 72 horas a 23 °C.

4.2.10. Diseño de construcciones para modificación génica de *G. frateurii*

En base a la secuencia del genoma de *G. frateurii* obtenida en *Ensembl Bacteria*, se realizó el diseño de primers para amplificar los brazos de homología, que flanquean un promotor y un RBS que será insertado frente al gen *adhS*.

Se realizó el diseño del ARNsg utilizando la herramienta CRISPOR y se verificó la especificidad con la herramienta Cas-OFFinder de CRISPR RGEN Tools. Los diseños fueron analizados en el programa *SnapGene 6.0.2*.

5. Resultados y discusión

El elevado costo de generación de inóculos de *G. frateurii* para las conversiones y su escaso rendimiento productivo, lleva a la necesidad de realizar una optimización del proceso. Para esto se llevó a cabo una optimización del crecimiento en matraces, seguido de un escalado del crecimiento en un fermentador de laboratorio. Además, se generaron herramientas de modificación genética para la sobreexpresión de la subunidad III de mADH.

Cabe destacar que los ensayos de esta Tesis fueron realizados utilizando glicerol puro. Es de interés repetir estos ensayos utilizando glicerol crudo.

5.1. Mejora del proceso de producción de inóculos

Existen en la literatura una serie de reportes de la utilización de bacterias del género *Gluconobacter* en reposo para la obtención de varios productos a partir de glicerol (37),(51)–(53). El foco de estos reportes es mayoritariamente la optimización de la producción de los compuestos de interés a través de ingeniería del proceso productivo, dejando de lado la optimización del crecimiento de las bacterias, previo a su utilización como catalizadores en reposo. Mayoritariamente, los protocolos de crecimiento de *G. frateurii* reportados resultan de elevado costo debido a la alta concentración de glicerol que contiene el medio utilizado. Teniendo en cuenta que para usar células en reposo las mismas deben ser previamente separadas del medio de crecimiento (Figura 1), se genera un gasto tanto de glicerol como de los productos GA y DHA que se obtienen durante el crecimiento, que resultan descartados. Es por esta razón que resulta de interés estudiar alternativas que supongan la disminución de costos de producción de inóculos, a través de modificaciones en los medios de crecimiento, así como también en los parámetros operativos del proceso de crecimiento.

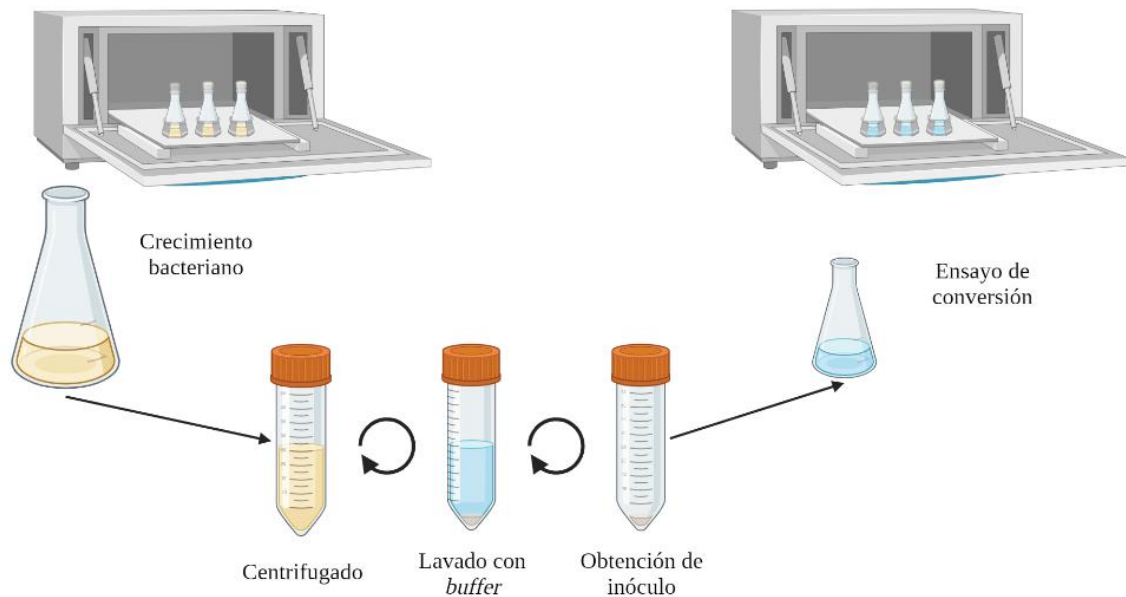


Figura 1. Representación del proceso para la obtención de los inóculos de células en reposo para los ensayos de conversión.

5.1.1. Estudios de crecimiento en matraces

El estudio del crecimiento bacteriano, en general, permite identificar una fase en la que la tasa de crecimiento específica comienza en un valor de cero y luego se acelera a un valor máximo en un cierto período de tiempo, lo que resulta en un tiempo de latencia. Además, las curvas de crecimiento contienen una fase final en la que la tasa decrece y finalmente llega a cero, de modo que se alcanza una asíntota superior. Estos cambios en la tasa de crecimiento dan como resultado una curva sigmoideal, con una fase de latencia justo después del tiempo inicial, seguida de una fase exponencial, y luego de una fase estacionaria (54).

Parámetros como la aireación, la agitación, el pH, la concentración de inóculo bacteriano, o la composición del medio de crecimiento influyen directamente en la forma que adquiere la curva de crecimiento de una determinada bacteria (55). Mediante su modificación es posible, por ejemplo, disminuir la fase de latencia u optimizar el valor de biomasa obtenida, ambos puntos de gran importancia a la hora de trabajar con células en reposo. Estudios previos demostraron la importancia de la fase de crecimiento a la hora de colectar las células en reposo previo a la conversión (37).

Con el objetivo de determinar el comportamiento del crecimiento de *G. frateurii* en relación al glicerol presente en el medio, se realizaron ensayos de crecimiento en matraces con diferentes concentraciones de glicerol (100 g/L, 30 g/L, 10 g/L) y sin glicerol (Figura 2). Este último experimento se llevó a cabo con la finalidad de estudiar la capacidad de *Gluconobacter frateurii* de crecer solamente en presencia de sales, extracto de levadura y peptona, ya que existen reportes previos de otros organismos que pueden utilizar este último componente como fuente de carbono (56), el cual es más económico que el glicerol. El ensayo se llevó a cabo a una temperatura de 30°C, temperatura óptima de esta bacteria (21), y durante 68 horas se tomaron alícuotas periódicamente para determinar la OD_{600nm} en función del tiempo.

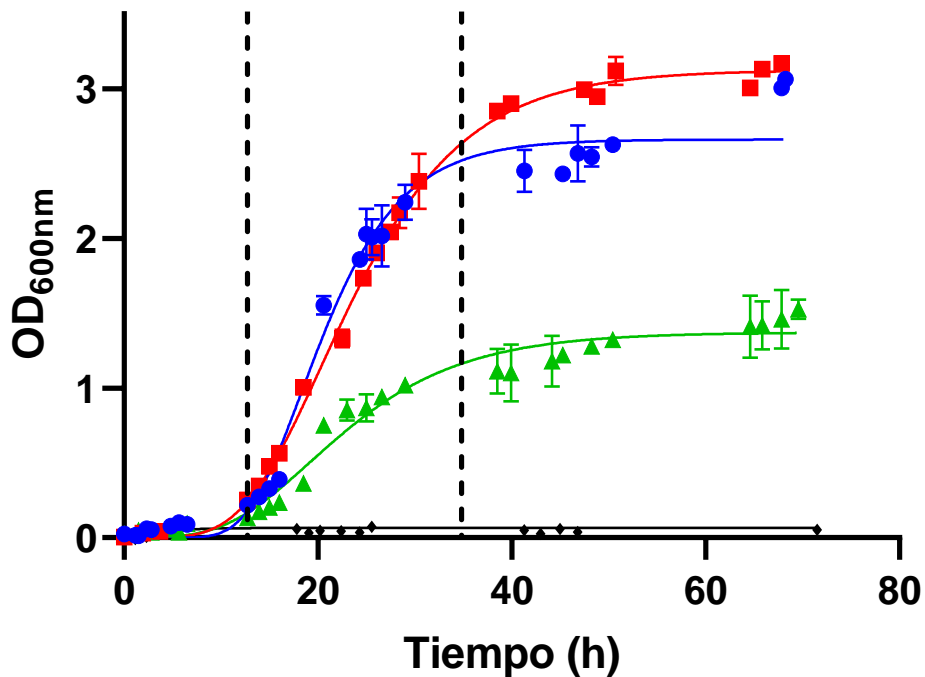


Figura 2. Regresión no lineal del crecimiento de *G. frateurii* durante 68 horas a 30 °C, 180 rpm, a diferentes concentraciones de glicerol: 10 g/L (cuadrados rojos), 30 g/L (círculos azules), 100 g/L (triángulos verdes), sin glicerol (rombos negros). Los cambios de fase señalados con líneas punteadas.

Los datos obtenidos fueron ajustados utilizando el modelo de Gompertz, este modelo es uno de los ajustes sigmoiales más utilizados en varios aspectos de la biología, ya que permite predecir, entre otros, el comportamiento del crecimiento bacteriano (57). De

acuerdo a los resultados obtenidos se pudo determinar que las fases del crecimiento de *G. frateurii* en presencia de distintas concentraciones de glicerol ocurren en tiempos similares. Sin embargo, se observó que en las condiciones de 10 y 30 g/L de glicerol hubo un aumento de generación de biomasa en comparación a 100 g/L, alcanzando valores de 0,652, 0,631, y 0,317 g/L respectivamente. Este fenómeno está asociado a que en altas concentraciones de glicerol se ve afectada la morfología y la división celular inhibiendo el crecimiento de las bacterias del género *Gluconobacter* (58).

Se destaca que en ausencia de glicerol en el medio no hubo crecimiento bacteriano. Se concluye entonces que la presencia de peptona y extracto de levadura en las concentraciones estudiadas no son suficientes para el crecimiento de la bacteria, por lo que resulta necesario que haya otra fuente de carbono presente en el medio, como puede ser la glucosa como alternativa al glicerol. Otra opción para la reducción de costos en el medio de crecimiento puede ser el uso de sales inorgánicas de bajo costo como fuente de nitrógeno o fósforo, como fue reportado por Poljungreed y colaboradores en el cual se identificó un medio óptimo de sales inorgánicas para la producción de DHA con *Gluconobacter frateurii* (59).

En base a estos resultados se pudo determinar los tiempos en los cuales la DO_{600nm} es igual a 1, un valor arbitrario seleccionado para realizar los ensayos de conversión de glicerol con células en reposo libres ya que corresponde en todos los casos a una fase de crecimiento exponencial, la cual probó ser la óptima para ensayos de conversión con células en reposo libres en reportes previos (37). En adelante, se procedió a trabajar solo con las células crecidas en presencia de 10, 30, y 100 g/L de glicerol en los ensayos de conversión, ya que, en ausencia de glicerol, las células no mostraron crecimiento.

5.1.2. Conversiones de glicerol con células en reposo crecidas en matraces

La concentración de glicerol disuelto en el medio durante el crecimiento influye directamente en el desarrollo de la maquinaria metabólica de *Gluconobacter*, pudiendo afectar la biotransformación del glicerol (59). Se estudió la capacidad de conversión de glicerol a GA y DHA por parte de *G. frateurii* en reposo libres crecidas en diferentes concentraciones de glicerol (10-100 g/L) con el fin de determinar cómo se ve afectada.

Los ensayos de conversión se llevaron a cabo en presencia de 200 g/L de glicerol en agua, considerando que, a altas concentraciones de glicerol, no solo reduce la conversión a DHA, sino que mejora la productividad de GA (32).

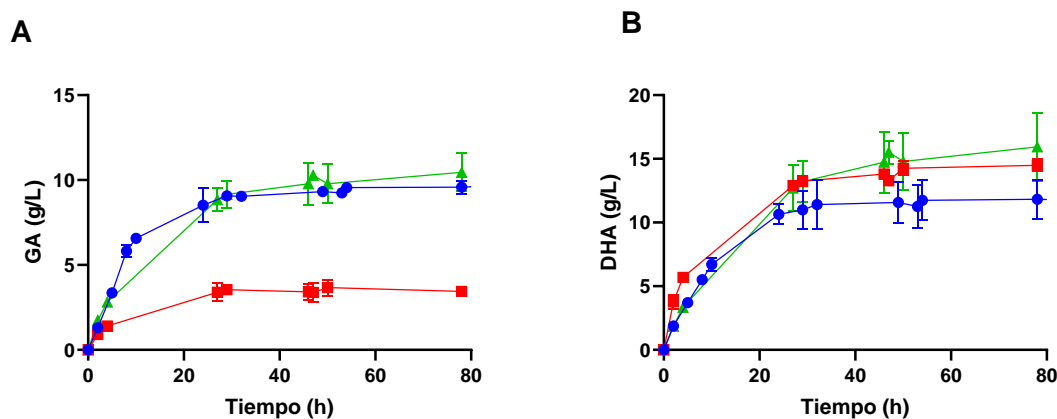


Figura 3. Producción de GA (A) y DHA (B) durante 78 horas con cultivos de *G. frateurii* crecidas con diferentes concentraciones de glicerol: 10 g/L (cuadrados rojos), 30 g/L (círculos azules), 100 g/L (triángulos verdes), partiendo de 200 g/L de glicerol como sustrato.

Al estudiar la producción de GA, se observó que las células crecidas en 30 y 100 g/L de glicerol (Figura 3.A) mostraron un rendimiento 3 veces mayor que el de las células crecidas en 10 g/L. En cuanto a la producción de DHA, no se observaron diferencias significativas entre las células crecidas en las diferentes concentraciones de glicerol (Figura 3.B). Estos resultados indican que posiblemente la expresión de mADH, la enzima responsable de la oxidación de glicerol a gliceraldehído, se vea afectada por las distintas concentraciones de glicerol durante el crecimiento. Por el contrario, la expresión de GDH no parece haberse visto afectada por las distintas concentraciones estudiadas, al no poder distinguir diferencia en su capacidad de conversión.

Estos resultados resultan alentadores, ya que se logró disminuir en un 70% el glicerol utilizado en el medio de crecimiento con respecto a en estudios previos, sin perjuicio de la producción de GA y DHA. De esta forma es posible reducir los costos de producción del inóculo bacteriano, a la vez que disminuye la cantidad de producto de interés que es descartado con el medio de crecimiento. A partir de estos resultados se seleccionó la concentración 30 g/L de glicerol para futuros experimentos.

5.1.3. Escalado del crecimiento de inóculos

Para alcanzar rendimientos productivos para la industria se necesitan, grandes volúmenes de células para su posterior uso en reacciones de conversión. Para esto, es necesario el uso de biorreactores o fermentadores. Además de poder trabajar en volúmenes mayores, los fermentadores permiten trabajar con una serie de parámetros con mayor control, tales como la temperatura, pH, aireación, y agitación.

Con el objetivo de hacer un escalado del crecimiento en medio con 30 g/L de glicerol, se realizó en estudio en un fermentador de 5 litros, conteniendo 2 litros de medio de cultivo. La fermentación fue llevada a cabo durante 48 horas en las siguientes condiciones: 30 °C, 400 rpm de velocidad de agitación, aireación con bomba externa. Se tomaron alícuotas periódicamente para medir en espectrofotómetro la DO a 600 nm.

Se observó que en el fermentador hubo un aumento en el máximo valor de DO_{600nm} alcanzado ($4,98 \pm 0,17$), con respecto a los resultados obtenidos a escala de matraz con la misma concentración de glicerol. Esto puede estar vinculado a una mejor aireación y agitación que se obtiene con el este tipo de reactores (Figura 4).

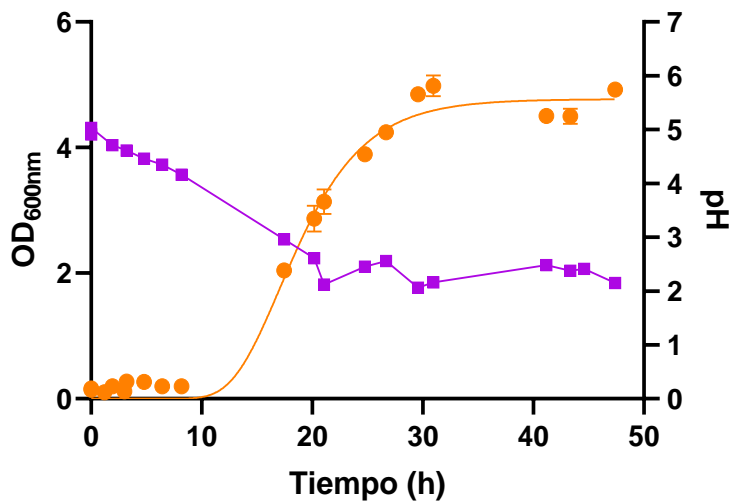


Figura 4. Regresión no lineal del crecimiento de *G. frateurii* durante 48 horas en un fermentador *Sartorius Biostat A* con 2 L de cultivo (círculos naranjas), y la variación de pH (cuadrados violetas).

Sin embargo, un estudio del perfil de valores de pH durante el crecimiento evidenció que el mismo disminuye drásticamente cuando se alcanzan valores de pH bajos. Se puede observar que cuando el pH se acerca a 2,0 el cultivo comienza a finalizar su crecimiento exponencial para entrar a una fase estacionaria. Se ha reportado una mejora en la biomasa generada mediante una regulación de pH, manteniéndolo en un valor de 6,0 con NaOH 10 M, con una concentración inicial de glicerol de 90 g/L (32), alcanzando valores de biomasa 2 veces mayor que la obtenida en nuestro estudio. Es de interés llevar a cabo un experimento de esta clase regulando el pH para un crecimiento con medio con glicerol 30 g/L, con la finalidad de determinar si se pueden alcanzar valores de DO_{600nm} mayores que faciliten la obtención de mayores cantidades del biocatalizador.

5.1.4. Conversiones de glicerol con células en reposo crecidas en fermentador

Se estudió la capacidad de conversión de glicerol a GA y DHA por parte de *G. frateurii* en reposo libres crecidas en el fermentador en presencia de 30 g/L. De acuerdo a los resultados obtenidos en el experimento anterior, se detuvo el crecimiento cuando se alcanzó una DO_{600nm} de 1,4 con el objetivo de utilizar estas células en su fase de crecimiento exponencial. Los ensayos de conversión se llevaron a cabo en matraces conteniendo 30 mL de 200 g/L de glicerol en agua.

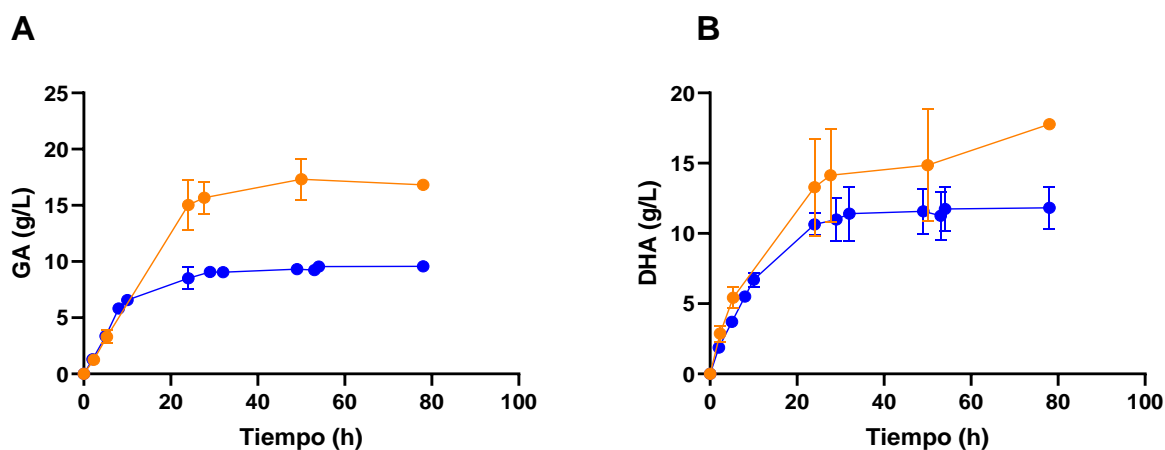


Figura 5. Producción de GA (A) y DHA (B) durante 78 horas con cultivos de *G. frateurii* crecidas en 30 g/L de glicerol en matraces (círculos azules), y en un fermentador de 2 L de medio cultivo (círculos naranjas), partiendo de 200 g/L de glicerol como sustrato.

Se registró una producción de GA de $17,3 \pm 1,8$ g/L, lo cual significa un aumento de 1,8 veces con respecto al resultado obtenido con células crecidas en presencia de 30 g/L de glicerol en matraces ($9,6 \pm 0,5$ g/L) (Figura 5). En cuanto a la producción de DHA, no se logró determinar una diferencia significativa en comparación con la producción obtenida utilizando las células crecidas en matraces.

Estos resultados indican que las condiciones que brinda el fermentador tales como mayor volumen, aireación por bomba de aire, y la agitación, pudo haber desencadenado en una mayor expresión en la maquinaria relacionada a la conversión de GA (mADH y ALDH). Este es un resultado alentador porque el crecimiento en fermentador permite no solo generar más concentración de biomasa, sino también un mayor volumen de esta, lo que se traduce en la obtención de volúmenes de inóculo bacteriano que pueden ser de significancia industrial.

5.2. Modificación genética

Como se mencionó anteriormente, existen limitaciones en la producción de GA utilizando células en reposo de *G. frateurii*, con conversiones que alcanzan los $17,3 \pm 1,8$ g/L luego de 78 horas. Una estrategia para mejorar esta producción es mediante técnicas de modificación genética.

Mediante disrupción genética y ensayos de conversión enzimática, se comprobó que la deshidrogenasa mADH está involucrada en los primeros pasos de la oxidación del glicerol para la producción de GA (60). Esta enzima está compuesta por tres subunidades (subunidad I: AdhA; subunidad II: AdhB; y subunidad III: adhS). AdhA contiene una pirroloquinolona quinona y un grupo hemo c como grupo prostético y funciona como sitio catalítico para la oxidación de glicerol y etanol. AdhB funciona como el aceptor de electrones de AdhA (61). El gen adhS parece expresar una chaperona molecular para el plegamiento de AdhA, pero se desconoce su función exacta (62). Sin embargo, ensayos de disrupción del gen adhS sugirieron que la subunidad III es esencial en la actividad de mADH (38). Estudios realizados por Zhang y colaboradores, demostraron que la sobreexpresión del gen adhS en una cepa de *Gluconobacter oxydans*, llevó a un aumento en la producción de GA (38). Teniendo en cuenta que *G. frateurii* es una buena productora

de GA en comparación a otras bacterias, es de interés obtener una cepa mutante de *G. frateurii* capaz de sobreexpresar el gen *adhS* y evaluar su producción de GA.

5.2.1. Amplificación del gen *adhS*

Se identificó la secuencia del gen *adhS* en *Ensembl Bacteria* bajo el código FFGA_1c0723 como una subunidad de 15kDa de la mADH. El gen tiene un largo de 402 bp y una secuencia de 133 aminoácidos.

El plásmido pBBR1MCS-2 (Figura A 3) es un vector de expresión de amplio espectro de huéspedes con un promotor constitutivo con un gen de resistencia a kanamicina (63). Con el fin de aislar el gen de la subunidad III de mADH, *adhS*, se diseñaron *primers* con sitios de restricción presentes en pBBR1MCS-2 (Tabla 4). Se diseñaron dos pares de *primers* para el mismo gen, ya que se decidió probar la transformación con un sitio de unión al ribosoma (RBS) a 12 bp *upstream* del gen, y una transformación solo con el marco abierto de lectura del gen. Se denominó al par de *primers* con el RBS: *adhS*-RBS, y al par de *primers* sin RBS: *adhS*.

Tabla 4. Secuencias de los *primers* para la amplificación del gen *adhS*.

Primer	Secuencia 5' – 3'
Forward 1 (adhS-XhoI)	ATCTCGAGAGGATACCGTCCATGTTTCG
Forward 2 (adhS-XhoI-RBS)	ATCTCGAGGGAGGAGGATACCGTCCATGTTTCG
Reverse (adhS-HindIII)	GCAAGCTTTAAAGTCGGGGCGTTCATAC

Sitios de corte de enzima de restricción subrayados y RBS en negrita.

Para reducir al mínimo la probabilidad de mutaciones en el gen durante la PCR, se utilizó una polimerasa de alta fidelidad (*Phusion High-Fidelity DNA Polymerase*), la cual tiene una tasa de error 50 veces menor que la tradicional polimerasa Taq. Los productos de la PCR fueron analizados mediante una electroforesis en gel de agarosa 1%. Se observó que las bandas de este gel se ubicaron entre 400 y 500 bp, lo cual corresponde al tamaño esperado de 480 y 485 bp para los productos de los pares de *primers* *adhS* y *adhS*-RBS respectivamente. (Figura 6).

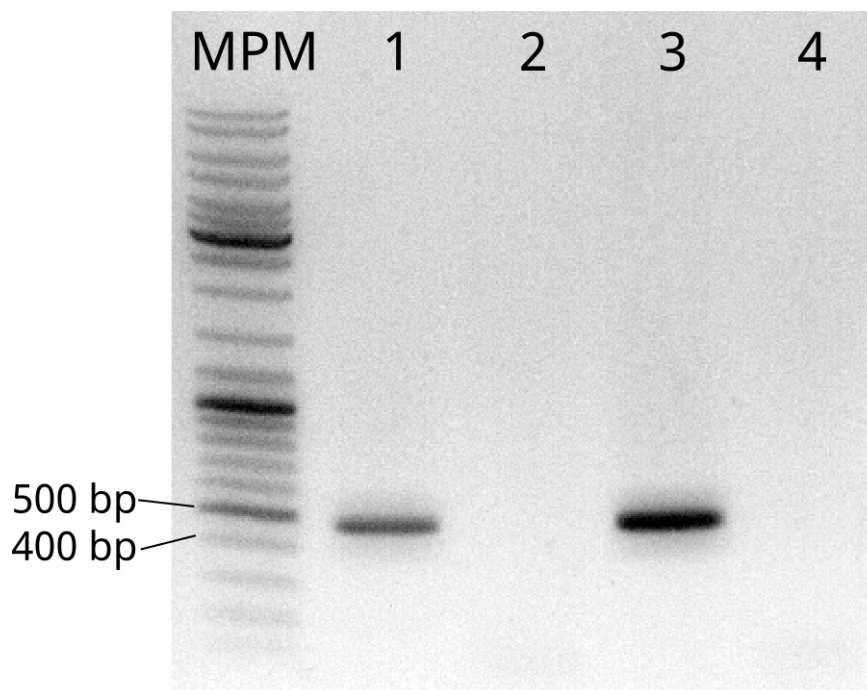


Figura 6. Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de PCR (pPCR) de la amplificación del gen *adhS*. (MPM) Marcador de peso molecular *GeneRuler DNA Ladder Mix* (Thermo #SM0331), (1) pPCR con par de *primers adhS*, (2) control sin templado de PCR con par de *primers adhS* sin ADN molde, (3) pPCR con par de *primers adhS-RBS*, (4) control sin templado con par de *primers adhS-RBS*.

5.2.2. Construcción del vector pBBR-*adhS*

Una vez que se realizó la digestión con las enzimas *XhoI* y *HindIII* el plásmido pBBR1MCS-2 y los productos de PCR de *adhS* y *adhS-RBS*, se procedió a hacer una ligación utilizando la T4 ligasa con ADN plasmídico en una relación 3:1 plásmido:inserto. Luego, se utilizaron de esta ligación para transformar por electroporación *E. coli DH5a* electrocompetentes. Luego se recuperaron las células para permitir la expresión del gen de resistencia a kanamicina, para luego ser cultivadas en medio LB agar suplementado con dicho antibiótico. Este ensayo se realizó con el objetivo de analizar las células que tengan la capacidad de crecer en el medio con antibiótico, lo que significa que presuntamente tengan la construcción deseada. Finalmente, se realizó una PCR partiendo de seis colonias transformadas con el par de *primers adhS* y tres colonias con el par de *primers adhS-RBS*, para verificar cuáles tienen el inserto.

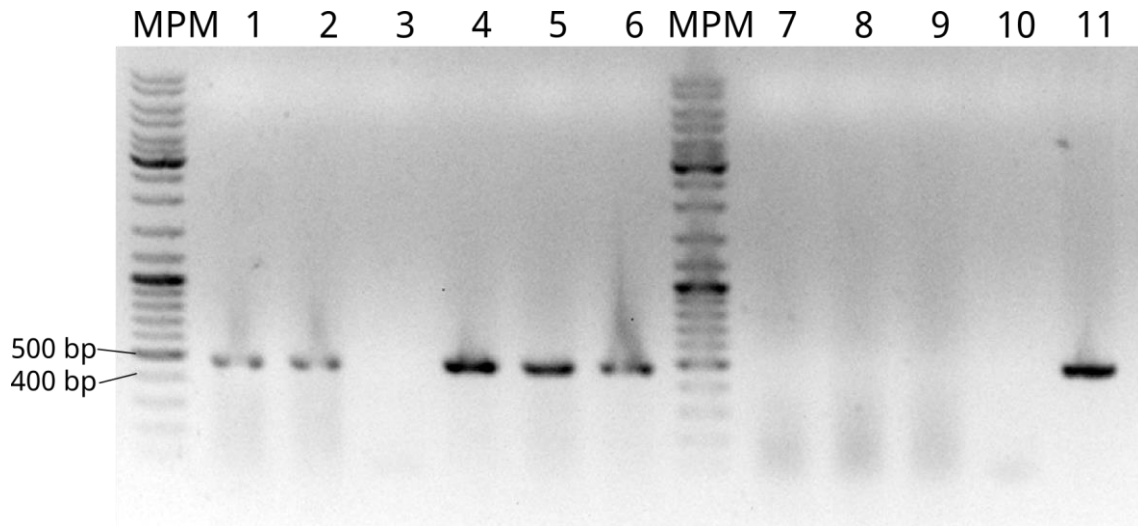


Figura 7. Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de PCR a partir de las colonias de *E. coli* DH5 α transformadas con el vector. (MPM) Marcador de peso molecular *GeneRuler DNA Ladder Mix*, (1 – 6) pPCR de las colonias con el plásmido pBBR-adhS, (7-9) pPCR de las colonias con el plásmido pBBR-adhS-RBS, (10) control sin templado (11) control positivo (pPCR con plásmido pBBR-adhS purificado).

Como se pudo observar en el análisis mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, se obtuvieron 5 colonias positivas para la construcción del vector con el gen *adhS* y ninguna para la construcción que incluía el RBS (Figura 7). Se seleccionaron cuatro colonias (1, 4, 5, y 6) y se decidió seguir utilizando solo esta construcción para los siguientes experimentos.

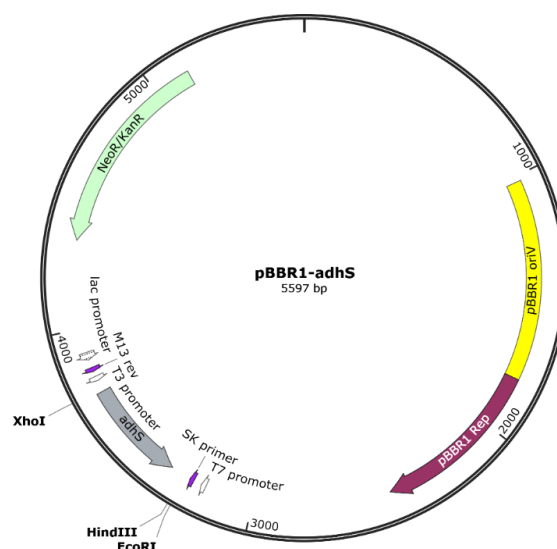


Figura 8. Construcción del vector de expresión pBBR-adhS.

Para confirmar la presencia del inserto en la construcción de las colonias positivas, se llevó a cabo un ensayo con enzimas de restricción. Se realizó un ensayo con las enzimas XhoI y HindIII que nos permitió determinar la presencia del inserto, utilizando las mismas enzimas de restricción que se utilizaron para la insertar el gen. Además, se eligieron las enzimas XhoI y EcoRI para verificar la direccionalidad del inserto. Este ensayo producirá un fragmento de 480 bp y otro de 5115 bp si la dirección del inserto es la correcta, mientras que producirá dos fragmentos de 12 bp y 5585 bp si la dirección del inserto es la incorrecta. En el análisis por electroforesis en el gel de agarosa 1% de la digestión con enzimas de restricción, se pudo determinar que el inserto se encuentra en el plásmido y que se encuentra con la dirección correcta en todos los clones analizados (Figura 9). El vector obtenido fue denominado pBBR-adhS (Figura 8), y se seleccionó el clon 6 para seguir trabajando.

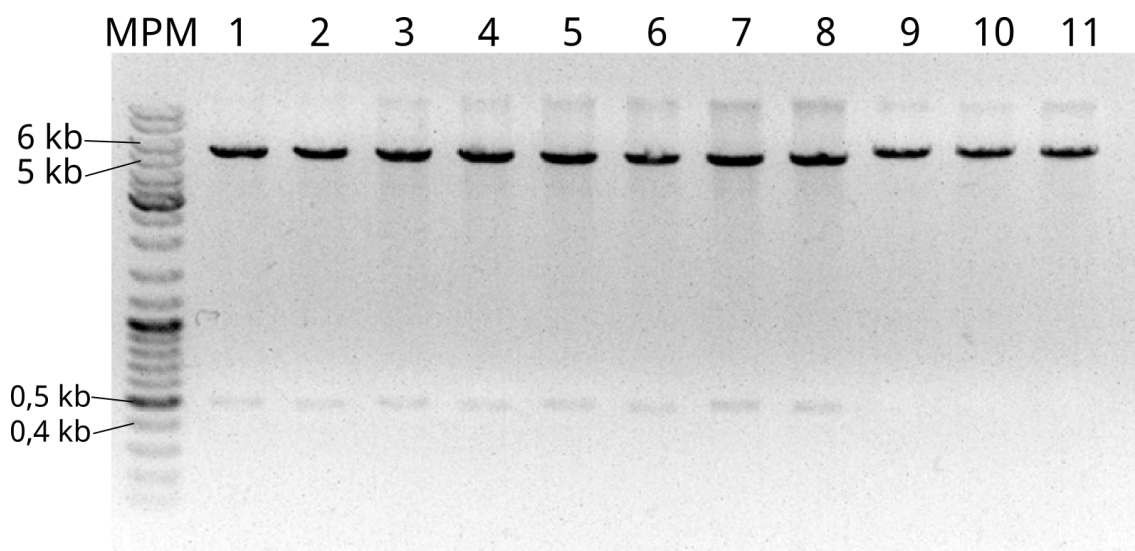


Figura 9. Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa 1% del ensayo con enzimas de restricción de las colonias positivas con el plásmido pBBR-adhS. (MPM) Marcador de peso molecular *GeneRuler DNA Ladder Mix*, (1,3,5,7) colonias positivas digeridas con XhoI y EcoRI, (2,4,6,8) colonias positivas digeridas con XhoI y HindIII, (9,10,11) colonia 6 digerida con XhoI, EcoRI, y HindIII respectivamente.

5.2.3. Transformación de *G. frateurii*

Partiendo de la construcción pBBR-adhS se realizó una transformación por electroporación a células electrocompetentes de *G. frateurii*. Luego de ser recuperadas

durante 1 hora a 30 °C en medio de crecimiento con glucosa, las células fueron cultivadas en medio glucosa agar suplementado con kanamicina. Se observó el crecimiento de tres colonias en la placa de transformadas con 5 ng de ADN y una colonia en la placa de 0,5 ng de ADN. Además, se observó un crecimiento de tapiz en las células electroporadas sin plásmido en medio de glucosa agar sin antibiótico, y no hubo crecimiento con estas células en medio de glucosa agar con antibiótico. Lo que demuestra que las *G. frateurii* electrocompetentes fueron preparadas con éxito.

Para determinar que colonias de *G. frateurii* fueron transformadas con éxito se realizó una PCR a partir de las colonias crecidas en las placas de glucosa agar con kanamicina. En el laboratorio se contó únicamente con el set de primers de adhS (Tabla 4), como estos *primers* amplifican el gen que también se encuentra en las cepas de *G. frateurii wild type* (wt), se realizó un estudio previo para intentar detectar únicamente el gen desde el plásmido. Se decidió aumentar la temperatura de *annealing* en el ciclado de 60 °C a 66 °C, teniendo en cuenta de que los *primers* poseen los sitios de restricción al comienzo, esto podría resultar en la no unión de los *primers* al sitio de adhS en el ADN genómico. Aun así, los resultados no fueron los deseados, ya que la PCR con estos primers amplificó en las cepas wt. Dados estos resultados, en el análisis mediante electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de PCR de las colonias que crecieron en el medio de glucosa agar con kanamicina, se pudo determinar que las cuatro colonias que crecieron fueron positivas para el gen adhS (Figura 10). Lo que nos permite afirmar que son *G. frateurii* con capacidad de crecer medio con kanamicina. Para confirmar que las bacterias contienen efectivamente el plásmido de expresión, se debería realizar una PCR con *primers* específicos del vector, como por ejemplo *primers* que amplifiquen una región que contenga una parte del vector y otra del gen adhS.

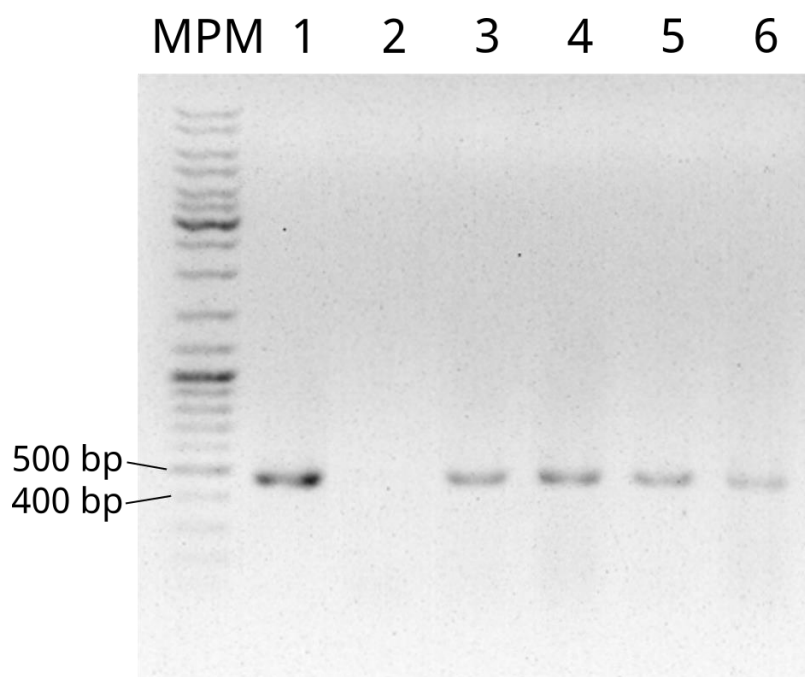


Figura 10. Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de PCR a partir de las colonias de *G. frateurii* transformadas con el vector pBBR-adhS (3-6), (MPM) Marcador de peso molecular *GeneRuler DNA Ladder Mix*, (1) producto de PCR con plásmido pBBR-adhS purificado, (2) producto de PCR sin ADN molde.

5.2.4. Diseño de construcciones para modificación génica de *G. frateurii*

Habitualmente, los cortes de doble hebra del ADN pueden repararse mediante unión de extremos no homólogos o el sistema de reparación dirigida por homología. De esta forma se puede realizar deleciones o inserciones de genes en el genoma utilizando nucleasas específicas de sitio (64). Sin embargo, la mayoría de las bacterias no tienen estos sistemas de reparación de ADN, por lo que la utilización de Cas9 para escindir el ADN puede causar la muerte celular (65),(66). Este es el caso de *G. frateurii* NBRC103465, presenta las secuencias codificantes de todas las proteínas necesarias para el sistema de reparación RecFOR (67). Este sistema de reparación permite hacer reparaciones basadas en homología una vez detectado un corte simple hebra en el ADN. La nickasa Cas9 D10A es una variación mutante de la endonucleasa Cas9 que carece de la actividad del dominio tipo RuvC de la endonucleasa, lo que resulta en un corte simple hebra del ADN (68).

Para aumentar la expresión del gen *adhS* en nuestra especie, al tratarse de un gen endógeno, no existe la necesidad de insertar la totalidad del gen para lograr una sobreexpresión enzimática. Por ese motivo se decidió insertar un promotor fuerte frente a la secuencia codificante ya presente en el genoma. . Se realizó un diseño de CRISPR para la inserción de un promotor de alta eficiencia para bacterias de la familia *Acetobacteraceae* (69), el promotor J23104 y un RBS a 7 bp *upstream* de la secuencia codificante de *adhS* (Tabla 5).

Para esto, se diseñaron dos plásmidos que posteriormente serán introducidos a células de *G. frateurii*. Un plásmido contendrá la nickasa Cas9 D10A junto con un sitio para la inserción de un ARNsg, mientras que el otro contendrá el molde de reparación.

Tabla 5. Secuencia de los fragmentos a ser insertados en el genoma para sobreexpresar *adhS*

Fragmento	Secuencia 5' – 3'
Promotor J23104	TTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATTGTGCTAGC
RBS	AAAGAGGAGACA

Se identificó el genoma completo de *G. frateurii* en *Ensembl Bacteria* bajo el código GCA_000509445. Basado en este genoma se diseñaron los brazos de homología que formarán parte del molde de reparación . Para lograr amplificar estos brazos de homología se diseñaron *primers* (Tabla 6), teniendo sitios de restricción para que posteriormente puedan ser ligados al plásmido comercial *MYMH 464* (*RRID:Addgene_138068*) y darán como resultado la construcción MYMH+BHs (Figura 11).

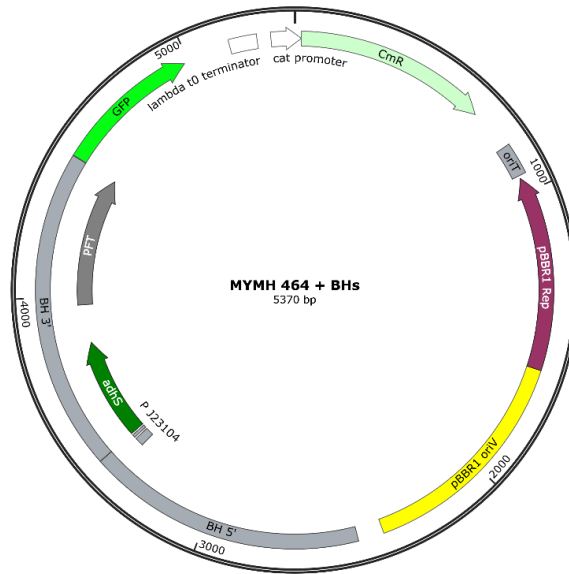


Figura 11. Plásmido MYMH+BHs conteniendo los brazos de homología.

En el primer *reverse* del brazo de homología 5' se agregaron las secuencias del promotor y el RBS a ser insertados previos al gen *adhS*. Además, para este diseño se tomó en cuenta la existencia de un gen de una pirofosfatasa (PFT) que se encuentra a 156 bp *downstream* del gen de *adhS*, por lo que para el brazo de homología 3' se incluyó el gen PFT para evitar su interrupción con los sitios de restricción agregados al final del brazo de homología 3'.

Tabla 6. Diseño de *primers* para amplificar los brazos de homología. Subrayados los sitios de corte con enzima de restricción

<i>Primer</i>	Secuencia 5' – 3'	Enzima de restricción
Fw- BH5'	GACTC <u>GGCGCGCCGG</u> CAAACCTACCACCTTTGA	AscI
Rv- BH5'	CTATAGGA <u>AATTCTGTCTCCTCTTTCTCTAGAGCTAGCAC</u> AATACCTAGGACTGAGCTAGCTGTCAAATCCTTTCTGA GACCCTGTCTT	EcoRI
Fw- BH3'	TATAGGA <u>AATTC</u> CATGTTTCGTCGTATCGTGC	EcoRI
Rv- BH3'	AACAC <u>CATATGCGT</u> ATTACTTTGCAGCGGCC	NdeI

En cuanto a la Cas9 D10A, se cuenta con una construcción realizada en nuestro laboratorio a partir de un plásmido comercial, *pSEVA231-CRISPR* (RRID:Addgene_138712) con inserto que codifica para Cas9 D10A seguido de un *cassette* de expresión para el ARNsg con sitios de restricción BsaI que permiten insertar los 20 bp que dan la especificidad al mismo. Este plásmido se denominó Cas9D10A-sgRNA (Figura A 4), y presenta promotores y terminadores específicos de *Gluconobacter*. Se diseñó un ARNsg (5'-CGGAAGACAGGGTCTCAGAA-3') con la herramienta CRISPOR y se verificó la especificidad con la herramienta Cas-OFFinder de CRISPR RGEN Tools, en la cual se tuvo en cuenta que debe poseer un motivo adyacente de protoespaciador (PAM) 5'-NGG-3'. Este ARNsg se diseñó con sitios de BsaI cohesivos para su posterior inserción en el plásmido Cas9D10A-sgRNA (Figura 12).

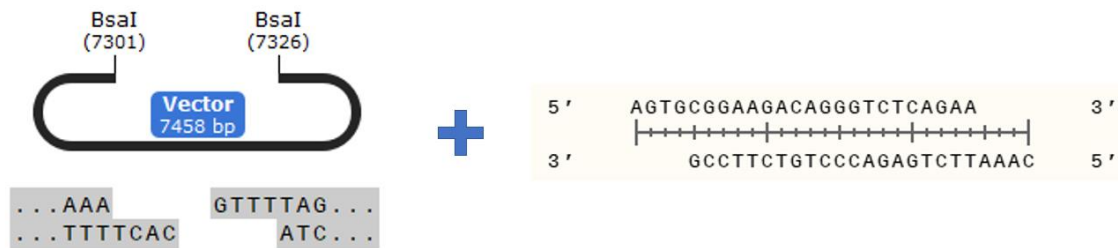


Figura 12. Esquema de clonado con BsaI del ARNsg en vector Cas9D10A-sgRNA.

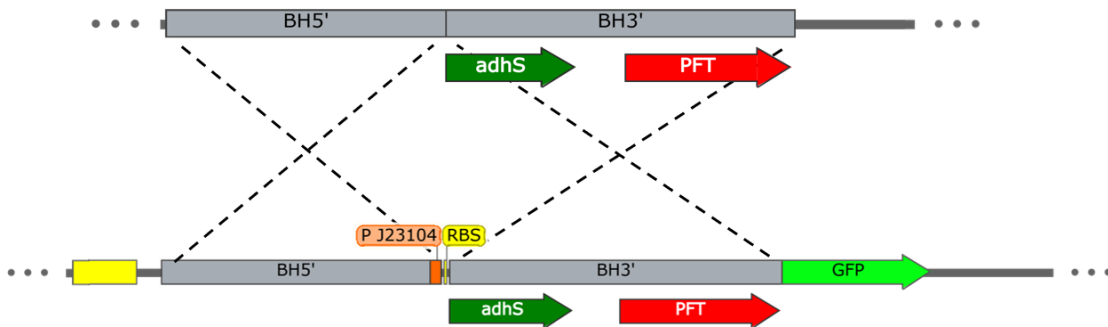


Figura 13. Reparación dirigida por homología en el sitio de corte en el genoma (arriba) con los brazos de homología de la construcción MYMH+BHs.

Una vez que el ARNsg reconozca la secuencia, la Cas9 D10A realizará un corte simple cadena a tres pares de base *upstream* del PAM en la secuencia objetivo. Luego se realizará una reparación dirigida por homología (Figura 13) y se espera como resultado la inserción del promotor y el RBS antes de la secuencia codificante de *adhS* (Figura 14).

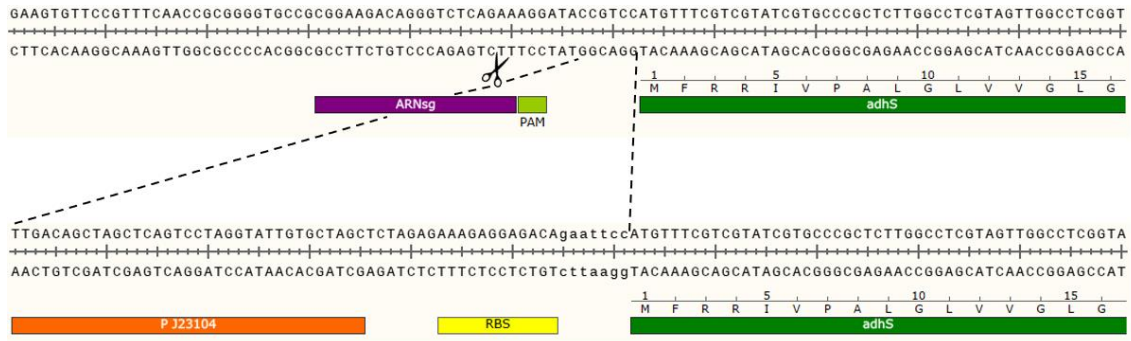


Figura 14. Representación de la inserción del promotor J23104 y el RBS en entorno genómico de *adhS*. El ARN guía está resaltado en violeta, y el sitio de corte de la nickasa está representado por las tijeras.

Estos diseños realizados para la sobreexpresión de la subunidad III de mADH, son el comienzo de una serie de ensayos de laboratorio que deben ser posteriormente realizados para lograr la modificación genética de *G. frateurii*.

4. Conclusiones

En este trabajo se realizó una optimización del medio de crecimiento de *G. frateurii* y un escalado del proceso de crecimiento, evaluando su conversión de glicerol a GA y DHA. Además, se generaron herramientas moleculares para la sobreexpresión de la subunidad III de mADH con el objetivo de aumentar su producción de GA.

Los resultados obtenidos en los estudios de crecimiento permitieron optimizar las condiciones necesarias para la generación de inóculos de *G. frateurii* con el fin de ser utilizados como catalizadores en reposo en la biotransformación de glicerol. El estudio de las curvas de crecimiento a distintas concentraciones de glicerol constató la importancia de la presencia de este durante el crecimiento. Se observó que las bacterias crecidas en presencia de 10 y 30 g/L de glicerol alcanzaron una biomasa final 2 veces mayor que las que crecieron en 100 g/L. Esto se debe a que a altas concentraciones de glicerol existe un efecto inhibitorio en el crecimiento de la bacteria, lo que resulta negativo a la hora de obtener grandes concentraciones de biomasa. Por otra parte, al estudiar la capacidad de conversión de glicerol a GA por estas bacterias partiendo de 200 g/L de glicerol se observó que aquellas crecidas en presencia de 30 y 100 g/L de glicerol tuvieron rendimientos 3 veces mayores que el de las células crecidas en 10 g/L ($9,5 \pm 0,4$, $10,5 \pm 1,1$ y $3,4 \pm 0,3$ g/L, respectivamente). Estos resultados sugieren que la concentración de glicerol durante el crecimiento afecta la expresión de la maquinaria asociada a la producción de GA, lo que finalmente impacta posteriormente en su producción al utilizar las células en reposo. Por su parte, la producción de DHA por parte de las células en reposo no se vio afectada por la concentración de glicerol en la que se crecieron las células. De acuerdo a estos resultados, se concluyó que es posible reducir la concentración de glicerol utilizada para crecer *G. frateurii* en un 70% con respecto a reportes previos. De esta forma no solamente se reducen costos en lo que respecta a preparación del medio de cultivo, sino que se reduce el desperdicio de glicerol y sus productos por oxidación (GA y DHA) obtenidos durante el crecimiento de los inóculos de *G. frateurii*.

Asimismo, se logró escalar el crecimiento de *G. frateurii* en un fermentador con 2 litros de cultivo en presencia de 30 g/L de glicerol, en el que se alcanzó una concentración de

biomasa final de 1,05 g/L después de 47 horas de incubación. Esto representa una concentración de biomasa 1,7 veces mayor que la obtenida las células crecidas en matraces con la misma concentración de glicerol. Estos resultados indican que las condiciones de crecimiento del fermentador pueden haber resultado en una mejor aireación que finalmente haya aumentado la generación de biomasa. Sin embargo, un estudio del pH del medio reveló una desaceleración significativa en la producción de biomasa al alcanzar pH 2. Futuros experimentos con control de pH podrían ser llevados a cabo con el objetivo de mejorar aún más la producción de biomasa.

Al ser utilizadas en conversiones, las células crecidas en fermentador resultaron en un aumento en la producción de GA de 1,8 veces que con células crecidas en 30 g/L en matraces. Nuevamente, en las condiciones estudiadas, no hubo una diferencia en la producción de DHA. Estos resultados indican que la preparación de inóculos de *G. frateurii* en fermentador no solamente otorga mejores rendimientos de biomasa, sino que las células obtenidas presentan una mayor capacidad de conversión de glicerol a GA al ser utilizadas como catalizadores en reposo.

Mediante tecnologías de ADN recombinante, se logró obtener una cepa mutante de *Gluconobacter frateurii* NBRC103465 capaz de crecer en kanamicina, con el plásmido de expresión pBBR-adhS de la cual no existen precedentes. Para confirmar la sobreexpresión de la enzima, se podrían realizar ensayos de actividad enzimática y de conversión de glicerol.

Por último, se realizó un diseño para la inserción del promotor J23104 junto con un RBS para lograr una sobreexpresión del gen adhS en el genoma de *G. frateurii* utilizando tecnología CRISPR. Para comprobar la eficacia del diseño se deberán realizar los ensayos de laboratorio correspondientes.

Los resultados de esta Tesis constituyen un valioso aporte a la biotransformación de glicerol en productos de valor agregado por *G. frateurii*, con especial énfasis en GA. Mediante la aplicación de los conocimientos adquiridos será posible continuar trabajando hacia un proceso de biotransformación de significancia industrial, que pueda ser integrado a la producción de biodiesel.

5. Referencias bibliográficas

1. Ramos M, Dias APS, Puna JF, Gomes J, Bordado JC. Biodiesel production processes and sustainable raw materials. *Energies*. 2019;12(23).
2. Gebremariam SN, Marchetti JM. Economics of biodiesel production: Review. *Energy Conversion and Management*. 2018;168:74–84.
3. Wang Y, Wang X, Liu Y, Ou S, Tan Y, Tang S. Refining of biodiesel by ceramic membrane separation. *Fuel Processing Technology*. 2009;90(3):422–427.
4. Biofuels Mandates Around the World 2018: Biofuels Digest. [Internet] [citado 2022 Mar 26]. Disponible desde: <https://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2018/01/01/biofuels-mandates-around-the-world-2018/>
5. FOMENTO Y REGULACION DE LA PRODUCCION COMERCIALIZACION Y UTILIZACION DE AGROCOMBUSTIBLES Ley N° 18195. [Internet] [citado 2022 Mar 26]. Disponible desde: <https://www.impo.com.uy/bases/leyes/18195-2007>
6. Gobierno revisará mezcla de biodiésel con gasoil para bajar costos - Información - 27/01/2021 - EL PAÍS Uruguay. [Internet] [citado 2022 Mar 26]. Disponible desde: <https://www.elpais.com.uy/informacion/politica/gobierno-revisara-mezcla-naftas-bajar-costos.html>
7. Tan HW, Abdul Aziz AR, Aroua MK. Glycerol production and its applications as a raw material: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2013;27:118–127.
8. Ayoub M, Abdullah AZ. Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2012;16(5):2671–2686.
9. Steinmetz SA, Herrington JS, Winterrowd CK, Roberts WL, Wendt JOL, Linak WP. Crude glycerol combustion: Particulate, acrolein, and other volatile organic emissions. *Proceedings of the Combustion Institute*. 2013;34(2):2749–2757.

10. Chozhavendhan S, Karthiga Devi G, Bharathiraja B, Praveen Kumar R, Elavazhagan S. Assessment of crude glycerol utilization for sustainable development of biorefineries. *Refining Biomass Residues for Sustainable Energy and Bioproducts: Technology, Advances, Life Cycle Assessment, and Economics*. 2020:195–212.
11. Labuda I. Flavor Compounds. In: *Encyclopedia of Microbiology*. 3ra. ed. 2009. p. 305–320.
12. de Carvalho CCCR, da Fonseca MMR. Biotransformations. In: *Comprehensive Biotechnology*. 2da ed. 2011. p. 451–460.
13. Milner SE, Maguire AR. Recent trends in whole cell and isolated enzymes in enantioselective synthesis. *Arkivoc*. 2012;(1):321–382.
14. de Carvalho CCCR. Whole cell biocatalysts: essential workers from Nature to the industry. *Microbial Biotechnology*. 2017;10(2):250–263.
15. Mu Y, Teng H, Zhang DJ, Wang W, Xiu ZL. Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparations. *Biotechnology letters*. 2006;28(21):1755–1759.
16. Papanikolaou S, Aggelis G. Modelling aspects of the biotechnological valorization of raw glycerol: Production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* and 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2003;78(5):542–547.
17. Sabourin-Provost G, Hallenbeck PC. High yield conversion of a crude glycerol fraction from biodiesel production to hydrogen by photofermentation. *Bioresource technology*. 2009;100(14):3513–3517.
18. Ashby RD, Solaiman DKY, Foglia TA. Bacterial Poly(Hydroxyalkanoate) Polymer Production from the Biodiesel Co-product Stream. *Journal of Polymers and the Environment* 2004;12(3):105–112.

19. Scholten E, Renz T, Thomas J. Continuous cultivation approach for fermentative succinic acid production from crude glycerol by *Basfia succiniciproducens* DD1. *Biotechnology letters*. 2009;31(12):1947–1951.
20. Taconi KA, Venkataramanan KP, Johnson DT. Growth and solvent production by *Clostridium pasteurianum* ATCC® 6013™ utilizing biodiesel-derived crude glycerol as the sole carbon source. *Environmental Progress & Sustainable Energy*. 2009;28(1):100–110.
21. Gupta A, Singh VK, Qazi GN, Kumar A. *Gluconobacter oxydans*: its biotechnological applications. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*. 2001;3(3):445–456.
22. Habe H, Shimada Y, Yakushi T, Hattori H, Ano Y, Fukuoka T, Kitamoto D, Itagaki M, Watanabe K, Yanagishita H, et al. Microbial production of glyceric acid, an organic acid that can be mass produced from glycerol. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009;75(24):7760–7766.
23. Macauley S, McNeil B, Harvey LM. The Genus *Gluconobacter* and Its Applications in Biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2008;21(1):1–25
24. Wu J, Wang J le, Li MH, Lin JP, Wei DZ. Optimization of immobilization for selective oxidation of benzyl alcohol by *Gluconobacter oxydans* using response surface methodology. *Bioresource Technology*. 2010;101(23):8936–8941.
25. Matsushita K, Yakushi T, Toyama H, Adachi O, Miyoshi H, Tagami E, Sakamoto K. The quinoxinoprotein alcohol dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans* has ubiquinol oxidation activity at a site different from the ubiquinone reduction site. *Biochimica et biophysica acta*. 1999;1409(3):154–164.
26. Deppenmeier U, Hoffmeister M, Prust C. Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002;60(3):233–242.

27. Hans Leonard Ohrem, Frank Westmeier; Merk. Microbial process for the preparation of dihydroxyacetone with recycling of biomass. United States Patent US 5,770,411 1998 Jun 23.
28. Ciriminna R, Fidalgo A, Ilharco LM, Pagliaro M. Dihydroxyacetone: An Updated Insight into an Important Bioproduct. *ChemistryOpen*. 2018;7(3):233-236.
29. Stasiak Lidia and Błazejak S. ACETIC ACID BACTERIA – PERSPECTIVES OF APPLICATION IN BIOTECHNOLOGY – A REVIEW. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2009;59(1):17–23.
30. Sato S, Umemura M, Koike H, Habe H. Draft genome sequence of *Gluconobacter frateurii* NBRC 103465, a glyceric acid-producing strain. *Genome Announcements*. 2013;1(4).
31. Habe H, Sato Y, Tani H, Matsutani M, Tanioka K, Theeragool G, Matsushita K, Yakushi T. Heterologous expression of membrane-bound alcohol dehydrogenase–encoding genes for glyceric acid production using *Gluconobacter sp.* CHM43 and its derivatives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2021;105(18):6749–6758.
32. Habe H, Fukuoka T, Kitamoto D, Sakaki K. Biotechnological production of D-glyceric acid and its application. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009:445–452.
33. Madrigal-Santillán E, Madrigal-Bujaidar E, Álvarez-González I, Sumaya-Martínez MT, Gutiérrez-Salinas J, Bautista M, Morales-González Á, García-Luna Y González-Rubio M, Aguilar-Faisal JL, Morales-González JA. Review of natural products with hepatoprotective effects. *World Journal of Gastroenterology*. 2014;20(40):14787.
34. Eriksson CJP, Saarenmaa TPS, Bykov IL, Heino PU. Acceleration of ethanol and acetaldehyde oxidation by D-glycerate in rats. *Metabolism: clinical and experimental*. 2007;56(7):895–898.
35. Habe H, Fukuoka T, Sato S, Kitamoto D, Sakaki K. Synthesis and Evaluation of Dioleoyl Glyceric Acids Showing Antitrypsin Activity. *Journal of Oleo Science*. 2011;60(6):327–331.

36. Wada R, Hyon SH, Ikada Y. New biodegradable oligoesters for pharmaceutical application. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*. 1996;7(8):715–725.
37. Jackson E, Ripoll M, Betancor L. Efficient glycerol transformation by resting *Gluconobacter* cells. *MicrobiologyOpen*. 2019;8(12).
38. Zhang H, Shi L, Lin J, Sun M, Wei D. Effective improvement of the activity of membrane-bound alcohol dehydrogenase by overexpression of *adhS* in *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnology Letters*. 2016;38(7):1131–1138.
39. Martínez-Espinosa RM. Heterologous and homologous expression of proteins from haloarchaea: Denitrification as case of study. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(1).
40. Hölscher T, Görisch H. Knockout and overexpression of pyrroloquinoline quinone biosynthetic genes in *Gluconobacter oxydans* 621H. *Journal of Bacteriology*. 2006;188(21):7668–7676.
41. Liu L, Chen Y, Yu S, Chen J, Zhou J. Simultaneous transformation of five vectors in *Gluconobacter oxydans*. *Plasmid*. 2021;117:102588.
42. Kostner D, Peters B, Mientus M, Liebl W, Ehrenreich A. Importance of *codB* for new *codA*-based markerless gene deletion in *Gluconobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013;97(18):8341–8349.
43. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013;339(6121):819–823.
44. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013;339(6121):823–826.
45. Zhang D, Zhang Z, Unver T, Zhang B. CRISPR/Cas: A powerful tool for gene function study and crop improvement. *Journal of Advanced Research*. 2021;29:207–221

46. Qin Z, Yang Y, Yu S, Liu L, Chen Y, Chen J, Zhou J. Repurposing the Endogenous Type I-E CRISPR/Cas System for Gene Repression in *Gluconobacter oxydans* WSH-003. *ACS Synthetic Biology*. 2021;10(1):84–93.
47. Howe KL, Achuthan P, Allen J, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Ridwan Amode M, Armean IM, Azov AG, Bennett R, Bhai J, et al. Ensembl 2021. *Nucleic Acids Research*. 2021;49(D1):D884–D891.
48. Habe H, Shimada Y, Fukuoka T, Kitamoto D, Itagaki M, Watanabe K, Yanagishita H, Sakaki K. Production of Glyceric Acid by *Gluconobacter sp.* NBRC3259 Using Raw Glycerol.
49. Garcia R, Besson M, Gallezot P. Chemoselective catalytic oxidation of glycerol with air on platinum metals. *Applied Catalysis A-general* 127 (1995): 165-176.
50. Carrettin S, McMorn P, Johnston P, Griffin K, Hutchings GJ. Selective oxidation of glycerol to glyceric acid using a gold catalyst in aqueous sodium hydroxide. *Chemical Communications*. 2002;7:696–697.
51. de Muynck C, Pereira C, Soetaert W, Vandamme E. Dehydrogenation of ribitol with *Gluconobacter oxydans*: Production and stability of l-ribulose. *Journal of Biotechnology*. 2006;125(3):408–415.
52. de la Morena S, Santos VE, García-Ochoa F. Influence of oxygen transfer and uptake rates on dihydroxyacetone production from glycerol by *Gluconobacter oxydans* in resting cells operation. *Biochemical Engineering Journal*. 2019;147:20–28.
53. Švitel J, Šturdík E. Product yield and by-product formation in glycerol conversion to dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1994;78(5):351–355.
54. Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, Van't, Riet T. Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Appl Environ Microbiol*. 1990;56(6):1875-81.
55. Jeffrey C. Pommerville. *Alcamo's Fundamentals of Microbiology*. 9th ed. 2010.

56. Yan S, Liang Y, Zhang J, Liu CM. *Aspergillus flavus* grown in peptone as the carbon source exhibits spore density- and peptone concentration-dependent aflatoxin biosynthesis. *BMC Microbiology*. 2012;12(1):1–14.
57. Tjørve KMC, Tjørve E. The use of Gompertz models in growth analyses, and new Gompertz-model approach: An addition to the Unified-Richards family. *PLoS ONE*. 2017;12(6).
58. Khanna S, Goyal A, Moholkar VS. Microbial conversion of glycerol: Present status and future prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2012;32(3):235–262. doi:10.3109/07388551.2011.604839
59. Poljungreed I, Boonyarattanakalin S. Low-cost biotransformation of glycerol to 1,3-dihydroxyacetone through *Gluconobacter frateurii* in medium with inorganic salts only. *Letters in Applied Microbiology*. 2018;67(1):39–46.
60. Habe H, Fukuoka T, Morita T, Kitamoto D, Yakushi T, Matsushita K, Sakaki K. Disruption of the membrane-bound alcohol dehydrogenase-encoding gene improved glycerol use and dihydroxyacetone productivity in *Gluconobacter oxydans*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2010;74(7):1391–1395.
61. Matsushita K, Yakushi T, Toyama H, Shinagawa E, Adachi O. Function of multiple heme c moieties in intramolecular electron transport and ubiquinone reduction in the quinoxinoprotein alcohol dehydrogenase-cytochrome c complex of *Gluconobacter suboxydans*. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(9):4850–4857.
62. Yakushi T, Matsushita K. Alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: Structure, mode of action, and applications in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010;86(5):1257–1265.
63. Kovach ME, Elzer A' PH, Steven Hill D, Robertson GT, Farris MA, Martin R, Ii R, Peterson KM, Peterson KM. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*. 1995;166(1):175-6

64. Liu Z, Dong H, Cui Y, Cong L, Zhang D. Application of different types of CRISPR/Cas doi:10.1186/s12934-020-01431-z -based systems in bacteria. *Microb Cell Fact.* 2020;19(1):172.
65. Standage-Beier K, Zhang Q, Wang X. Targeted Large-Scale Deletion of Bacterial Genomes Using CRISPR-Nickases. *ACS Synthetic Biology.* 2015;4(11):1217–1225.
66. Dillingham MS, Kowalczykowski SC. RecBCD Enzyme and the Repair of Double-Stranded DNA Breaks. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR.* 2008;72(4):642.
67. Morimatsu K, Kowalczykowski SC. RecFOR Proteins Load RecA Protein onto Gapped DNA to Accelerate DNA Strand Exchange: A Universal Step of Recombinational Repair. *Molecular Cell.* 2003;11(5):1337–1347.
68. McCaffrey J, Sibert J, Zhang B, Zhang Y, Hu W, Riethman H, Xiao M. CRISPR-CAS9 D10A nickase target-specific fluorescent labeling of double strand DNA for whole genome mapping and structural variation analysis. *Nucleic Acids Research.* 2016;44(2):e11–e11.
69. Teh MY, Ooi KH, Danny Teo SX, bin Mansoor ME, Shaun Lim WZ, Tan MH. An Expanded Synthetic Biology Toolkit for Gene Expression Control in *Acetobacteraceae*. *ACS Synthetic Biology.* 2019;8(4):708–723.
70. Mostafa HE, Heller KJ, Geis A. Cloning of *Escherichia coli* lacZ and lacY Genes and Their Expression in *Gluconobacter oxydans* and *Acetobacter liquefaciens*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY.* 2002;68(5):2619–2623.

6. Anexos

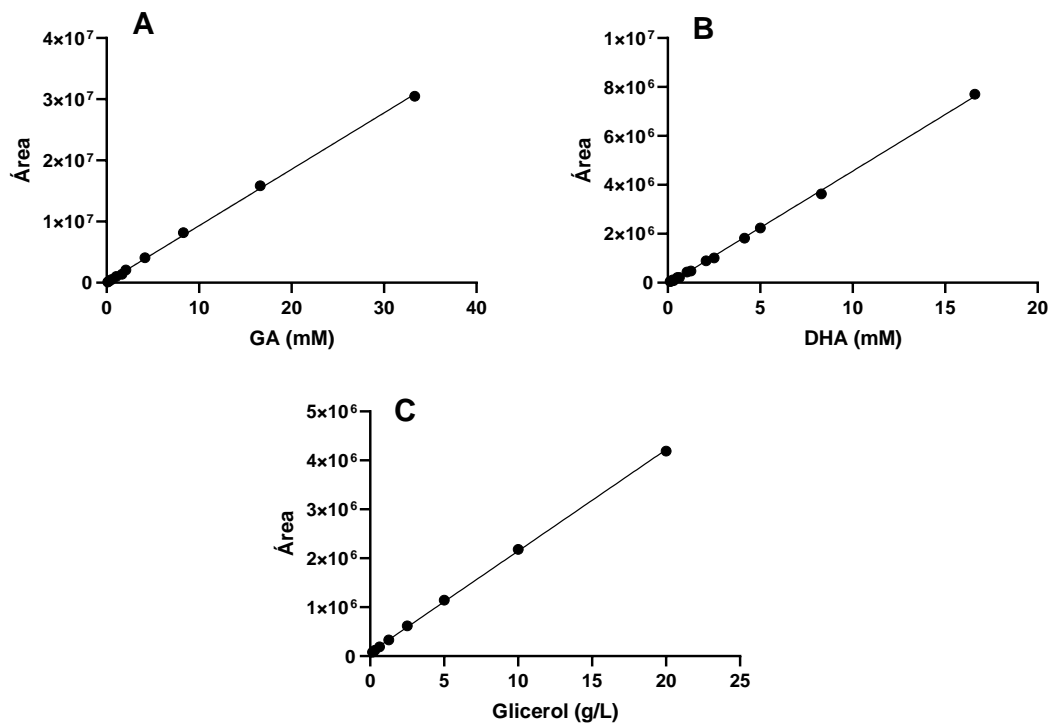


Figura A 1. Curvas de calibración para: (a) GA, $R^2=1$. $Y = 922079 \cdot X + 87069$, (b) DHA, $R^2=1$. $Y = 462387 \cdot X - 63264$, (c) Glicerol, $R^2=1$. $Y = 207188 \cdot X + 75343$.

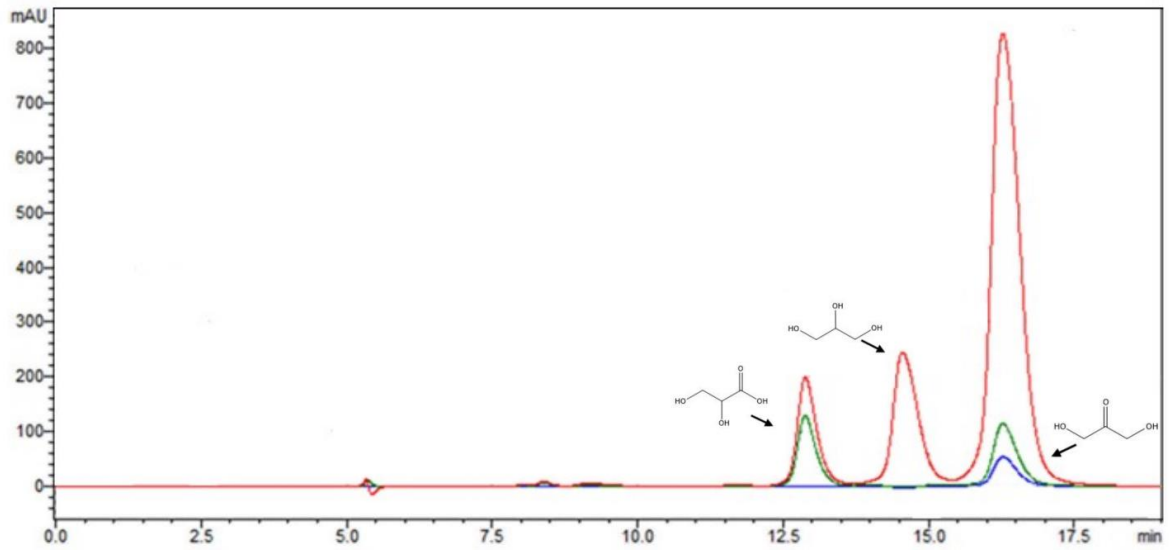


Figura A 2. Cromatograma de HPLC con tres canales de absorbancia en simultaneo: rojo 190 nm, verde 210 nm, azul 271 nm. Se detecta el GA en 13,7 minutos, glicerol en 14,7 minutos, DHA en 16,7 minutos.

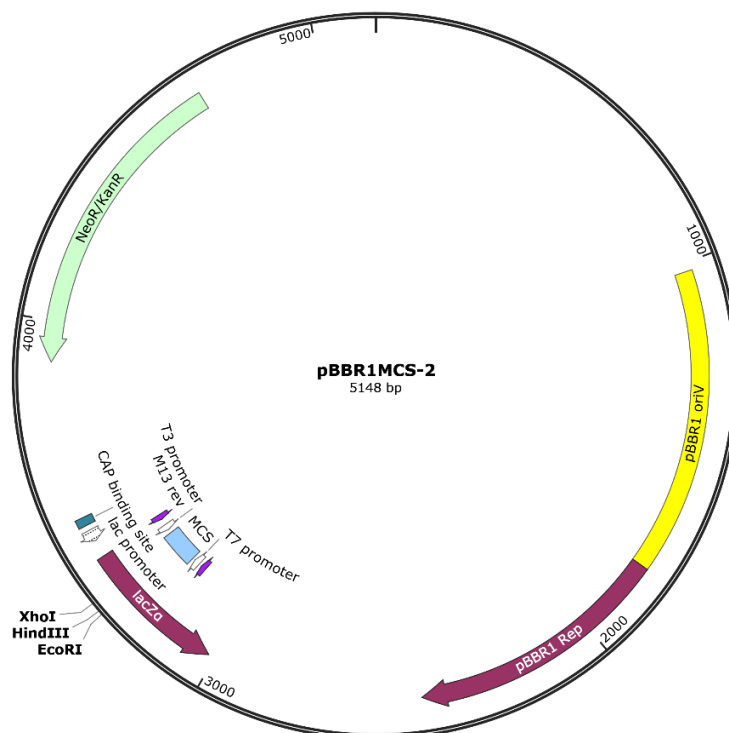


Figura A 3. Plásmido comercial de expresión pBBR1MCS-2.

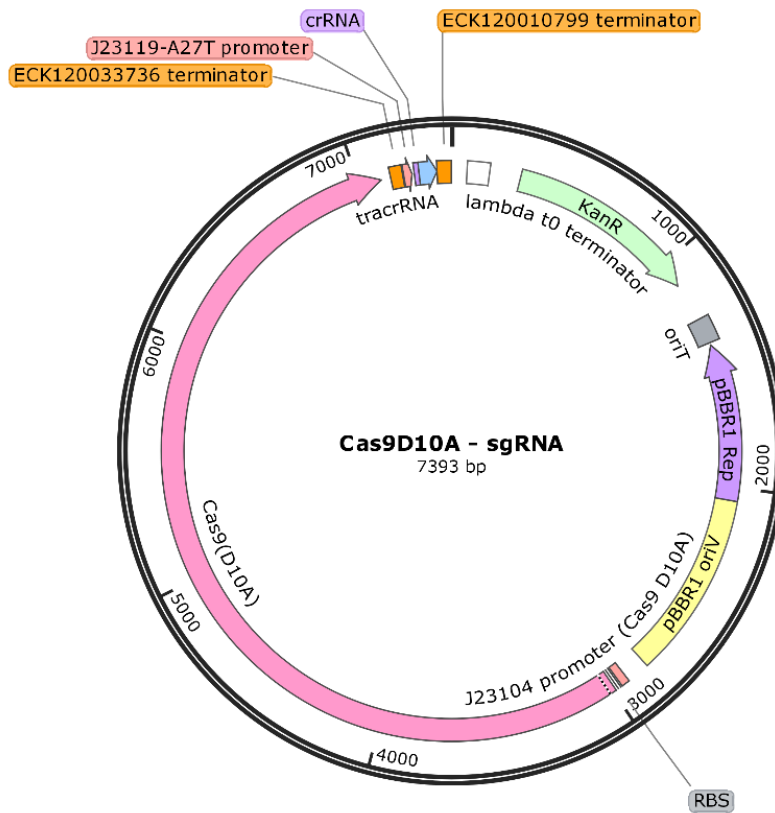


Figura A 4. Construcción del plásmido pSEVA231-CRISPR + el inserto de Cas9 D10A.

```

10  ATGATCAGAAGATCAGTGTGCTCAGAGAAAGTGGCTGGGCGGCCTTCAGCGCATTGTGGCAGGCTGCGCGG 79
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
3320 ATGATCAGAAGATCAGTGTGCTCAGAGAAAGTGGCTGGGCGGCCTTCAGCGCATTGTGGCAGGCTGCGCGG 3389

80  CGGTCATCTTCATTGGTATAGGCCACGAGATAGTAACGCTTGCCGTTGCTGTTGAAGAAGCCGGCGGTGC 149
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
3390 CGGTCATCTTCATTGGTATAGGCCACGAGATAGTAACGCTTGCCGTTGCTGTTGAAGAAGCCGGCGGTGC 3459

150  CGAGAGCATAGTCGTCATTGCCGACCCTGTTTCGGTGGCCTTGACTTCTCGCTCAGGCCATACAGAGC 219
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
3460 CGAGAGCATAGTCGTCATTGCCGACCCTGTTTCGGTGGCCTTGACTTCTCGCTCAGGCCATACAGAGC 3529

220  CGGATTGCCTTCGTCGTAGGACAGATACTGCAGTTCGATGCAGTAGTTCATGATTCTGCGAGGTTGGCG 289
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
3530 CGGATTGCCTTCGTCGTAGGACAGATACTGCAGTTCGATGCAGTAGTTCATGATTCTGCGAGGTTGGCG 3599

290  GGAGAAACGCCTGTGAAATCCTTGCCTGGCGTGCCTGAAACGGCTGGCGGGCGGCGGGTACTGTTCCCT 359
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
3600 GGAGAAACGCCTGTGAAATCCTTGCCTGGCGTGCCTGAAACGGCTGGCGGGCGGCGGGTACTGTTCCCT 3669

360  GTGCCAGAGCGGGCCGACGAAACCATACCGAGGCCAACTACGAGGCCAAGAGCGGGCACGATACGACGAAA 429
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
3670 GTGCCAGAGCGGGCCGACGAAACCATACCGAGGCCAACTACGAGGCCAAGAGCGGGCACGATACGACGAAA 3739

430  CATGGACGGTATCCTCTCGAGGGGGGGGCCGGTACCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCG 499
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
3740 CATGGACGGTATCCTCTCGAGGGGGGGGCCGGTACCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCG 3809

```

Figura A 5. Alineamiento de la secuenciación con la secuencia teórica de pBBR-adhS.

```

500  CGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACA 569
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
3810 CGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACA 3879

570  TACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTT 639
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
3880 TACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTT 3949

640  GCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCG 709
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
3950 GCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCG 4019

710  GGGAGAGGCGGTTTGCATATTGGGCGCATGCATAAAAAGTGTGTAATTCATTAAGCATTCTGCCGACAT 779
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
4020 GGGAGAGGCGGTTTGCATATTGGGCGCATGCATAAAAAGTGTGTAATTCATTAAGCATTCTGCCGACAT 4089

780  GGAAGCCATCACAACGGCATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTGCGCTTGCGTATA 849
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
4090 GGAAGCCATCACAACGGCATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTGCGCTTGCGTATA 4159

850  ATATTTGCCCATGGGGGTGGGCGAAGAAGTCCAGCATGAGATCCCCGCGCTGGAGGATCATCCAGCCGGC 919
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
4160 ATATTTGCCCATGGGGGTGGGCGAAGAAGTCCAGCATGAGATCCCCGCGCTGGAGGATCATCCAGCCGGC 4229

920  GTCCCGGAAAACGATTCCGAAGCCCAACCTTTCATAGAAGGCGGCGGTGGAATCGAAATCTCGTGATGGC 989
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
4230 GTCCCGGAAAACGATTCCGAAGCCCAACCTTTCATAGAAGGCGGCGGTGGAATCGAAATCTCGTGATGGC 4299

```

Figura A 6. Alineamiento de la secuenciación con la secuencia teórica de pBBR-adhS (cont.).

```

990  AGGTTGGGCGTCGCTTGGTCGGTCATTTCTGAACCCAGAGTCCCCTCAGAAGAAGGCG 1059
    |||
4300 AGGTTGGGCGTCGCTTGGTCGGTCATTTCTGAACCCAGAGTCCCCTCAGAAGAAGGCG 4369

1060 ATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTCAGCCATTG 1129
    |||
4370 ATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTCAGCCATTG 4439

1130 CCGCCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCAACGCTTTGTCCGGAAAGCGGTCGGCC-CACCCAGC 1198
    |||
4440 CCGCCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCCTGATAGCGGTCGGCCACA-CCCAGC 4508

1199 CGG-CACAGTCCATGAATCCA-AAAAGCGGCCTTTTTCC-CCCTGAATTTCCG-AAGACGGGATCCCCAT 1264
    |||
4509 CGGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCAT 4578

1265 GGGTCCAAAAAATC--CCCCGCTCGGGGATGCCCCCTTTGA---CGGGGAAAATTTGGG--GGGGCG 1327
    |||
4579 GGGTCACGACGAGATCCTCGCCG-TCGGGCATGCGCGCC-TTGAGCCTGGCGAACAGTTTCGGCTGGCGCG 4646

1328 A--CCCCGA--GTTTTTTTCCAAA 1347
    |
4647 AGCCCTGATGCTCTTCGTCCAGA 4670

```

Figura A 7. Alineamiento de la secuenciación con la secuencia teórica de pBBR-adhS (cont.).