



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**“OBTENCIÓN DE CEPAS MUTANTES DE
Escherichia coli SOBREPRODUCTORAS DE
HIDRÓGENO A PARTIR DE LACTOSUERO”**

Tesis que presenta

Luis Manuel Rosales Colunga

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Directores de la Tesis:

Dr. Antonio De León Rodríguez

Dr. Elías Razo Flores

San Luis Potosí, S.L.P., julio de 2007



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**OBTENCIÓN DE CEPAS MUTANTES DE *Escherichia coli* SOBREPRODUCTORAS DE HIDRÓGENO A PARTIR DE LACTOSUERO**" presentada para obtener el Grado de de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Luis Manuel Rosales Colunga** y aprobada el **10 de julio de 2007** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Antonio De León Rodríguez
(Director de la tesis)

Dr. Elías Razo Flores
(Codirector de la tesis)

Dra. Irene Castaño Navarro
(Asesor de la tesis)

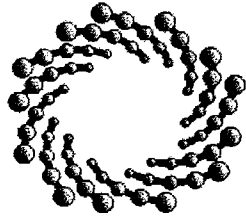
Dr. Felipe Alatraste Mondragón
(Asesor de la tesis)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de los doctores Antonio De León Rodríguez y Elías Razo Flores.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-201843). Así como apoyo financiero para la elaboración de los experimentos, obtenido a través del proyecto Fondos Mixtos-CONACYT FMSP-2005-C01-23 concedido al Dr. Elías Razo Flores.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 037 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 10 días del mes de julio del año 2007, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Antonio De León Rodríguez	Presidente	IPICYT
Dr. Elías Razo Flores	Secretario	IPICYT
Dr. Felipe Alátriste Mondragón	Sinodal	IPICYT
Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Luis Manuel Rosales Colunga

sobre la Tesis intitulada:

Obtención de Cepas Mutantes de Escherichia coli Sobreproductoras de Hidrógeno a Partir de Lactosuero

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Antonio De León Rodríguez
Dr. Elías Razo Flores

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 19:10 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 10 días del mes julio de 2007.

L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedico esta tesis con cariño para:

Mis abuelos Teodoro (†) y Amparo (†)
Mi mamá Amparo, Pacho, Enrique y Yucana.

Gracias por su apoyo.

Agradecimientos

A los doctores Antonio, Elías, Irene y Felipe por su dirección y asesoría.

A mis compañeros de laboratorio Nahomy, Faby, Ara, Hera, Teresita, Emilio, Víctor, Jacinto, Juan Antonio y Sergio por sus comentarios y compañerismo.

A Gabriel y Gus por sus comentarios y asesoría

A Adelfo Escalante por sus comentarios

Al IPICyT Y CONACYT

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de Figuras	viii
Lista de Tablas	ix
Anexos	x
Resumen	xi
Abstract	xii
1. Antecedentes	1
1.1 El hidrógeno como fuente de energía	1
1.2. Producción biológica de hidrógeno	3
1.3 Bases moleculares de la producción de hidrógeno en <i>Escherichia coli</i>	4
1.4. Microorganismos modificados genéticamente para aumentar la producción de hidrógeno	7
1.5 Sustratos para la producción de biohidrógeno	9
1.5.1 El lactosuero como sustrato	10
1.5.2 Metabolismo de lactosa en <i>E. coli</i>	11
2. Objetivos y justificación	13
3. Materiales y métodos	14
3.1 Estrategia experimental	14
3.2 Cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados	15
3.3 Condiciones de PCR	16
3.4 Inactivación de genes cromosomales	17
3.4.1 Eliminación de la resistencia a antibiótico	19
3.5 Evaluación de la producción de hidrógeno	20
4. Resultados y discusión	23
4.1 Obtención de cepas mutantes	23
4.2 Producción de hidrógeno por las cepas mutantes	27
4.3 Obtención de la doble mutante	30
4.4 Producción de hidrógeno a partir de lactosuero	31
5. Conclusiones y perspectivas	35
Referencias	37
Anexos	40

Lista de Figuras

Figura. 1 Esquema de las rutas metabólicas del piruvato y formiato en <i>E. coli</i> .	4
Figura 2. Esquema del regulón de formiato.	6
Figura 3. Modelo de la regulación de la transcripción del operón <i>lac</i> .	12
Figura 4. Inactivación de genes cromosomales con productos de PCR.	17
Figura 5. Cultivos tipo lote utilizados para la producción de hidrógeno.	20
Figura 6. Cuantificación del volumen de gas producido por los cultivos.	21
Figura 7. Plásmido pKD46.	23
Figura 8. Patrón de restricción de los plásmidos utilizados.	24
Figura 9. Plásmido pKD3.	25
Figura 10. Producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos HYCF y HYCR.	25
Figura 11. Productos de PCR de colonia de las cepas silvestre (WT) y mutante <i>hycA</i> ⁻ (EDH) de <i>E. coli</i> W3110.	26
Figura 12. Productos de PCR de colonia de las cepas silvestre (WT) y mutante <i>tatC</i> ⁻ (EDT) de <i>E. coli</i> W3110.	27
Figura 13. Producción de hidrógeno por las cepas de <i>E. coli</i> W3110 silvestre (WT) y mutantes EDH y EDT a partir de ácido fórmico.	28
Figura 14. Productos de PCR para confirmar la eliminación de la resistencia a antibiótico.	30
Figura 15. Producción de hidrógeno a partir de suero de leche por las cepas WT y mutantes EDH, EDT y EDHL.	31

Lista de Tablas

Tabla 1. Características de los métodos de producción de hidrógeno.	2
Tabla 2 Cepas plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este trabajo.	15

Anexos

A. Soluciones.	40
B. Medios de cultivo.	41
C. Técnicas.	42

Resumen

OBTENCIÓN DE CEPAS MUTANTES DE *Escherichia coli* SOBREPRODUCTORAS DE HIDRÓGENO A PARTIR DE LACTOSUERO.

PALABRAS CLAVE: Biohidrógeno, regulón de formiato, *Escherichia coli* W3110

Los problemas causados por la contaminación ambiental y la disminución de las reservas de petróleo han conducido a la búsqueda de nuevas fuentes energéticas que permitan un desarrollo sustentable. El hidrógeno es una alternativa con amplio potencial ya que se puede utilizar en celdas de combustible y solo genera calor y vapor de agua como subproducto. La producción biológica de hidrógeno (biohidrógeno) presenta algunas ventajas respecto a las formas convencionales de obtención, debido a que se lleva a cabo a temperatura ambiente, bajas presiones y se puede acoplar a la utilización de residuos orgánicos. El objetivo de este trabajo es la construcción y uso de cepas de *E. coli* manipuladas genéticamente para realizar la fermentación anaerobia de lactosuero (subproducto de la industria de lácteos) y obtener como producto principal hidrógeno molecular.

Para obtener cepas mutantes sobreproductoras de hidrógeno se realizó la remoción de los genes *hycA* y *tatC*. El gen *hycA*, codifica para el regulador negativo del operón del formiato y el producto del gen *tatC*, tiene un papel fundamental en la vía Tat del transporte de formiato deshidrogenasas e hidrogenasas que compiten por los electrones que darían origen a hidrógeno molecular. También se obtuvo una cepa doble mutante $\Delta hycA$, $\Delta lacI$, éste último gen codifica para la proteína represora del operón de lactosa, por lo tanto, en una mutante que carece de este gen, la expresión del operón *lac* se vuelve constitutiva. La ausencia de los genes *hycA* y *lacI*, permitió que se incrementara la cantidad y la velocidad de producción de hidrógeno a partir de lactosuero.

Abstract

CONSTRUCTION OF A HYDROGEN OVERPRODUCER *Escherichia coli* MUTANT STRAINS USING CHEESE WHEY AS SUBSTRATE

KEY WORDS: Biohydrogen, formate regulon, *Escherichia coli* W3110

Problems caused by environmental pollution and the decrease of the fossil fuels reserves have led to the search of new sustainable energy sources. Hydrogen is a promising option since its utilization in fuel cells produces pure water and energy. Biological hydrogen production (biohydrogen) is a more advantageous alternative than the conventional methods. This is because the biological processes are carried out at ambient temperature and pressure, and organic residues can be used for hydrogen production. The aim of this work is the construction of *E. coli* mutant strains that can use the cheese whey (by-product of the cheese production) as substrate to produce hydrogen.

In order to obtain overproducer mutant strains, we knocked-out the *hycA* and *tatC* genes. The *hycA* gene encodes for the repressor of the formate operon. The *tatC* gene encodes for a protein that is involved in the transport of respiratory hydrogenases and formate dehydrogenases by Tat translocation pathway. We also constructed a double mutant strain that had *hycA* and *lacI* genes deleted. The *lacI* gene encodes the *lac* operon repressor and its deletion leads to the constitutive expression of the *lac* operon. Both the hydrogen production and rate were increased in the mutant strain $\Delta hycA \Delta lacI$ using cheese whey.

1. ANTECEDENTES

1.1 EL HIDRÓGENO COMO FUENTE DE ENERGÍA

Los problemas de energéticos, el desarrollo y el cambio climático, se encuentran estrechamente relacionados, ya que el desarrollo está basado en la energía proveniente de los combustibles fósiles. El resultado de esta dependencia energética es el incremento de la concentración de dióxido de carbono en la atmósfera. Los niveles actuales de dióxido de carbono, metano y óxido nitroso, son los más altos en 650 000 años (1,2). Este aumento de la concentración de dióxido de carbono en la atmósfera es considerado la causa principal del calentamiento global y está asociado al cambio climático. Por otro lado el rápido decremento de las reservas de combustibles fósiles nos puede conducir a una crisis energética mundial en un futuro cercano (3). Ante esta problemática, resulta de vital importancia la búsqueda urgente de nuevas fuentes energéticas que permitan un desarrollo sustentable sin afectar al medio ambiente.

Entre las fuentes de energía alterna, el hidrógeno destaca porque su combustión sólo genera calor y vapor de agua. Además puede utilizarse en celdas de combustible para generar electricidad (4). A pesar de que es el elemento más abundante en el universo, no se encuentra en su forma molecular en la naturaleza. Por lo tanto, los métodos de producción de hidrógeno están basados en la separación de este a partir de materias primas que lo contienen. El método de obtención más común en la actualidad es el reformado del gas natural, el cuál además de utilizar como materia prima un combustible fósil, es un proceso que requiere altas temperaturas y genera

dióxido de carbono. Los métodos de obtención de hidrógeno, y algunas de sus características se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de los métodos de producción de hidrógeno.

Método	Proceso	Materia Prima	Energía	Emisiones
Térmico	Reformado	Gas Natural	Vapor a altas temperaturas	CO ₂
	Hidrólisis Termoquímica	Agua	Calor a partir de Energía Nuclear	-----
	Gasificación	Carbón, Biomasa	Vapor, Oxígeno, Calor, Presión	CO, CO ₂
	Pirólisis	Biomasa	Vapor, Temperatura media	CO, CO ₂
Electro-químico	Electrólisis	Agua	Electricidad	Depende de la energía primaria
	Fotoelectroquímico	Agua	Luz Solar	-----
Biológico	Fotobiológico	Agua y algas	Luz Solar	-----
	Fermentación	Biomasa	Calor	CO ₂

Los procesos que generan energía a partir de biomasa, son tecnologías que no dañan el medio ambiente ya que la biomasa (celulosa, paja, madera) está incluida en el ciclo global del carbono de la biosfera (5). Los métodos biológicos de producción resultan atractivos, ya que se llevan a cabo a temperatura ambiente y baja presión y las emisiones producidas son menores. Otra de las ventajas de la producción biológica de hidrógeno es que puede ser acoplada a la utilización de residuos orgánicos. Debido a esta característica se aumenta el potencial económico de dicha producción.

1.2. PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE HIDRÓGENO

Entre los microorganismos capaces de producir hidrógeno (biohidrógeno) se encuentran anaerobios estrictos y facultativos, aerobios y bacterias fotosintéticas (5). Los procesos biológicos de producción de hidrógeno incluyen la biofotólisis directa e indirecta, la producción fotosintética y fermentación. La biofotólisis es el proceso en la cuál microalgas y cianobacterias descomponen el agua en hidrógeno y oxígeno en presencia de luz (6). La vía fermentativa de producción presenta algunas ventajas, ya que se lleva a cabo en ausencia de luz y se pueden utilizar una amplia variedad de sustratos como glucosa, sacarosa y lactosa.

La mayoría del hidrógeno producido en la biosfera involucra procesos de fermentación microbiana. La fermentación es un fenómeno ubicuo bajo condiciones anóxicas o anaeróbicas. Cuando el crecimiento bacteriano se lleva a cabo a partir de sustratos orgánicos, estos sustratos son oxidados para proporcionar los elementos y la energía necesarios para el crecimiento. Esta oxidación genera electrones que necesitan ser utilizados para mantener la neutralidad eléctrica. En ambientes aeróbicos el oxígeno es reducido para obtener agua como producto. En condiciones anaeróbicas se necesitan otros compuestos para actuar como aceptores de electrones, los cuales son reducidos a H₂ (6). Entre los microorganismos capaces de realizar esta fermentación se encuentran las enterobacterias como *Escherichia coli*.

1.3 BASES MOLECULARES DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO EN *Escherichia coli*.

El sustrato para la generación de H_2 en *E. coli* y otras enterobacterias es el formiato, como se muestra en la Figura 1. En condiciones anaerobias parte del piruvato puede ser transformado a lactato por la lactato deshidrogenasa (LDH), pero la mayoría es hidrolizado por la piruvato formiato liasa (PFL) en acetil-CoA y formiato. Esta enzima sólo es activa en condiciones fermentativas, mientras que la piruvato deshidrogenasa (PDH) descarboxila el piruvato en condiciones aeróbicas. El acetil-CoA es parcialmente convertido en etanol y acetato. El formiato es el donador de electrones en el metabolismo anaerobio de reducción de nitratos o puede transformarse en hidrógeno por el complejo de la formiato-hidrógeno liasa (FHL).

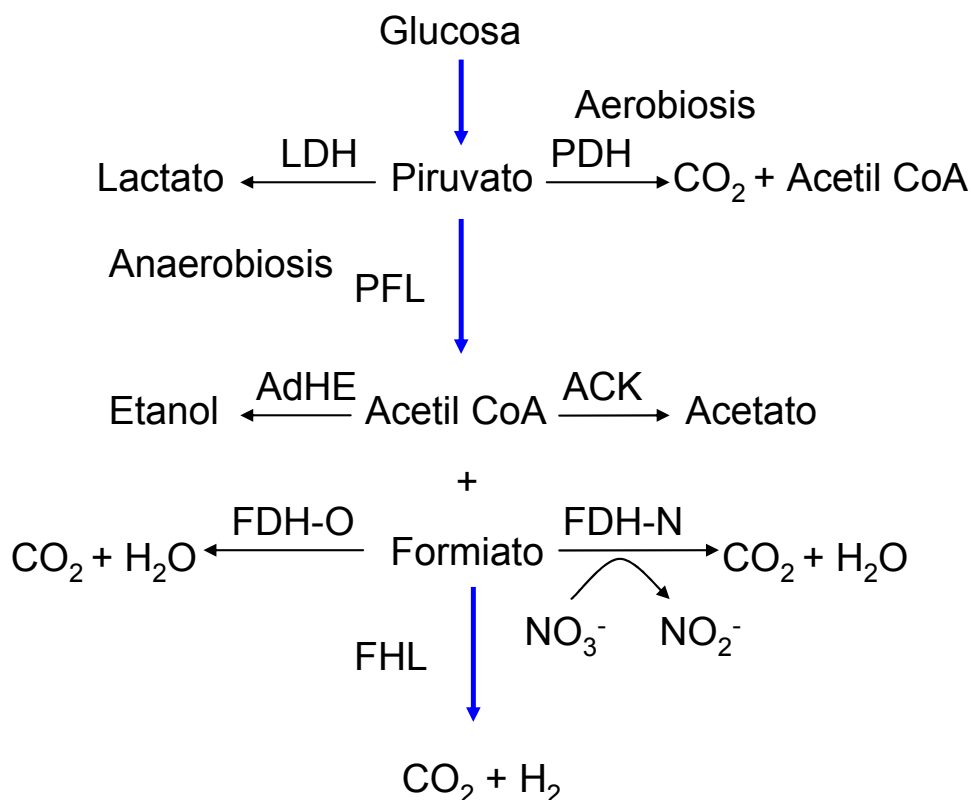


Figura. 1 Esquema de las rutas metabólicas del piruvato y formiato en *E. coli*.

En *E. coli* existen tres isoenzimas formiato deshidrogenasas (FDH) denominadas FDH-N, O y H. La enzima FDH-N acopla la oxidación del formiato a la reducción de nitratos y su síntesis se induce en anaerobiosis si hay nitratos presentes, mientras que la enzima FDH-O se induce en presencia de oxígeno o nitratos, sin embargo, estas enzimas no son capaces de producir hidrógeno. Las enzimas FDH-N, FDH-O y las hidrogenasas respiratorias 1 y 2 que consumen hidrógeno, se encuentran localizadas en el espacio periplásmico y son transportadas por la vía Tat de translocación de proteínas. En cepas mutantes defectivas de la vía Tat la producción de hidrógeno se incrementa debido a la ausencia de estas proteínas en el espacio periplásmico.

La FDH-H forma parte del complejo formiato-hidrógeno-liasa (FHL), el cual es el responsable de la producción de hidrógeno. La FHL es codificada por el gen *fdhF* y solo es sintetizada bajo condiciones fermentativas, su sitio activo está localizado en el lado citoplásmico de la membrana. El complejo FHL comprende siete proteínas, seis de las cuales están codificadas en el operón *hyc* (ver Figura 2), las proteínas HycB, C, D, F, G son componentes integrales de membrana y participan en el transporte de electrones, mientras que HycE es una de las tres hidrogenasas. A pesar de que FDH-H también forma parte de este complejo, esta proteína y HycE no se encuentran en la membrana citoplasmática (7).

El regulón de formiato también incluye al operón *hypA-E* y el operón *hydN-hypF* (ver Figura 2). Las proteínas HypA-E, HypF y Hycl se requieren para el ensamblaje del cofactor níquel-hierro y la maduración de hidrogenasas. La

proteína FhIA es el regulador positivo del regulón mientras que la proteína HycA es el regulador negativo.

La expresión de los genes del regulón de formiato es absolutamente dependiente de la presencia de formiato y su expresión se ve disminuida en presencia de aceptores de electrones externos como nitrato y oxígeno. Estos genes solo se pueden inducir a un pH menor de 7.0 (8).

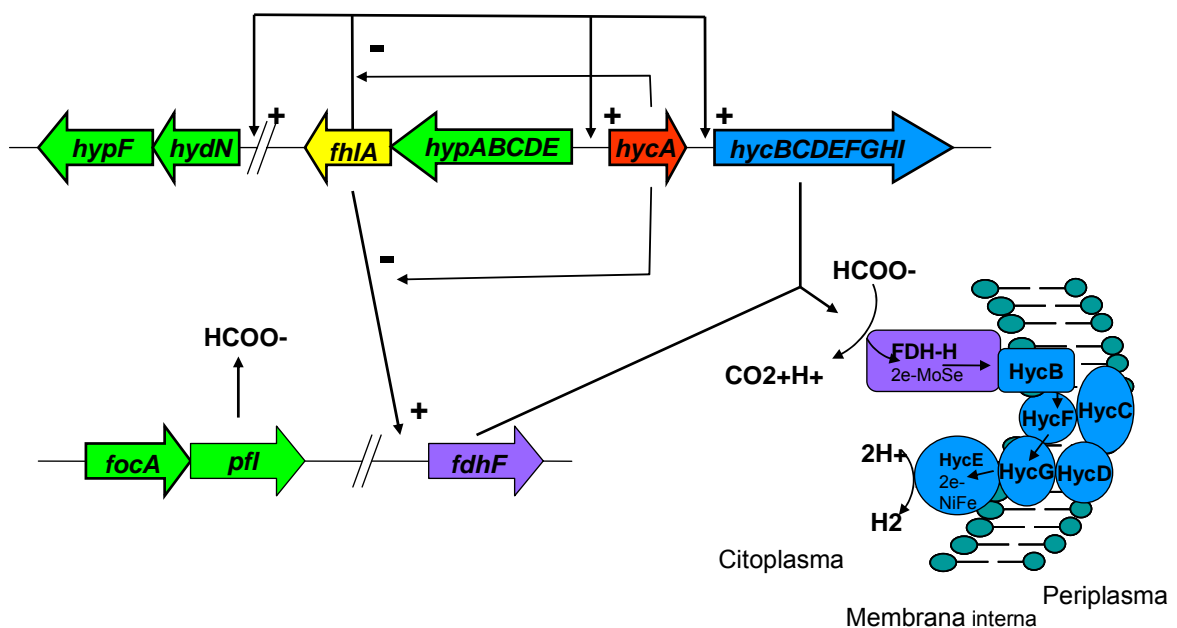


Figura 2. Esquema del regulón de formiato. Los genes u operones regulados positivamente a través de FhIA están marcados con +. El papel de HycA como anti-activador está marcado con -

La producción de hidrógeno es dependiente de varias condiciones fisiológicas. En anaerobiosis y en ausencia de aceptores de electrones externos, la enzima PFL se encuentra en su forma activa y el formiato comienza a acumularse dentro de la célula. Para prevenir la acidificación del citoplasma, el formiato es exportado por medio de la proteína FocA. Cuando se alcanza un pH de 6.8 en el medio de cultivo, el formiato es reimportado hasta alcanzar la concentración umbral (5mM) para unirse a la proteína FhIA. El complejo FhIA-formiato activa

la transcripción de los componentes del regulón, como consecuencia FDH-H y los otros componentes del complejo FHL se sintetizan, transformando el formiato a CO_2 y H_2 . La proteína HycA actúa como un anti-activador, ya que disminuye la actividad de FhIA, si el gen *hycA* es mutado, la actividad de FHL se incrementa al doble (8).

1.4. MICROORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE PARA AUMENTAR LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO.

Escherichia coli es el microorganismo más utilizado para llevar a cabo modificaciones genéticas que aumenten la producción de hidrógeno, debido a que tanto sus vías metabólicas como su genética son bien conocidas.

La cepa HD701, que es incapaz de producir el represor del complejo FHL (*hycA*), fue construida por Penfold y col. (9). En esta cepa se incrementó la producción de hidrógeno con respecto a la cepa silvestre MC4100. Sin embargo, esta cepa no es capaz de metabolizar lactosa.

Penfold y Macaskie (10) transformaron las cepas de *E. coli* HD701 ($\Delta hycA$) y FTD701 (HD701 con el gen *tatC* inactivado) con el plásmido pUR400, el cuál contiene los genes necesarios para transportar y metabolizar sacarosa. Las cepas que no fueron transformadas con el plásmido fueron incapaces de producir hidrógeno a partir de sacarosa, mientras que las cepas recombinantes produjeron 1.27 y 1.38 mL de hidrógeno/ mg de peso seco-L de cultivo.

Penfold y col. (11) reportaron que cepas MC4100 mutantes del sistema de transporte de proteínas TAT ($\Delta tatC$ y $\Delta tatA-E$), mostraron una producción de hidrógeno comparable a una cepa de *E. coli* $\Delta hycA$.

Mishra y col. (12) sobreexpresaron una Fe-hidrogenasa de *Enterobacter cloacae* en *E. coli* BL-21. La cepa no transformada fue incapaz de producir hidrógeno. Sin embargo, la cepa recombinante resultante tuvo la habilidad de producir hidrógeno, pero crece en un medio a base de lactosuero.

Yoshida y col. (13) construyeron una cepa de *E. coli* que sobreexpresa el complejo FHL combinando la inactivación del gen *hycA* con la sobreexpresión del gen *fhIA*. Con estas manipulaciones genéticas la producción de hidrógeno se incrementó 2.8 veces con respecto a la cepa silvestre.

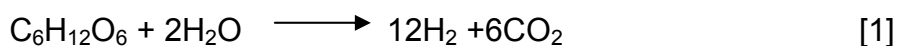
Bisaillon y col. (14) estudiaron el efecto de mutaciones en hidrogenasas consumidoras de hidrógeno, en el gen de lactato deshidrogenasa (*ldhA*) y *fhIA*, encontrando que cada mutación incrementó modestamente la producción de hidrógeno y que el efecto de dichas mutaciones fue sinérgico.

Además de las manipulaciones realizadas en *E. coli*, también se han publicado trabajos sobre bacterias Gram-positivas como *Clostridium* sp. en los que se hacen manipulaciones genéticas para aumentar la producción de biohidrógeno (15,16).

1.5 SUSTRATOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO

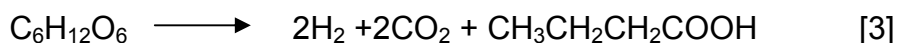
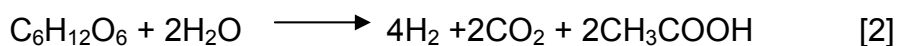
Los principales criterios para la selección de sustrato son: disponibilidad, costo, contenido de carbohidratos y biodegradabilidad. La glucosa, la sacarosa y en menor grado el almidón y la celulosa han sido ampliamente estudiados como sustratos para la producción de hidrógeno y se utilizan como sustratos modelo debido a que son fácilmente biodegradados y están presentes en diversas aguas residuales ricas en carbohidratos (5).

A partir de glucosa el rendimiento máximo teórico de producción de hidrógeno es de 12 moles de hidrógeno por mol de hexosa (Ecuación 1).



Esta reacción no genera la energía necesaria para el crecimiento microbiano (17).

El rendimiento máximo teórico cuando se obtiene acetato es de 4 moles de hidrógeno por mol de glucosa (Ecuación 2). Si se obtiene butirato (en el caso de bacterias Gram-positivas) o compuestos más reducidos como etanol o ácido láctico o propiónico, sólo se alcanza la mitad de este rendimiento (Ecuación 3).



Los rendimientos que se han alcanzado en procesos fermentativos son de 2 moles de hidrógeno por mol de glucosa y 4 moles a partir de sacarosa (5). Esta es la llamada barrera de la fermentación.

Los sustratos más adecuados para la generación de biohidrógeno son los azúcares simples como la glucosa, sacarosa o lactosa, pero debido al elevado costo de las fuentes puras de estos carbohidratos, se debe recurrir al uso de subproductos industriales como el lactosuero, de esta manera se genera energía a un menor costo al mismo tiempo que se da tratamiento a estos desechos industriales (18).

1.5.1 EL LACTOSUERO COMO SUSTRATO

El lactosuero se produce como residuo de la elaboración industrial del queso y representa del 80 al 90% del volumen total de leche procesada. En 1998 se produjeron alrededor de 137.9 millones de toneladas de lactosuero a nivel mundial (19). A pesar de que se emplea en suplementos de alimentación animal y humana, alrededor del 50% se desecha, y, debido a su alta carga orgánica susceptible de fermentación por microorganismos patógenos y ubicuos se convierte en un problema de contaminación (18).

El lactosuero es rico en lactosa, proteínas y minerales. Debido a que algunos microorganismos pueden utilizar la lactosa como fuente de carbono, se ha explorado el uso de este subproducto en procesos fermentativos (20 y 21).

1.5.2 METABOLISMO DE LACTOSA EN *E. coli*

La lactosa es degradada por la hidrólisis del enlace β (1-4) glucosídico por la enzima β -galactosidasa, produciendo β -D-glucosa y β -D-galactosa. Esta enzima también puede catalizar la conversión de lactosa a alolactosa por transglicosilación, y puede también hidrolizar a la alolactosa (22).

Las enzimas necesarias para metabolizar lactosa están codificadas en el operón *lac*. Este operón comprende los genes estructurales Z, Y, A. El gen *lacZ* codifica para la β -galactosidasa que cataliza la hidrólisis de la lactosa en glucosa más galactosa. El gen *lacY* codifica para la galactósido permeasa que transporta β -galactósidos al interior de la célula bacteriana. El gen *lacA* que codifica para la tiogalactósido transacetilasa; la función de ésta última enzima en el metabolismo de lactosa no se conoce claramente. Además de estos tres genes, el operón está compuesto por una región promotora, una región reguladora y el gen regulador *lacI* (Figura 3).

En *E. coli* el operón es inducible, de manera que en ausencia del inductor alolactosa, la proteína represora producto de *lacI* se encuentra unida a la región operadora e impide la unión de la RNA-polimerasa a la región promotora y, como consecuencia de ello, no se transcriben los genes estructurales (23). En cambio, la presencia del inductor ocasiona la transcripción de los genes estructurales, debido a que el inductor se une a la proteína reguladora impidiendo la unión de ésta a la región operadora, dejando libre el acceso de la RNA-polimerasa (Figura 3), de tal manera que una mutante defectiva del gen

lacI permitiría la transcripción de los genes del operón sin necesidad del inductor.

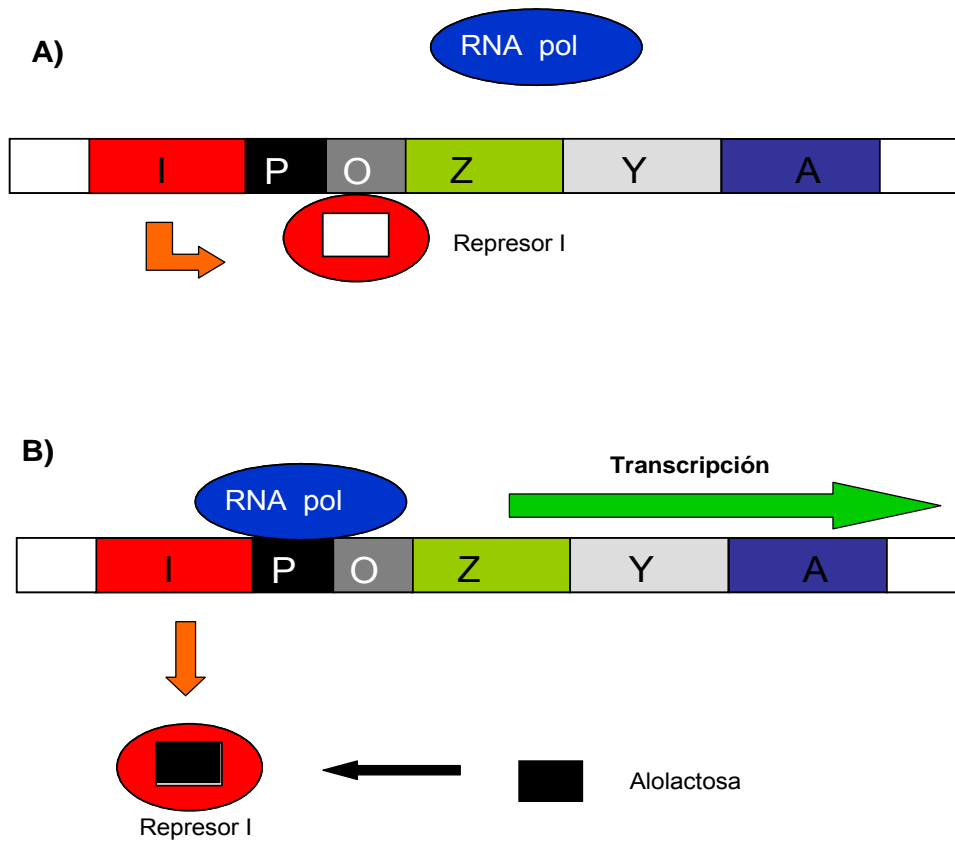


Figura 3. Modelo de la regulación de la transcripción del operón *lac* por el represor I. En A) sin presencia de alolactosa y B) en presencia del inductor alolactosa

La glucosa formada dentro de la célula es fosforilada por la glucocinasa para formar glucosa-6-fosfato y entrar a la vía glucolítica. La galactosa induce el regulón *gal* y las tres enzimas que se producen convierten la galactosa en glucosa-1-fosfato que a su vez es convertida a glucosa-6-fosfato por la fosfoglucomutasa.

2. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

OBJETIVO GENERAL

Obtener cepas mutantes de *Escherichia coli* capaces de sobreproducir hidrógeno a partir de lactosuero.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Generar mutantes de *Escherichia coli* W3110 $\Delta hycA$, $\Delta tatC$, $\Delta hycA \Delta lacI$.

Evaluar la producción de hidrógeno a partir de lactosuero utilizando las cepas obtenidas.

JUSTIFICACIÓN

La producción de biohidrógeno a partir de subproductos orgánicos tiene el potencial para competir con los métodos convencionales de producción de hidrógeno, mediante el uso de las herramientas de biología molecular se puede incrementar la producción de biohidrógeno y conseguir un mejor rendimiento a partir de subproductos orgánicos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para obtener cepas mutantes que sobreproduzcan hidrógeno a partir de lactosuero se siguieron dos estrategias: la primera consistió en la remoción de genes cuyos productos tienen un efecto negativo sobre la producción de hidrógeno, estos genes fueron *hycA* y *tatC*. El gen *hycA* produce el regulador negativo del operón del formiato y mutantes defectivas de este gen son cepas sobreproductoras de hidrógeno (9). Por otro lado, el producto del gen *tatC* tiene un papel fundamental en la vía Tat del transporte de proteínas. Entre las proteínas transportadas por vía Tat se encuentran las formiato deshidrogenasas N y O (FDH-N y FDH-O) e hidrogenasas 1 y 2, las cuales se encuentran en el espacio periplásmico y compiten por los electrones que darían origen a hidrógeno molecular. El complejo FHL también comprende una hidrogenasa (HycE o hidrogenasa 3) y a la isoenzima FDH-H. Estos componentes se encuentran en el citoplasma y por lo tanto no son transportados por vía Tat. Las cepas Tat^- presentan un fenotipo similar a las cepas $hycA^-$ en cuanto a la capacidad de sobreproducir hidrógeno (11).

Debido a que el sustrato que se utiliza en este trabajo es lactosuero, el cual es rico en lactosa, la segunda estrategia consistió en obtener una cepa doble mutante $\Delta hycA, \Delta lacI$. Este último gen codifica para la proteína represora del operón de lactosa, por lo tanto, una mutante defectiva expresa constitutivamente los genes del operón *lac*.

Una vez que se obtuvieron las cepas mutantes se evaluó el efecto que tienen las mutaciones sobre la producción de hidrógeno a partir de lactosuero.

3.2 CEPAS, PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS

En la Tabla 2 se enlistan las cepas, plásmidos y oligonucleótidos que se utilizaron en este trabajo. Se decidió trabajar con la cepa de *Escherichia coli* W3110 debido a que gracias a su genotipo (lac^+ , gal^+ , F^- , λ^- IN (rrnD-rrnE)1), es capaz de crecer en un medio a base de suero de leche (24).

Tabla 2 Cepas plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

	Nombre	Descripción (Genotipo) o secuencia 5´-3´
Cepa	WT	<i>Escherichia coli</i> W3110 (lac^+ , gal^+ , F^- , λ^- IN (rrnD-rrnE)1)
	EDH	WT $\Delta hycA$
	EDT	WT $\Delta tatC$
	EDHL	WT $\Delta hycA \Delta lacI$
Plásmido	pKD46	Plásmido de expresión del sistema de recombinación del fago λ (pBAD- λ -Red ($\gamma \beta$ <i>exo</i>) Ap^R)
	pKD3	Plásmido molde para amplificar el gen <i>cat</i> (<i>oriR6Kγ</i> , <i>bla</i> (Ap^R), <i>cat</i> , <i>rghB</i> (Ter))
	pCP20	Plásmido de expresión de la recombinasa FLP FLP^+ , λ cI857 $^+$, λp_R Rept ts , Ap^R , Cm^R
Oligonucleótidos	HYCF*	GCCTGCAAAACGGGCAAAGCCTCAGCTCATGCTGCCGGGCTT TGTCCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
	HYCR*	GCATCTCTGTAAACGGGTAACCTGACAATGACTATTTGGGAA ATAAGCGCATATGAATATCCTCCTTAG
	TATF†	ACAACCGCCCTGACGGGCGGTTGAATTTATTCTTCAGTTTTTTC GCTTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
	TATR†	CCCCTTCGTCGAGTGATAAACCGTAAACATGTCTGTAGAAGAT ACTCAACCATATGAATATCCTCCTTAG

* Oligonucleótidos para obtener un producto de PCR del gen *cat* con extremos homólogos a *hycA*

† Oligonucleótidos para obtener un producto de PCR del gen *cat* con extremos homólogos a *tatC*

LACF ^x	CTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGT CGGGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
LACR ^x	AGAGAGTCAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACCAGTAACGTTA TACGATGCATATGAATATCCTCCTTAG
OGHF ⁺	CACCAAGGCATTCTCAGG
OGHR ⁺	GTCGAAATGACACGTCGA
OGTF [‡]	GAAGTGGTCAAATTAACGCCG
OGTR [‡]	CGGTGGTAAAACCTGCTGCGG
OGLF [*]	CGCAGGCTATTCTGGTGGCCG
OGLR [*]	AGGGTTTTCCAGTCACGACG

^xOligonucleótidos para obtener un producto de PCR del gen *cat* con extremos homólogos a *lacI*

⁺Oligonucleótidos para amplificar el gen *hycA* (flanquean al gen)

[‡]Oligonucleótidos para amplificar el gen *tatC* (flanquean al gen)

^{*}Oligonucleótidos para amplificar el gen *lacI* (flanquean al gen)

Las secuencias marcadas en negrita corresponden a la secuencia de homología con el gen blanco

3.3 Condiciones de PCR

Se trabajó con un volumen de reacción de 25 µL (16.75 µL de agua miliQ estéril, 2.5 µL de buffer 10x, 1 µL de mezcla de dNTP 10 mM, 1 µL de oligonucleótido 1 (10 pmoles / µL), 1 µL oligonucleótido 2 (10 pmoles / µL), 1 µL de DNA molde (10-50 ng), 1 µL de MgCl₂ 25 mM, 0.25 µL de *Taq* DNA polimerasa. La desnaturalización inicial se llevó a cabo a 94°C, durante 4 minutos, para después realizar 30 ciclos de amplificación, cada ciclo consistió en desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, alineamiento (52°C con los oligonucleótidos HYC, TAT y LAC, 54°C con los oligonucleótidos OGH y 57 °C para los oligonucleótidos OGT y OGL) durante 45 segundos y la extensión a

72°C durante 2 minutos. Posterior a los 30 ciclos se realizó una extensión final a 72°C durante 8 minutos.

3.4 INACTIVACIÓN DE GENES CROMOSOMALES

Para llevar a cabo la inactivación de los genes *hycA*, *tatC* y *lacI* se siguió el método descrito por Datsenko y Wanner (25). En la Figura 4 se esquematiza este procedimiento.

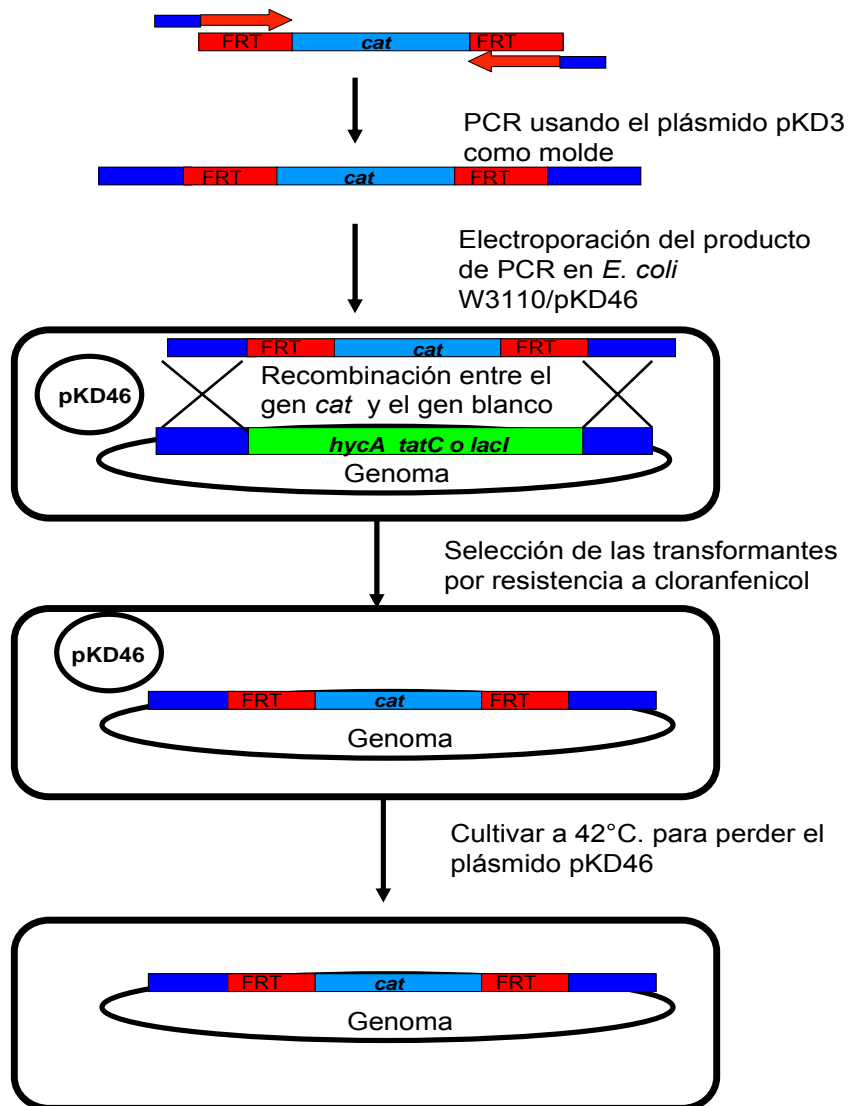


Figura 4. Inactivación de genes cromosomales con productos de PCR.

Las bacterias que fueron transformadas con el plásmido pKD46 fueron cultivadas en medio SOB con 200 µg/mL de ampicilina y L-arabinosa 1mM a 30°C con una agitación de 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 600nm. Posteriormente, estas células se hicieron electrocompetentes concentrándolas por centrifugación y lavándolas tres veces con una solución fría de glicerol al 10% estéril. Los productos de las reacciones de PCR que comprenden al gen *cat* flanqueado por regiones homologas al gen blanco se concentraron, se purificaron con el kit “*gel extraction (Qiagen)*” y se suspendieron en agua para posteriormente transformar las células electrocompetentes con estos productos de PCR. Se añaden 900 µL de medio SOC a las células electroporadas y se incuban de 3 a 4 horas a 30 °C, se toman 200 µL de cultivo y se siembran en placas de LB sólido con 25 µg/mL de cloranfenicol durante 24 horas a 37 °C; si después de éste tiempo no ha crecido ninguna colonia, el resto del cultivo, que se mantuvo a temperatura ambiente y sin agitación, se siembra y se incuba nuevamente.

Con ayuda de las proteínas Gam, Bet y Exo, codificadas por el plásmido pKD46, se lleva a cabo una doble recombinación homóloga sustituyendo el gen blanco (en este caso *hycA*, *tatC* o *lacI*) por el gen de resistencia a cloranfenicol. De esta manera las colonias transformantes pueden ser seleccionadas con éste antibiótico.

Las colonias resistentes a cloranfenicol son verificadas mediante PCR de colonia para evaluar que efectivamente se llevó a cabo la remoción de los genes blanco. Utilizando distintas parejas de oligonucleótidos es posible

comprobar que el gen blanco ha sido sustituido por el gen de resistencia a antibiótico

Para eliminar al plásmido termosensible pKD46 se toman varias colonias y se siembran por estría en placas de LB sólido sin antibiótico y se cultivan a 42°C durante 24 horas. Posteriormente se estrían por duplicado en placas de LB sólido sin antibiótico y con ampicilina, para seleccionar las colonias sensibles a ampicilina ya que han perdido el plásmido.

3.4.1 ELIMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICO

Una vez comprobada la mutación por medio de PCR, la resistencia a cloranfenicol puede ser removida del cromosoma utilizando el plásmido pCP20 (26), ya que este plásmido codifica para la recombinasa FLP inducible por temperatura y el gen *cat* esta flanqueado por regiones FRT. Las células se transforman por electroporación con el plásmido pCP20. Las transformantes se seleccionan en placas de LB sólido con ampicilina y cloranfenicol a 30 °C. Se toman 1 ó 2 de estas colonias y se cultivan en medio LB líquido a 42°C durante toda la noche. Se hace una dilución 1:1000 de este cultivo y se toma una alícuota que se siembra en LB sólido sin antibiótico. Algunas de estas colonias se estrían por triplicado en placas de LB sólido sin antibiótico, con cloranfenicol y con ampicilina, la mayoría de las células pierden simultáneamente la resistencia a cloranfenicol flanqueada por los sitios FRT y el plásmido pCP20. Las colonias sensibles a ambos antibióticos son verificadas por PCR para comprobar la ausencia del gen de resistencia a cloranfenicol y del gen original.

3.5 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO

Las células se cultivaron en 5 ml de medio LB durante toda la noche, este cultivo se añade a 900 mL de medio LB fresco y se cultivan en frascos cerrados durante 48 horas a 37° C, agitando a 200 rpm. Después de 48 horas de cultivo, las células se concentran por centrifugación y se ajustan a una densidad óptica de 1.5 a 600nm con PBS pH 6.8 (0.8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 1.43 g/L Na₂HPO₄ y 0.2 g/L KH₂PO₄) (9) adicionado con elementos traza (descrito en el anexo A), resazurina como indicador, y el sustrato que se va a emplear para la fermentación. Se toman 110 mL de estos cultivos y se colocan en botellas serológicas de 120 mL selladas con tapones de hule y anillos de aluminio, para dejar un espacio de cabeza de 10 mL (Figura 5).



Figura 5. Cultivos tipo lote utilizados para la producción de hidrógeno por cepas mutantes de *E. coli* W3110.

Las botellas son burbujeadas con nitrógeno hasta que la suspensión pierde el color rosáceo de la resazurina indicando que el cultivo alcanzó las condiciones anaerobias. Las botellas se conservan a una temperatura de 37°C agitándose a 200 rpm.

Para cuantificar el volumen de gas que producen los cultivos se introduce una aguja en el tapón de la botella serológica, esta aguja está conectada por medio de una manguera a una bureta invertida llena de agua acidificada. El volumen de agua desplazado corresponde al volumen de gas producido (Figura 6)

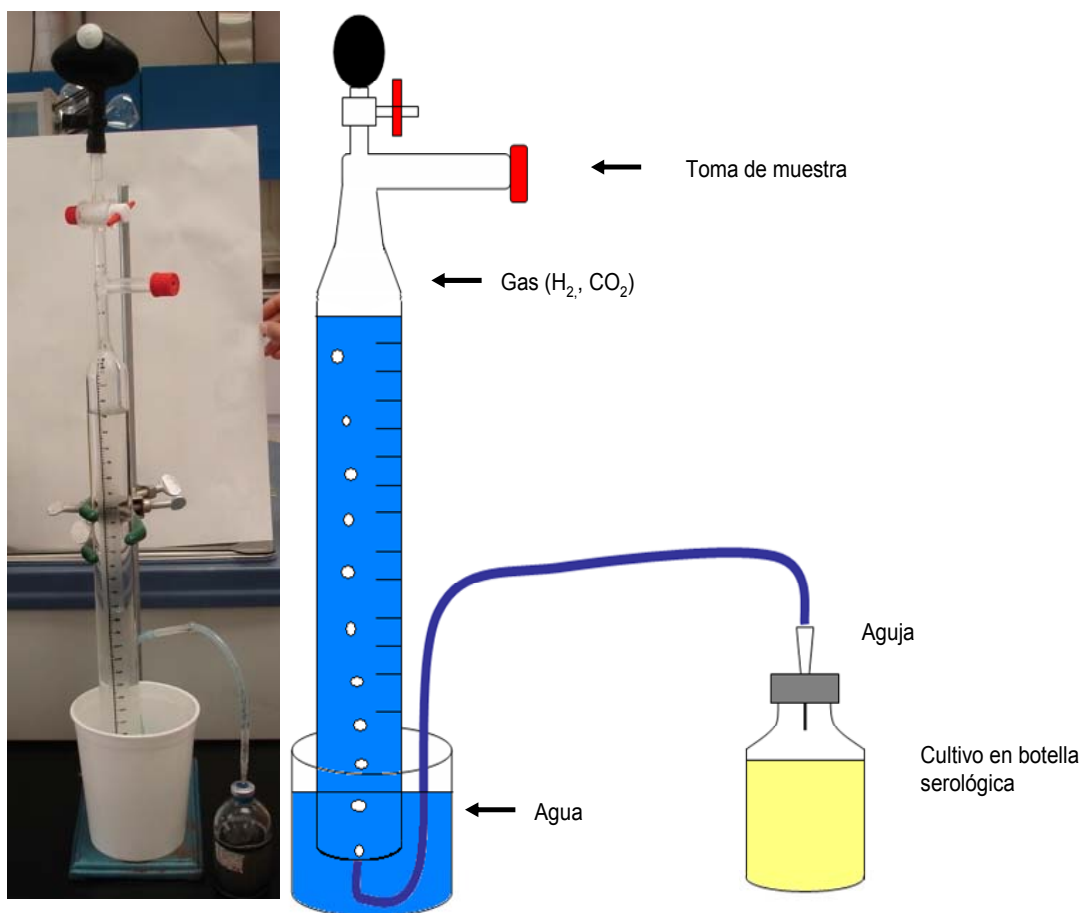


Figura 6. Cuantificación del volumen de gas producido por los cultivos.

La proporción de hidrógeno presente en el gas se determinó periódicamente utilizando una jeringa Pressure-Lok de 1.0 mL (Valco Instruments), comparando una muestra de gas de 300 μ L contra estándares cromatográficos (Alltech). Para ello se usó un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies

6890N) equipado con un detector de conductividad térmica y una columna de 30 m, empacada con el polímero HayeSep D (Alltech). Se usó nitrógeno como gas acarreador a un flujo de 12.0 ml/min, las temperaturas de operación del inyector y detector fueron de 250°C y la del horno de 60°C.

A partir del área (A) de los picos obtenidos por el cromatógrafo de gases, se determinan los micromoles de H₂ y CO₂ con las siguientes fórmulas

$$\text{Micromoles de H}_2 = 0.000252(A) + 0.3782 \quad [4]$$

$$\text{Micromoles de CO}_2 = 0.0064(A) + 0.6948 \quad [5]$$

Para determinar el volumen de hidrógeno en mL se determina el porcentaje de micromoles de hidrógeno respecto a los micromoles totales y se relaciona con los mL de gas producido.

La determinación del volumen de hidrógeno en mL a los distintos tiempos se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen de H}_2 \text{ a } t=i \quad (V_{H_2 \ t=i}) = VG \cdot CH_i + VH \cdot (CH_i - CH_{i-1}) \quad [6]$$

VG=Volumen desplazado (mL)

CH_i=Concentración de H₂ a tiempo=i

CH_{i-1}=Concentración de H₂ a tiempo=i-1

VH=Volumen del espacio de cabeza (mL)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 OBTENCIÓN DE CEPAS MUTANTES

Para que se lleve a cabo la inactivación de los genes cromosomales se transformó la cepa de *Escherichia coli* W3110 con el plásmido pKD46 (Figura 7), este plásmido contiene los genes γ , β y *exo* bajo el control de un promotor inducible por L-arabinosa. Los productos de estos genes son Gam, Bet y Exo respectivamente. La función de Gam es la de inhibir a la exonucleasa V, de esta manera se evita que el producto de PCR (DNA lineal) con el que se transforman las células sea degradado, mientras que Bet y Exo promueven la recombinación homóloga.

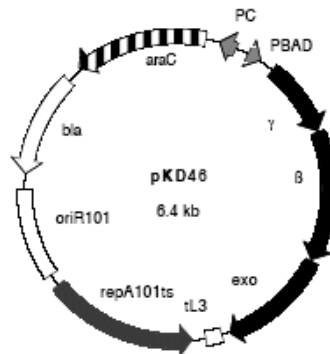


Figura 7. Plásmido pKD46, plásmido de expresión de proteínas que ayudan a que se lleve a cabo la inactivación de genes.

El plásmido pKD46 también contiene el gen de resistencia a ampicilina. Después de la electroporación se seleccionaron algunas colonias resistentes a este antibiótico y se les extrajo el plásmido. Para comprobación dicho plásmido se digiere con *EcoRI*. En la Figura 8 se observa el patrón de restricción del plásmido, con esta enzima se generan dos fragmentos uno de 4.8 Kpb y otro

de 1.5 Kpb confirmando de ésta manera la presencia de este plásmido en *E. coli* W3110.

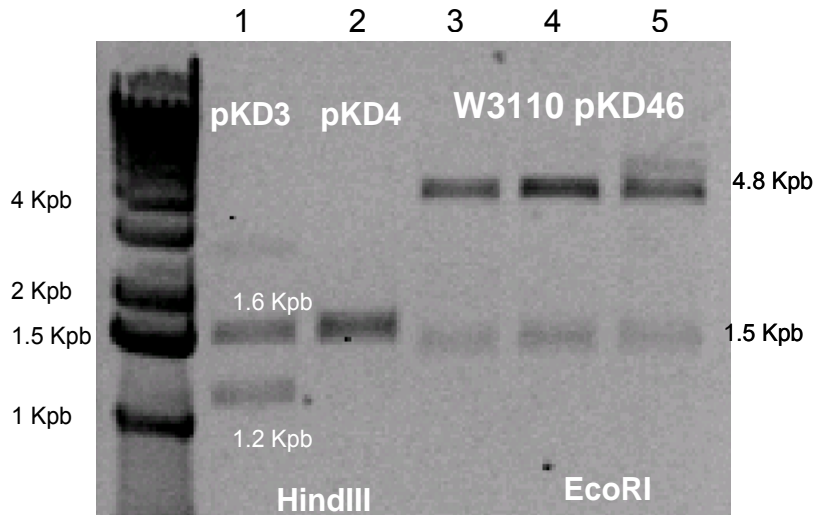


Figura 8. Patrón de restricción de los plásmidos utilizados, en el carril 1 se muestra la digestión del plásmido pKD3 con *HindIII*, generando fragmentos de 1.6 y 1.2 Kpb. En los carriles 3, 4, 5 se muestra la digestión del plásmido pKD46 con *EcoRI*, los fragmentos de 4.8 y 1.5 Kpb confirman la presencia de éste plásmido en *E. coli*

Para obtener los productos de PCR con los cuales se va a transformar *E. coli* W3110/pKD46 se utilizó como molde el plásmido pKD3 (Figura 9) y los oligonucleótidos HYCF y HYCR para realizar el knock-out de *hycA* y los oligonucleótidos TATF y TATR en el caso de *tatC*. Los oligonucleótidos están diseñados para amplificar el gen *cat*, (que codifica para la enzima cloranfenicol acetiltransferasa y confiere resistencia a cloranfenicol), y las regiones FRT adyacentes. Además estos oligonucleótidos presentan en sus extremos 5' regiones de homología (48-50 nt) a las regiones que flanquean al gen blanco.

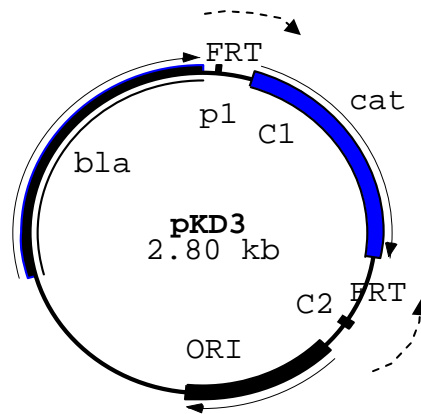


Figura 9. Plásmido pKD3 que contiene los genes de resistencia a ampicilina (*bla*) y cloranfenicol (*cat*). El gen *cat* esta flanqueado por sitios FRT. Las flechas ---- representan los oligonucleótidos utilizados para la amplificación.

De acuerdo a este diseño de oligonucleótidos, con el par HYCF y HYCR se obtiene un producto de PCR de 1100 pb de longitud y comprende al gen *cat* y los sitios FRT flanqueados por extremos homólogos a las regiones adyacentes al gen *hycA*. En la Figura 10 se muestra el producto de la reacción de PCR utilizando estos oligonucleótidos.

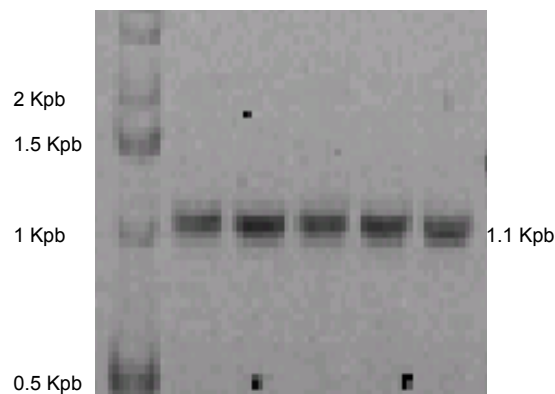


Figura 10. Producto de cinco reacciones de PCR obtenidos con los oligonucleótidos HYCF y HYCR, utilizando como molde el plásmido pKD3.

Para inactivar el gen *tatC* se sigue el mismo procedimiento anterior, pero utilizando el par TATF y TATR se obtiene un producto de la misma longitud, la diferencia radica en que ahora dicho producto es el gen *cat* flanqueado por extremos homólogos a regiones adyacentes al gen *tatC*.

Los productos de PCR obtenidos se electroporaron en *E. coli* W3110/pKD46 para que se lleve a cabo la inactivación de los genes blanco.

De acuerdo al método descrito para realizar la remoción de los genes blanco, las colonias en donde se llevó a cabo exitosamente la recombinación se pueden seleccionar por resistencia a cloranfenicol. Para comprobar que el gen blanco ya no está presente, se tomaron algunas de las colonias que crecieron en cloranfenicol y se evaluaron por PCR de colonia con oligonucleótidos que flanquean a el gen *hycA* (par OGHF y OGHR), *tatC* (par OGTF y OGTR) y para el gen de resistencia a cloranfenicol (par HYCF y HYCR o TATF y TATR). En el caso de las cepas EDH (Figura 11), la cepa transformada origina un producto de 1.1 Kpb con los oligonucleótidos HYC. Este producto corresponde al gen *cat* flanqueado por las regiones FRT. Con los oligonucleótidos OGH se obtuvo un producto de 1.3 Kpb, lo que indica que el producto de PCR con el que se transformó se integró al genoma intercambiándose con *hycA*. La cepa silvestre no generó producto de PCR con los oligonucleótidos HYC, y, utilizando el par OGH se obtuvo un producto de 700 pb correspondiente al gen *hycA*.

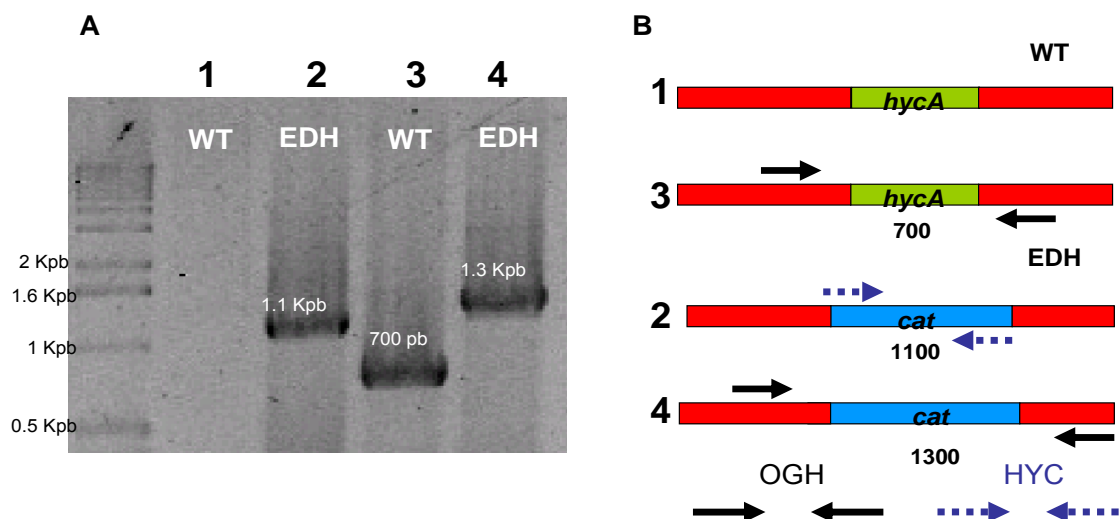


Figura 11. A: Productos de PCR de colonia de las cepas de *E. coli* W3110 silvestre (WT) y mutante *hycA*⁻ (EDH). En B se muestra el esquema de los productos esperados (en pb) con los oligonucleótidos OGH y HYC.

En el caso de las cepas EDT (Figura 12), utilizando los oligonucleótidos TAT, la cepa silvestre no generó producto, y la mutante originó un producto de 1.1 Kpb. Utilizando los oligonucleótidos OGT la cepa silvestre generó un producto de 900 pb correspondiente al gen *tatC* y la cepa transformada generó un producto de 1.2 Kpb que corresponde al gen de resistencia a cloranfenicol integrado en el lugar de *tatC*.

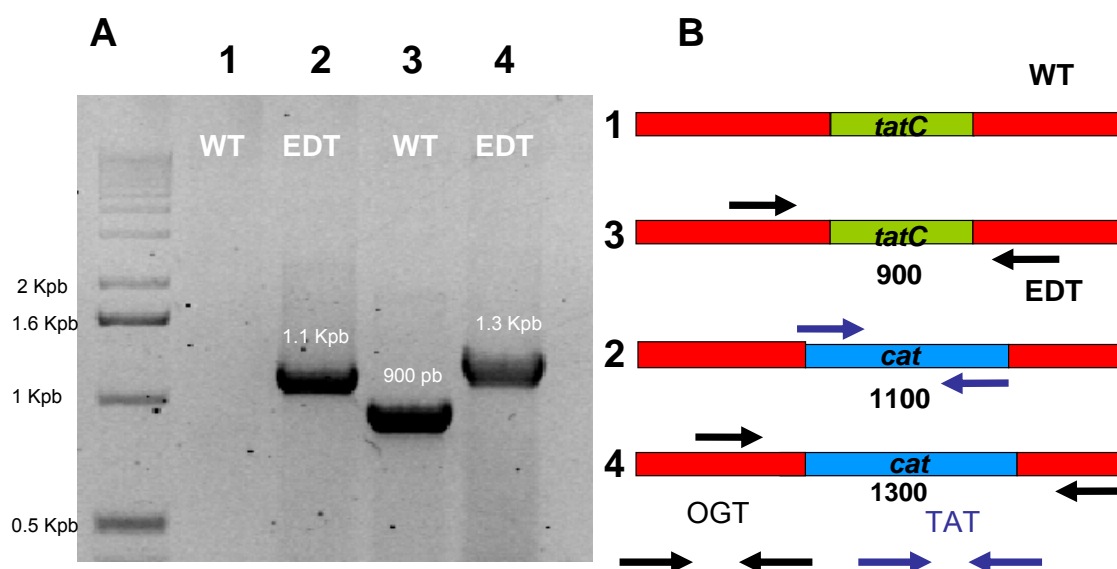


Figura 12. A: Productos de PCR de colonia de las cepas de *E. coli* W3110 silvestre (WT) y mutante *tatC*⁻ (EDT). En B se muestra el esquema de los productos esperados (en pb) con los oligonucleótidos OGT y TAT.

4.2 PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO POR LAS CEPAS MUTANTES

Para evaluar si efectivamente las cepas EDH y EDT son sobreproductoras de hidrógeno, se utilizó el método de Yoshida y col. (13) que se basa en la producción de hidrógeno utilizando ácido fórmico a una concentración de 25mM. Se utilizó este ácido debido a que la activación de los genes cuyos productos intervienen en la generación de hidrógeno es completamente

dependiente de formiato, ya que es el sustrato directo para la generación de hidrógeno. La concentración utilizada es la que permite una mayor velocidad de producción de biohidrógeno debido al balance entre la concentración de formiato y el pH (13). En la Figura 13 se observa que la cepa EDH produce una mayor cantidad de hidrógeno que las cepas WT y EDT.

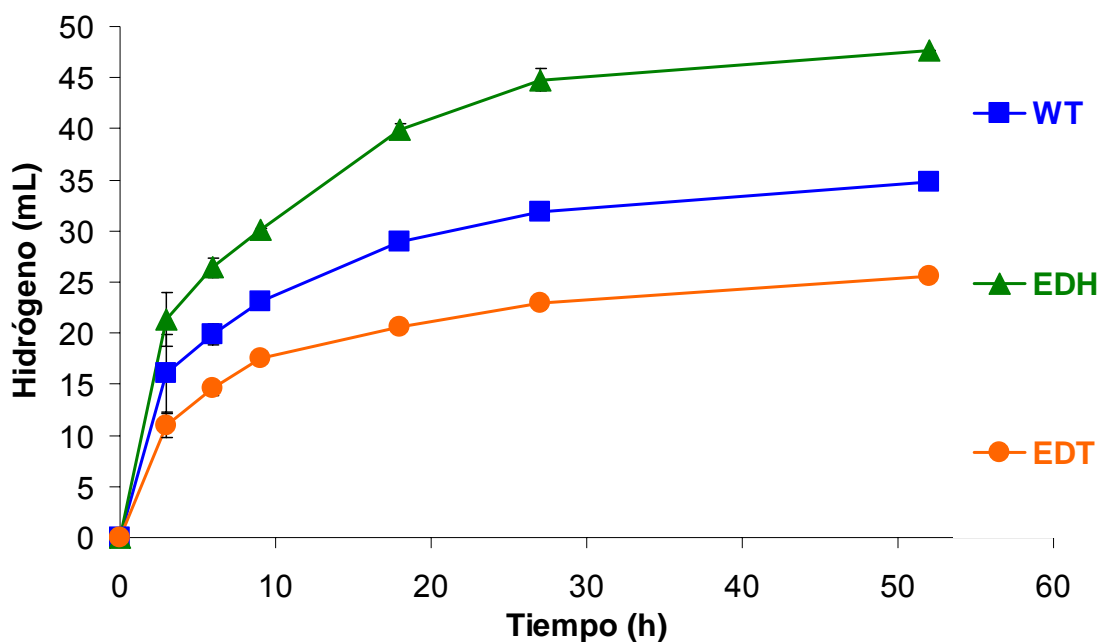


Figura 13. Producción de hidrógeno por las cepas de *E. coli* W3110 silvestre (WT), EDH y EDT a partir de ácido fórmico. Condiciones de cultivo pH 6.8, Ac. fórmico 25mM, 37°C, 200 rpm, D.O=1.5

La ausencia del gen *hycA* en la cepa EDH ocasiona que la inducción de los genes del regulón de formiato por FhIA continúe hasta que el formiato se agota. En la cepa silvestre la inducción del regulón de formiato conduce a la expresión de HycA, esta proteína se une a FhIA y el complejo FhIA-HycA es incapaz de continuar induciendo la expresión de los genes del regulón de formiato. Esta diferencia de expresión del regulón entre las cepas EDH y WT se traduce en que la cepa EDH produce alrededor de 1.4 veces más hidrógeno a lo largo de

la fermentación. La velocidad de producción de hidrógeno de la cepa EDH (2.22 mL H₂ h⁻¹ unidad de D.O⁻¹) aumentó 1.3 veces en comparación con la cepa silvestre (1.7 mL H₂ h⁻¹ unidad de D.O⁻¹). Estos resultados son similares a los obtenidos por Yoshida y col., ya que ellos observaron que la velocidad de producción de hidrógeno aumenta 1.2 veces en una cepa de *E. coli* W3110 $\Delta hycA$ con respecto a la cepa silvestre (13).

La cepa EDT es deficiente del sistema de translocación de proteínas Tat. Las proteínas FDH-N, FDH-O y las hidrogenasas respiratorias 1 y 2 que consumen hidrógeno son transportadas vía Tat, por lo tanto se esperaba que la producción de hidrógeno aumentara en esta cepa, como se ha reportado utilizando glucosa como sustrato (11). Sin embargo la cepa EDT produjo una menor cantidad de hidrógeno que la cepa silvestre. Esto podría deberse a dos factores. En primer término la vía Tat transporta otras proteínas. Además las cepas mutantes defectivas de la vía Tat crecen más lentamente y presentan defectos en la membrana externa (27). Probablemente alguna proteína involucrada en el transporte o metabolismo de formiato sea sustrato de la vía Tat, o los defectos en la membrana no permitan el adecuado transporte de formiato. Por ejemplo se reportó un aumento de expresión del gen *yfiD* en cepas defectivas de la vía Tat (27), el producto de este gen tiene una actividad similar a la activasa de PFL (28).

4.3 OBTENCIÓN DE LA DOBLE MUTANTE

La cepa EDH produce una mayor cantidad de hidrógeno a partir de ácido fórmico, debido a esto se propuso realizar la mutación del gen *lacI* de esta cepa, ya que el sustrato que se va a utilizar es lactosuero y es conveniente que la transcripción de los genes del operón *lac* sea en forma constitutiva para acelerar el consumo de lactosa.

Para obtener la doble mutante se transformó la cepa EDH con el plásmido pCP20 y se eliminó la resistencia a cloranfenicol, posteriormente se siguió el mismo procedimiento utilizado para obtener las mutantes sencillas. Una vez que se seleccionó la mutante de *lacI* resistente a cloranfenicol, se removió el gen de resistencia y se comprobó la ausencia de ambos genes por PCR de colonia con el par de oligonucleótidos OGH y OGL (Figura 14). Los productos de PCR obtenidos son menores a 500 pb que corresponden a la “cicatriz” que queda después de eliminar la resistencia a cloranfenicol.

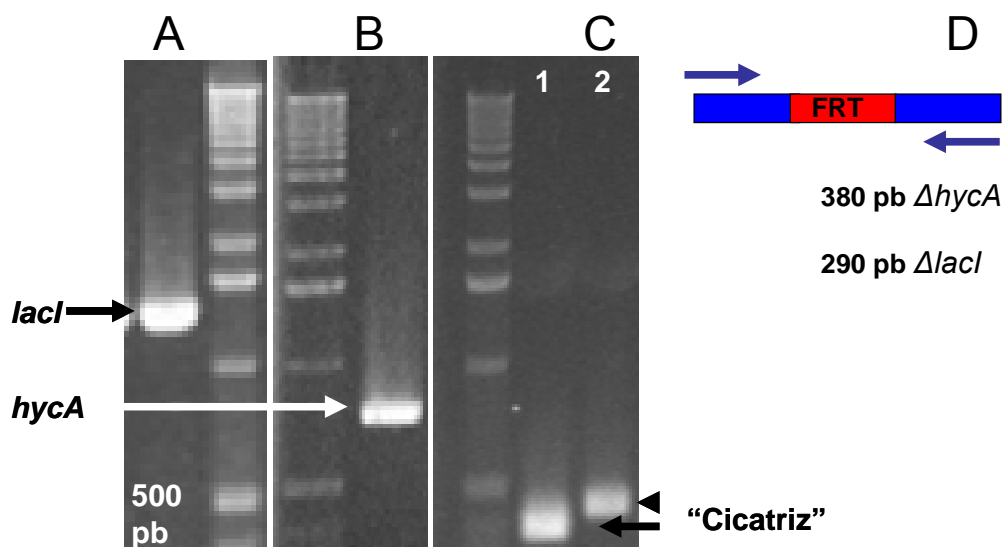


Figura 14. Productos de PCR de colonia de las cepas WT con oligonucleótidos OGL (A), con oligonucleótidos OGH (B), y mutante EDHL con oligonucleótidos OGL (C1) y con oligonucleótidos OGH (C2). D Esquema de la cicatriz resultante de la eliminación de la resistencia a cloranfenicol

4.4 PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO A PARTIR DE LACTOSUERO

Se evaluó la producción de hidrógeno por las cepas de *E. coli* W3110 silvestre y mutantes EDH, EDT y EDHL utilizando suero de leche como sustrato. La concentración de lactosuero fue de 16.5 g/L (14.5 g/L de lactosa). La densidad óptica inicial de cada cepa fue de 1.5026 +/- 0.013 a 600 nm. En la Figura 15 se muestra la producción de hidrógeno de cada cepa.

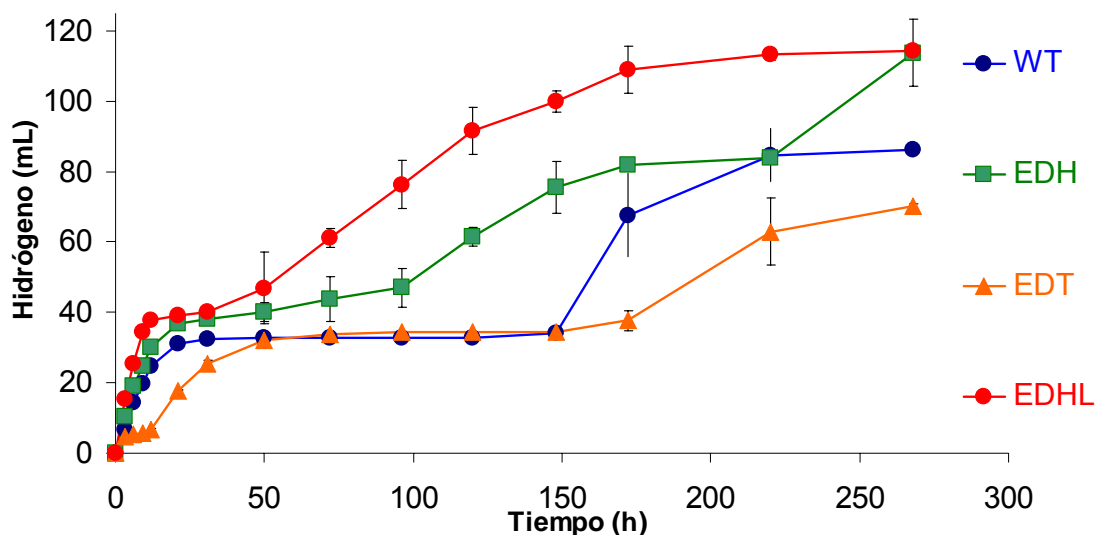


Figura 15. Producción de hidrógeno a partir de suero de leche por las cepas WT y mutantes EDH, EDT y EDHL de *E. coli* W3110.

En todas las cepas se presentó el fenómeno de diauxia, ya que en las primeras horas de la fermentación consumieron probablemente el lactato presente en el lactosuero para producir hidrógeno y posteriormente tienen un periodo de adaptación para después utilizar lactosa como segundo sustrato, a excepción de la doble mutante que inmediatamente inició el consumo de lactosa.

La cepa EDT presenta un periodo de adaptación de 12 horas al primer sustrato para después comenzar a producir hidrógeno; cuando este sustrato se termina tiene un segundo periodo de adaptación de aproximadamente 125 horas para entonces comenzar a producir hidrógeno a partir de lactosa. La cantidad y velocidad de producción de hidrógeno son inferiores en comparación con la cepa silvestre.

Estas observaciones indican que los defectos de la membrana externa y la menor velocidad de crecimiento de las cepas mutantes de la vía Tat, también afectan la producción de hidrógeno a partir de lactosuero, ya que estas cepas sobreexpresan genes como *galP* ya sea en respuesta a los defectos de la envoltura celular o por ser sustrato de la vía Tat (27). El producto de *galP* está involucrado en el transporte de galactosa al interior de la célula.

La cepa silvestre produce hidrógeno a partir del primer sustrato durante las primeras 30 horas. Al agotarse este sustrato la presencia de HycA ocasiona que los genes del regulón de formiato dejen de expresarse. La producción de hidrógeno se reanuda 120 horas después, durante este periodo se inducen los genes del operón *lac* y se comienza a metabolizar lactosa. La concentración de formiato se incrementa gradualmente como consecuencia del metabolismo de glucosa proveniente de lactosa. La acumulación de formiato provoca la inducción del operón de formiato y de nueva cuenta se produce hidrógeno a partir de las 150 horas y hasta que la glucosa se agota. La producción de hidrógeno de esta cepa fue de 86 mL en 270 horas.

La cepa EDH utiliza el primer sustrato para producir hidrógeno las primeras 30 horas al igual que la cepa silvestre. Sin embargo produce 18 % más hidrógeno, lo cual indica que en la cepa silvestre, HycA está regulando negativamente la producción de hidrógeno desde las primeras etapas de la fermentación. Además la ausencia de HycA en la cepa EDH ocasiona que la producción de hidrógeno continúe mientras se lleva a cabo la inducción de los genes del operón *lac*. A partir de las 100 horas la velocidad de producción aumenta, debido a que la β -galactosidasa está liberando glucosa, esta a su vez genera formiato y se aumenta aún más la expresión del regulón de formiato. Es probable que la galactosa proveniente de la lactosa se acumule mientras la glucosa se está consumiendo. Cuando la glucosa se agota, los niveles de AMPc aumentan. La producción de hidrógeno que se observa en las últimas 50 horas de la fermentación (Figura 15 cepa EDH) probablemente se deba a que la presencia de altas concentraciones de AMPc y galactosa ocasione que los genes del operón *gal* se induzcan y se produzca hidrógeno a partir de la galactosa. La cepa EDH produce un 32% más hidrógeno que la cepa silvestre al final de la fermentación.

La cepa EDHL produce 23 % más hidrógeno que la cepa silvestre a partir del primer sustrato. En esta cepa los genes del operón *lac* se expresan constitutivamente y la inducción de los genes del regulón de formiato es constante. Debido a lo anterior, después de agotarse el primer sustrato, la producción de hidrógeno es continua. Esta cepa produce la misma cantidad de hidrógeno que la cepa EDH (32 % más que la silvestre). Sin embargo lo hace en menor tiempo (alrededor de 100 horas antes). La cepa EDHL produce en

100 horas una cantidad de hidrógeno equivalente a la máxima producción de hidrógeno por la cepa silvestre, la cual se alcanzó en aproximadamente 225 horas.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La estrategia de remover los genes *hycA* y *lacI* para mejorar la producción de hidrógeno fue exitosa ya que la cepa EDHL expresa desde un inicio todas las proteínas necesarias para metabolizar la lactosa del lactosuero y generar hidrógeno, y por lo tanto produce 32% más hidrógeno que la cepa silvestre. Así mismo produce la misma cantidad de hidrógeno que la cepa EDH, pero en menor tiempo.

La remoción del gen *hycA* tiene como consecuencia un aumento en la producción de hidrógeno tanto con ácido fórmico como con lactosuero en la cepa de *E. coli* W3110.

La inactivación del gen *tatC* no aumentó la producción de hidrógeno con ácido fórmico ni con lactosuero, probablemente existan otras proteínas involucradas en el metabolismo o transporte de lactosa y formiato que sean transportadas por la vía Tat o los defectos en la envoltura celular ocasionen un transporte deficiente de estos sustratos, sería conveniente utilizar otros azúcares para observar si el fenómeno se repite.

Además de los genes que se inactivaron en este trabajo, sería interesante investigar el efecto que tiene la sobreexpresión de genes como *pflB*, *pflA* y *fhIA* que codifican para la piruvato formiato liasa, la activasa de la piruvato formiato liasa y el activador del regulón de formiato respectivamente. También es recomendable cuantificar los sustratos y productos de la fermentación para decidir a que nivel de la ruta metabólica del piruvato se puede trabajar para aumentar la cantidad de formiato.

La producción de biohidrógeno a partir de subproductos orgánicos tiene el potencial para competir con los métodos convencionales de producción de hidrógeno. Mediante el uso de las herramientas de biología molecular se puede incrementar la producción de biohidrógeno y conseguir un mejor rendimiento a partir de residuos orgánicos. Las condiciones de cultivo se deben optimizar para incrementar los rendimientos y la productividad primero en cultivos tipo lote para posteriormente hacerlo en reactor.

REFERENCIAS

1. Spahni R, Chappellaz J, Stocker TF, Loulergue L, Hausammann G, Kawamura K, Fluckiger J, Schwander J, Raynaud D, Masson-Delmotte V, Jouzel J. (2005) Atmospheric Methane and Nitrous Oxide of the Late Pleistocene from Antarctic Ice Cores *Science* 310: 1317-1321.
2. Siegenthaler U, Stocker TF, Monnin E, Luthi D, Schwander J, Stauffer B, Raynaud D, Barnola JM, Fischer H, Masson-Delmotte V, Jouzel J. (2005) Stable Carbon Cycle–Climate Relationship During the Late Pleistocene. *Science* 310: 1313-1317.
3. Kapdan IK, Kargi F. (2006) Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme Microb Technol* 38(5):569–582.
4. Claassen PAM, van Lier JB, Lopez Contreras AM, van Niel EWJ, Sijtsma L, Stams AJM, de Vries SS, Weusthuis RA. (1999) Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Appl Microbiol Biotechnol* 52(6):741–755.
5. Davila-Vazquez G, Arriaga S, Alatríste-Mondragón F, de León Rodríguez A, Rosales-Colunga LM, Razo-Flores E. (2007) Fermentative biohydrogen production: Trends and perspectives. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. (En prensa).
6. Nath K, Das D. (2004) Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. *Appl Microbiol Biotechnol* 65(5):520–529.
7. Sawers RG. (2005) Formate and its role in hydrogen production in *Escherichia coli*. *Biochemical Society Transactions* 3(1) 42-46
8. Leonhartsberger S, Korsa I, Böck A. (2002) The Molecular Biology of Formate Metabolism in Enterobacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* 4(3): 269-276.
9. Penfold DW, Forster CF, Macaskie LE. (2003) Increased hydrogen production by *Escherichia coli* strain HD701 in comparison with the wild-type parent strain MC4100. *Enzyme Microb Technol* 33(2–3):185–189.
10. Penfold DW, Macaskie LE. (2004) Production of H₂ from sucrose by *Escherichia coli* strains carrying the pUR400 plasmid, which encodes invertase activity. *Biotechnol Lett* 26(24):1879–1883.

11. Penfold DW, Sargent F, Macaskie L. (2006) Inactivation of the *Escherichia coli* K-12 twin-arginine translocation system promotes increased hydrogen production. *FEMS Microbiol Lett* 262 135-137.
12. Mishra J, Khurana S, Kumar N, Ghosh AK, Das D. (2004) Molecular cloning, characterization, and overexpression of a novel [Fe]-hydrogenase from a high rate of hydrogen producing *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Biochem Biophys Res Commun* 324(2):679–685.
13. Yoshida A, Nishimura T, Kawaguchi H, Inui M, Yukawa H. (2005) Enhanced hydrogen production from formic acid by formate hydrogen lyase-overexpressing *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* 71(11):6762–6768.
14. Bisailon A, Turcot J, Hallenbeck PC. (2006) The effect of nutrient limitation on hydrogen production by batch cultures of *Escherichia coli*. *Int J Hydrogen Energy* 31(11):1504–1508.
15. Morimoto K, Kimura T, Sakka K, Ohmiya K. (2005) Overexpression of a hydrogenase gene in *Clostridium paraputrificum* to enhance hydrogen gas production. *FEMS Microbiol Lett* 246(2):229–234.
16. Harada M, Kaneko T, Tanisho S. (2006) Improvement of H₂ yield of fermentative bacteria by gene manipulation. In: Proceedings of the 16th world hydrogen energy conference. Lyon, France, p 211.
17. Hallenbeck PC (2005). Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. *Water Sci Technol* 52(1–2):21–29.
18. Rivera Pastrana DM. (2005) Producción de Penicilino Acilasa en *Escherichia coli* recombinante a partir de suero de leche bovino. Tesis de Maestría IPICYT San Luis Potosí, Mex.
19. Ghaly AE, Ramkumar DR, Sadaka SS, Rochon JD. (2000) Effect of reseeded and pH control on the performance of a two-stage mesophilic anaerobic digester operating on acid cheese whey. *Canadian Agricultural Engineering* 42(4): 173-183.
20. Ahn WS, Park SJ, Lee SY.(2000) Production of Poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution. *Appl Environ Microbiol* 66:3624–3627.
21. Kim BS.(2000) Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. *Enzyme Microb Technol* 27:774–777.

22. Huber RE, Litton J, Fung EB. (1980) Efflux of beta-galactosidase products from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 141(2):528-33.
23. Jacob F, Monod J (1961) Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* 3:318-56.
24. De León-Rodríguez A, Rivera-Pastrana D, Medina-Rivero E, Flores-Flores JL, Estrada-Baltazar A, Ordoñez-Acevedo LG, Barba de la Rosa AP. (2006) Production of penicillin acylase by a recombinant *Escherichia coli* using cheese whey as substrate and inducer. *J Bioeng* 23:299-305.
25. Datsenko, KA, Wanner, BL. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6640–6645.
26. Cherepanov PP, & Wackernagel W. (1995) Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of FLP-mediated excision of the antibiotic determinant. *Gene* 158, 9–14.
27. Ize B, Porcelli I, Lucchini S, Hinton JC, Berks BC, Palmer T. (2004) Novel phenotypes of *Escherichia coli* tat mutants revealed by global gene expression and phenotypic analysis. *J Biol Chem* 279:47543-47554.
28. Zhu J, Shalel-Levanon S, Bennett G, Ka-Yiu S. (2006) The YfiD protein contributes to the pyruvate formate-lyase flux in an *Escherichia coli* arcA mutant strain *Biotechnol/Bioengineering* 97(1): 138 – 143.

ANEXOS

A. Soluciones

Antibióticos

Solución patrón de ampicilina (200 mg/ mL)

Pesar 0.2 gramos de ampicilina y disolver en 1 mL de agua miliQ. Esterilizar por filtración en membranas de 0.45 μ m (Millipore). Almacenar a -20 °C

Solución patrón de cloranfenicol (50 mg/ mL)

Pesar 0.05 gramos de ampicilina y disolver en 1 mL etanol. Almacenar a -20°C

Soluciones patrón

Glucosa 2 M

Glucosa	36.04 g
Agua destilada	Aforar a 100 mL

Esterilizar por filtración o autoclave

Arabinosa 10mM

Arabinosa	0.075 g
Agua	Aforar a 50 mL

Esterilizar por filtración

Mg⁺⁺ 2 M

MgCl ₂ -6 H ₂ O	20.33 g
MgSO ₄ -7 H ₂ O	24.65 g
Agua destilada	Aforar a 100 mL

Esterilizar por filtración

EDTA 0.5 M pH 8

EDTA-Na-2H ₂ O	18.61 g
NaOH	2 g
Agua	Aforar a 100 mL

SDS 20 %

SDS	20 g
Agua	80 mL

TAE 50X

Tris base	121 g
Ácido acético glacial	28.55 mL
EDTA 0.5 M pH 8	50 MI
Agua	Aforar a 500 mL

Solución de elementos traza y rezasurina

FeCl ₂ 4H ₂ O	0.15 g
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0.0036 g
NiCl ₃ 6H ₂ O	0.0024 g
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.007 g
CuCl ₂ 2H ₂ O	0.002 g
Na ₂ SeO ₃	0.002 g
Rezasurina	0.05 g
Agua	Aforar a 1L

PBS

NaCl	0.8 g/L
KCl	0.2 g/L
Na ₂ HPO ₄	1.43 g/L
KH ₂ PO ₄	0.2 g/L
Ajustar al pH deseado con HCl y esterilizar en autoclave	

Soluciones para extracción de DNA plásmidico

Solución I

Tris 0.25 M pH 8	250 µL
EDTA 10 mM	200 µL
Glucosa 10 mM	10 µL
Agua miliQ estéril	Aforar a 1 mL

Solución II

NaOH 2N	100 µL
SDS 10%	100 µL
Agua miliQ estéril	Aforar a 1 mL

Solución III

Acetato de sodio 3M	4.08 g
Agua miliQ estéril	Aforar a 10 mL
Ajustar el pH a 5.2 con ac. acético glacial	

B. Medios de cultivo

LB

	g/L
Bacto triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10
Agua	Aforar a 1 L
Ajustar el pH a 7.5 con NaOH y esterilizar en autoclave.	

LB sólido

Bacto triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10
Agar bacteriológico	15

Agua Aforar a 1 L
Ajustar el pH a 7.5 con NaOH y esterilizar en autoclave.

SOB

Bacto triptona	20
Extracto de levadura	5
Cloruro de sodio	0.584
Cloruro de potasio	0.186

Aforar a un litro con agua, ajustar el pH a 7.0 con hidróxido de sodio. Esterilizar en autoclave

SOC

SOB	98 mL
Solución glucosa 2M	1mL
Solución Mg 2m	1mL

Medio para la producción de hidrógeno

Lactosuero (Land O Lakes)	16 g
Solución de elementos traza y rezasurina	1 mL
Solución MgCl ₂ (5g/L)	100 µL
PBS	Aforar a 1 L

Mezclar, ajustar a pH 6.8, pasteurizar

C. Técnicas

Extracción de DNA plasmídico

- Crecer un preinóculo de células toda la noche.
- Centrifugar 3 – 4.5 mL de preinóculo a 10 000 rpm durante un minuto. Eliminar el sobrenadante.
- Resuspender en 200 µL de la solución I en vortex.
- Adicionar 400 µL de la solución II. Mezclar invirtiendo 5 veces suavemente.
- Dejar reposar en hielo por 5 minutos.
- Añadir 300 µL de la solución III. Mezclar suavemente por inversión.
- Dejar reposar en hielo 10 minutos.
- Centrifugar a 10 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.
- Obtener el sobrenadante, agregar 400 µL de fenol- cloroformo. Mezclar.
- Dejar reposar durante 10 minutos a -20 °C.
- Centrifugar 10 minutos a 10 000 rpm a 4 °C.
- Recuperar la fase acuosa y agregar 500 µL de etanol.
- Dejar reposar en hielo 10 minutos.
- Centrifugar 10 minutos a 10 000 rpm y 4 °C
- Lavar 2 veces la pastilla con 500 µL de etanol al 70 %.
- Secar la pastilla a temperatura ambiente

- Resuspender en 30 μ L de agua miliQ estéril.

Miniprep kit Qiagen.

- Crecer un preinóculo de células toda la noche.
- Centrifugar 3 – 4.5 mL de preinóculo a 10 000 rpm durante un minuto. Eliminar el sobrenadante.
- Resuspender en 150 μ L de P1 con ARNasa en vortex
- Adicionar 175 μ L de P2
- Adicionar 150 μ L de N3, mezclar suavemente por inversión, dejar reposar en hielo durante 5 min.
- Centrifugar 10 minutos a 10 000 rpm a temperatura ambiente, tomar el sobrenadante y pasarlo a la columna.
- Centrifugar a 10 000 rpm durante 1 minuto y eliminar el sobrenadante, adicionar 400 μ L de PB y centrifugar nuevamente 1 minuto.
- Eliminar el sobrenadante y agregar 700 μ L de PE con etanol, centrifugar a 10 000 1 minuto, tirar el sobrenadante y volver a centrifugar.
- Pasar la columna a un tubo nuevo de 1.5 mL y agregar 30 μ L de agua miliQ estéril, centrifugar durante 1 minuto, y almacenar a -20 °C.

Extracción de DNA en gel (kit Qiagen)

- El fragmento de DNA del gel de agarosa, remover la agarosa extra.
- Adicionar 3 volúmenes de amortiguador QG por cada volumen de gel.
- Decantar la muestra en la columna y centrifugar a 10 000 rpm durante 1 minuto.
- Eliminar el filtrado y adicionar 750 μ L de amortiguador PE a la columna y centrifugar 2 veces a 10 000 rpm durante un minuto, descartar el filtrado cada vez.
- Colocar la columna en un tubo nuevo de 1.5 mL y eluir el DNA con 30 μ L de amortiguador EB o agua mliQ estéril.

Electroporación

- Poner preinóculo toda la noche.
- Tomar 1 mL del preinóculo y añadirlo a 50 mL de LB, incubar a 37 °C. hasta alcanzar una D.O de 0.6 a 600nm.
- Centrifugar 10 minutos a 7000 rpm a 4 °C.
- Hacer 3 lavados con una solución de glicerol al 10 %.
- Resuspender en poco volumen de la misma solución.
- Tomar alícuotas de 70 μ L para almacenar a -80 °C o utilizar.
- En hielo agregar 1 μ L de DNA a las células, mezclar y pasar a una cubeta de electroporación
- Electroporar con las siguientes condiciones:
 - 1800 V
 - 100 Ohmios
 - 25 milifaradios

- Añadir inmediatamente 900 μL de medio SOC e incubar a 37 °C durante 3 o 4 horas
- Tomar 200 μL y sembrar en medio con el antibiótico adecuado.

Digestiones

DNA	5 μL
Buffer 10x	1 μL
Enzima	0.5 μL
Agua miliQ estéril	3.5 μL

Incubar durante 1 hora a 37°C