

Aplicación de ingeniería metabólica para optimizar la producción de polihidroxialcanoatos (PHAs) por *Herbaspirillum seropedicae* a partir de hemicelulosa residual

Difusión de los Proyectos
Fondo Sectorial de Energía (ANII) 2009



Silvia Batista

Unidad Microbiología Molecular (IIBCE)
Montevideo, Uruguay



Ana Inés Catalán (Unidad MM, IIBCE)

Ana Karen Malán (Unidad MM, IIBCE)

Manuel Minteguiaga (Unidad MM, IIBCE)

Verónica Saravia (Depto. Bioingeniería, Fac. Ingeniería)

Guadalupe Martínez (Depto. Bioingeniería, Fac. Ingeniería)

Fernando Ferreira (Lab. Carbohidratos y Gli-conjugados, Inst. Higiene, Fac. Química)

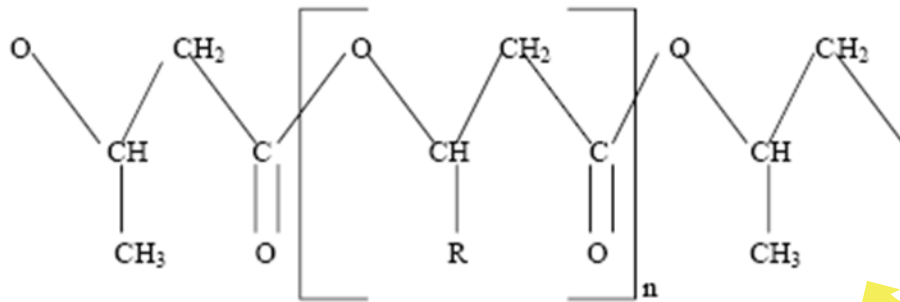
Gregório Cabrera Gomez y Marilda Keico Taciro (Inst. Ciencias Biomédicas, Depto. Microbiología, USP, San Pablo, Brasil)

Proyecto ANII-FSE-1-2009-46

Tesis Doctorado y Maestría Programa PEDECIBA (Becas ANII)

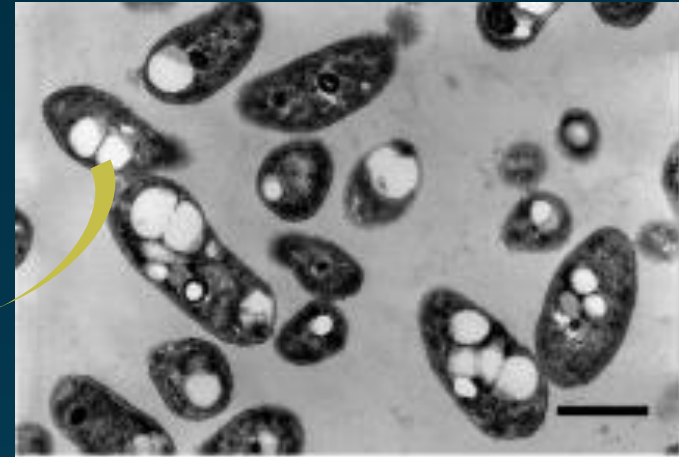
Proyecto CYTED-2009 P309RT0120 (PRIBOP)

Polihidroxicanoatos: ésteres de hidroxiácidos



n varies from 600 to 35000

R= hydrogen	Poly(3-hydroxypropionate)
R= methyl	Poly(3-Hydroxybutyrate)
R= ethyl	Poly(3-hydroxyvalerate)
R= propyl	Poly(3-hydroxyhexanoate)
R= pentyl	Poly(3-hydroxyoctanoate)
R= nonyl	Poly(3-hydroxydodecanoate)

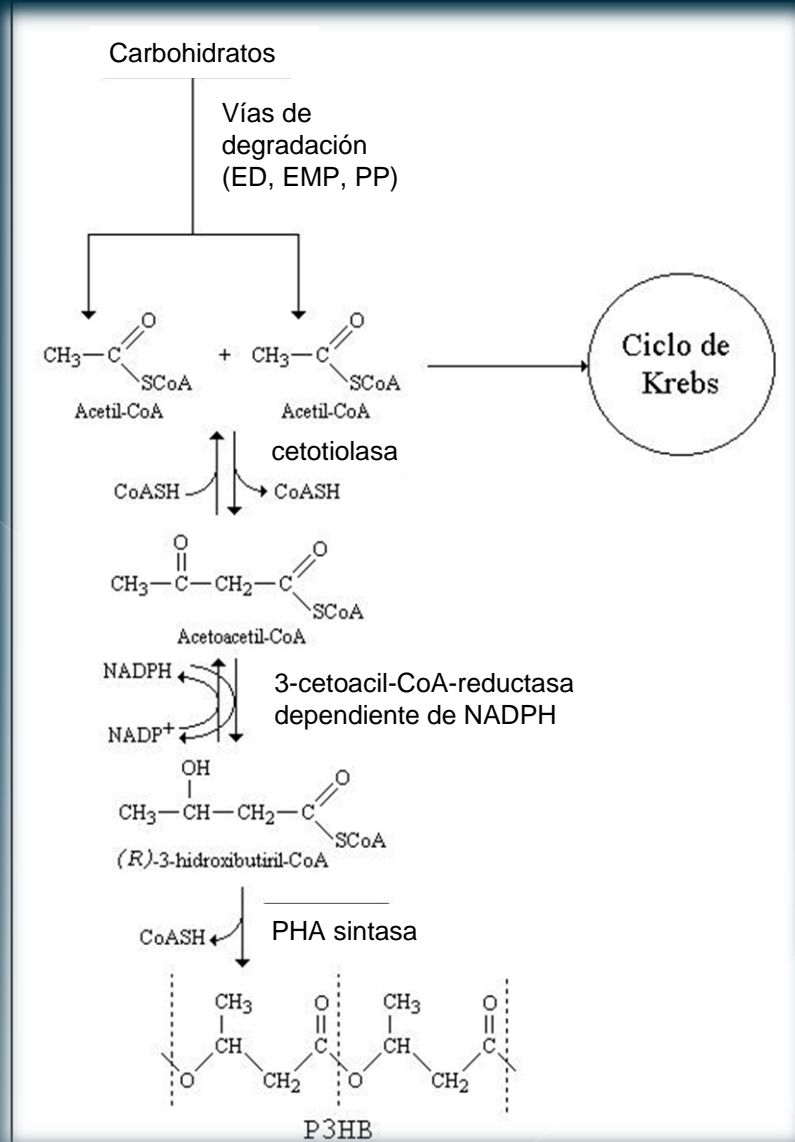
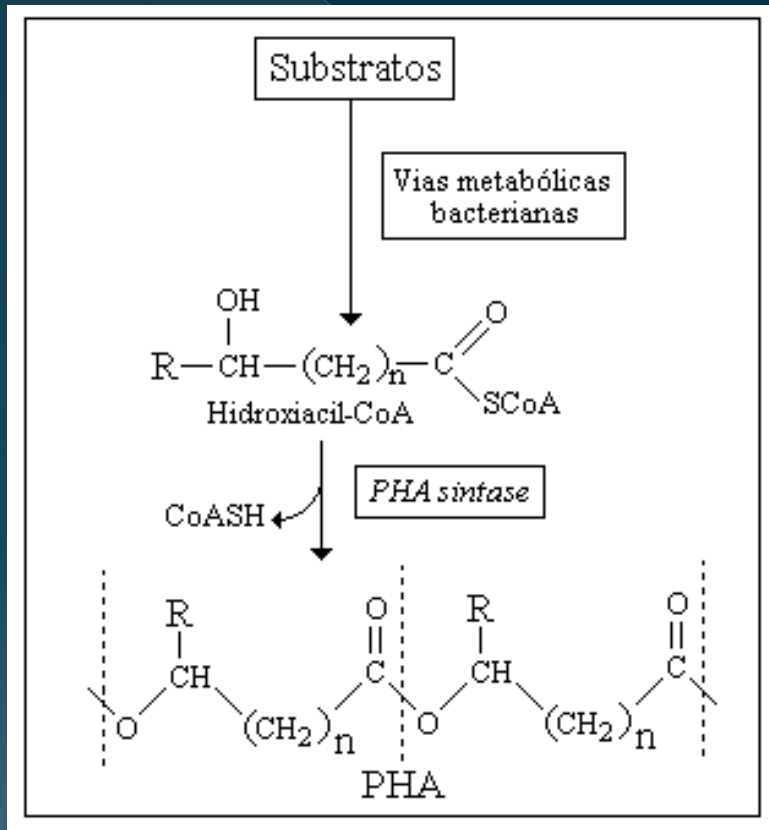


Sintetizados por bacterias creciendo en condiciones desbalanceadas (exceso fuente de C y limitación de otro nutriente como N, O, P)

Son termoplásticos, biodegradables, reciclables y biocompatibles. Proviene de fuentes renovables.



Vista general de la vía de síntesis de PHAs



Vía clásica de síntesis PHB

Propiedades físicas dependen de la composición química

El homopolímero puro PHB es un termoplástico altamente cristalino y muy frágil, mientras que el co-polímero P(3HB-3HV) es menos cristalino, más flexible y fácil de procesar.

Table 2-30 Comparing PHA polymers with common plastics in properties (Sudesh *et al.*, 2000)

	Melting Temperature, T_m (°C)	Glass transition temperature, T_g (°C)	Young's Modulus (GPa)	Tensile strength (MPa)	Elongation at break (%)
P(3HB)	180	4	3.5	40	5
P(3HB-co-20 mol%3HV)	145	-1	0.8	20	50
P(3HB-co-17 mol% 3HHx)				20	850
P(3HB-co- 25 mol% 3HHx)	52	-4			
P(3HB-co-6 mol% 3HA) ^a	133	-8	0.2	17	680
P(3HB-co-71 mol% 3HV)	83	-13			
P (4HB)	53	-48			
PHA _{MCL} ^b	45-54	-25 to -40			
P(3HB) _{UHMW} ^c	190	-	1.1	62	58
Polypropylene	176	-10	1.7	38	400
LDPE	130	-30	0.2	10	620

^a 3HA units: 3-hydroxydecanoate (3 mol%), 3-hydroxydodecanoate (3 mol%), 3-hydroxyoctanoate (<1 mol%), 3-hydroxy-cis-5-dodecanoate (<1 mol%)

^b PHA_{MCL} is the PHA with mainly medium-chain-length monomers ranging from C₆-C₁₂.

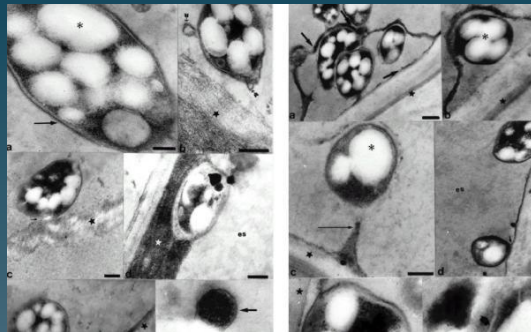
^c P(3HB)_{UHMW} stands for ultra-high molecular weight P(3HB). The properties refer to stretched films made from ultra-high molecular weight P(3HB) homopolymer. After the annealing treatment of the film the melting temperature was 190 °C (Kusaka *et al.*, 1998).

Bacteria en estudio: *Herbaspirillum seropedicae* Z69

Aislada en Brasil: β proteobacteria.
Aerobio estricto, con metabolismo
microaerofílico. No patógeno.
Diazótrofo, bacteria del suelo y
endófito de plantas.



Baldani (Embrapa)

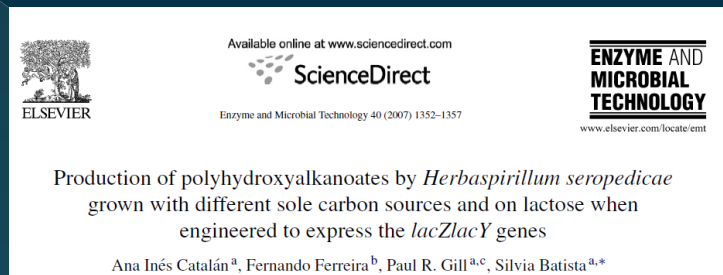


James et al.. 2002

Datos disponibles: Genoma de cepa SmR1
(Genopar)

H. Seropedicae como productor de PHA

Expresa la vía clásica de síntesis de PHB. Acumula PHB o (3HB-co-3HV) en distintas condiciones. Contenido del 60% de PHB al consumir glucosa como única fuente de carbono (optimizado mediante diseño factorial con punto central bajo limitación de N)



Fuente C	Polímero		
	Z67	Z69	Z78
Glucosa	PHB	PHB	PHB
Xilosa	PHB	PHB	PHB
Manitol	PHB	PHB	PHB
Galactosa	PHB	PHB	PHB
Arabinosa	nd*	PHB	nd
Succinato	PHB	PHB	PHB
Acido nonanoico	P(3HB-co-3HV)	P(3HB-co-3HV)	P(3HB-co-3HV)
Acido propiónico	nd	P(3HB-co-3HV)	nd

*nd.: No determinado

¿Por qué emplear subproductos industriales para el cultivo?

La fuente de carbono es el ítem más caro del proceso.

Los subproductos industriales son más baratos y se podría resolver un problema ambiental. Para evitar extender el uso de áreas de cultivo para producir materia prima no usada como alimento.

Producción de PHB en mezcla de carbohidratos, similar al hidrolizado de hemicelulosa de bagazo de caña

Azúcar	Xt (g/l)	Xr (g/l)	PHB (g/l)	PHB (%)
Glucosa 30 g/l	12.5	5.3	7.2	58
Xilosa 30 g/L	7.6	3.8	3.8	50
Xilosa 24 g/l –glucosa 4.5 g/l –arabinosa 1.5g/l	8.9	3.9	5.0	56

Objetivo:

Optimizar la producción de PHAs [copolímero P(3HB-co-3HV)] al emplear hidrolizado de hemicelulosa como fuente de carbono y propionato como co-sustrato

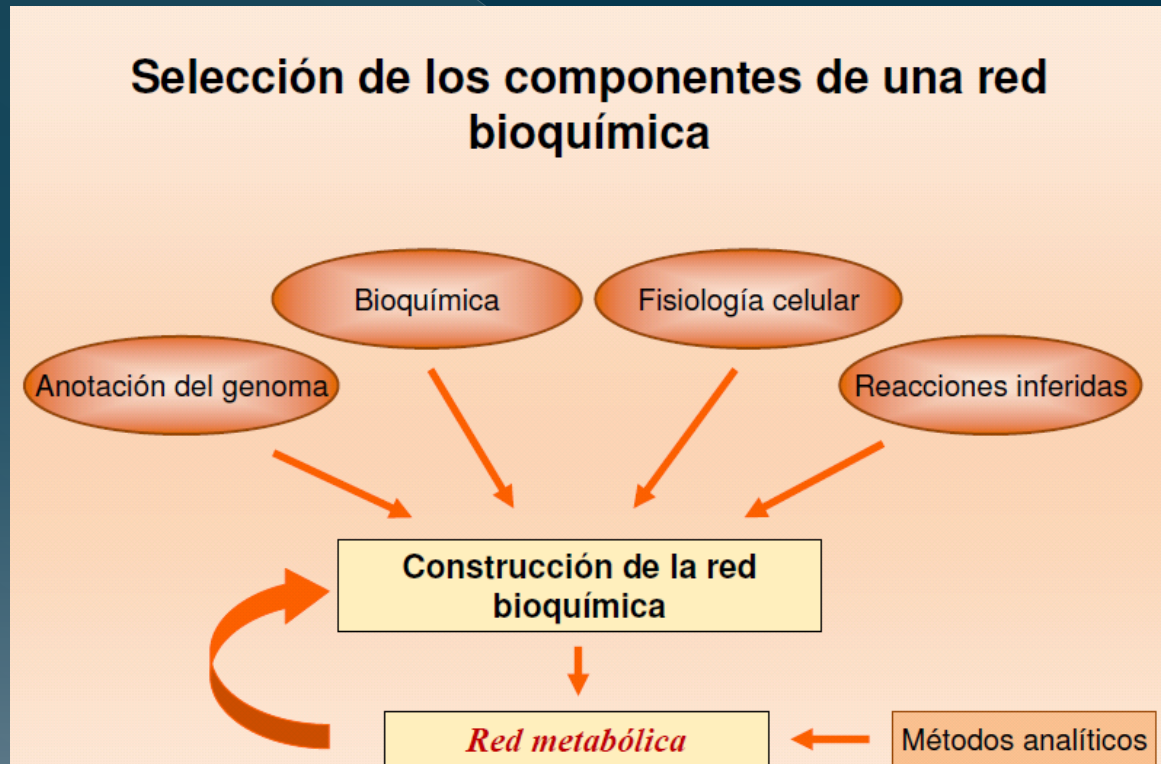
Estrategia:

Ingeniería metabólica: análisis de flujos metabólicos y estrategia clásica por modificación genética

Conceptos

Ingeniería metabólica: diseño racional y dirigido de las propiedades celulares por manipulación de las reacciones bioquímicas, por modificaciones genéticas, regulatorias o fenotípicas.

Flujos metabólicos: velocidad a la cual se procesan bioquímicamente los metabolitos de entrada para convertirlos en metabolitos de salida.



Modelado de redes metabólicas

Herramientas computacionales para analizar flujos de una red metabólica:

1-Análisis de flujos metabólicos (Stephanopoulos et al. 1998), requiere conocer todas las vías metabólicas internas y determinar varios flujos (isótopos estables) para estimar los flujos no conocidos

2-Análisis de balance de flujo (Kauffman et al. 2003; Price et al. 2004), dirigida a optimizar una función objetivo. Sólo calcula la solución óptima y desestima otras posibles.

3- Análisis de vías metabólicas (Schuster and Hilgetag 1994; Schilling et al. 2000). Describe un sistema determinando los posibles modos elementales de flujo (ME). ME: Mínimo set de reacciones que pueden participar en estado estacionario, actuando en determinada dirección y de forma irreversible.

Herbaspirillum seropedicae Z69

- **Xilosa:** se desconocían la(s) vía(s) metabólica(s)
- **Glucosa:** se conocían al menos parcialmente las vías metabólicas (vías Entner Doudoroff, Pentosa Fosfato en dirección de síntesis, ciclo Krebs. Ausencia de glicolisis, se expresa gluconeogénesis)
- **Acido propiónico:** se desconocían la(s) vía(s) metabólicas

Estrategia de trabajo:

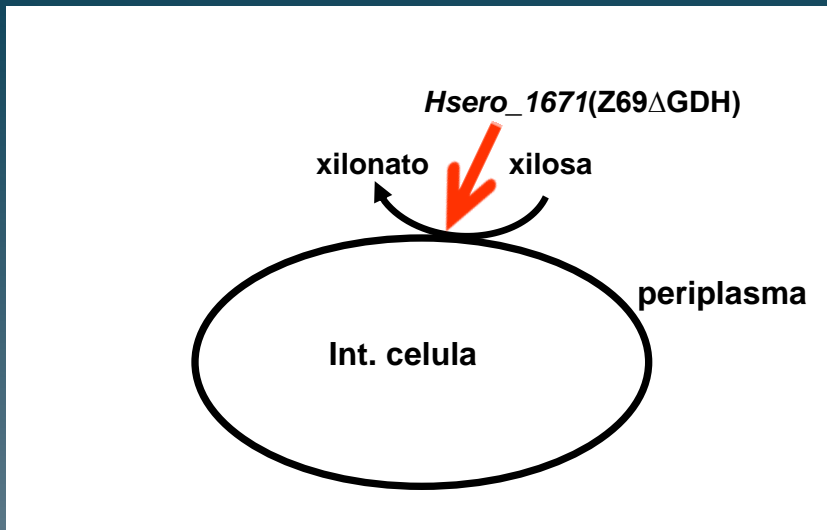
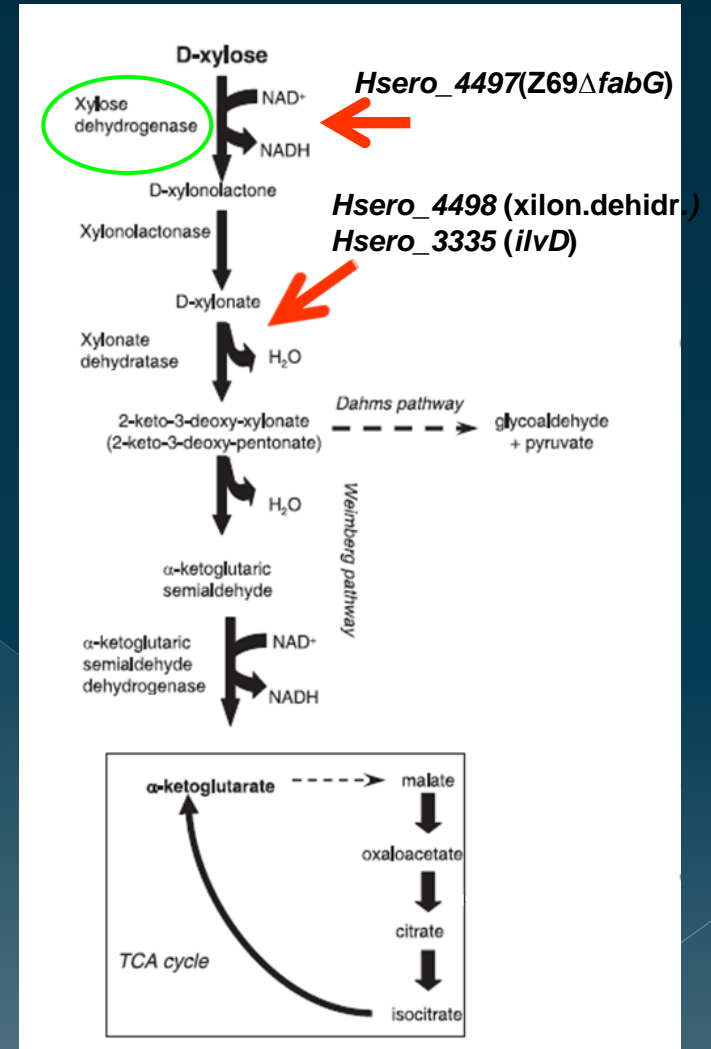
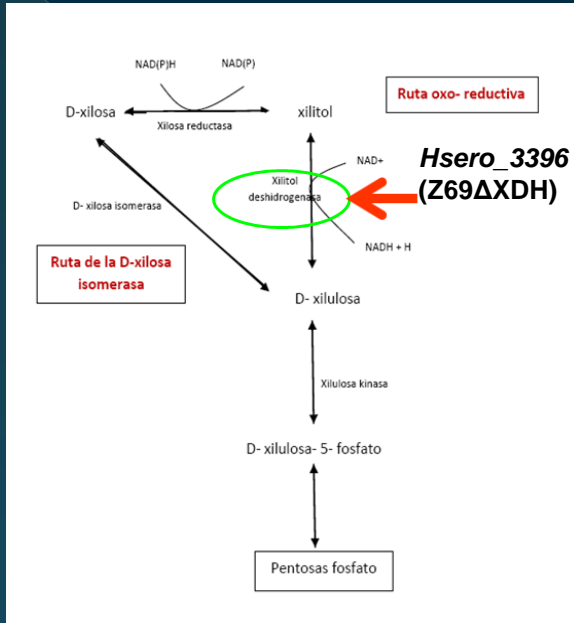
-**XILOSA**: Inferir la red metabólica mediante mutaciones dirigidas. Análisis de vías metabólicas de Z69 cultivada en xilosa para confirmar la red propuesta y determinar el ME que optimiza la producción de polímero.

-**GLUCOSA**: Análisis de vías metabólicas de Z69 cultivada en glucosa para confirmar la red propuesta y determinar el ME que optimiza la producción de polímero.

-**PROPIONICO**: Inferir la red metabólica a partir del genoma. Generar mutantes incapaces de metabolizar propionato para orientar el propionil-CoA a la síntesis de 3-hidroxicaproil por condensación con acetyl-CoA.

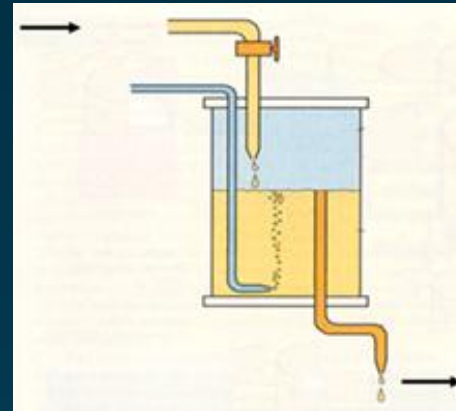
-Desarrollo de un análisis de flujos metabólicos empleando xilosa y glucosa marcadas con isótopos estables.

Identificación de vías del metabolismo de xilosa: **XILOSA** mutaciones no polares dirigidas y análisis bioquímico



Análisis de vías metabólicas en quimióstato usando xilosa como fuente de carbono

Xyl



Xyl, X, PHB

D (h ⁻¹)	Xt (g/l)	Xr (g/l)	PHB (g/l)	PHB (%)	Xyl inicial (g/l)	Xyl residual (g/l)	Xyl consum (g/l)	NH ₄ Cl inicial (mM)	NH ₄ Cl residual (mM)	Y _{Xr/xil} (g/g)	Y _{PHB/xil} (g/g)
0.021	0.96				7.11			7.8			
	1.35	0.47	0.88	65		0	7.11		0	0.066	0.124
	1.50	0.53	0.97	65		0	7.11		0	0.074	0.136
	1.47	0.47	1.00	68		0	7.11		0	0.066	0.140
	1.57	0.64	0.93	69		0	7.11		0	0.090	0.131

Software de análisis: Metatool versión 3.9.2 (Pfeiffer, 1999)

Input File: Metabolic network: ED, Weimberg-Dahms, anaplerotic pathway (Gluconeogenesis and Phosphate Pentose), aerobic respiration

Restricciones: 67 % cell dry weight PHB accumulation

$XT = X_r + PHB$

Output File:

- 1: ATP = ADP
- 2: 20241.4 XYLext + 301819 ADP + 103446 O = 301819 ATP + 55999.8 CO₂ + XT
- 3: XYLext + 29 ADP + 10 O = 29 ATP + 5 CO₂
- 4: 34046.6 XYLext + 715976 ADP + 241498 O = 715976 ATP + 125026 CO₂ + XT
- 5: 20241.4 XYLext + 274208 ADP + 103446 O = 274208 ATP + 55999.8 CO₂ + XT

N° EM	Experimental			
	$Y_{X_r/xil}$ (g/g)	$Y_{PHB/xil}$ (g/g)	$Y_{X_r/xil}$ (g/g)	$Y_{PHB/xil}$ (g/g)
2	0.108	0.221		
4	0.064	0.131	0.075	0.133
5	0.108	0.221		

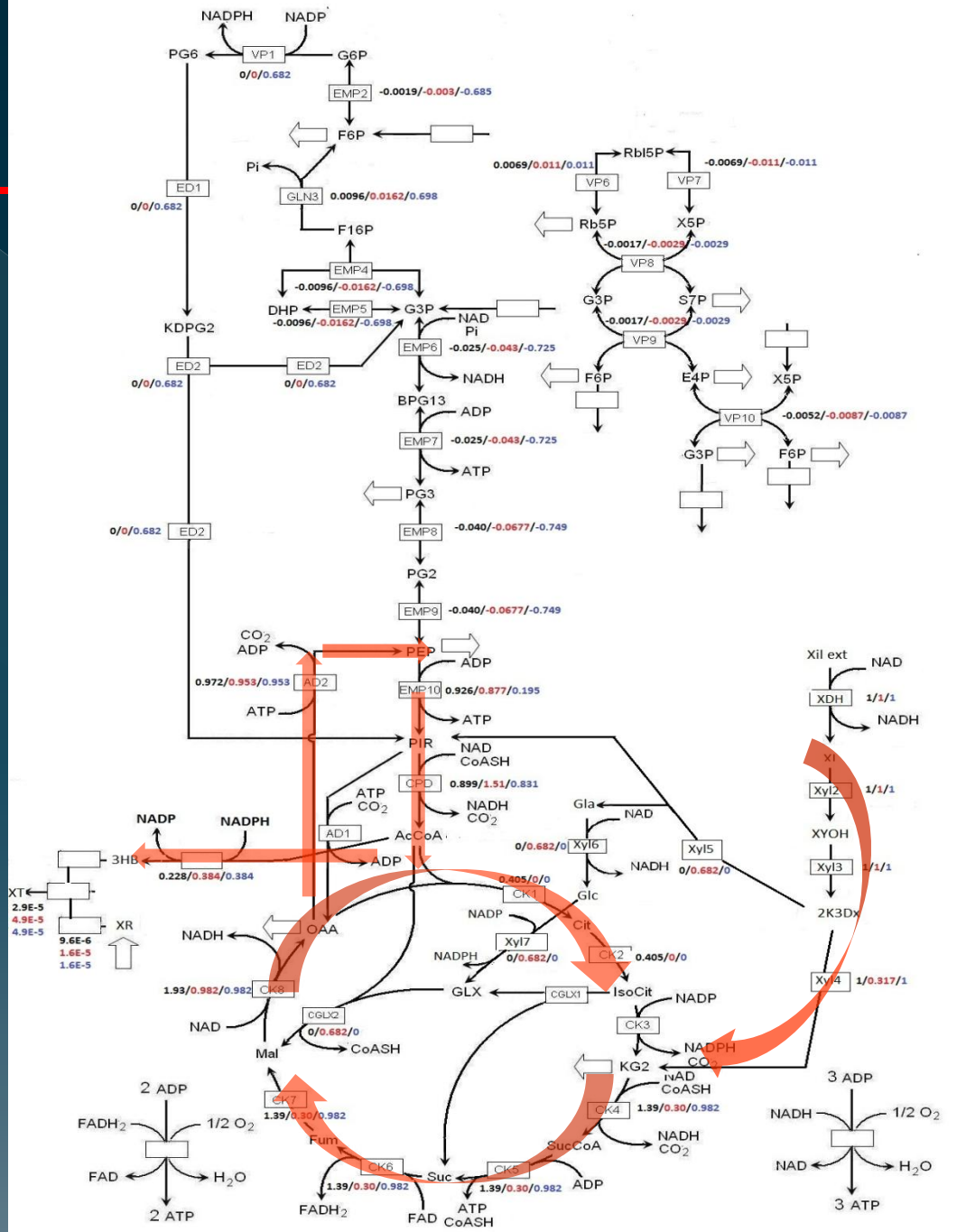
ME N°4

Catabolismo

- Weimberg pathway
- TCA

Anabolismo

- Gluconeogenesis
- PP



Como optimizar la producción de PHB?

Los modos elementales 2 y 5 parecen ser mejores que el experimental.
¿Que vías metabólicas están expresando?

N° ME	Experimental			
	$Y_{Xr/xil}$ (g/g)	$Y_{PHB/xil}$ (g/g)	$Y_{Xr/xil}$ (g/g)	$Y_{PHB/xil}$ (g/g)
2	0.108	0.221		
4	0.064	0.131	0.075	0.133
5	0.108	0.221		

Cultivo en fermentador *batch* con glucosa como fuente de C

Estado *pseudo-estacionario* (2-8 horas de cultivo)

Velocidad específica de crecimiento

Celular: 0.38 h^{-1}

La síntesis de PHB está asociada al crecimiento.

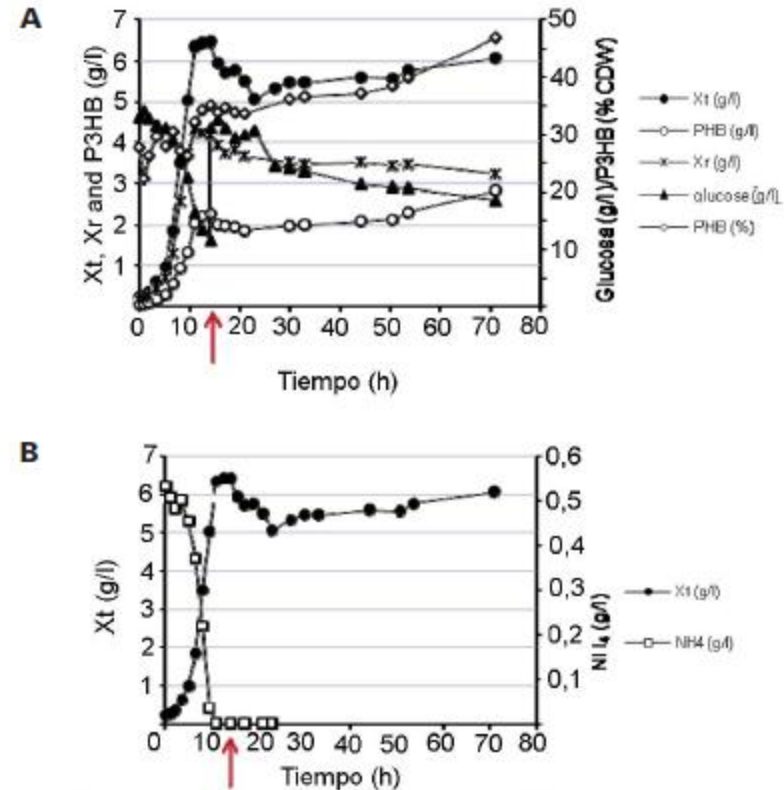


Figura 1. Perfil de crecimiento de la cepa Z69 cultivada en el biorreactor con 2 L de medio MM-G. (A) Se muestra la biomasa total (X_t) (g/L), biomasa residual (X_r) (g/L), y concentraciones de glucosa y P3HB (g/L). (B) Se presenta también la concentración amonio en el medio de cultivo (g/L). La flecha roja indica el inicio de la alimentación con glucosa.

GLUCOSA

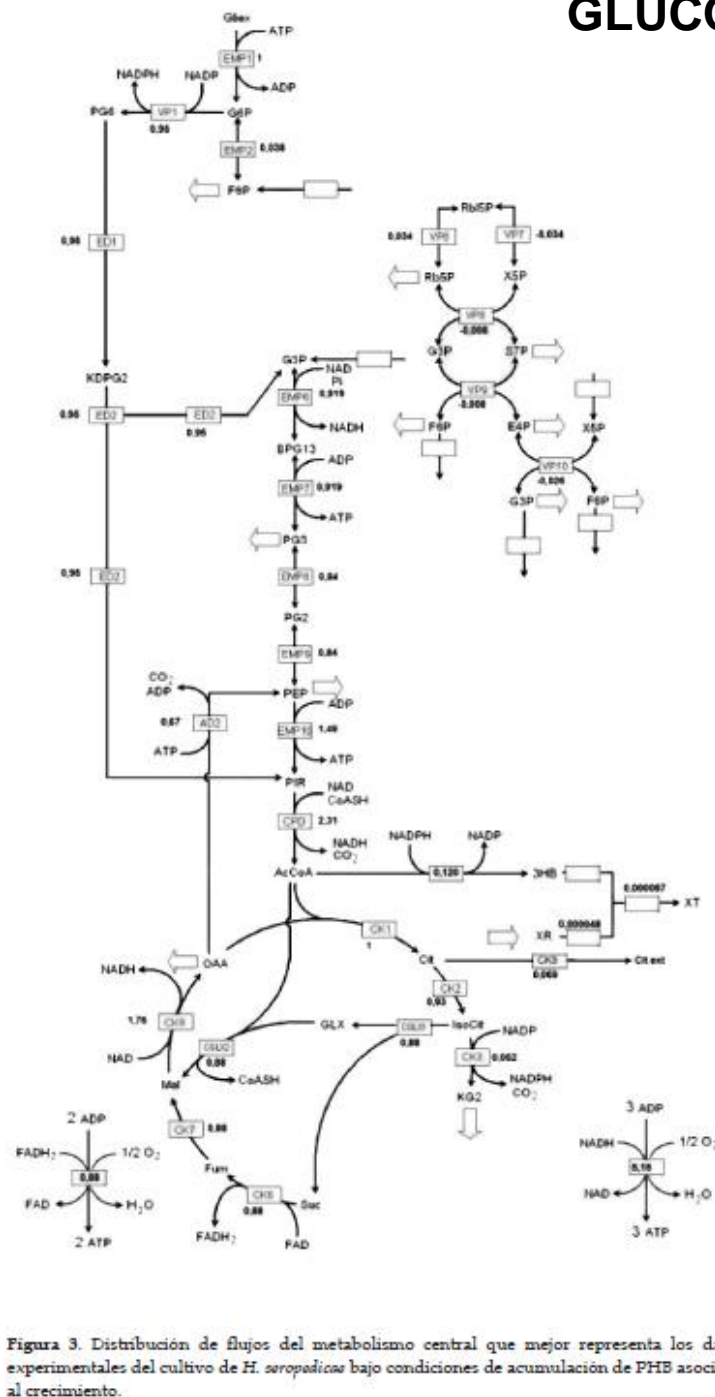
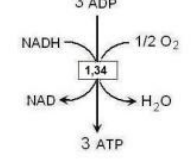
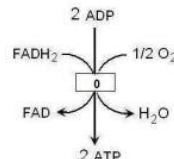
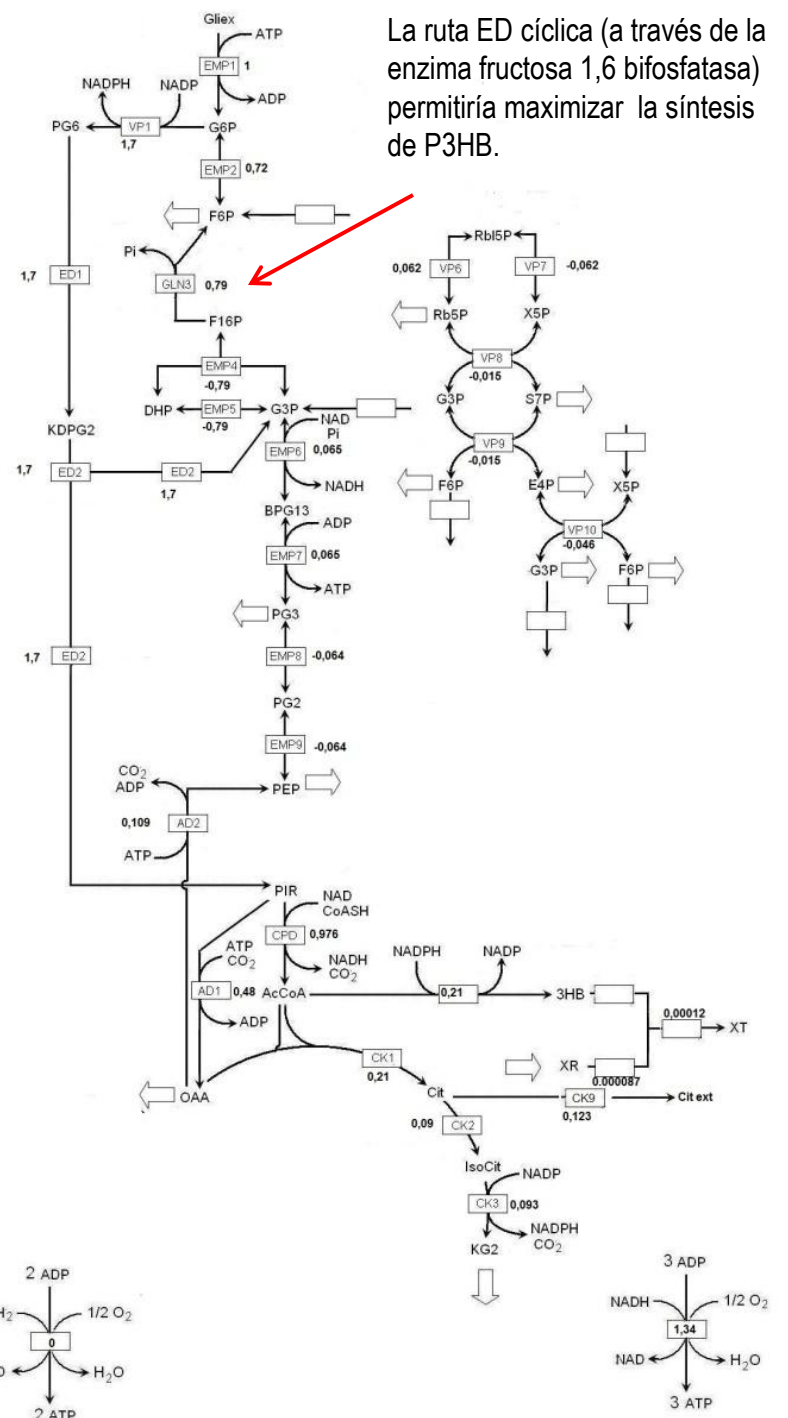
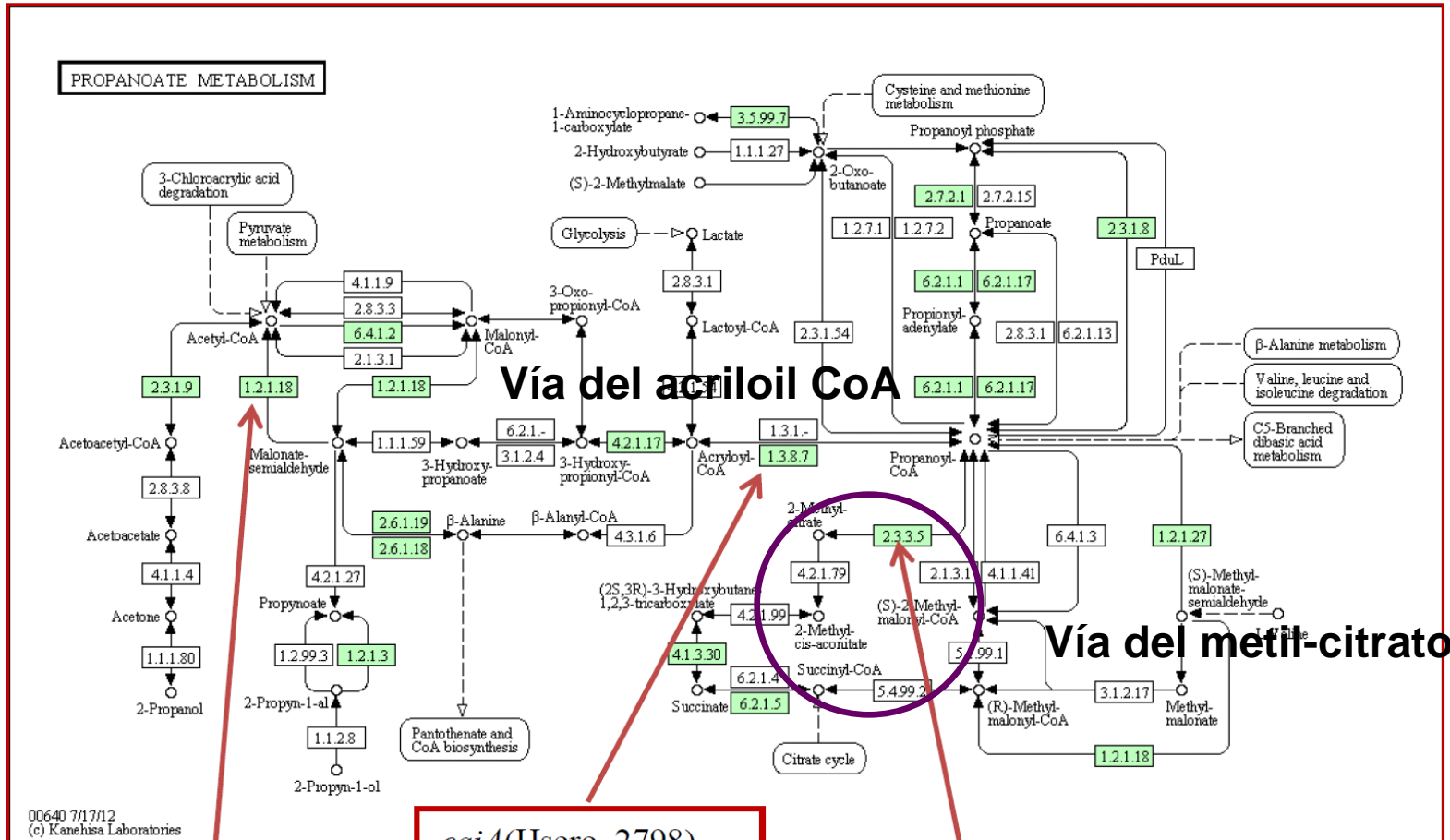


Figura 3. Distribución de flujos del metabolismo central que mejor representa los datos experimentales del cultivo de *H. sorosporicus* bajo condiciones de acumulación de PHB asociado al crecimiento.

La ruta ED cíclica (a través de la enzima fructosa 1,6 bifosfatasa) permitiría maximizar la síntesis de P3HB.



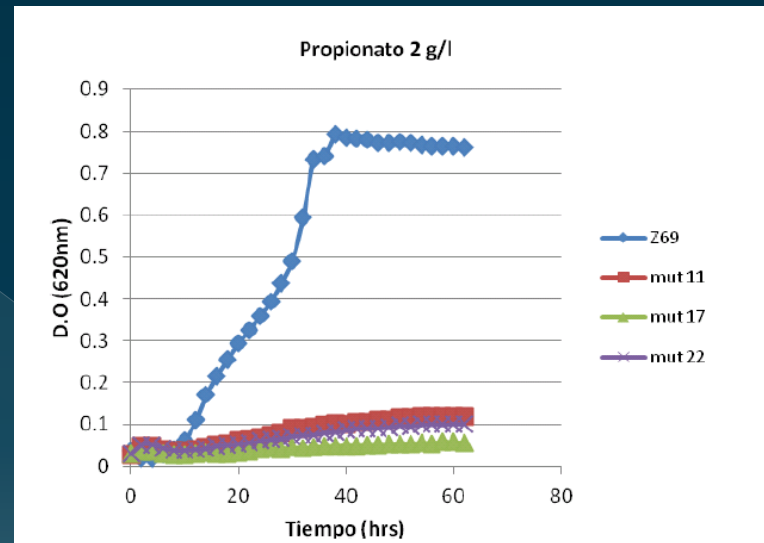
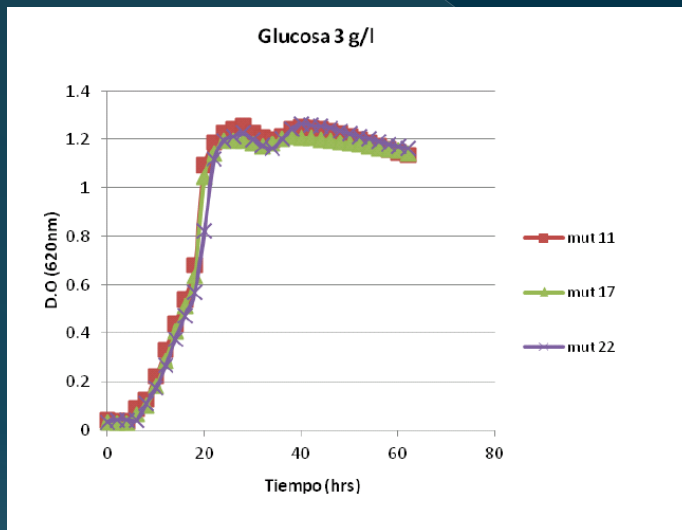


caiA(Hsero_2798)

mmsA(Hsero_3067), (Hsero_4798)

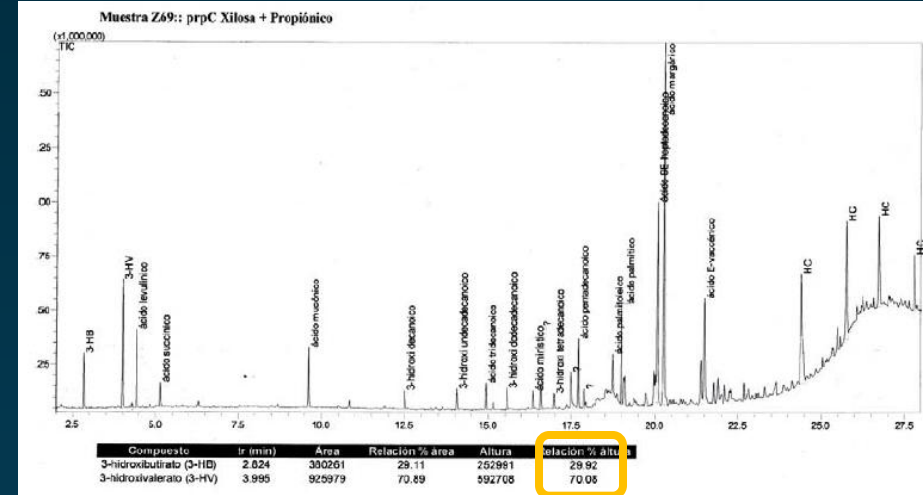
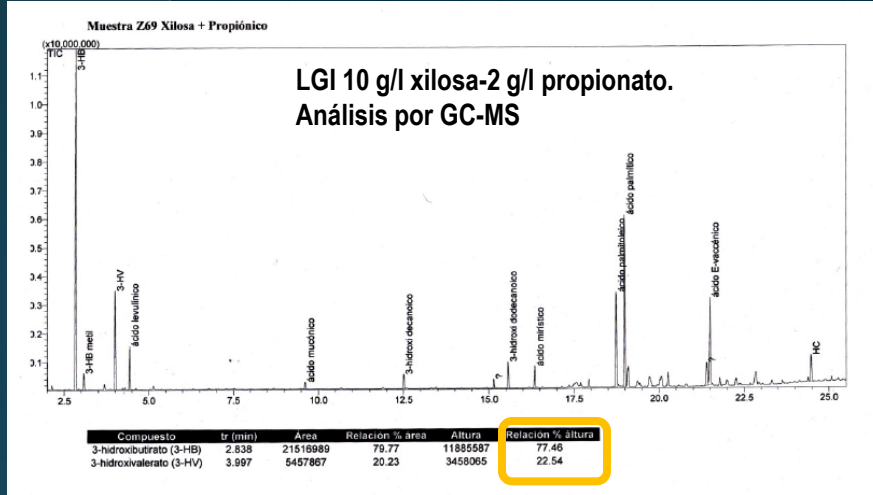
prpC
(Hsero_3119)

Fenotipo del mutante *prpC* en medio LGI NH₄



Composición de PHA acumulado

PROPIONATO



PERFIL DE CONSUMO PROPIONATO Y TASA DE CONVERSION EN HIDROXIVALERATO

Cepa	Biomasa (g/l)	%3HV	$Y_{3HV/prp}$
Z69	2,8	0,5	0,024
Z69Prp	2,4	6	0,615

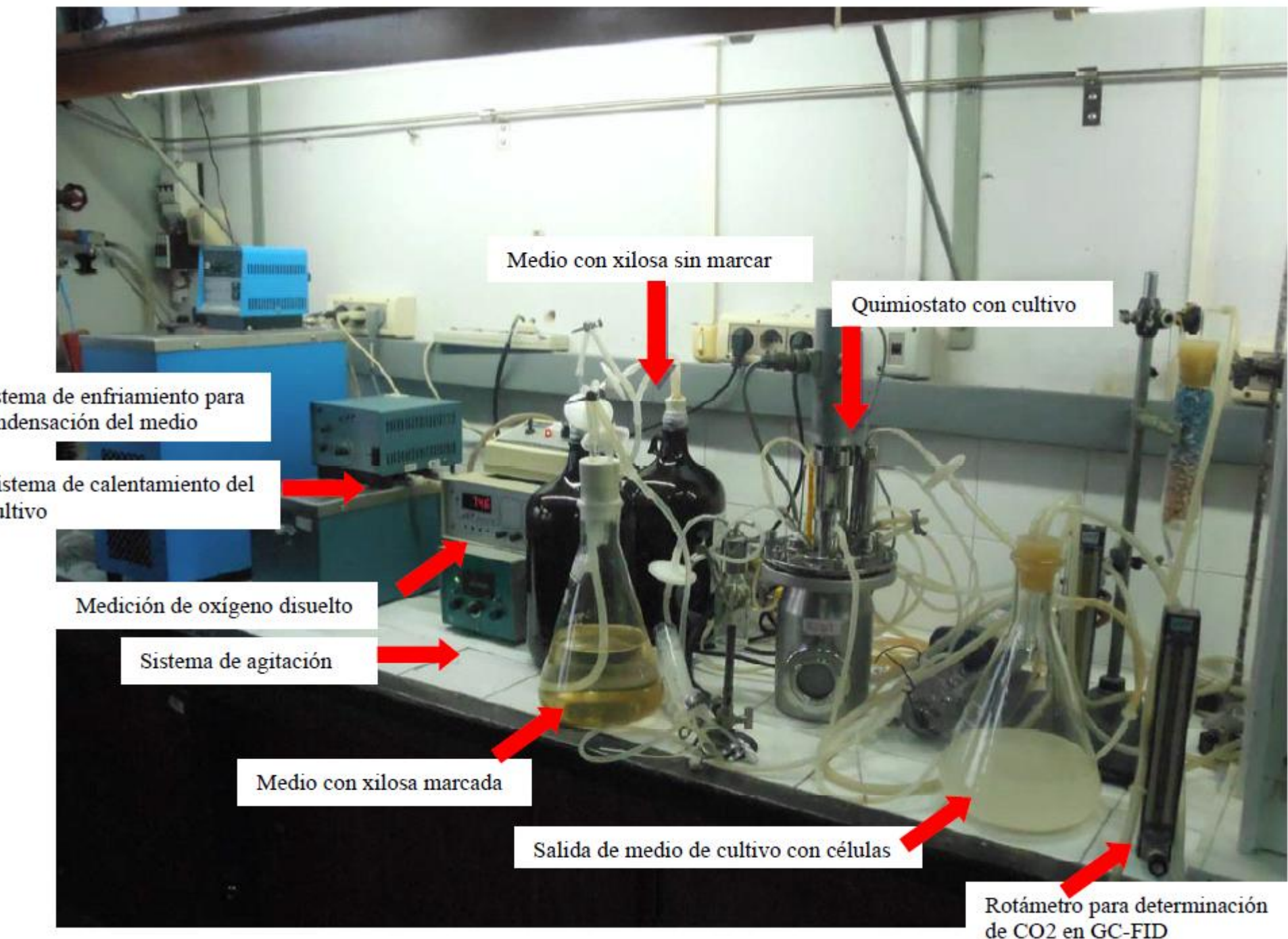
Modificaciones genéticas sugeridas y resultados

Xilosa: mutante *gltA* (citrato sintasa) no se logró obtener (¿será un gen esencial?)

Glucosa: cepa recombinante y se evalúa la mayor expresión del gen *fbp* (control promotor fuerte en plásmido pMB220 *plac*)

Propiónico: mutante *prpC* (Hsero_1269) mejoró eficiencia de transformación propiónico

Se determinó perfil de aminoácidos proteinogénicos (GC MS) para desarrollo de AFM mediante software FIAT



Medio con xilosa sin marcar

Quimiostato con cultivo

Sistema de enfriamiento para condensación del medio

Sistema de calentamiento del cultivo

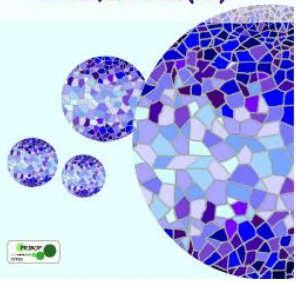
Medición de oxígeno disuelto

Sistema de agitación

Medio con xilosa marcada

Salida de medio de cultivo con células

Rotámetro para determinación de CO2 en GC-FID



Análisis de flujos metabólicos en cultivos alimentados de *Herbaspirillum seropedicae* durante la síntesis de poli-3-hidroxibutirato

Ana Inés Catalán¹, Silvia Batista¹, Marilda Keico Taciro²,
José Gregório Cabrera Gomez²

- CATALÁN, A.I.; K. MALÁN; M. MINTEGUIAGA; V. SARAIVA; G. MARTÍNEZ; FERREIRA, F.; BATISTA S.B. Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS): una herramienta para estudios metabólicos. El caso de *Herbaspirillum seropedicae* Z69 , 2013, X Encuentro Nacional de Microbiólogos (SUM, Sociedad Uruguaya de Microbiología), Montevideo
- AK MALÁN; CATALÁN, A.I.; BATISTA S.B. Obtención de un mutante en el gen *fabG* que codifica para la enzima xilosa deshidrogenasa en *Herbaspirillum seropedicae* Z69 , 2013, X Encuentro Nacional de Microbiólogos (SUM, Sociedad Uruguaya de Microbiología), Montevideo
- CATALÁN, A.I.; G. GOMEZ; AK MALÁN; BATISTA S.B. Aplicación del análisis de flujos metabólicos en cultivos alimentados de *Herbaspirillum seropedicae* bajo condiciones de síntesis de poli-3-hidroxibutirato, 2013, 8vas Jornadas de la SBBM, Montevideo
- CATALÁN, A.I.; AK MALÁN; M. MINTEGUIAGA; FERREIRA, F.; BATISTA S.B. Metabolismo del ácido propiónico y producción del copolímero poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) en *Herbaspirillum seropedicae*, 2013, Encuentro Nacional de Químicos 2013, Montevideo
- CATALÁN, A.I.; AK MALÁN; BATISTA S.B. Biopolymers produced by specific bacterial genera, 2012, Workshop Sustainable Production of Biopolymers and other bio-based products , San Pablo, Brasil
- K. MALÁN; CATALÁN, A.I.; BATISTA S.B. Estudio del metabolismo de xilosa en *Herbaspirillum seropedicae* Z69 orientado a optimizar la producción de PHB a partir de hemicelulosa., 2010, XIII Jornadas Sociedad Uruguaya de Biociencias, Piriápolis
- B. MENDEZ; M.A. PRIETO; L. SILVA; BATISTA S.B.; G. GOMEZ; M. REIS; G. ESPÍN; ORTEGA S.; M. BERLANGA; RAMON D. "Optimización de procesos industriales para la obtención de bioplásticos y otros productos. Proyecto CYTED-2009 P309RT0120 (PRIBOP)", 2010, XX Congreso Latinoamericano de Microbiología. ALAM , Montevideo, Uruguay

