

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias de la Vida
con orientación en Biotecnología Marina**

**Expresión de los genes piruvato cinasa de *Synechocystis* sp.
PCC 6803 y su relación con la producción de PHB**

Tesis
para cubrir los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestra en Ciencias

Presenta:

Ana Laura Villagómez Aranda

Ensenada, Baja California, México.
2017

Tesis defendida por

Ana Laura Villagómez Aranda

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Elizabeth Ponce Rivas

Directora de tesis

Miembros del Comité

Dra. Meritxell Riquelme Pérez

Dr. Ernesto García Mendoza



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez

Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez

Directora de Estudios de Posgrado

Ana Laura Villagómez Aranda © 2017

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis

Resumen de la tesis que presenta **Ana Laura Villagomez Aranda** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestría en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología marina.

**Expresión de los genes piruvato cinasa de *Synechocystis* sp. PCC 6803
y su relación con la producción de PHB**

Resumen aprobado por:

Dra. Elizabeth Ponce Rivas
Directora de tesis

Los bioplásticos como el poli-hidroxitirato (PHB) son una alternativa sustentable y biodegradable a los plásticos petroquímicos, que representan un serio problema de contaminación. Sin embargo, no existe un sistema eficiente de producción por el alto costo de productos de fermentación en el caso de bacterias heterotróficas, y la baja tasa de producción en bacterias fotosintéticas. Las estrategias para optimizar la acumulación de PHB consisten en la manipulación de sustratos en el cultivo bacteriano y/o la ingeniería genética. Estas se enfocan en la estimulación de las vías metabólicas centrales como la glicólisis, en la que uno de los puntos de control y distribución de carbono es el piruvato, por lo que es un blanco potencial para ingeniería genética. *Synechocystis* posee dos genes codificantes para la enzima piruvato cinasa *pyk1* (*sll0587*) y *pyk2* (*sll1275*), de los cuales no hay información de la importancia de éstos en la formación de compuestos de interés como el PHB. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la relación entre la expresión de los genes *pyk1* y *pyk2* con la producción de PHB. Para ello, se caracterizó la producción de PHB de *Synechocystis* cultivada en diferentes condiciones (fotomixotrófica con glucosa y acetato; y/o limitación de nitrógeno). Se cuantificó el contenido de PHB por espectrofotometría, y se evaluó la expresión relativa de los genes *pyk1* y *pyk2* por qPCR para cada condición de cultivo. Posteriormente se correlacionó ambas variables. La mayor producción de PHB se encontró en los cultivos en la condición fotomixotrófica con glucosa, tanto con nitrógeno como con limitación de nitrógeno, con un 10.3 y 11.0 % de PHB (w/w), respectivamente, lo que representa un incremento de 1.5 veces en comparación con la condición fotoautotrófica. La mayor expresión relativa del gen *pyk1* se obtuvo en la condición de limitación de nitrógeno, mientras que se observó un incremento en la expresión del gen *pyk2* en las condiciones de fotomixotrofia, siendo mayor en la condición en limitación de nitrógeno con suplemento de glucosa. La correlación entre la producción de PHB y la expresión de los genes *pyk* tuvo un coeficiente de - 0.28 para el gen *pyk1* y 0.55 para *pyk2*. Estos indican una relación de la producción de PHB débil negativa para el gen *pyk1*, y una relación moderada positiva para el gen *pyk2*. Los datos sugieren que los genes *pyk* tienen un papel en el flujo metabólico, independientemente de las pequeñas diferencias en la expresión de los genes, por lo que el potencial de utilizarlos como blanco en ingeniería metabólica es una opción viable.

Palabras clave: PHB, *Synechocystis*, piruvato cinasa, expresión génica.

Abstract of the thesis presented by **Ana Laura Villagomez Aranda** as a partial requirement to obtain the Master degree in Life Sciences with orientation in Marine Biotechnology.

**Expression of the pyruvate kinase genes of *Synechocystis* sp. PCC 6803
and their relationship to the PHB production**

Abstract approved by:

Dra. Elizabeth Ponce Rivas
Thesis Director

Bioplastics such as the poly-hydroxybutyrate (PHB) are a sustainable and biodegradable alternative to petrochemical plastics, which represent a serious problem of environmental contamination. However, there is not an efficient production system, because of the high cost of fermentation products when using heterotrophic bacteria, and the low rate of production when using photosynthetic bacteria. Some strategies to increase PHB accumulation are substrate modification of the culture medium and the metabolic engineering, in which the pyruvate is a potential point by its central position and control of the carbon distribution of the cells. *Synechocystis* has two genes encoding pyruvate kinase, *pyk1* (*sll0587*) and *pyk2* (*sll1275*) from which there is no information of its importance in the synthesis of compounds of interest such as the PHB. The objective of this work was to study the relationship between the expression of the *pyk1* and *pyk2* genes with the PHB production. The production of PHB in different culture media was analysed by spectrophotometric quantification, and the relative expression of the *pyk1* and *pyk2* genes was obtained by qPCR, and the correlation between the two variables was determined. The highest production of PHB was found in the cultures in the photomixotrophic condition with glucose, both with nitrogen and with nitrogen limitation, with 10.3 and 11.0 % of PHB (w/w), respectively, which represents an increase of 1.5 times in comparison with the photoautotrophic condition. The highest level of expression of the *pyk1* gene was obtained in the condition with nitrogen limitation, while an increase in the expression levels of the *pyk2* gene was observed in the photomixotrophic condition, being higher in the condition in nitrogen limitation with glucose supplementation. The correlation between the PHB production and the expression of the *pyk* genes had a coefficient of -0.28 for *pyk1* gene and 0.55 for *pyk2* gene. The relation between the variables was negative for *pyk1* and positive for *pyk2*, with a weak relation for *pyk1* and a moderate relation for *pyk2*. These results suggest that *pyk* genes may play a role in the metabolic flux, despite the small differences in gene expression, and the potential for metabolic engineering is still a viable option.

Keywords: PHB, *Synechocystis*, pyruvate kinase, gene expression.

Dedicatoria

*“Lo que era ya no es lo que soy.
Y lo que soy no es aun lo que puedo ser.”*

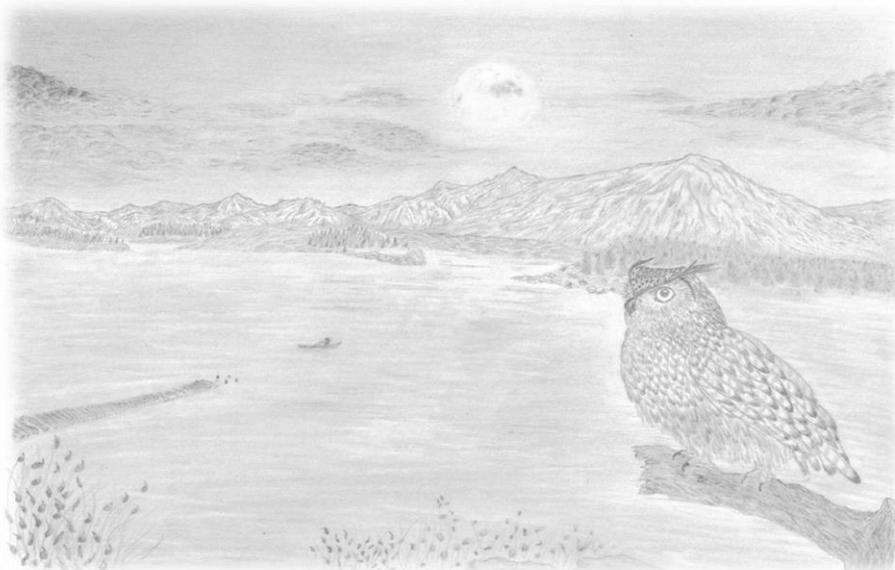
J. Katzenbach

*La genética define nuestra vida,
pero la epigenética define nuestro ser..*

Este trabajo es dedicado a mi familia:

- ✚ Mi abuela, para mí mi madre: Teresa Aranda Flores*
- ✚ Mis tíos Luz, Lucy, Rafa y Laura Villagómez Aranda, y Félix Vargas Alegría.*
- ✚ Mi primo Daniel Vargas Villagómez.*

*Porque ellos me han convertido en quién soy;
por ese apoyo, ánimo y amor incondicional,
que me dio soporte, estructura y fortaleza;
por estar conmigo cada día durante estos meses
sin importar los 2 500 km de distancia.*



Agradecimientos

*"Ningún hombre es una isla,
todo hombre es una parte de un conjunto."
John Donne*

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el otorgamiento de la beca de maestría (folio 21881) a través el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC), la cual me permitió continuar con mis estudios.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, y en particular al Posgrado en Ciencias de la Vida, por permitirme realizar esta nueva etapa de mi formación profesional y personal dentro de su seno.

A la Dra. Elizabeth Ponce, por reclutarme en su laboratorio, las facilidades y recursos para llevar a cabo el presente trabajo.

A los miembros del comité de tesis: el Dr. Ernesto García Mendoza y la Dra. Meritxell Riquelme, por su participación y apoyo durante el trabajo de tesis.

A Laura Liliana López, por su gran apoyo y ayuda para resolver los problemas técnicos en la técnica de PCR tiempo real.

A Manuel y Johana, por su apoyo durante su servicio social para el mantenimiento de mis cultivos durante las temporadas vacacionales, sin los cuales no

A la Dra. Pilar Sánchez Saavedra, por sus conocimientos y enseñanzas, por su apoyo y paciencia, por sus consejos tanto profesionales como personales. Por ser una gran persona, y una investigadora dedicada a quien me alegra haber conocido, y en quien encuentro un modelo a seguir...

A mi amigo Manuel Morales, por estar a mi lado en todo momento, por su gran actitud y franqueza; por su apoyo moral y escucharme cuando fue necesario; por ser siempre muy activo y estar dispuesto a todo: trabajar, pasear, tomar una cerveza, ir al cine, y bailar flamenco...

A mis amigos Manuel, Fabián Siqueiros y Joel Ricci, quienes estuvieron ahí para compartir momentos de diversión, relajación, trabajo y estrés...

A Javier robles, Anaid, Edgar, Lolis, Leonel y demás chicos del laboratorio, por su compañía, hacer más placentero el ambiente de trabajo, las pláticas durante la comida, y hacerme sentir esa vecina que es casi parte de la familia...

A mis compañeros de generación, por enriquecer esta experiencia, en quienes sé que encontraré excelente colegas en un futuro no tan lejano.

A todo el personal de Cicese, en particular al Departamento de Servicios Escolares y Biblioteca, por su gran actitud e inclusión, que hizo más ameno cada día de trabajo, así como por facilitar todos los trámites y procesos administrativos.

A Ernestina por su gran corazón y generosidad, por traer a mí casa a pequeños demonios peludos como Many, Ely y en especial Frida, que me dieron mucha alegría durante su estancia...

A las chicas de Andajaleo, por mostrarme lo bonito que es el flamenco y hacerme sentir como en familia.

A mis roomies Blanca Durán y Enrique Pérez, que si bien nos conocemos desde hace 7 años, por estos 2 años que hemos vivido bajo el mismo techo.

A todos aquellas personas que de alguna forma influyeron en mi durante esta etapa.

*Y por último, agradezco **Mí**,
por tomar la decisión de llegar hasta aquí
por arriesgarme a conocer nuevos horizontes,
por en pie y continuar hacia adelante a pesar de todo,
porque esta experiencia ahora forma parte de mí,
los momentos buenos, malos, frustrantes y alegres.*

Tabla de Contenido

	Página
Resumen en español	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	xi
Lista de tablas	xiii
Capítulo 1. Introducción	1
1.1. Antecedentes	2
1.1.1. Las cianobacterias en la biotecnología.....	2
1.1.2. <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	4
1.1.3. Polihidroxicanoatos	5
1.1.4. Biosíntesis de PHB	6
1.1.5. Acumulación de PHB en <i>Synechocystis</i>	8
1.1.6. Metabolismo de Carbono	11
1.1.7. Piruvato cinasa	12
1.1.8. <i>Pyk1</i>	13
1.1.9. <i>Pyk2</i>	14
1.2. Justificación	14
1.3. Hipótesis.....	15
1.4. Objetivos	15
1.4.1. <i>Objetivo general</i>	15
1.4.2. <i>Objetivos específicos</i>	15

Capítulo 2. Metodología	16
2.1 Organismo y condiciones de cultivo	17
2.1.1 Cinética de crecimiento	17
2.2 Efecto de luz y agitación en la acumulación de PHB	18
2.2.1 Extracción de PHB.....	19
2.2.2 Cuantificación de PHB.....	20
2.2.3 Determinación de peso seco	20
2.3 Relación entre el crecimiento de <i>Synechocystis</i> y la acumulación de PHB.	21
2.4 Acumulación de PHB en condiciones de fotomixotrofia y limitación de nitrógeno.	21
2.5 Análisis de expresión de <i>pyk1</i> y <i>pyk2</i>	22
2.5.1 Extracción de RNA total	23
2.5.2 Transcripción reversa.....	23
2.5.3 Extracción de DNA genómico.	24
2.5.4 PCR punto final de cDNA	25
2.5.5 PCR tiempo real (qPCR).....	26
2.6 Análisis estadístico.....	26
Capítulo 3. Resultados	27
3.1 Efecto del tiempo de exposición a la de luz y tipo de agitación en la acumulación de PHB	27
3.1.1 Cinética de crecimiento en diferentes condiciones de fotoperiodo y agitación.....	27
3.1.2 Acumulación de PHB en diferentes condiciones de fotoperiodo y agitación	28
3.2 Relación entre el crecimiento y la acumulación de PHB.	30
3.3 Efecto de fotomixotrofia y limitación de N.....	31
3.3.1 Cinética de crecimiento en diferentes medios de cultivo	31
3.3.2 Acumulación de PHB en diferentes medios de cultivo.....	35

3.4	Expresión de los genes <i>pyk1</i> y <i>pyk2</i>	36
3.4.1	Extracción de DNA genómico de <i>Synechocystis</i>	36
3.4.2	Extracción de RNA total.	37
3.4.3	Síntesis de cDNA	38
3.4.4	qPCR.....	39
3.4.4.1	Gradiente de temperatura.....	39
3.4.4.2	Gradiente de concentración de oligonucleótidos.....	39
3.4.4.3	Gradiente de cantidad de templado.....	39
3.4.4.4	Eficiencia de amplificación por curvas estándar.....	43
3.4.4.5	Cuantificación de la expresión de los genes <i>pyk1</i> y <i>pyk2</i> en las muestras de <i>Synechocystis</i> en diferentes medios de cultivo	44
3.5	Relación entre la acumulación de PHB y la expresión de <i>pyk1</i> y <i>pyk2</i>	46
Capítulo 4. Discusión		47
4.1	Efecto de las condiciones de luz y agitación en la acumulación de PHB	47
4.2	Acumulación de PHB en <i>Synechocystis</i> en relación con el crecimiento	49
4.3	Efecto de fotomixotrofia y limitación de N en la acumulación de PHB.....	51
4.4	Expresión de los genes <i>pyk1</i> y <i>pyk2</i>	55
4.4.1	Estandarización de condiciones de qPCR.....	55
4.4.2	Expresión de genes <i>pyk1</i> y <i>pyk2</i>	56
4.5	Relación los genes <i>pyk1</i> y <i>pyk2</i> y la acumulación de PHB	58
Capítulo 5. Conclusiones.....		60
Literatura citada.....		61
Anexos		69

1. Datos de crecimiento y peso seco para ensayo de efecto de la agitación y luz en la acumulación de PHB.....	69
2. Curva estándar de PHB.....	70
3. Datos de crecimiento y peso seco de ensayo de acumulación de PHB en relación con el crecimiento en <i>Synechocystis</i>	71
4. Datos de peso seco y PHB de ensayo de efecto de fuentes de carbono y limitación de nitrógeno	72
5. Datos de extracción de RNA.....	75
6. Cinética de pH de cultivo de <i>Synechocystis</i>	Error! Marcador no definido.
7. Fase de crecimiento lineal en cultivos de cianobacterias	80

Lista de figuras

Figura	Página
Figura 1. Flujo metabólico del carbono en <i>Synechocystis</i>	3
Figura 2. PHA.....	5
Figura 3. Vía de biosíntesis de PHB.. ..	6
Figura 4. Vías glicolíticas en cianobacterias.	12
Figura 5. Reacción enzimática de piruvato cinasa.	13
Figura 6. Diagrama experimental de la tesis.....	16
Figura 7. Zona de cultivo de <i>Synechocystis</i>	19
Figura 8. Curva de crecimiento de <i>Synechocystis</i> en diferentes condiciones de iluminación y agitación.....	27
Figura 9. Contenido de PHB en <i>Synechocystis</i> en diferentes condiciones de agitación y luz.	29
Figura 10. Contenido de PHB en <i>Synechocystis</i> en relación con el crecimiento.....	30
Figura 11. Cambio de coloración en <i>Synechocystis</i> en diferentes medios de cultivo.....	32
Figura 12. Curva de crecimiento de <i>Synechocystis</i> en diferentes medios de cultivo.	33
Figura 13. Contenido de peso seco orgánico de <i>Synechocystis</i> en diferentes medios de cultivo. ...	34
Figura 14. Contenido de PHB en <i>Synechocystis</i> en diferentes medios de cultivo.....	35
Figura 15. Extracción de gDNA de <i>Synechocystis</i>	37
Figura 16. Extracción de RNA.....	38
Figura 17. Comprobación de cDNA por PCR punto final.....	38
Figura 18. Gradiente de temperatura en qPCR.....	40
Figura 19. Gradiente de concentración de oligonucleótidos en qPCR.....	41
Figura 20. Gradiente de concentración de templado en qPCR.....	42
Figura 21. Curvas estándar en qPCR para los genes <i>rnpB</i> , <i>pyk1</i> y <i>pyk2</i>	43

Figura 22. Expresión de los genes <i>pyk1</i> y <i>pyk2</i> en diferentes medios de cultivo..	44
Figura 23. Cambios en los niveles de expresión relativa de <i>pyk1</i> y <i>pyk2</i> al día 5 de cultivo en los diferentes medios en relación con el medio BG-11	45
Figura 24. Relación entre contenido de PHB y expresión de los genes <i>pyk1</i> y <i>pyk2</i> ..	46
Figura 25. Curva estándar de PHB.....	70
Figura 26. Espectro de absorción de PHB en estándar y muestra.....	70
Figura 27. Extracción de RNA día 10.....	76
Figura 28. Extracción de RNA día 15.....	77
Figura 29. Extracción de RNA día 20.....	78
Figura 30. Cambio de pH durante la cinética de crecimiento	79
Figura 31. Fases de crecimiento en cultivo de <i>Synechocystis</i>	80

Lista de tablas

Tabla	Página
Tabla 1. Acumulación de PHB en <i>Synechocystis</i> en diferentes medios de cultivo.....	9
Tabla 2. Acumulación de PHB en <i>Synechocystis</i> modificada genéticamente.	10
Tabla 3. Condiciones de luz y agitación.....	18
Tabla 4. Medios de cultivo a utilizar.....	22
Tabla 5. Oligonucleótidos para qPCR de los genes <i>rnpB</i> , <i>pyk1</i> y <i>pyk2</i>	25
Tabla 6. Valores de μ y t_d para <i>Synechocystis</i> en diferentes condiciones de iluminación y agitación.	69
Tabla 7. Valores de peso seco y PHB de <i>Synechocystis</i> en diferentes condiciones de luz y agitación.	69
Tabla 8. . Valores para la curva estándar de PHB.....	70
Tabla 9. Valores de μ y t_d para cultivo de <i>Synechocystis</i>	71
Tabla 10. Valores de peso seco y PHB en cultivo de <i>Synechocystis</i>	71
Tabla 11. Valores de μ de cultivos en fotomixotrofia y/o limitación de N.....	72
Tabla 12. Valores de t_d de cultivos en mixotrofia y/o limitación de N	72
Tabla 13. Peso seco de <i>Synechocystis</i> en diferentes medios de cultivo.	73
Tabla 14. Valores de PHB para <i>Synechocystis</i> en diferentes medios de cultivo.	74
Tabla 15. Valores de extracción de RNA día 0.....	75
Tabla 16. Valores de extracción de RNA día 5.....	75
Tabla 17. Valores de extracción de RNA día 10.....	76
Tabla 18. Valores de extracción de RNA día 15.....	77
Tabla 19. Valores de extracción de RNA día 20.....	78

Capítulo 1. Introducción

El plástico es uno de los materiales más utilizados en nuestra vida diaria en múltiples aplicaciones con el fin de mejorar nuestra calidad de vida (Emadian, Onay, & Demirel, 2017; Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016). Es un material predilecto por sus interesantes propiedades como son fuerza mecánica, ligereza, flexibilidad, versatilidad, inercia química y durabilidad, lo que junto a su bajo costo y rápida producción a gran escala han permitido la diversificación de sus aplicaciones (Balaji, Gopi, & Muthuvelan, 2013; Bornscheuer, 2016; Rehm, 2010; Freinkel, 2011).

El plástico se encuentra en prácticamente todos los objetos y herramientas que utilizamos al grado que se considera que vivimos en un “planeta plástico”. En 2015 se reportó una producción global de 322 millones de toneladas (PlasticsEurope, 2016), con un valor superior a los 400 billones de dólares. Se considera que la producción de plástico tiene una tasa de crecimiento anual de 10% aproximadamente debido a la creciente demanda por el continuo crecimiento poblacional (P. B. S. Albuquerque & Malafaia, 2017).

Se estima que anualmente se generan alrededor de 34 millones de toneladas en desperdicios, de los cuales el 93 % llega directamente a los campos y océanos. El plástico para ser degradado por completo requiere de un tiempo de entre 100 a 400 años en función del tipo de material, por lo que su presencia en el ambiente representa un serio problema de contaminación. Además, provoca una interferencia en la cadena trófica de los organismos, debido a que es ingerido por éstos accidentalmente. Se han encontrado residuos plásticos dentro del tracto digestivo de más de 663 especies. Otro problema asociado al uso de plásticos petroquímicos es la disponibilidad y precio del petróleo y sus derivados, ya que la producción del plástico depende en un 90% de éstos (Bornscheuer, 2016; North & Halden, 2014; L. Sharma, Kumar Singh, Panda, & Mallick, 2007; Sudesh & Iwata, 2008).

En las últimas décadas ha surgido interés por desarrollar materiales biodegradables y sustentables como alternativa a los plásticos petroquímicos. Aquí surgen los bioplásticos, que son polímeros producidos por sistemas biológicos, como son microorganismos y plantas, y sus derivados (Elain et al., 2016; Hondo et al., 2015; Khanna & Srivastava, 2005; Luengo, García, Sandoval, Naharro, & Olivera, 2003; B. H. a. Rehm, 2010). Aunque en 2014 se produjeron 1.7 millones de toneladas de bioplásticos, a la fecha no existe un sistema de producción eficiente. La principal fuente para la producción de bioplásticos consiste en bacterias heterotróficas, cuya capacidad de producción es de 100 mil toneladas por año, con un costo de

2.5 euros/kg, el cual representa un incremento de 5 a 10 veces más alto en comparación con los plásticos petroquímicos cuyo costo es de 0.25 a 0.5 euros/Kg (Khanna & Srivastava, 2005; B. H. A. Rehm, 2010).

Una alternativa es el uso de cianobacterias como “fábricas microbianas”. El requerimiento mínimo de nutrientes, su naturaleza fotoautotrófica, accesibilidad genética y alta eficiencia fotosintética, las convierte en un sistema de producción ideal para la obtención de productos de interés, con lo que contribuyen al establecimiento de una economía verde (Angermayr, Gorchs Rovira, & Hellingwerf, 2015; Branco, 2014; N. K. Sharma, Rai, & Stal, 2014).

1.1. Antecedentes

1.1.1. Las cianobacterias en la biotecnología.

Las cianobacterias son una de las formas de vida más antiguas en la Tierra. Su éxito evolutivo se refleja en su gran flexibilidad metabólica, al ser capaces de realizar fotosíntesis oxigénica, fermentación, fotosíntesis anoxigénica, heterotrofia facultativa, y en algunas especies la fijación de nitrógeno. Esta plasticidad permite a las cianobacterias adaptarse a una amplia variedad de condiciones, que se observa en su distribución cosmopolita (Abed, Dobretsov, & Sudesh, 2009; Ponce, 2009; Lai & Lan, 2015).

En la actualidad estos organismos procariontes fotoautotróficos se han convertido en candidatos prometedores para la producción de compuestos de interés biotecnológico, debido a que a partir de CO₂ y luz solar como únicas fuentes de carbono y energía, se puede generar alcoholes, ácidos orgánicos, azúcares, y ácidos grasos (Figura 1), con aplicaciones en diversos sectores industriales (Abed, Dobretsov, & Sudesh, 2009; Angermayr, Gorchs Rovira, & Hellingwerf, 2015; Ruffing, 2016). Una de las principales áreas de interés es la producción de biocombustibles con el objetivo de reducir la dependencia de energía fósil y reducir la emisión de gases de efecto invernadero. Asimismo ha surgido el creciente interés por la producción de bioplásticos. En la industria farmacéutica el interés reside en la producción de metabolitos secundarios y compuestos bioactivos con actividad citotóxica, antitumoral, antiviral y antibiótica para el tratamiento de enfermedades. Otras aplicaciones de las cianobacterias incluyen la bioremediación, biodetección, producción de proteínas, producción de hidrógeno, y como suplemento alimenticio (Angermayr, Gorchs Rovira, & Hellingwerf, 2015; Lai & Lan, 2015; Ruffing, 2011).

Además de la versatilidad nativa de las cianobacterias, el uso de la tecnología y las herramientas moleculares a través de la ingeniería genética abre la posibilidad de optimizar la producción de compuestos de interés, así como expandir el rango de precursores metabólicos y productos (Angermayr et al., 2015; Ruffing, 2011).

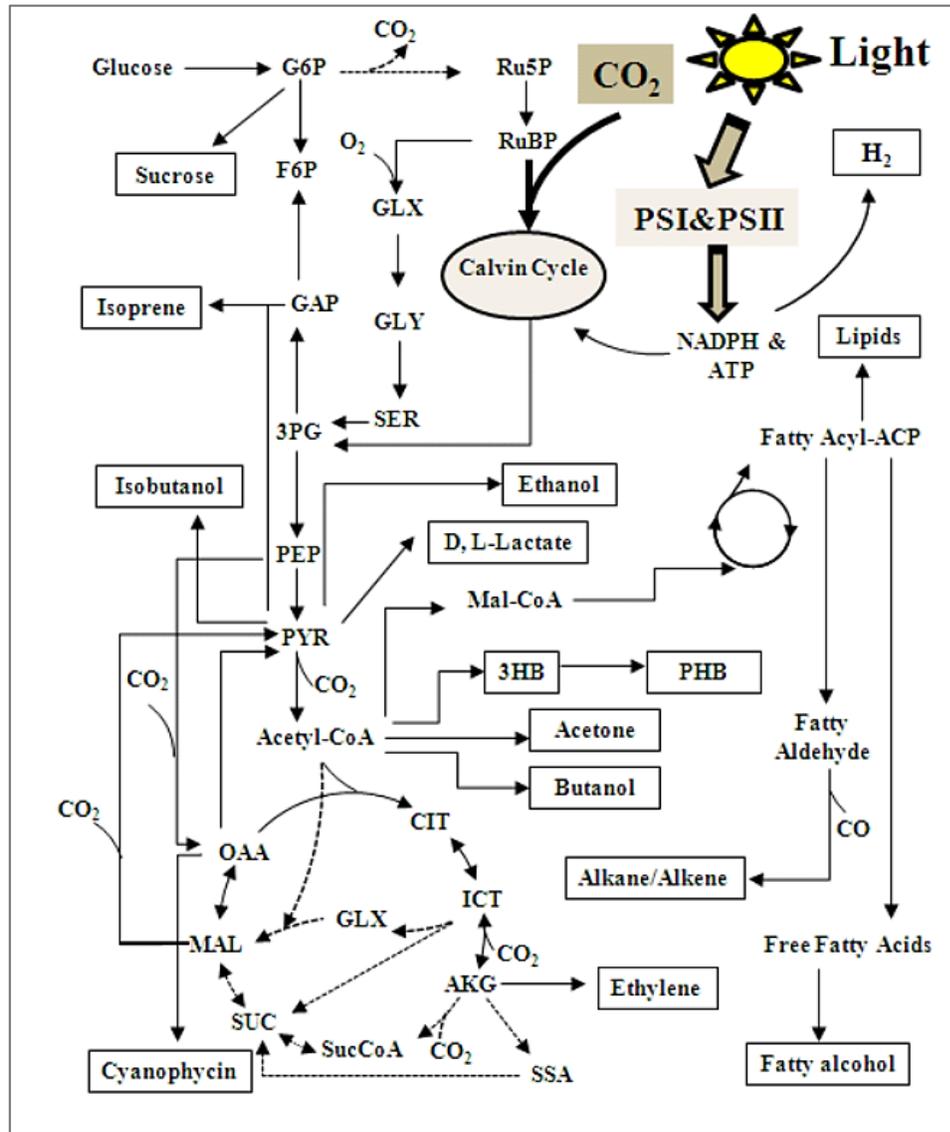


Figura 1. Flujo metabólico del carbono en *Synechocystis*. En el ciclo de Calvin-Benson se fija el CO_2 en forma de 3fosfoglicerato (3PG), que alimenta la vía glicolítica donde se produce piruvato (Pyr) que es convertido a acetil-CoA a partir del cual se distribuye al ciclo de Krebs (TCA), producción de lípidos, alcoholes, alcanos, y PHB, entre otros (Yu et al., 2013).

Existe una gran variedad de cianobacterias dado que se han descrito más de 200 especies. Sin embargo, las más utilizadas con fines biotecnológicos son *Anabaena* sp. PC 7120, *Nostoc* sp., y *Spirulina platensis* entre las cianobacterias de forma filamentosa; mientras que de forma unicelular son destacan *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Synechococcus* sp. PCC 70002 y *Synechocystis* PCC 6803 (Abed et al., 2009; Lai & Lan, 2015).

1.1.2. *Synechocystis* sp. PCC 6803

Synechocystis sp. PCC 6803 (referida como *Synechocystis* de aquí en adelante) es una especie planctónica unicelular de agua dulce con crecimiento fotosintético y heterotrófico facultativo, no diazotrófica. Esta especie ha sido utilizada ampliamente como organismo modelo por su corto tiempo de generación, versatilidad metabólica y amplio rango de adaptación a diferentes condiciones ambientales (Angermayr et al., 2015; Bhabatarini Panda, Jain, Sharma, & Mallick, 2006; Ruffing, 2011).

El genoma de *Synechocystis* está completamente secuenciado, y consiste en un cromosoma de 3.6 Mb y siete plásmidos con tamaño variable de 2.3 a 120 kb (Kaneko, Sato, Kotani, Tanaka, & Asamizu, 1996). Es una célula con competencia natural, es decir, puede integrar DNA exógeno en su genoma por recombinación homóloga (Angermayr et al., 2015; Bhabatarini Panda et al., 2006; Ruffing, 2011). Además, un aspecto interesante es que *Synechocystis* es una especie altamente poliploide, ya que puede presentar múltiples copias de su cromosoma en función de la fase de crecimiento y/o las condiciones ambientales (Griese & Lange, 2011; Lai, 2015).

Otro aspecto relevante es que las cianobacterias poseen un reloj circadiano que influye en la expresión de genes implicados en mecanismos como la transcripción, la traducción, el transporte de compuestos, la transducción de señales, la respiración y la síntesis de compuestos como el polímero poli- β -hidroxibutirato (PHB). Este último, tiene un gran potencial para aplicaciones como bioplásticos (Kucho et al., 2005).

1.1.3. Polihidroxicanoatos

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son polímeros constituidos por unidades de (R)-hidroxi-ácidos grasos (Figura 2 A), que son producidos naturalmente por más de 300 diferentes microorganismos como un material de reserva energética. Este se acumula en cuerpos de inclusión, denominados gránulos de PHA, dentro de la célula en respuesta a estrés fisiológico. El gránulo está compuesto por un centro hidrofóbico amorfo de PHA (97.7 %) rodeado por una monocapa de fosfolípidos (0.46%) y proteínas (1.87 %), las cuales incluye tanto proteínas estructurales como con actividad enzimática (Figura 2 B) (Khanna & Srivastava, 2005; Madison & Huisman, 1999; Pötter & Steinbüchel, 2005; B. H. a. Rehm, 2010).

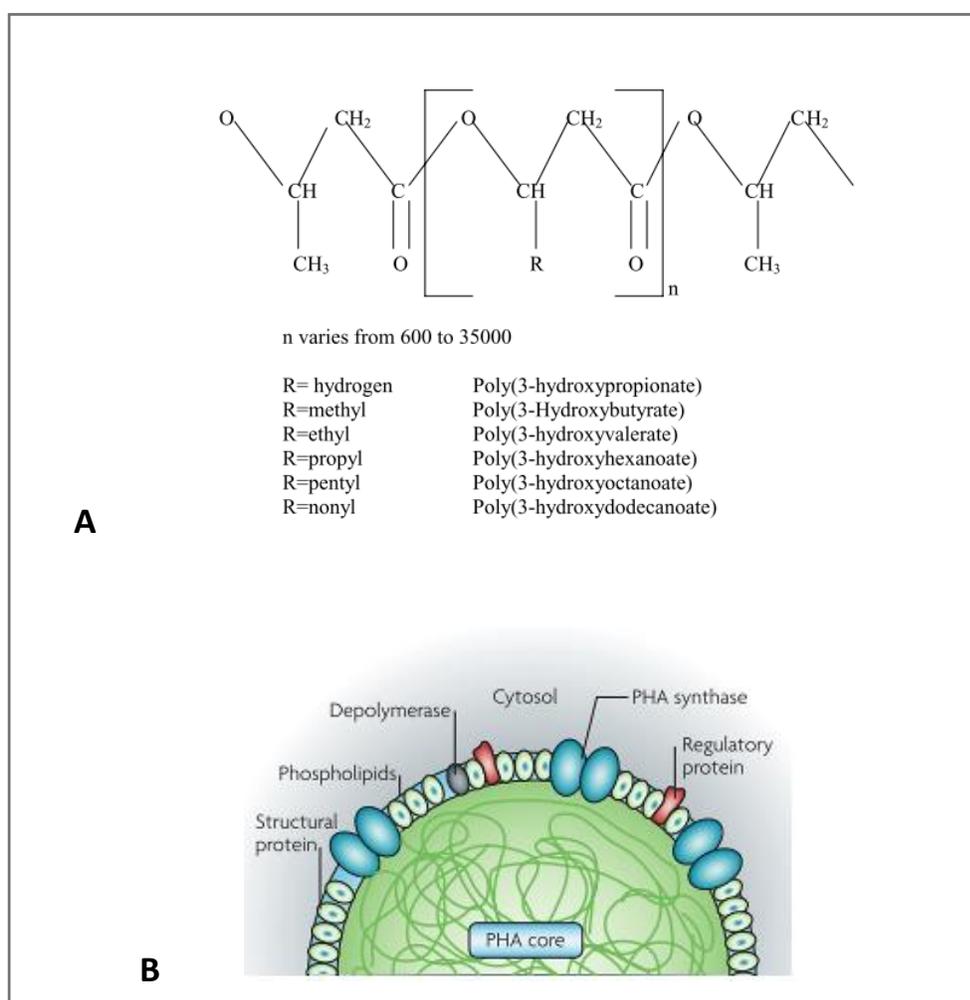


Figura 2. PHA. A) Estructura química de PHA. La fórmula general son unidades de ácidos grasos hidroxi con un grupo R que puede ser un grupo acil, del cual se han descrito más de 150 compuestos monoméricos (Khanna & Srivastava, 2005). B) Estructura de un gránulo de PHA. Se compone por una membrana monolipídica con proteínas integrales con actividad enzimática relacionadas a su catabolismo y anabolismo como sintasas y depolimerasas (Rehm, 2010).

El PHA puede ser sometido a procesamiento termoplástico y posee propiedades similares a las del polipropileno, con la ventaja de ser biodegradable. Por ello, es un material potencial para utilizarse como alternativa a los plásticos petroquímicos en aplicaciones como empaquetamiento. Además el PHA es idóneo para usarse en implantes médicos y como transportadores para entrega de fármacos por nanotecnología por su biocompatibilidad, mencionar algunos ejemplos de sus múltiples aplicaciones (Abed et al., 2009; Luengo et al., 2003; B. H. a. Rehm, 2010).

Las características y el nombre de los PHAs dependen de los monómeros que conforman la estructura del polímero. El PHA más sencillo, más ampliamente distribuido en los microorganismos y comúnmente estudiado es el homo-polímero de 3-hidroxi butirato (PHB) (Khanna & Srivastava, 2005; Luengo et al., 2003; B. H. a. Rehm, 2010).

1.1.4. Biosíntesis de PHB

La ruta de biosíntesis de PHB está altamente conservada en las bacterias. Ésta consiste en tres reacciones, a cargo de tres enzimas: la β -cetotilasa, la acetoacetyl-CoA reductasa, y la PHB sintasa (Figura 3), las cuales llevan a la formación del polímero de PHB a partir de moléculas de acetyl-CoA (Hondo et al., 2015; Khanna & Srivastava, 2005; B. H. a. Rehm, 2010).

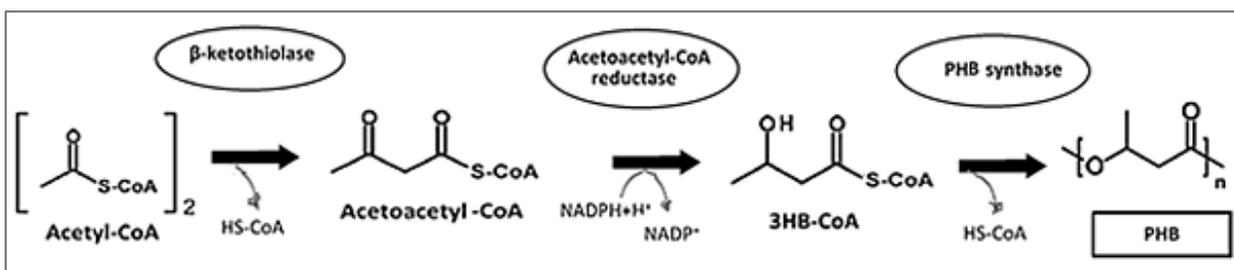


Figura 3. Vía de biosíntesis de PHB. La síntesis de PHB ocurre en 3 reacciones: i) la condensación de 2 acetyl-CoA por una β -cetotilasa para producir acetoacetyl-CoA; ii) la reducción a 3-hidroxi butiril-CoA por una acetoacetyl-CoA reductasa dependiente de NADPH; y iii) la polimerización por una PHB sintasa.

La regulación de la vía biosintética de PHB es compleja, ya que involucra señales ambientales, metabólicas y genéticas. En condiciones de una fuente excesiva de carbono, limitación de nutrientes como N y P, así como una alta incidencia lumínica, y limitación de intercambio de gases se favorece su acumulación en las células (Abed et al., 2009; Hondo et al., 2015; T Monshupanee & Incharoensakdi, 2013; L. Sharma & Mallick, 2005; Xu et al., 2002).

Los principales efectores metabólicos para la síntesis de PHB son la concentración de acetil-CoA y el NADH/NAD⁺. La β -cetotilasa es inhibida por un exceso de CoA libre, siendo la disponibilidad de acetil-CoA un factor inductor para la formación de PHB. Por su parte, el incremento en el NADH, que ocurre cuando nutrientes como la fuente de N es agotada, inhibe las enzimas del ciclo TCA y favorece la dirección del flujo de carbono a la acumulación de PHB (Hondo et al., 2015; Khanna and Srivastava, 2005; Luengo et al., 2003; Shrivastav et al., 2013).

Genéticamente la vía de PHB consiste básicamente en el operón *phaABC*, el cual comprende los genes *phaA*, *phaB* y *phaC*, donde cada uno codifica para una de las enzimas de la ruta biosintética (Figura 3). Existen cuatro clases de sintasas según su composición: clase I y II de una sola subunidad (PhaC), clase III y IV de dos subunidades (PhaEC y PhaRC respectivamente) (Luengo et al., 2003; B. H. a. Rehm, 2010; B. H. a Rehm, 2003; Stubbe et al., 2005). Otros elementos implicados en la formación de los gránulos de PHB incluye proteínas catalíticas como la PhaZ (PHA depolimerasa), enzima que degrada PHA; PhaG (transacilasa) enzima que participa en la síntesis de PHA a partir de ácidos grasos; PhaJ (enoil-CoA hidratasa), así como las proteínas PhaD y PhaR (reguladores transcripcionales); y PhaI, PhaF y PhaP (fasinas), las cuales tienen un papel estructural en la formación del gránulo y regulador en el control de forma, tamaño y número de gránulos (Hauf, Watzer, Roos, Klotz, & Forchhammer, 2015; Pötter & Steinbüchel, 2005; B. H. A. Rehm, 2006).

Synechocystis presenta una sintasa clase III, que consiste en un heterodímero, donde cada subunidad es codificada por un gen diferente *phaC* y *phaE*. Además en esta especie se ha identificado una fasina (*phaP*), que regula el volumen y tamaño de los gránulos de PHB (Hauf et al., 2015). Así mismo la disrupción de los genes *sll0461* y *sll0565*, codificantes para proteínas hipotéticas, incrementan la acumulación de PHB (Osanai et al., 2013).. El gen *sll0783* se cree tiene un papel regulatorio, dado que impide la acumulación de PHB (Schlebusch & Forchhammer, 2010). Además, los reguladores transcripcionales *SigE* y *Rre37* activan la expresión de genes relacionados al catabolismo de carbohidratos y la biosíntesis de PHB (Nakaya et al., 2015)

1.1.5. Acumulación de PHB en *Synechocystis*

El PHB es sintetizado en una proporción de hasta un 90% (w/w) del peso seco (PS) celular por bacterias heterotróficas como *Cupriavidus necator* en fermentación. Sin embargo, las cianobacterias acumulan PHB en alrededor de un 10 % (w/w) (Balaji et al., 2013; Sharma et al., 2007; Khanna and Srivastava, 2005).

En *Synechocystis* se ha reportado un contenido de PHB de entre 0.04 y 6 %. La acumulación del polímero en la célula es en función en las condiciones de cultivo utilizadas. Diversos estudios han demostrado que el contenido de PHB puede estimularse por modificación de las condiciones de iluminación (ciclo luz/oscuridad), temperatura, pH, y la limitación de intercambio de gas (GEL) (B. Panda & Mallick, 2007; Bhabatarini Panda et al., 2006; L. Sharma et al., 2007). Sin embargo, el principal efector es el medio de cultivo debido a que la limitación de nutrientes como N y P, así como la suplementación con fuentes de carbono como glucosa (Glc), acetato (Ac) y fructosa (Frc) provocan un aumento en la acumulación de PHB en *Synechocystis*, como se muestra en la Tabla 1 (T Monshupanee & Incharoensakdi, 2013; Osanai et al., 2013; Sudesh, Taguchi, & Doi, 2002; Tyo, Espinoza, & Stephanopoulos, 2009).

Debido a que el proceso de optimización de la acumulación de PHB por manipulación de condiciones de cultivo ha logrado una acumulación máxima de 38 % PHB (w/w) (Panda & Mallick, 2007), el cual continúa siendo bajo en comparación a la producción de bacterias, se han realizado diversos estudios aplicando ingeniería genética (Tabla 2). Estos estudios se han basado en la inserción de los genes *pha* de *C. necator* al ser la bacteria con mayor producción, y en la alteración de factores transcripcionales, donde la producción máxima obtenida en *Synechocystis* ha sido de 35 % PHB (w/w) en combinación con la modificación del medio de cultivo (Khetkorn, Incharoensakdi, Lindblad, & Jantaro, 2016).

A partir de estos estudios se ha observado que existe una interacción directa entre los genes de biosíntesis de PHB y los genes del metabolismo catabólico de carbohidratos, debido a que ambos están bajo el control del factor transcripcional *SigE* (Nakaya et al., 2015; Osanai et al., 2013). Esto enfatiza el hecho de que conocer los mecanismos que participan en la regulación de las enzimas del metabolismo catabólico de azúcares es importante para la acumulación de PHB, ya que el flujo de carbono es una fuerza motriz fundamental para la acumulación de PHB (Angermayr et al., 2015; Lau, Foong, Kurihara, Sudesh, & Matsui, 2014; Osanai et al., 2013). Por ello es que la ingeniería de vías metabólicas se enfoca en los metabolitos intermediarios relevantes del metabolismo central, como son el piruvato, el fosfoenolpiruvato (PEP), y la acetil-CoA (Figura 1), los cuales son productos de la glicólisis (Angermayr et al., 2015; Luengo et al., 2003; Oliver & Atsumi, 2014).

Tabla 1. Acumulación de PHB en *Synechocystis* en diferentes medios de cultivo.

Medio	Contenido PHB %	Referencia
BG-11	0.6	(Osanai et al., 2013)
	1.0	(Khetkorn et al., 2016)
	3.0	(Tyo, Espinoza, & Stephanopoulos, 2009)
	3.3	(Sudesh, Taguchi, & Doi, 2002)
	3.4	(T Monshupanee & Incharoensakdi, 2013)
	3.8	(B. Panda & Mallick, 2007)
N-	8.1	(B. Panda & Mallick, 2007)
	10.9	(Xu et al., 2002)
P -	8.0	(Tyo et al., 2009)
	11.2	(B. Panda & Mallick, 2007)
Ac +	3.0	(Tyo et al., 2009)
	7.0	(Sudesh et al., 2002)
	9.9	(Xu et al., 2002)
Glc +	9.2	Monshupanee and Incharoensakdi, 2013)
	1.8	(Xu et al., 2002)
N- Ac +	14.6	(Bhabatarini Panda et al., 2006)
	15.2	(Xu et al., 2002)
P - Ac +	10.5	(Tyo et al., 2009)
	25.7	(Bhabatarini Panda et al., 2006)
N- Glc +	13.1	Monshupanee and Incharoensakdi, 2013)
	2.2	(Xu et al., 2002)
P - Glc +	15.1	Monshupanee and Incharoensakdi, 2013)
N- P - Glc +	21.8	Monshupanee and Incharoensakdi, 2013)
Oscuridad	18.9 (Ac +)	(B. Panda & Mallick, 2007)
	10.8 (Frc +)	
GEL	30 (Ac +)	(B. Panda & Mallick, 2007)
	38 (Frc + Ac +)	
N-: sin nitrógeno. P -: sin fósforo.		
Ac +: adición de 0.4 % de acetato de sodio. Glc +: adición de 0.4 % glucosa.		

Tabla 2. Acumulación de PHB en *Synechocystis* modificada genéticamente.

Modificación	Contenido PHB *	Referencia
Inserción de transposón en <i>sll046</i> (A) y <i>sll0565</i> (B)	(A) 7.5 % y 11.0 % (P- Ac+) (B) 7.0 % 10.0 % (P- Ac+)	(Tyo et al., 2009)
Inserción de operón <i>phaABC</i> de <i>R. eutropha</i>	N.D. 1.3 % (N-)	(Suzuki, Miyake, Tokiwa, Saegusa, Harusaito, & Asada, 1996)
Inserción de operón <i>phaABC</i> de <i>R. eutropha</i>	1.0 % 11.0 % (Ac+)	(Sudesh et al., 2002)
Sobreexpresión del factor <i>SigE</i> en cepa GOX50	1.4 %	(Osanai et al., 2013)
Incorporación de <i>nphT7ss</i> (acetooacetil-CoA sintasa) (A) y co-expresión con PHA sintasa exógena (B).	A: 14 %, 16% (N-), 18 % (P- Ac+ Frc+), 15 % (N- Ac+ Frc+) B: 7 %, 10 % (N-), 8 % (P- Ac+ Frc+), 12 % (N- Ac+ Frc+)	(Lau et al., 2014)
Sobreexpresión de operones nativos <i>phaAB</i> , <i>phaCE</i> y <i>phaABCE</i>	AB: 9 %, 26 % (N-), 35 % (N- Ac+) EC: 2 %, 15 % (N-) ABCE: 3 %, 15 % (N-)	(Khetkorn et al., 2016)
Sobreexpresión del operón <i>phaEC</i> y <i>phaABCE</i> de <i>M. aeruginosa</i> .	EC: 1.18 % (N-) ABEC: 6.98 % (N-)	(Hondo et al., 2015)
Inserción de <i>testB</i> (<i>tioesterasa</i>) de <i>E. Coli</i> y <i>phaAB</i> de <i>R. eutropha</i> .	533.4 mg/L de 3HB	(Wang, Pugh, Nielsen, Zhang, & Meldrum, 2013)
Sobre-expresión homóloga de la sintasa <i>phaEC</i>	37 %	(González et al, 2016, en preparación).
* El contenido de PHB se expresa en % (w/w) PSO (porcentaje en razón del peso seco orgánico). En los casos donde se evaluó la acumulación de PHB en diferentes medios, se indica entre paréntesis el medio correspondiente: ausencia de fosfato (P-), ausencia de nitrógeno (N-), suplemento de acetato 0.4% (Ac+), suplemento de fructosa 0.4% (Frc+) y sus respectivas combinaciones.		

1.1.6. Metabolismo de Carbono

El metabolismo del carbono está ampliamente conservado en los dominios de la vida. En cianobacterias las principales vías de interés son: el ciclo de Calvin-Benson-Bassham (CBB), el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), y las vías de degradación de glucosa (Adebiyi, Jazmin, & Young, 2014; Chen et al., 2016; Noor, Eden, Milo, & Alon, 2010). En el ciclo CBB se realiza la fijación de CO₂ a compuestos orgánicos, y es generalmente el paso limitante del flujo de carbono en cianobacterias (Kanno, Carroll, & Atsumi, 2017). Se lleva a cabo en un compartimento especializado, el carboxisoma, donde se localiza la enzima ribulosa 1-5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO), la cual se encarga de la fijación del CO₂ (Cameron, Wilson, Bernstein, & Kerfeld, 2013). El ciclo TCA es una parte central del metabolismo al generar poder reductor NADPH, mediante la oxidación de unidades de dos carbonos derivadas del acetil-CoA, y electrones para la fosforilación oxidativa. Además provee metabolitos precursores esenciales para la biosíntesis de componentes celulares, como el 2-oxoglutarato; y tiene una conexión importante con el metabolismo del nitrógeno (Steinhauser, Fernie, & Arau, 2012; Zhang & Bryant, 2011). Así mismo, la presencia de tres variantes diferentes del ciclo refleja su capacidad metabólica para adaptarse a las condiciones ambientales (Steinhauser et al., 2012; Zhang et al., 2016).

El catabolismo de glucosa es esencial para la obtención de energía (ATP) y precursores para la biosíntesis de componentes celulares, independientemente de la fotosíntesis, permitiendo el crecimiento celular y continúa producción de compuestos en condiciones diurnas. Las cianobacterias presentan tres vías para el catabolismo de la glucosa: la vía oxidativa de las pentosas fosfato (OPP), la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), y la vía Entner-Doudoroff (ED) (Figura 4) (Chen et al., 2016; Kanno et al., 2017).

La presencia de diversas rutas catabólicas de glucosa refleja su capacidad metabólica de cambiar de autotrofia a heterotrofia y mixotrofia. Las tres vías glicolíticas convergen en la parte baja de la glicólisis con la producción de gliceraldehído 3-fosfato (GAP) (Chen et al., 2016; Kanno et al., 2017). A partir de aquí, la enzima piruvato cinasa representa el paso de regulación más importante, al controlar flujo de salida de la vía glicolítica en una reacción irreversible con formación de ATP (Figura 5).

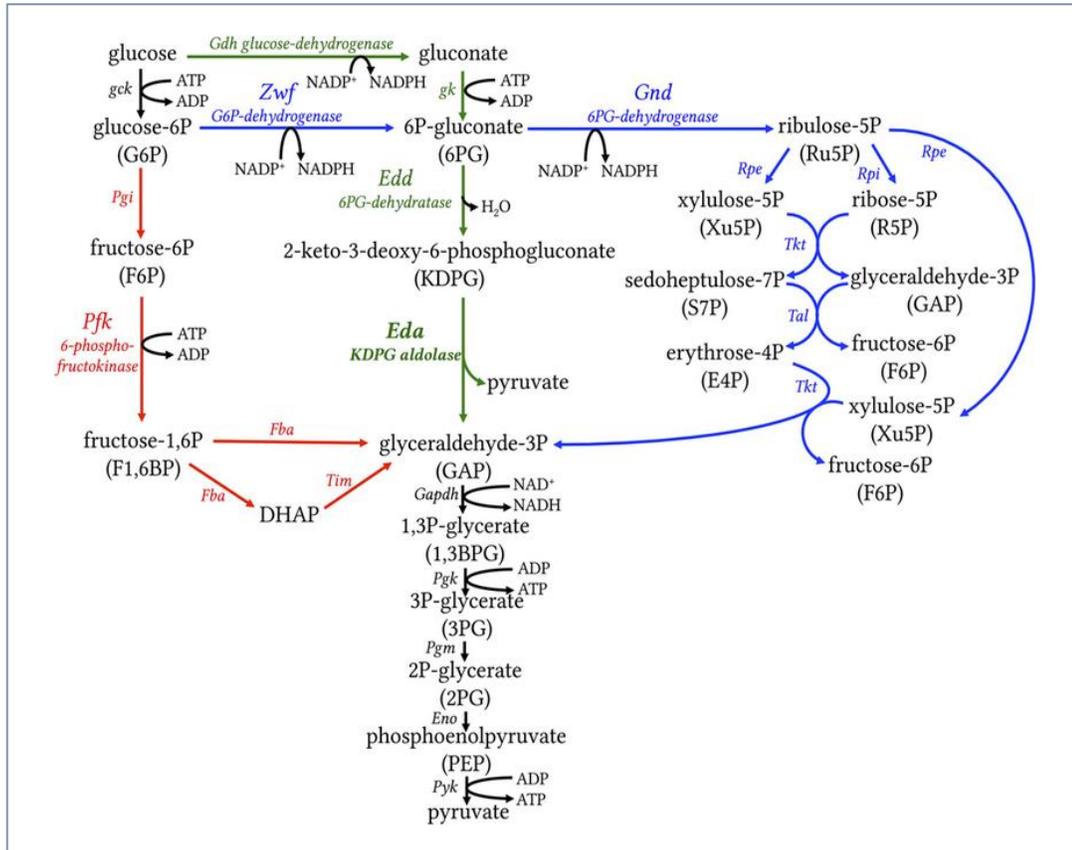


Figura 4. Vías glicolíticas en cianobacterias. En cianobacterias están presentes tres vías para el catabolismo de la glucosa: la vía EMP (rojo), la vía OPP (azul) y la vía ED (verde) (Chen et al., 2016).

1.1.7. Piruvato cinasa

La enzima piruvato cinasa (EC 2.7.1.40) cataliza la formación de piruvato a partir de fosfoenolpiruvato (Figura 5). El piruvato es el precursor inmediato del acetil-CoA, el cual es requerido para la síntesis de PHB (Figura 1), así como de otros compuestos como aminoácidos y pigmentos carotenoides (Angermayr et al., 2015; Muñoz & Ponce, 2003; Valle, Mufioz, Ponce, Flores, & Bolivar, 1996).

La PK es una enzima conservada en organismos procariotas y eucariotas. Generalmente existe en forma de homotetrámero, cuya subunidad tiene una masa molecular entre 55-60 kDa y muestra asociación a proteínas integrales de membrana. Presenta regulación alostérica por unión al sustrato, así como fosforilación reversible que coordinan su actividad de acuerdo a las demandas energéticas y biosintéticas de la célula (Knowles, Smith, Smith, & Plaxton, 2001; Muñoz & Ponce, 2003).

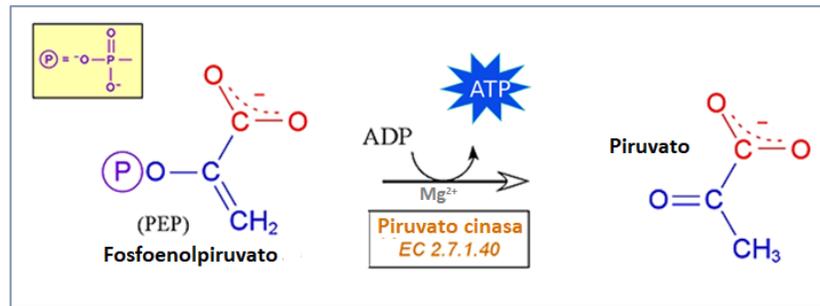


Figura 5. Reacción enzimática de la piruvato cinasa. La piruvato cinasa realiza la desfosforilación del fosfoenolpiruvato para formar piruvato y ATP. Es una reacción irreversible, por lo que es el último paso regulatorio de la glicólisis.

En animales y plantas se expresan isoenzimas específicas de tejido, con propiedades catalíticas y regulatorias diferenciales. Algunas bacterias como *E. coli* presentan 2 isoenzimas de PK, denominadas PykA o PK II y PykF o PK I (Ponce-Rivas et al, 1995). Ambas isoenzimas presentan un efecto cooperativo con respecto al sustrato fosfoenolpiruvato. La enzima PK I tiene regulación alostérica, es activada por fructosa 1-6-bifosfato e inhibida por ATP y succinil-CoA. La enzima PK II es activada por AMP y diversos azúcares fosfato (Knowles et al., 2001). De forma similar a algunas bacterias, *Synechocystis* posee dos genes que codifican para la enzima piruvato cinasa, denominados *pyk1* y *pyk2* (Angermayr et al., 2015; Osanai, Azuma, & Tanaka, 2007).

1.1.8. *Pyk1*

El gen *pyk1* (*sll0587*) tiene un tamaño de 1457 pb, y se localiza en el cromosoma de *Synechocystis* en la posición 2958036 - 2959487. Este gen codifica para una proteína de 483 aminoácidos correspondiente a una piruvato cinasa tipo I (Kanehisa, 2016). Tiene una masa molecular de 53.1 kDa y un punto isoeléctrico de 5.5 (Knowles & Plaxton, 2003)

La expresión de *pyk1* se favorece en presencia de glucosa con irradiación lumínica, pero no en la oscuridad; se encuentra regulado a nivel de mRNA por el sistema de respuesta de dos componentes OmpR (*sll1330*) y el factor SigE; y es inducido por la limitación de nitrógeno (Osanai et al., 2006; Tabei, Okada, & Tsuzuki, 2007).

1.1.9. *Pyk2*

El gen *pyk2* (*sll1275*) tiene un tamaño de 1752 pb, y se localiza en el cromosoma de *Synechocystis* en la posición 1102283 - 104058, y codifica para una proteína de 591 aminoácidos correspondiente a una piruvato cinasa tipo II (Kanehisa, 2016). Tiene una masa molecular de 63.0 kDa y un punto isoeléctrico de 6.2 (Knowles & Plaxton, 2003)

A diferencia de *pyk1*, la expresión de *pyk2* se favorece con la presencia de glucosa tanto en condiciones de luz como de oscuridad, y es reprimido por condiciones de limitación de nitrógeno. Además es independiente de la regulación por *sll1330* y el factor SigE, y presenta activación por presencia de AMP, tiene una alta transcripción bajo condiciones de crecimiento fotoautotróficas (Osanai et al., 2006; Tabei et al., 2007; Magdaleno-Moncayo, 2010) y presenta una regulación cíclica acorde al ritmo circadiano de la célula (Kucho et al., 2005). Además en trabajos previos en el laboratorio se ha observado una expresión diferencial a lo largo de la cinética de crecimiento (Matas-Ruiz, 2001).

1.2. Justificación

Este trabajo, forma parte de un proyecto del grupo de laboratorio de Biología Celular y Molecular, enfocado en el estudio del metabolismo del carbono y la ingeniería de vías metabólicas de cianobacterias para la acumulación de PHAs.

El piruvato tiene un papel clave en la producción de compuestos de interés biotecnológico, debido a que es el punto de distribución de carbono en la célula. En el metabolismo los productos derivados de piruvato muestran una alta tasa de producción y partición de carbono de hasta 70%. Por ello el nodo de piruvato es un punto potencial para incrementar el flujo de carbono hacia la producción de compuestos de baja tasa de producción, como es el caso del PHB, ya sea por medio de la manipulación de sustratos en el cultivo bacteriano, y/o la ingeniería de vías metabólicas.

Se ha sugerido que los dos genes codificantes para la enzima piruvato cinasa (*pyk1* y *pyk2*) presentes en *Synechocystis* tienen actividad y regulación diferencial, lo cual resulta de gran interés debido a su ubicación central en el metabolismo. Sin embargo, hay poca información al respecto, y nula información respecto al papel e importancia de cada gen en la producción de compuestos de interés como el PHB. Por

lo cual, es importante estudiar la relación entre la expresión de los genes *pyk* y la acumulación de PHB en los medios de cultivo en los que se ha observado un aumento de la cantidad del polímero.

1.3. Hipótesis

El cultivo de *Synechocystis* en condiciones de limitación de nitrógeno y/o suplementado con fuentes de carbono adicionales como la glucosa y el acetato en promueve la expresión de los genes de piruvato cinasa *pyk1* y *pyk2* que se verá reflejado en un aumento de la acumulación de PHB.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Estudiar la relación entre la acumulación de PHB en *Synechocystis* sp. PCC 6803 y los genes de piruvato cinasa *pyk1* y *pyk2* en diferentes condiciones de fotomixotrofia y/o limitación de nitrógeno

1.4.2. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto del tipo de iluminación y de aireación de cultivos de *Synechocystis* en la acumulación de PHB.
2. Evaluar la expresión de los genes *pyk1* y *pyk2* de *Synechocystis* en diferentes condiciones de fotomixotrofia y/o limitación de nitrógeno.
3. Identificar la relación entre la acumulación de PHB y la expresión de los genes *pyk1* y *pyk2*.

Capítulo 2. Metodología

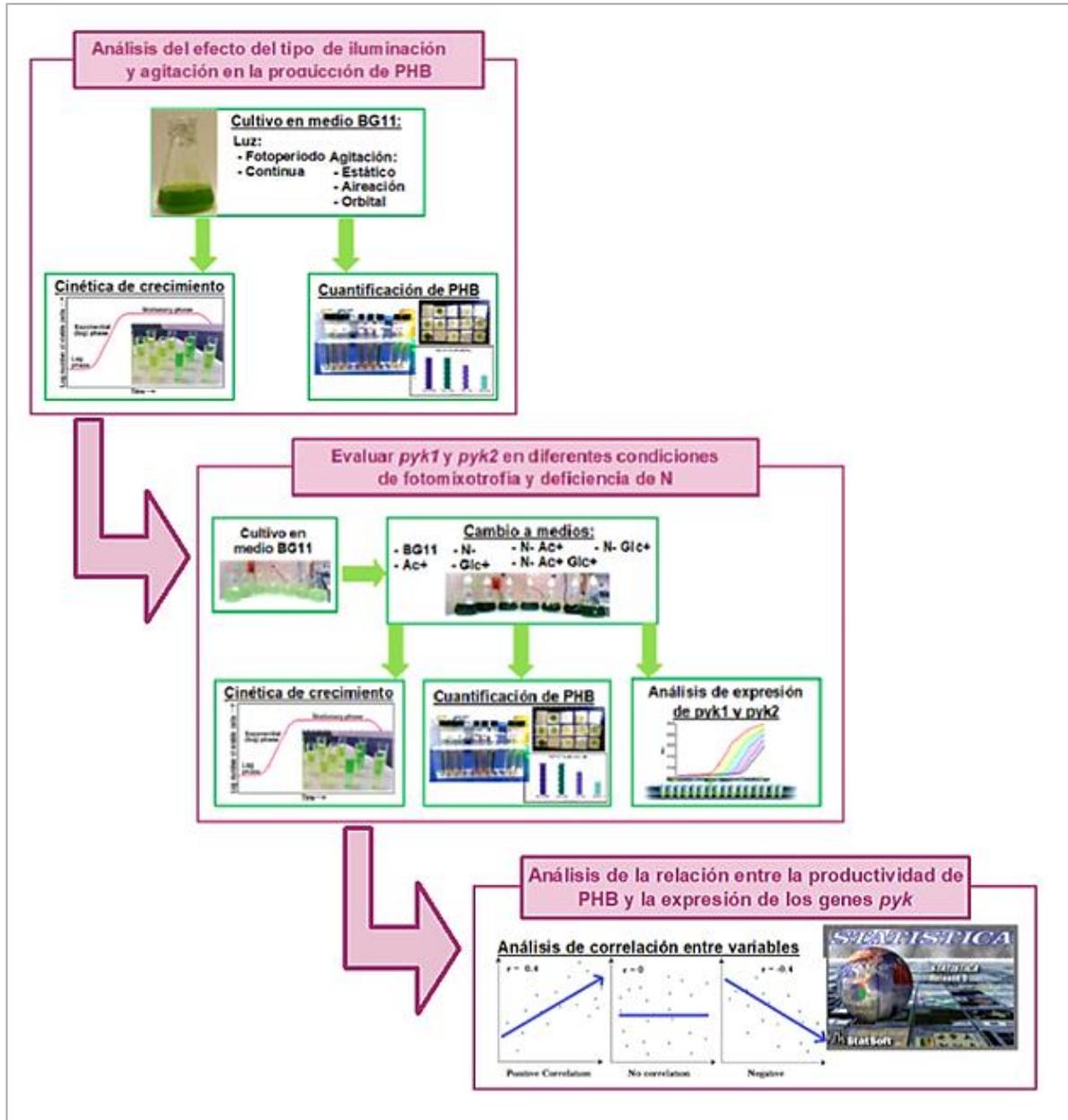


Figura 6. Diagrama experimental del trabajo de tesis. Se muestran tres secciones principales, que corresponden a cada uno de los objetivos específicos. En el primero para el análisis del efecto del tipo de iluminación y agitación se obtuvo la cinética de crecimiento y contenido de PHB de un cultivo de *Synechocystis* en diferentes condiciones de luz y agitación. Posteriormente para evaluar la acumulación de PHB y la expresión de *pyk1* y *pyk2* en diferentes condiciones de mixotrofia y limitación de N se realizó un pre-cultivo y luego el cambio a diferentes de condiciones nutrimentales. En estas se obtuvo la cinética de crecimiento, el contenido de PHB y la expresión de los genes *pyk*. Por último, para el análisis de relación entre variables se realizó un análisis de correlación.

2.1 Organismo y condiciones de cultivo

La cepa *Synechocystis* sp. PCC 6803 pertenece a la colección de cianobacterias del Laboratorio de Biología Celular y Molecular del CICESE, la cual fue obtenida de la colección de cepas de la ATCC (American Type Culture Collection). La cepa se cultivó en medio líquido BG-11, que se preparó de acuerdo a Stanier et al. (1971). El pH del medio se ajustó inicialmente a 8.0 con NaOH a 1 M y se esterilizó en una autoclave a 15 psi a 121 °C por 20 min.

Los cultivos se manejaron en lote monoespecífico en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 6 ml de esferas de vidrio de 2 mm, con un volumen de 200 ml de medio. Los matraces se agitaron diariamente en forma manual; se mantuvieron a una temperatura de 30 ± 2 °C, en condición de fotoperiodo de 14 h luz/10 h oscuridad controlado por un temporizador Temp-24H Steren, con una intensidad lumínica de 100 μmol fotones/ m^2/s provista por lámparas de luz blanca fría de 40 W Philips F40T12/DX. La irradiancia se midió con un radiómetro 4 π QSL-100 Biospherical Instruments.

2.1.1 Cinética de crecimiento

El crecimiento de los cultivos de *Synechocystis* se evaluó por densidad óptica a 730 nm (OD_{730}) en un espectrofotómetro Multiskan GO UV/Vis Thermo Scientific™. Cuando el valor de OD de la muestra fue mayor a 0.8 se realizaron diluciones para que el valor medido en el equipo oscilara entre 0.5 y 0.8, y después se multiplico éste por el factor de dilución para obtener el valor de OD final de la muestra.

Los parámetros de tasa de crecimiento (μ) y la tasa de duplicación (T_d) instantánea se calcularon en todos los puntos de crecimiento para observar el cambio. Sin embargo, para fines de comparación entre tratamientos se consideró únicamente los valores máximos, que en general correspondió a los días 4 y 6 de los cultivos en fase exponencial. Para el cálculo de estos se utilizaron las fórmulas:

$$\mu = \frac{LN N_f - LN N_i}{t} \quad (1)$$

$$T_d = \frac{LN 2}{\mu} \quad (2)$$

en donde: μ = tasa de crecimiento; LN= Logaritmo natural; N_f = número de células final; N_i = número de células inicial, t = tiempo y T_d = tiempo de duplicación.

Para la obtención de N se consideraron los datos de densidad óptica (OD_{730}) y se obtuvo el número de células en base al dato de que una $OD_{730} \approx 3.2 * 10^9$ células/ml (Summerfield & Sherman, 2008).

2.2 Efecto de luz y agitación en la acumulación de PHB

Para establecer el efecto de las condiciones de luz y agitación en la acumulación de PHB en *Synechocystis*, se realizó un ensayo con 2 modalidades de iluminación y 3 formas de agitación (Tabla 3):

Tabla 3. Condiciones de luz y agitación

Condición	Luz	Agitación
LO	Continua	Orbital a 100 rpm
LE	Continua	Estático, manual diariamente
LA	Continua	Aireación por burbujeo
FE	Fotoperiodo 14:10	Estático, manual diariamente
FA	Fotoperiodo 14:10	Aireación por burbujeo

La condición de agitación orbital se realizó en un agitador de plataforma Lab Line modelo 4633 a una velocidad de 100 rpm. La agitación por burbujeo consistió en el suministro constante de flujo de aire a través de una varilla de vidrio conectada al sistema de aire del laboratorio. Se conectó un filtro EMD Millipore SLFH05000 MILLEX-FH 0.5UM 50MM 100/PK para tubo de látex antes de cada matraz para mantener la inocuidad del sistema, además de un filtro de aire previo a la tubería de PVC donde se conectaban las mangueras. El flujo se reguló por medio de llaves de control de aire.

El área de cultivo consistió en un estante de madera de tres paneles (Figura 7). Los cultivos en cada condición se manejaron por triplicado, con una OD_{730} inicial de 0.05, la cual se monitoreó por 22 días.

2.2.1 Extracción de PHB

La acumulación de PHB se evaluó en dos puntos de la cinética de crecimiento: el primero a $OD_{730} \approx 0.5$ y el segundo a $OD_{730} \approx 1.0$. La extracción de PHB se hizo de acuerdo a los protocolos de Albuquerque et al., 2011 y Sharma et al., 2007 con modificaciones por la Dra. Ponce y el Dr. Sánchez.

Se tomó una alícuota de 10 ml del cultivo, las células se centrifugaron a 8 000 rpm por 5 min en una centrifuga 5804 R Eppendorf, y se lavaron con 5 ml de agua destilada estéril. El pellet se resuspendió en 10 ml de metanol a 4 °C y se dejó reposar por 12 h. Después se centrifugó a 8 000 rpm por 15 min, y se lavó con etanol. El pellet se dejó secar a 60 °C por 1 h y se resuspendió en 15 ml de cloroformo, se dejó a 37 °C por 3 días en una incubadora 1322 VWR. Posteriormente se filtró la solución con filtros de papel de 5.5 cm VWR (28310-015). La solución se dejó en la incubadora para la evaporación del cloroformo y recuperación del polímero en forma de una película delgada.



Figura 7. Zona de cultivo de *Synechocystis*. Los 2 paneles superiores estaban provistos de seis lámparas: dos para iluminación y 4 como fuente de calor (cubiertas con papel aluminio). El tercero consistió de tres lámparas en la parte superior. Para el ensayo se utilizó el panel superior para los tratamientos FE y FA, el intermedio para los LE y LA, y el inferior para el LO.

2.2.2 Cuantificación de PHB

Para la cuantificación se siguió el método espectrofotométrico de Panda (2006). El polímero se mezcló con 10 ml de ácido sulfúrico concentrado y se sometió a un baño de agua a 100 °C por 10 min. La absorbancia de la solución se midió a 235 nm en el espectrofotómetro, donde se utilizó como blanco una solución de ácido sulfúrico, y para las mediciones se realizaron diluciones de las muestras.

La cantidad de PHB se determinó de acuerdo a una curva estándar preparada con una solución de PHB natural Sigma Aldrich de 0.5 a 5.0 µg/ml a intervalos de 0.5 µg/ml. El contenido de PHB se normalizó con el peso seco orgánico correspondiente, para expresarse como % PHB (w/w) de acuerdo a la fórmula:

$$\% PHB = \frac{[PHB]}{PSO} * 100 \quad (3)$$

2.2.3 Determinación de peso seco

Para la obtención del peso seco orgánico se siguió el método de Arredondo-Vega y Voltolina (2007), para lo cual 10 ml de cultivo se filtraron con un filtro de microfibra de vidrio Whatman de 1 µm de poro. Estos fueron previamente lavados, incinerados a 490 °C por 4 h en una mufla FB1314M Thermolyne Thermo Scientific, secados a 60 °C por 12 h, y pesados (PSF).

La muestra se lavó con 10 ml de formato de amonio al 3 %, y se secó a 60 °C en una incubadora VWR 13220 por 24 h, tras lo cual se pasó a un desecador por 1 h, y se pesó en una balanza analítica para la obtención del peso seco total (PST). El filtro con la muestra se incineró en una mufla Barnstead Thermolyne Furnace 1300 a 490 °C por 6 h, y se pesó para la obtención del contenido de cenizas (PSI).

El peso seco orgánico (PSO) se calculó por la diferencia de peso entre el peso seco total y el peso de cenizas, como se muestra en las siguientes ecuaciones:

$$PST (\mu g/ml) = PSFM - PSF/VF \quad (4)$$

$$PSI (\mu g/ml) = PSC - PSF/VF \quad (5)$$

$$PSO (\mu g/ml) = PST - PSI \quad (6)$$

dónde: PST: peso seco total; PSI: peso seco inorgánico; PSO: peso seco orgánico; PSF: peso seco del filtro; PSFM: peso seco de filtro con muestra; PSC: peso seco del filtro y muestra incinerada; y VF: volumen de muestra filtrado.

2.3 Relación entre el crecimiento de *Synechocystis* y la acumulación de PHB.

Para evaluar la producción basal de PHB en un cultivo de *Synechocystis* a lo largo de la cinética de crecimiento, se manejaron cultivos en lote de 200 ml de medio BG-11 en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, por triplicado. Se utilizaron las condiciones mencionadas en la sección 2.1.

Además, se tomó muestra para determinar el contenido de PHB del cultivo a los días 5, 10, 15 y 20 de incubación (Sección 2.2.1, 2.2.2, 2.2.3).

2.4 Acumulación de PHB en condiciones de fotomixotrofia y limitación de nitrógeno.

Para estimular la acumulación de PHB en *Synechocystis* se utilizaron medios modificados que han demostrado favorecer su acumulación, como lo es la limitación de nitrógeno y la presencia de fuentes de carbono con base a Monshupanee y Incharoensakdi (2013), Panda et al. (2006), y Panda y Mallick (2007), entre otros.

Para la limitación de nitrógeno (N -): se eliminó el NaNO_3 , y se sustituyó el citrato ferroso de amonio por citrato férrico en concentraciones equimolar. Para las condiciones de crecimiento fotoheterótrofo se utilizó medio BG-11 suplementado con glucosa al 0.4 % (Glc +), y acetato de sodio al 0.4 % (Ac +), y el efecto aditivo de estos, que resultó en un total de 7 condiciones (Tabla 4):

Tabla 4. Medios de cultivo a utilizar

Condición	Medio
BG-11	BG-11 estándar
N-	BG-11 sin NaNO ₃
Ac+	BG-11 con 0.4 % acetato
Glc+	BG-11 con 0.4 % glucosa
N- Ac+	BG-11 sin NaNO ₃ con 0.4 % acetato
N- Glc+	BG-11 sin NaNO ₃ con 0.4 % glucosa
N- Ac+ Glc+	BG-11 sin NaNO ₃ con 0.4 % acetato y 0.4 % glucosa

Para el ensayo se realizó una fase de pre-cultivo, donde se inocularon 7 matraces Erlenmeyer de 1 L con 600 ml de medio BG-11 a una OD₇₃₀ inicial de 0.05, a los que se dejó alcanzar una OD₇₃₀ ≈ 1.0 para pasar a la fase de acumulación de PHB en cada uno de los medios antes mencionados. En base al ensayo anterior, se decidió utilizar las condiciones de iluminación y agitación de fotoperiodo de 14 h luz/10 h oscuridad en estado estacionario con agitación manual.

Para el cambio de medio, las células de cada matraz se centrifugaron a 8 000 rpm por 10 min, se lavaron con 300 ml del nuevo medio, se resuspendió en 600 ml de medio y se dividió en tres matraces Erlenmeyer de 250 ml. Se evaluó cinética de crecimiento y acumulación de PHB a los días 5, 10, 15 y 20 como se mencionó en la sección 2.1. y 2.2.

2.5 Análisis de expresión de *pyk1* y *pyk2*

Para evaluar la importancia de los genes piruvato cinasa en la acumulación de PHB, se realizó un análisis de expresión de los genes *pyk1* y *pyk2* de *Synechocystis* en los diferentes tratamientos, en los mismos puntos de evaluación de PHB. El análisis de expresión se realizó mediante transcripción reversa (RT-PCR) seguido de un PCR cuantitativo (qPCR). Se utilizó una cuantificación relativa, utilizando el gen de la subunidad B de la ribonucleasa P (*rnpB*) como gen de referencia.

2.5.1 Extracción de RNA total

Para la extracción de RNA total de las muestras se siguió protocolo de la extracción de isotiocianato de guanidina/fenol/cloroformo en base a Chomczynski (1987). Para ello, se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min a 4 °C 10 ml de cultivo, y se resuspendió el pellet en 1 ml de reactivo TRIzol (Invitrogen). Se realizó lisis celular por choque térmico, al congelar la muestra en nitrógeno líquido y descongelar en un bloque térmico a 70 °C, por cinco ciclos consecutivos, mezclando 30 s con vórtex entre cada ciclo.

Posteriormente se adicionaron 200 µl de cloroformo, se mezcló por inversión durante 10 s, y se centrifugó a 10,000 g por 15 min a 4 °C en una centrifuga Heraeus Biofuge Fresco. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, se adicionaron 500 µl de isopropanol y se incubó en hielo por 30 min. Después se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4 °C, se lavó el pellet con 1 ml de etanol al 75% y se secó en un concentrador Eppendorf Vacuum Plus a 45 °C por 10 min. El pellet se resuspendió en 50 µl de agua mQ estéril (Barnstead Nanopure Infinity System UV).

La extracción de RNA se corroboró mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % preparado con buffer TAE, con una muestra de 3 µl de RNA, a la cual se adicionó 6 µl de formamida, incubó a 50 °C por 5 min, y 5 min en hielo (Masek, Vopalensky, Suchomelova, & Pospisek, 2005). Posteriormente se adicionó 1 µl de buffer de carga con Gel Red, y se corrió la electroforesis en una cámara Apollo, con una fuente de poder EC-105 Thermo Fisher Scientific a 90 V por 30 min. Se visualizó en un fotodocumentador ChemiDoc MP Bio-Rad. El RNA total extraído se cuantificó en un Nanodrop 2000 Thermo Scientific con una alícuota de 1 µl. Las muestras se almacenaron a -20 °C.

2.5.2 Transcripción reversa

Se realizó una reacción de retro-transcripción con el sistema SuperScript III (Invitrogen) de acuerdo a las indicaciones del proveedor utilizando 2 µg de RNA total y hexámeros aleatorios para la obtención de los tres diferentes genes de interés (*rnpB*, *pyk1* y *pyk2*) a partir de una misma muestra de cDNA.

Previamente a la síntesis de cDNA se realizó un tratamiento con DNasa I (Zymo Research) utilizando 1 µl de Buffer DNasa I 10 X y 0.33 µl de DNasa I (3 U/µl) por cada muestra de RNA en un volumen total de 8 µl. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 30 min, tras lo cual se adicionó 1 µl de EDTA 0.5 M, se calentó a 65 °C por 1 min en un termociclador Apollo ATC 401 y se dejó en hielo por 1 min.

Se adicionaron 2 μl de Hexámeros aleatorios (50 ng/ μl) y 1 μl de mix dNTP (10 mM) a cada muestra de RNA. La reacción se incubó a 65 °C por 5 min, y se colocó en hielo por 1 min. Se preparó el mix RT para la siguiente fase de reacción con 2 μl de buffer RT 10x, 4 μl de MgCl_2 25 mM, 2 μl de DDT 0.1 M, 1 μl de Rnase out (40 U/ μL) y 1 μl de RetroTranscriptasa SuperScript III (200 U/ μl). Se adicionó 10 μl de mix RT a cada muestra de RNA y se incubó a 25°C por 10 min seguido de incubación a 50 °C por 50 min, después a 85 °C por 5 min, y se puso en hielo 1 min. Se adicionó 1 μl de RNasa H a cada reacción, y se incubó a 37 °C por 20 min. Los productos de cDNA se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

2.5.3 Extracción de DNA genómico.

La extracción de DNA cromosomal de *Synechocystis* se realizó de acuerdo al método de Singh et al., 2011. Se centrifugaron 10 ml de cultivo a 13 000 rpm por 5 min en tubos Falcón estériles. El pellet se lavó con agua destilada estéril, y se transfirió a un tubo eppendorf estériles, y se resuspendió en 400 μl de buffer de lisis (Urea 4 M; Tris-HCl 0.2 M, pH 7.4; NaCl 20 mM y EDTA 0.2 M). Se adicionó 50 μl de proteinasa K (20 mg/ml), se mezcló e incubó a 55 °C por 1 h. Posteriormente se adicionó 1 ml de buffer de extracción (CTAB 3%; NaCl 1.4 M; EDTA 20 mM; Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0; Sarkosyl 1% and mercaptoetanol 1%) pre-calentado a 55 °C, se mezcló e incubó a 55 °C por 1 h, mezclando por inversión cada 15 min.

Después la mezcla se separó en 2 fracciones, se adicionó a cada fracción 2 volúmenes de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min, se colectó la fase acuosa superior y se adicionó 2 volúmenes de etanol absoluto y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M (pH 5). Posteriormente se incubó a - 80 °C por 1 h, tras lo cual se centrifugó a 13,000 rpm por 3 min. El pellet se lavó con 500 μl de etanol al 70 %, se secó a 45°C por 10 min, y se resuspendió en 50 μl de agua destilada estéril.

Las muestras de DNA se cuantificaron en un Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific), y se analizó una alícuota de 2 μl mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Las muestras se almacenaron a - 20 °C hasta su utilización.

2.5.4 PCR punto final de cDNA

Se realizó un PCR con el cDNA obtenido, para comprobar la presencia de las secuencias de interés *pyk1*, *pyk2* y *rnpB*, utilizando el kit de la enzima GoTaq® (Promega) de acuerdo a las sugerencias del proveedor. Como control positivo de reacción se usó como templado DNA cromosomal. Para los genes *pyk1* y *pyk2* se diseñaron oligonucleótidos específicos, y para el gen *rnpB* se utilizaron los oligonucleótidos de Mustila et al. (2014). Las secuencias de los oligonucleótidos para cada gen se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Oligonucleótidos para qPCR de los genes *rnpB*, *pyk1* y *pyk2*.

Oligonucleótido	Secuencia (5' -> 3')	Amplicón (pb)	Tm (°C)	t _E (s)
rnpB RT Mus For	GTGAGGACAGTGCCACAGAA	122	60	15
rnpB RT Mus Rev	CCTTTGCACCCTTACCCTTT			
pyk0587 RT100 For	CATCGGTGCCGTCCAAAATA	100	60	15
pyk0587 RT100 Rev	ATCACCGCTACCCAAATGCTA			
pyk1275 RT100 For	TCCTTAATCGCTTCGTGCTTCT	119	60	15
pyk1275 RT100 Rev	GTGGCCCTGAGTTTTGTTCGTA			

En la tabla se indica el tamaño del amplicón generado como producto para cada par de oligonucleótidos, así como su temperatura de alineamiento (T_m) y tiempo de extensión (t_E) para cada reacción.

La reacción consistió en: 5.0 µl de buffer GoTaq® Flexi 5x, 3.0 µl de MgCl₂ 25 mM, 0.5 µl mix nucleótidos 10 mM, 1.0 µl de oligonucleótido sentido 10 mM, 1.0 µl de oligonucleótido antisentido 10 mM, 0.125 µl de GoTaq® Polimerasa (5U/µl), y 3 µl de cDNA a una dilución 1:10, en un volumen final de 25 µl. El PCR se llevó a cabo en un termociclador Veriti® 96 Applied Biosystems, con las siguientes condiciones de reacción: 95 °C por 2 min, 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s y 72 °C por 15 s, y 72 °C por 2 min.

Los productos de PCR se analizaron mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 2 % para comprobar la presencia del amplicón específico de tamaño esperado. Para ello se utilizó el colorante Gel Red (Biotium), y se visualizó el gel en un Sistema ChemiDoc XR (Bio-Rad).

2.5.5 PCR tiempo real (qPCR)

En primera instancia se realizó la estandarización de las condiciones de amplificación en qPCR, mediante diferentes ensayos: un gradiente de temperatura (56, 58, 60 y 62 °C); un gradiente de concentración de oligonucleótidos (100, 200 y 500 nM); y un gradiente de cantidad de templado (cDNA en dilución 1:5, 1:10 y 1:15).

La cuantificación de los genes *pyk1* y *pyk2* se realizó con base en el método de CT comparativo (Pfaffl, 2004b). Para ello se determinó la eficiencia de amplificación de cada par de oligonucleótidos para cada gen (Tabla 3), con base en una curva estándar con diluciones seriadas 1:10 de DNA genómico.

Las reacciones de qPCR se realizaron por triplicado, utilizando el Master Hot Star-It Sybr Green qPCR Master Mix (USB Corporation). La reacción consistió en con 5.0 µl de qPCR Master Mix 2X, 0.5 µl de Primer F 10 mM, 0.5 µl de Primer R 10 mM, 1.0 µl de agua, y 3.0 µl de cDNA, en un volumen de reacción final de 10 µl.

El PCR se llevó a cabo en un termociclador CTX96 Touch Real-Time System Bio-Rad usando un protocolo de tres pasos con las siguientes condiciones: 1 ciclo de 95 °C por 4 min, 40 ciclos de 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s y 72 °C por 30 s, y un ciclo correspondiente a la curva de disociación de 65 a 95 °C con incrementos cada 5s. El análisis de los datos de qPCR se realizó mediante el software CFX Manager versión 3.1 (Bio-Rad) y el software qbase⁺ versión 2.6.1 (Biogazelle).

2.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los ensayos: parámetros de crecimiento, contenido de PHB y expresión de los genes *pyk1* y *pyk2* fueron analizados mediante diferentes pruebas estadísticas mediante el programa Statistica v 8.0 (Stat Soft Inc.) para determinar su diferencia y significancia. En primera instancia se realizó un análisis de normalidad, tras el que se realizó un análisis de varianza ANOVA ($p > 0.05$) y una pruebas de diferencia significativa y grupos homogéneos (HSD) de Turkey ($\alpha > 0.05$),

Para el análisis de correlación se seleccionaron los datos de contenido de PHB y expresión de *pyk1* y *pyk2* para un análisis de matrices de correlación en Statistica.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Efecto del tiempo de exposición a la luz y tipo de agitación en la acumulación de PHB

3.1.1 Cinética de crecimiento en diferentes tipos de fotoperiodo y agitación

En general, los diferentes cultivos de *Synechocystis* presentaron crecimiento bajo en los diferentes tipos de iluminación: luz: continua (L) y fotoperiodo (F), y los diferentes tipos de agitación: por aireación (A), por agitación orbital (O), y estático (E) con agitación manual diaria. Los cultivos presentaron una coloración azul-verde intensa homogénea característica de la especie. La curva de crecimiento de los *m* cultivos (Figura 8) presentó el comportamiento típico de una curva de crecimiento de bacterias fototróficas (Schuurmans et al., 2017) con las fases de crecimiento exponencial y lineal.

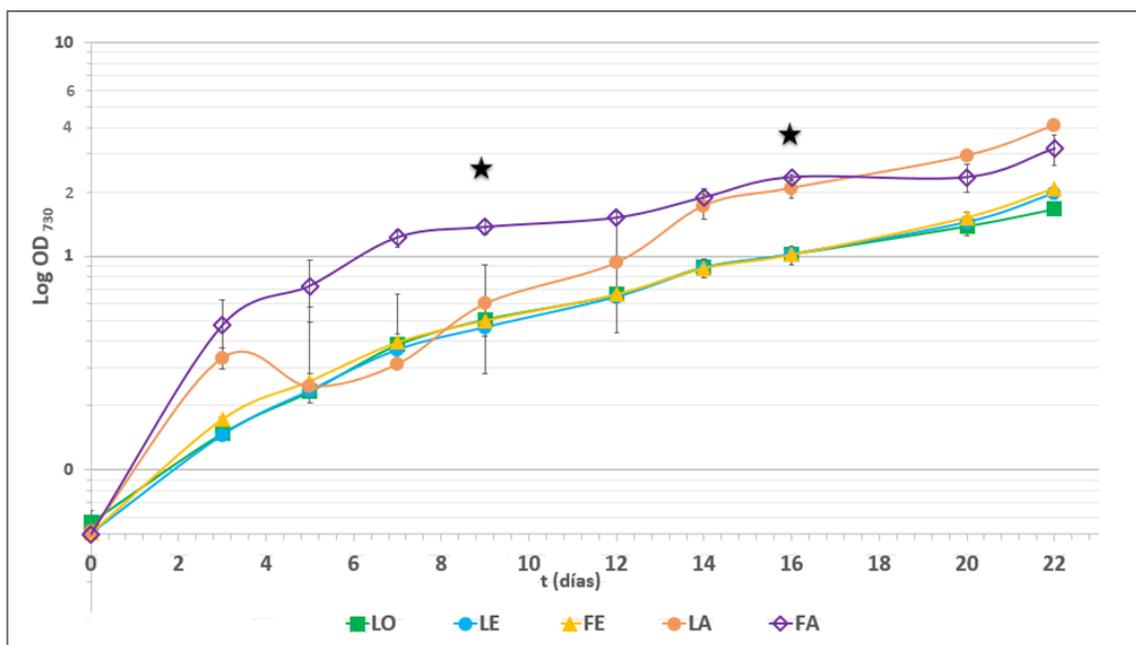


Figura 8. Curva de crecimiento de *Synechocystis* en diferentes condiciones de iluminación y agitación.

LO: luz continua, agitación orbital. LE: luz continua, estático. FE: fotoperiodo, estático. LA: luz continua, burbujeo. FA: fotoperiodo, burbujeo. ★ : día de muestreo para acumulación de PHB (n=3).

Sin embargo, dado que el cultivo se detuvo al día 22, solo se alcanzó la fase estacionaria en el tratamiento de fotoperiodo con aireación (FA), que es la condición donde se presentó la mayor tasa de crecimiento y el menor tiempo de duplicación de 10.3 ± 1.33 h (Tabla 6 de anexos). En la condición de fotoperiodo estacionario (FE) se registró un tiempo de 17.76 ± 0.98 h 20.6 ± 0.65 h para la condición de luz continua con aireación (LA), 20.4 ± 0.96 h para la condición de luz continua estacionario (LE) y 22.5 ± 3.78 h para la condición de luz continua con agitación orbital (LO). No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre el tiempo de duplicación de los tratamientos LA, LE y LO ($p > 0.05$).

La mayor cantidad de biomasa celular se alcanzó en la condición de LA con una OD_{730} de 4.08 ± 0.14 a los 22 días de cultivo, seguido de la condición FA con una OD_{730} de 3.18 ± 0.52 . En los demás tratamientos las curvas de crecimiento presentaron un comportamiento similar entre ellas alcanzando una OD_{730} aproximada de 2 y (Figura 8).

3.1.2 Acumulación de PHB en diferentes tipos de fotoperiodo y agitación

La evaluación de acumulación de PHB se realizó en dos puntos de la cinética de crecimiento a una OD_{730} aproximada de 0.5 y 1.0 que correspondieron a los días 9 y 16, respectivamente. En los diferentes tratamientos (LA, FA, LE, FE y LO) se registró una acumulación de PHB en un rango de 1 a 3 % PHB (w/w) (ver Tabla 7 en anexos y Figura 9).

El mayor acumulación de PHB con base al peso seco orgánico se obtuvo al día 9 en las condiciones LA y FE, con una concentración de 3.17 ± 1.06 % PHB (w/w) y 2.78 ± 0.28 % PHB (w/w), respectivamente, no encontrándose una diferencia significativa ($p > 0.05$) en la cantidad de PHB con respecto a los demás tratamientos. En la condición FA se tuvo una acumulación de 1.93 ± 0.08 % PHB (w/w). Por su parte, en las condiciones de LO y LE se obtuvieron 1.13 ± 0.13 % de PHB (w/w) y 0.82 ± 0.16 % PHB (w/w), respectivamente.

La condición de aireación por burbujeo (A) presentó un alto valor de desviación estándar en comparación con las otras condiciones de agitación. Esto se debió a la dificultad de mantener un flujo de aire uniforme y constante en los diferentes matraces de cultivo, que causó una gran diferencia entre los replicados en las distintas condiciones de iluminación, tanto en el crecimiento celular como en la acumulación de PHB. Por ello, no se consideró viable para futuros ensayos.

Las cinéticas de crecimiento de las condiciones LO, LE y FE presentaron un comportamiento similar entre ellas (Figura 8). Sin embargo, el contenido de PHB fue distinto ya que el mayor contenido de PHB se obtuvo en la condición FE. En las condiciones LE y LO no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$). El contenido de PHB en FE presentó un incremento del 59.3 % en relación con LO, y un 70.5 % respecto a LE.

En el segundo día de evaluación del contenido de PHB (día 16) se observó una disminución en éste, ya que en todas las condiciones se registró un contenido de PHB por debajo del 1% (w/w). No se obtuvo una diferencia significativa ($p > 0.05$) en el análisis estadísticos para el contenido de PHB en las diferentes condiciones. El decremento de PHB observado en el día 16 con respecto al día 9 fue de 15.9 % para LO, 15.8 % para LE, 69.4 % para FE, 70.9 % para LA, y 61.6 % para FA.

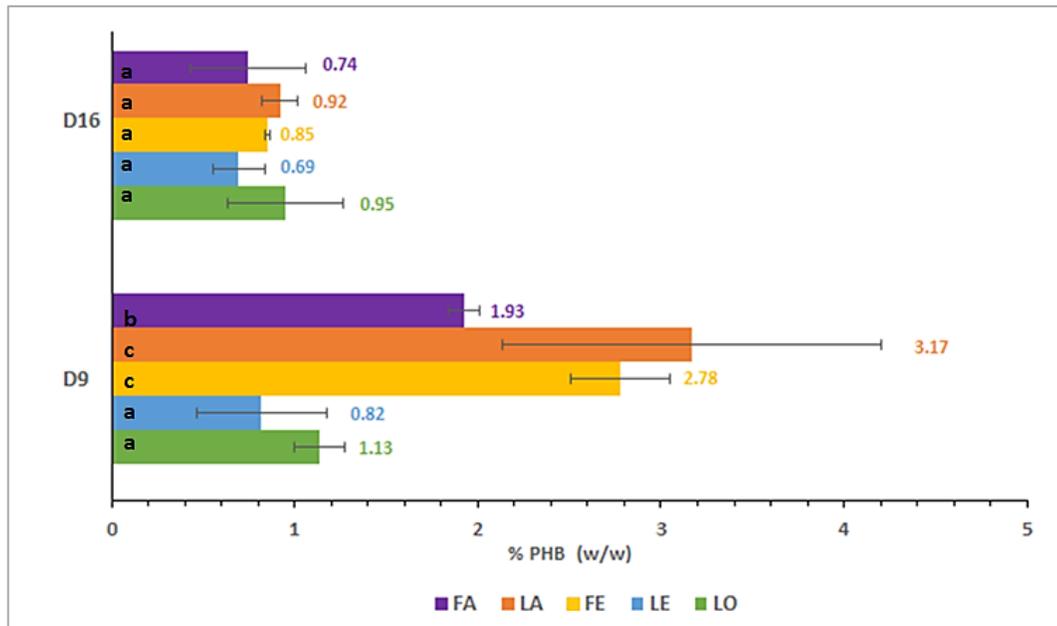


Figura 9. Contenido de PHB en *Synechocystis* en diferentes condiciones de agitación y luz. LO: luz continua, agitación orbital. LE: luz continua, estático. FE: fotoperiodo, estático. LA: luz continua, burbujeo. FA: fotoperiodo, burbujeo. Se muestra el contenido de PHB en dos puntos de la curva, el día 9 y 16. Los valores indicados en cada barra corresponde a la media \pm SD ($n=3$). Las letras en la parte inferior de las barras indica los grupos homogéneos según la diferencia significativa entre tratamientos de acuerdo a una prueba HSD de Turkey con $\alpha=0.05$.

3.2 Relación entre el crecimiento y la acumulación de PHB.

Debido a la disminución de la acumulación de PHB al día 16 de cultivo en comparación con el día 9, se llevó a cabo un nuevo cultivo de *Synechocystis* para tener un mayor detalle sobre la acumulación de PHB a lo largo de las fases de crecimiento. En el cultivo se observó una relación proporcionalmente inversa entre la acumulación de PHB y el crecimiento (Figura 10).

La mayor acumulación de PHB se registró en el día 5 con un valor de 2.43 ± 0.21 % PHB (w/w), el cual para el día 10 disminuyó a 2.07 ± 0.12 % PHB (w/w). Sin embargo, para los días 15 y 20 se obtuvieron menores cantidades del polímero. Para el día 20 de incubación el contenido de PHB fue de 0.18 ± 0.03 % PHB (w/w), que representa una reducción del 92.59 % respecto a la cantidad registrada en el día 5. En este punto las células se encontraban en la fase de crecimiento lineal.

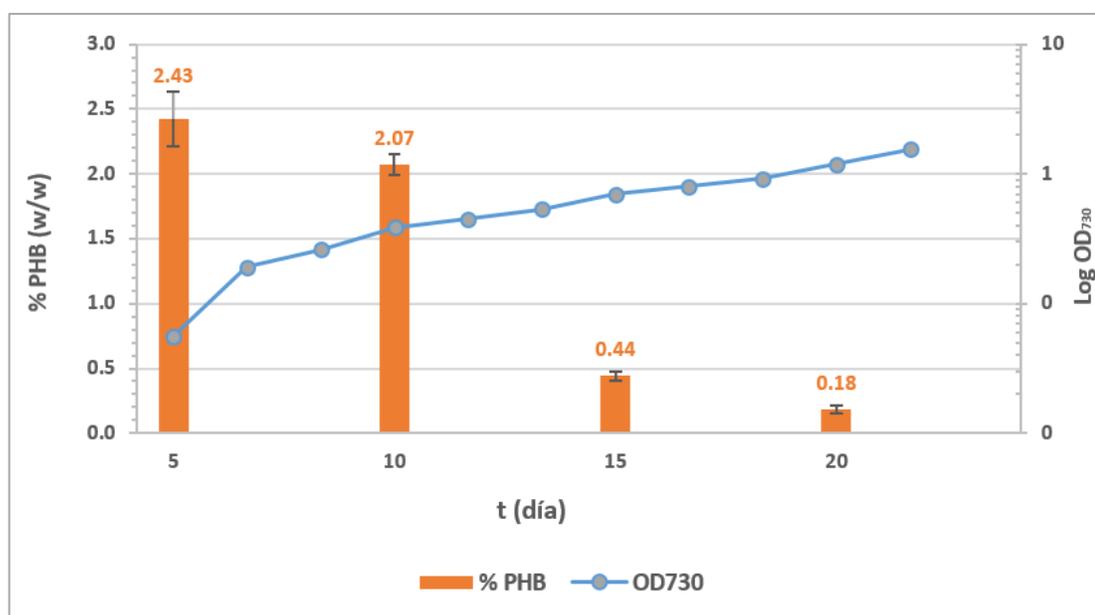


Figura 10. Contenido de PHB en *Synechocystis* en relación con el crecimiento. El contenido de PHB se muestra en barras, y en el eje secundario la cantidad de biomasa (OD₇₃₀). El valor medio del contenido de PHB obtenido en cada punto se muestra sobre cada barra (n=3). Las letras en el centro de la columna indican la significancia estadística entre grupos ($p < 0.05$).

3.3 Efecto de la suplementación con fuentes de carbono y limitación de N en la acumulación de PHB

Con el objetivo de buscar incrementar la acumulación de PHB en *Synechocystis* se llevó a cabo un cultivo preaclimatado a condiciones de cultivo estándar (BG-11) por 20 días (hasta alcanzar una OD \approx 1.0). La biomasa celular obtenida en este punto de la fase exponencial fue transferida a medios de cultivo en los que se ha observado la acumulación del polímero como son los medios suplementados con fuentes de carbono exógenas (glucosa y acetato) y/o la limitación de nitrógeno. Debido a esto, a diferencia del cultivo anterior que inició una OD₇₃₀ de 0.1, en estos ensayos los cultivos iniciaron con una OD₇₃₀ de 0.8.

3.3.1 Cinética de crecimiento en diferentes medios de cultivo

Los cultivos de *Synechocystis* presentaron una coloración distinta dependiendo de la composición del medio. En la fase de pre-cultivo, todos los matraces presentaron la coloración característica mencionada anteriormente (Figura 11 A y B). Sin embargo, tras el cambio de medio se observó un cambio en la coloración de los cultivos, que refleja la respuesta de las células a un estrés por nutrientes, de acuerdo a la composición de cada uno de los medios (Figura 11 C - F), ya que en el cultivo control (medio BG-11) no se presentaron estos cambios de coloración.

Los cultivos N- y N- Ac+ presentaron clorosis. En el cultivo N- se observó en el día 5, mientras que en el cultivo N- Ac+ fue evidente desde el segundo día de cultivo. En los cultivos suplementados con Ac+ se observó un color verde-azul más brillante. En el cultivo N- Glc+ aunque inicialmente se observó una coloración verde intensa brillante similar al cultivo con Ac+, a partir del día 10 comenzó a presentarse blanqueamiento. Por su parte el cultivo N- Ac+ Glc+ desde el tercer día presentó una coloración verde-negra intensa los primeros 5 días de cultivo, pero la intensidad del color cambió progresivamente a café.

En el cultivo Glc+ a los 5 días del cambio de medio se observó una coloración verde brillante, similar al cultivo Ac+. Sin embargo, para el día 10 se presentó un blanqueamiento de las células, así como crecimiento microbiano. Aunque se repitió este tratamiento, se presentó nuevamente contaminación del cultivo, por lo que se eliminó ese tratamiento.

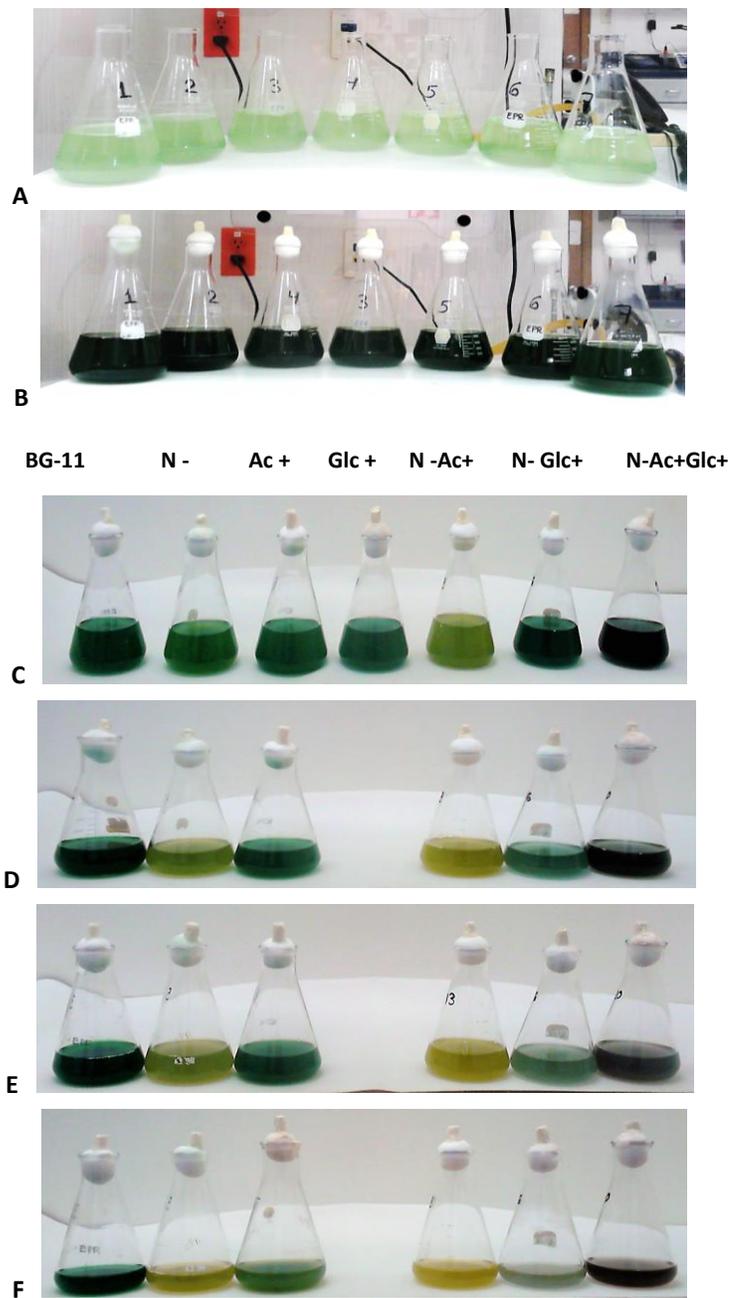


Figura 11. Cambio de coloración en *Synechocystis* en diferentes medios de cultivo. Se muestran los matraces en medio BG-11 al inicio (A) y final (B) de la fase de pre-cultivo. También, un matraz de cada cultivo tras el cambio de medio a lo largo del experimento: C) Día 5. D) Día 10. E) Día 15. F) Día 20. El cambio en el volumen es debido a las alícuotas extraídas para los ensayos en los días.

Además de la coloración, los cultivos presentaron diferencias en la cinética de crecimiento en función del medio (Figura 12). A diferencia de las curvas de crecimiento anteriores, en este experimento se observó una fase de latencia en algunos cultivos y después un crecimiento paulatino, mientras que en otros se mantuvo constante.

La mayor cantidad de biomasa celular se obtuvo en los cultivos Ac+ y BG-11 con una OD_{730} final de 2.7, no encontrándose una diferencia significativa entre ellos ($p > 0.05$). Así mismo, en estos se registraron los mayores valores de μ con 0.060, y los menores td con valores de $4.95 \pm 0.41 \text{ día}^{-1}$ y $5.03 \pm 0.14 \text{ día}^{-1}$, respectivamente (tabla 11 en anexo). El cultivo N- presentó una menor OD final en comparación con los cultivos anteriores, ya que solo alcanzó un valor de 1.5 de OD_{730} , y una μ de 0.034.

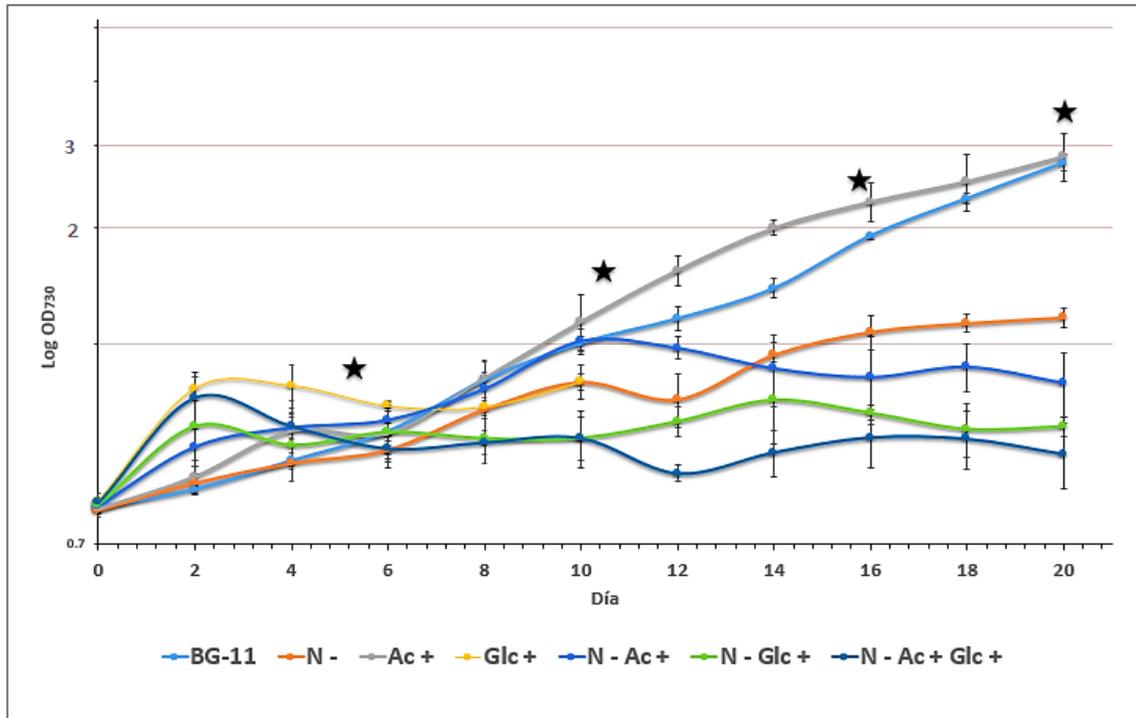


Figura 12. Curva de crecimiento de *Synechocystis* en diferentes medios de cultivo. Se muestra la curva de crecimiento para cada cultivo ($n=3$). La ★ indica los días de muestreo.

En los cultivos N- Ac+, N- Glc+ y N- Ac+ Glc+ el crecimiento en los 20 días de incubación tras el cambio de medio fue muy bajo. Inclusive en la condición N- Ac+ Glc+ el día 12 se observó una disminución de la OD_{730} del cultivo.

Los cultivos con suplemento de glucosa al 0.4 % (Glc+, N- Glc +, y N- Ac+ Glc+) presentaron una mayor tasa de crecimiento en los primeros 2 días de incubación, que corresponde a la fase de crecimiento exponencial. Sin embargo, a partir de ahí los valores de μ disminuyeron progresivamente. El cultivo Glc+ presentó una mayor cantidad de biomasa celular en comparación a los cultivos en combinación con la

limitación de N (N- Glc+, y N- Ac+ Glc+). Sin embargo, se eliminó al día 10 de incubación tras la toma de muestra debido a la presencia de contaminación microbiana.

El contenido de peso seco orgánico (PSO) de las células en cada cultivo fue directamente proporcional al cambio en OD en los diferentes cultivos (Figura 13). Se observó un aumento progresivo del PSO con el tiempo de cultivo. El incremento fue más notorio en los cultivos BG-11 y Ac+, que corresponden con los mayores valores de OD₇₃₀. En los cultivos N- y N- Ac+ se observó un ligero incremento a lo largo del cultivo. En los cultivos N- Glc+ y N- Ac+ Glc+ se observó un ligero incremento del PSO en el día 10, y posteriormente se presentó una disminución con el tiempo, que concuerda con la cinética de crecimiento.

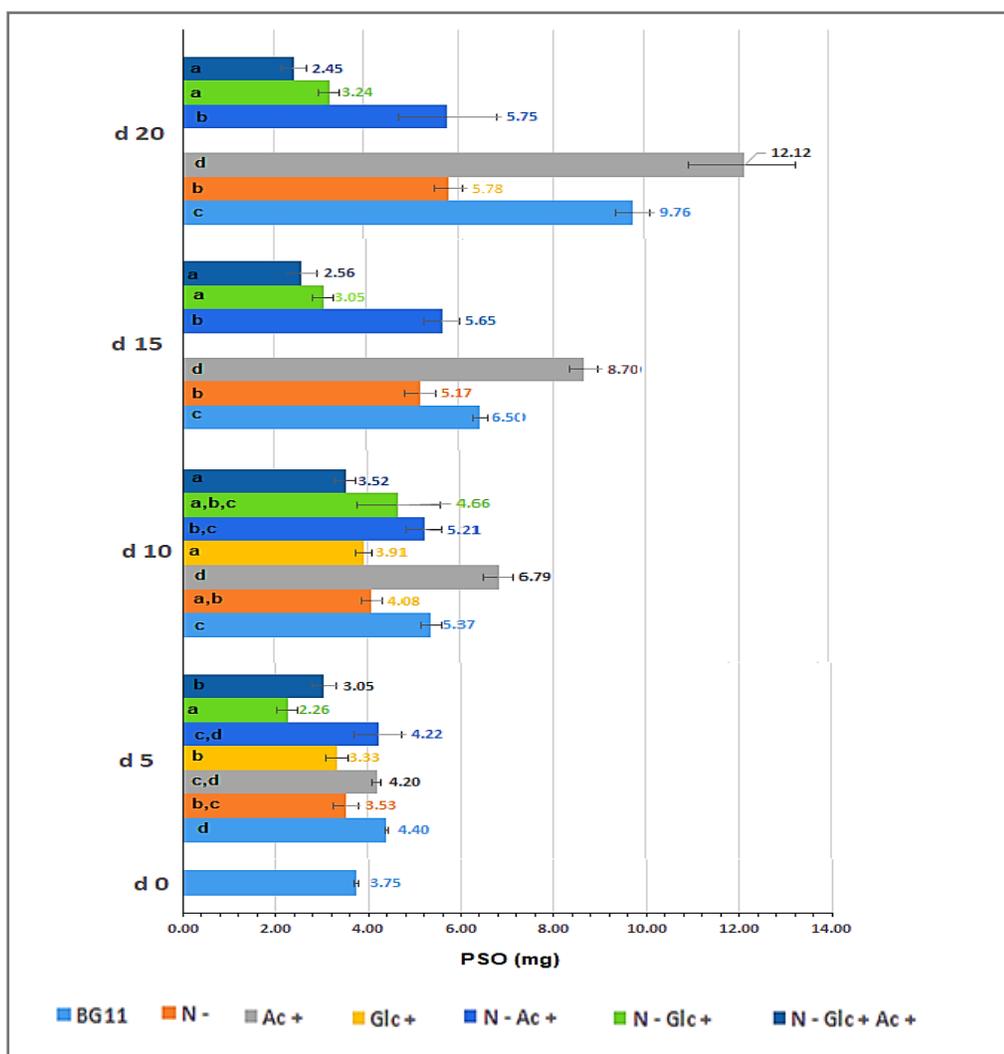


Figura 13. Contenido de peso seco orgánico de *Synechocystis* en diferentes medios de cultivo. Los tratamientos se agrupan por día de muestreo (5, 10, 15 y 20). Las barras indican el contenido de peso seco orgánico. Los valores en la parte superior representan el valor medio, las barras de error reflejan la SD y las letras la diferencia significativa de acuerdo a la prueba HSD de Turkey ($n=3$; $\alpha > 0.05$).

3.3.2 Acumulación de PHB en diferentes medios de cultivo

En todos los cultivos la mayor acumulación de PHB se registró en el día 5 posterior al cambio de medio de cultivo (Figura 14). En las condiciones N- Glc+ y Glc+ se detectó el mayor contenido de PHB con un valor de 11.02 ± 1.14 y 10.34 ± 0.65 % de PHB (w/w) respectivamente. No hubo diferencias significativas entre estos tratamientos ($p > 0.05$). En comparación con el cultivo en BG-11 (4.17 ± 0.08 % PHB (w/w)), el cultivo N- Glc+ presentó un incremento de 163 % en el contenido de PHB, mientras que en el cultivo Glc+ se obtuvo un incremento del 146 %.

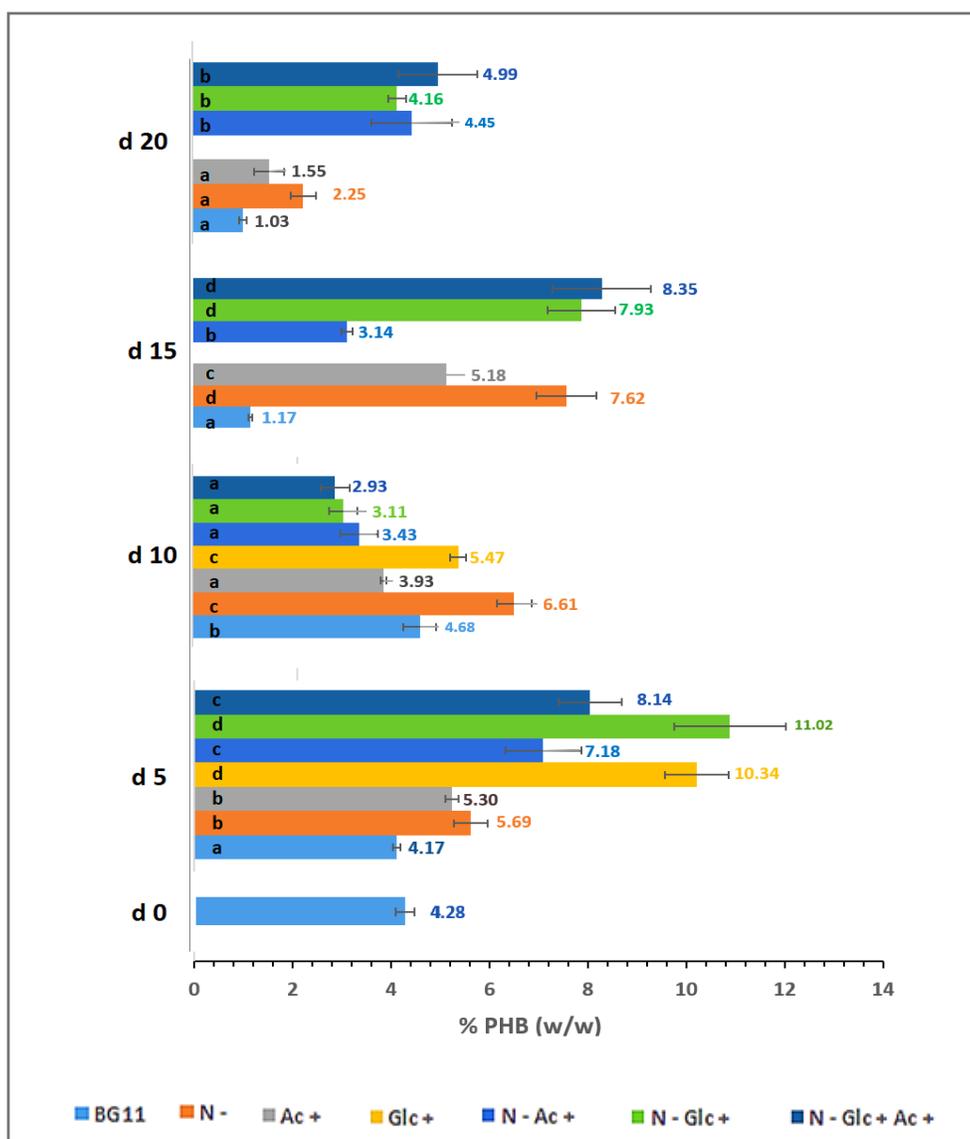


Figura 14. Contenido de PHB en *Synechocystis* en diferentes medios de cultivo. Los valores indicados en cada barra corresponden a la media \pm SD ($n=3$). Las letras en la parte inferior de las barras indican los grupos homogéneos según la diferencia significativa entre tratamientos de acuerdo a una prueba HSD de Turkey ($\alpha=0.05$).

Al día 10 de cultivo, se presentó una reducción significativa en el contenido de PHB en la mayoría de los cultivos en comparación con el día 5: 25 % en Ac+, 47 % en Glc+, 53 % en N- Ac+, 72 % en el cultivo N- Glc+ y 64 % en el N- Ac+ Glc+. Todos ellos, a excepción del cultivo Glc+, presentaron un contenido de PHB menor al cultivo BG-11 (4.68 ± 0.33 % PHB (w/w)) en un 16%, 26 %, 34 % y 37 % respectivamente.

El cultivo N- registró el mayor contenido de PHB al día 10 con un 6.61 ± 0.29 % PHB (w/w), que representa un incremento de 54.4 % de PHB con respecto al medio BG-11, y a diferencia de los otros cultivos presentó un incremento en el contenido de PHB respecto al día 5 en un 16 %.

Para el día 15 de cultivo el contenido de PHB en el medio BG-11 decreció a 1.17 ± 0.02 % PHB (w/w), en contraste con los demás cultivos donde se presentó un incremento en el contenido de PHB. En N- se registró 7.62 ± 0.61 % PHB (w/w), el cual representa un incremento de 551 % con respecto al cultivo BG-11; además corresponde al punto de mayor acumulación para este cultivo en los tiempos evaluados. Para los cultivos N- Glc+ y N- Ac+ Glc+ los valores de PHB fueron de, 7.93 ± 0.68 % PHB (w/w) y 8.35 ± 1.0 % PHB (w/w) respectivamente, que implican incrementos de 577 % y 613 % en comparación con el cultivo BG-11.

En el día 20 de cultivo hubo una reducción del contenido de PHB en todos los cultivos. El menor valor se encontró en el cultivo BG-11 con un 1.03 ± 0.08 % PHB (w/w), y el mayor en los cultivos N- Ac+, N- Glc+ y N- Ac+ Glc+ con 4.45 ± 0.81 , 4.16 ± 0.17 , y 4.99 ± 0.79 % PHB (w/w), entre los cuales no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$).

3.4 Expresión de los genes *pyk1* y *pyk2*

3.4.1 Extracción de DNA genómico de *Synechocystis*

Se obtuvieron 2 alícuotas de 100 μ l de DNA genómico (gDNA) con una concentración de 292.0 ng/ μ l y 342.9 ng/ μ l. La relación 260/280 para éstas fue de 1.86, que indica que el DNA esta libre de compuestos fenólicos o proteínas. En el gel de electroforesis se observó un fragmento definido (Figura 15). No se colocó marcador de peso molecular. El peso teórico del genoma de *Synechocystis* es de 3.6 Mb. El gDNA fue utilizado para realizar las curvas estándar en qPCR y como control positivo en la comprobación de la amplificación de los amplicones deseados tras el proceso de RT-PCR.

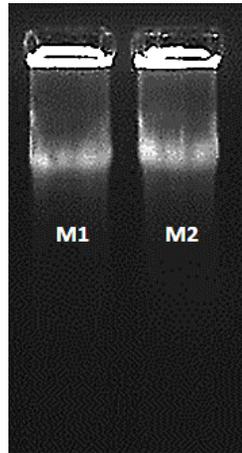


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa de gDNA de *Synechocystis*. Carriles 1 y 2, alícuotas de dos muestras de DNA. Las muestras fueron teñidas con Gel Red.

3.4.2 Extracción de RNA total.

La extracción de RNA de los cultivos se realizó de forma simultánea para las 21 muestras (7 tratamientos x 3 réplicas) en cada uno de los días de evaluación (día 5, 10, 15 y 20). En la Figura 16 se muestran las alícuotas de RNA correspondientes a las muestras del día 5. Ver datos de extracción en el anexo 5 (Tablas 15 a 20 y Figuras 34 a 36). El método de extracción y purificación de RNA utilizado permitió la extracción de una cantidad suficiente de material genético para llevar a cabo el ensayo de expresión génica. Se obtuvieron concentraciones superiores a 500 ng/ μ l de RNA, con una buena calidad y sin contaminación con proteínas o DNA como indicó el índice 260/280.

El análisis del gel de electroforesis (Figura 16) sugiere una posible degradación parcial en algunas muestras de RNA, al observarse una disminución en la intensidad de las bandas de RNA ribosomal (23 S, 16 S y 5 S). Este problema se incrementó progresivamente en las siguientes extracciones de RNA, siendo más evidente en las muestras del día 20 (Figura A3-A6).

En todas las muestras de RNA de los cultivos N- Ac+ Glc+ se presentó contaminación por materia orgánica. Durante el proceso de extracción el pellet de RNA presentó una coloración café, similar a la coloración del medio de cultivo, que no fue posible eliminar en los procesos de lavado.

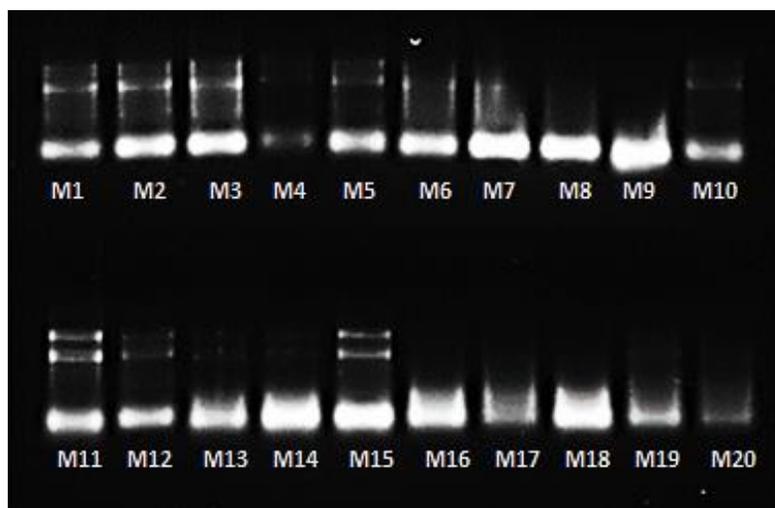


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de RNA total. Muestras de RNA total del día 5 de todas las muestras de cada tratamiento: M1-M3: BG-11, M4-M6: N⁻, M7-M9: Ac⁺, M10-M12: Glc⁺, M13-M15: N⁻ Ac⁺, M16-M18: N⁻ Glc⁺, M19- M20: N⁻ Ac⁺ Glc⁺. Las muestras fueron teñidas con Gel Red.

3.4.3 Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA a partir de hexámeros aleatorios permitió la amplificación de los genes *pyk1*, *pyk2* y *rnpB* a partir de una misma muestra de RNA. En la comprobación por PCR punto final se observó la presencia de un único amplicón para cada uno de los genes (Figura 17), que corresponde al tamaño esperado de 122 pb para *rnpB*, 100 pb para *pyk1* y 119 pb para *pyk2* (Tabla 3).

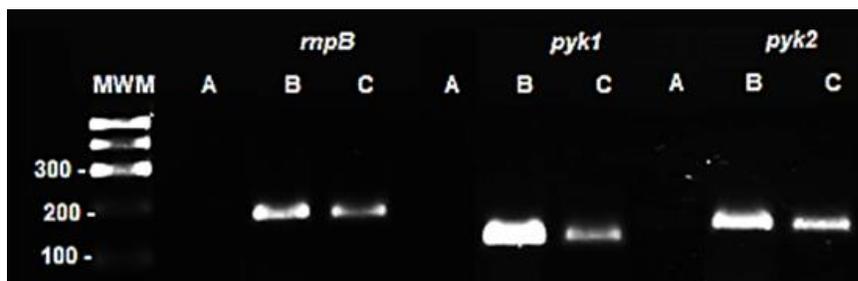


Figura 17. Comprobación de cDNA por PCR punto final. Productos de PCR de los genes *rnpB*, *pyk1* y *pyk2*: A) Control negativo. B) Control positivo con gDNA. C) cDNA en dilución 1:10. MWM: marcador de peso molecular Hyperladder 100 pb (Bioline).

3.4.4 qPCR

3.4.4.1 Gradiente de temperatura

No se encontraron diferencias significativas para los genes *pyk1*, *pyk2* y *rnpB* en las curvas de amplificación a las diferentes temperaturas (56, 58, 60 y 62 °C) (Figura 18). Sin embargo, las curvas de disociación de los genes *pyk1* y *pyk2* mostraron el pico más elevado a 60 °C. Para la curva del gen *rnpB* el mayor valor se obtuvo a 56 °C, pero no hubo diferencias significativas entre las demás temperaturas, a excepción de 62°C, en la cual se obtuvo una reducción significativa en ambas curvas. Con base a esto, se seleccionó la temperatura de 60 °C para la amplificación de los tres genes en los ensayos de qPCR posteriores.

3.4.4.2 Gradiente de concentración de oligonucleótidos

El valor del ciclo de cuantificación (Cq) se redujo al aumentar la concentración de oligonucleótidos para los tres genes (Figura 19). Esto se observó de forma más significativa en los oligonucleótidos para el gen *rnpB*, donde a una concentración de 100 nM de oligonucleótidos no hubo amplificación, y la diferencia del valor de Cq entre 200 y 500 nM fue de 5. Además, a 200 nM se presentaron amplificaciones inespecíficas, que se sugiere son dímeros de oligonucleótidos por la curva de disociación de *rnpB* (Figura 19). Por lo tanto, la concentración de oligonucleótidos óptima para la amplificación fue de 500 nM, al presentar los valores más bajos de Cq.

3.4.4.3 Gradiente de cantidad de templado

La cantidad de cDNA seleccionado para los ensayos de expresión génica en las muestras de *Synechocystis* fue la dilución 1:10 de cDNA, ya que fue la concentración de cDNA a la cual se presentaron las mejores curvas de amplificación y los picos de disociación mal altos (Figura 20).

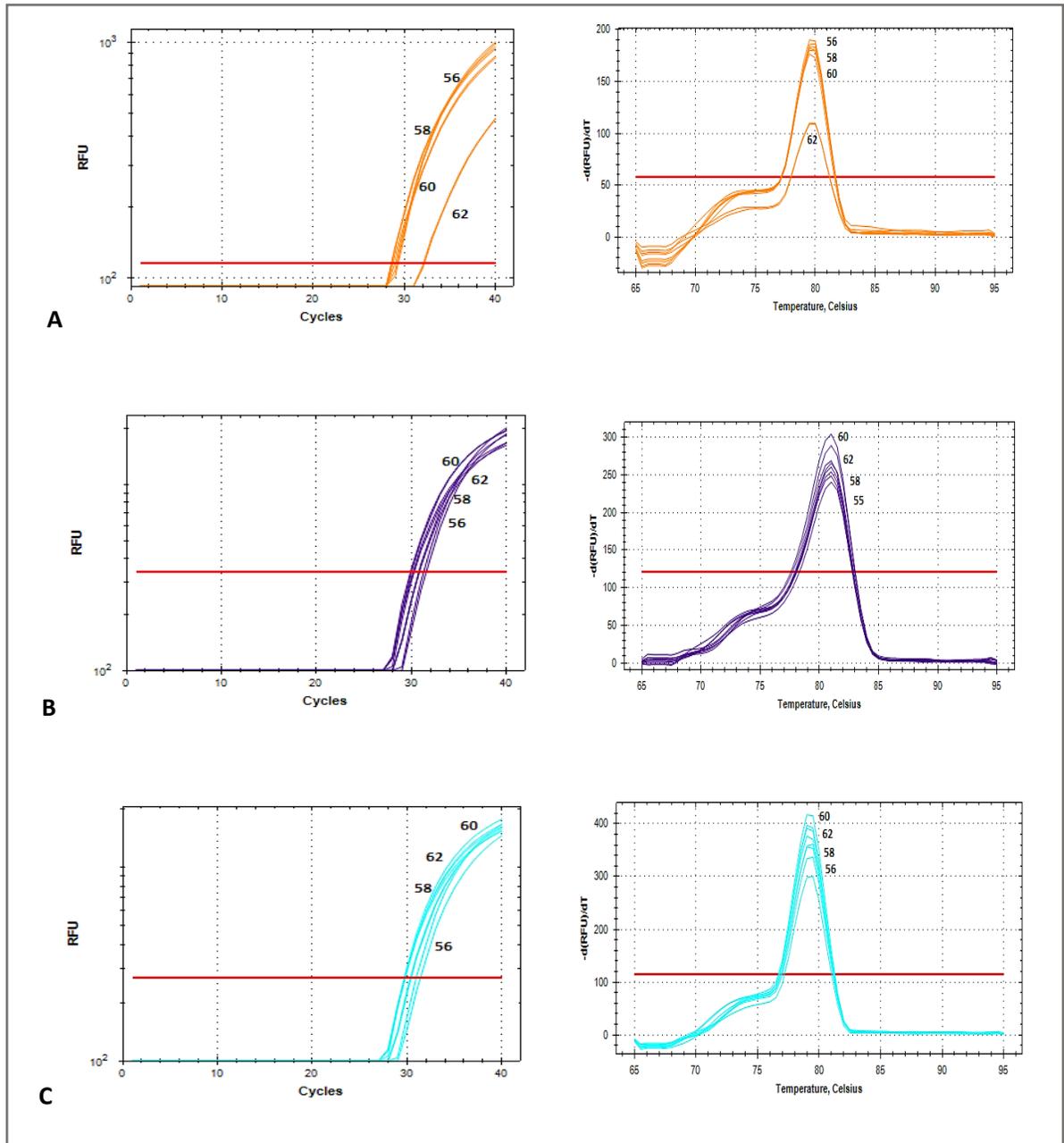


Figura 18. Gradiente de temperatura en qPCR. Curvas de amplificación y disociación en un gradiente de temperatura a 56, 58, 60 y 62 °C para cada gen: A) *rnpB*. B) *pyk1*. C) *pyk2*.

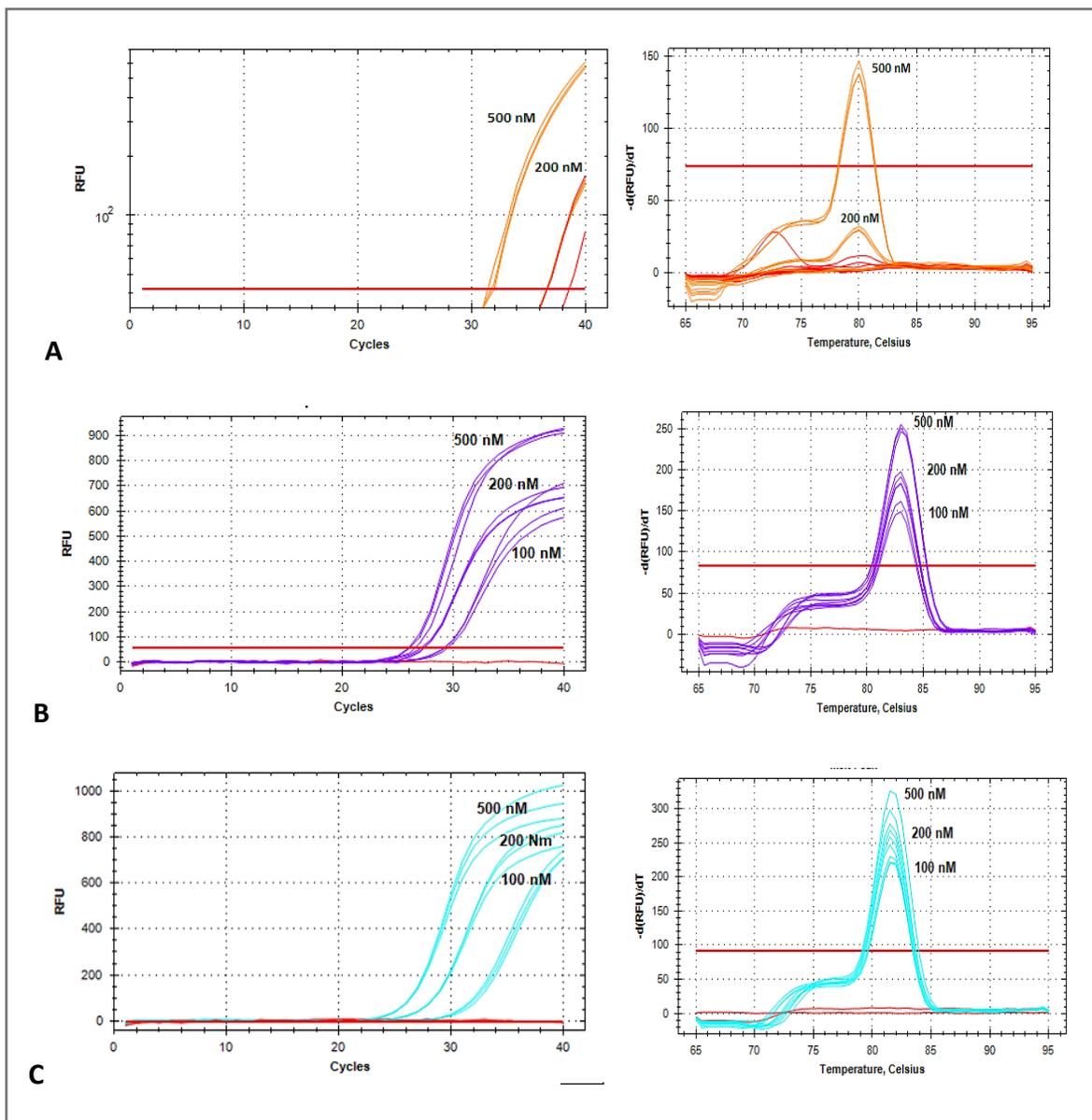


Figura 19. Gradiente de concentración de oligonucleótidos en qPCR. Curvas de amplificación y disociación a las diferentes temperaturas para cada gen: A) *rnpB*. B) *pyk1*. C) *pyk2*.

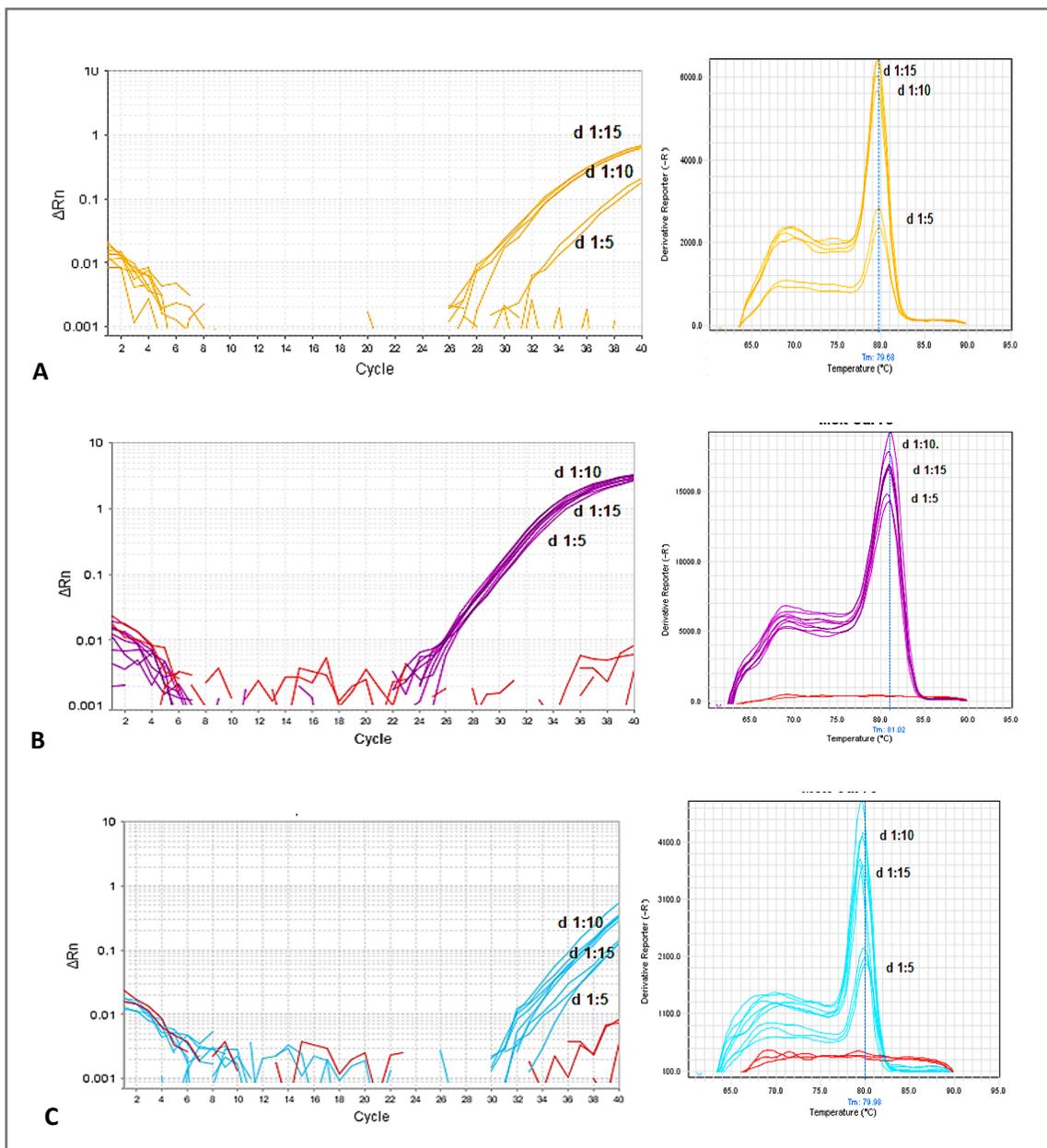


Figura 20. Gradiente de concentración de templado en qPCR. Curvas de amplificación y disociación a las diferentes temperaturas para cada gen: A) *rnpB*. B) *pyk1*. C) *pyk2*.

3.4.4.4 Eficiencia de amplificación por curvas estándar

Las curvas estándar de los genes arrojaron una eficiencia de amplificación de 95.1 % para *rnpB*, 97.3 % para *pyk1* y 99.6 % para *pyk2* (Figura 21 A). En todos los casos la curva estándar presentó un coeficiente de correlación lineal de 0.99. En la gráfica de disociación se observó un pico de amplificación de dímeros de oligonucleótidos en el gen *rnpB* y *pyk1* (Figura 21 C).

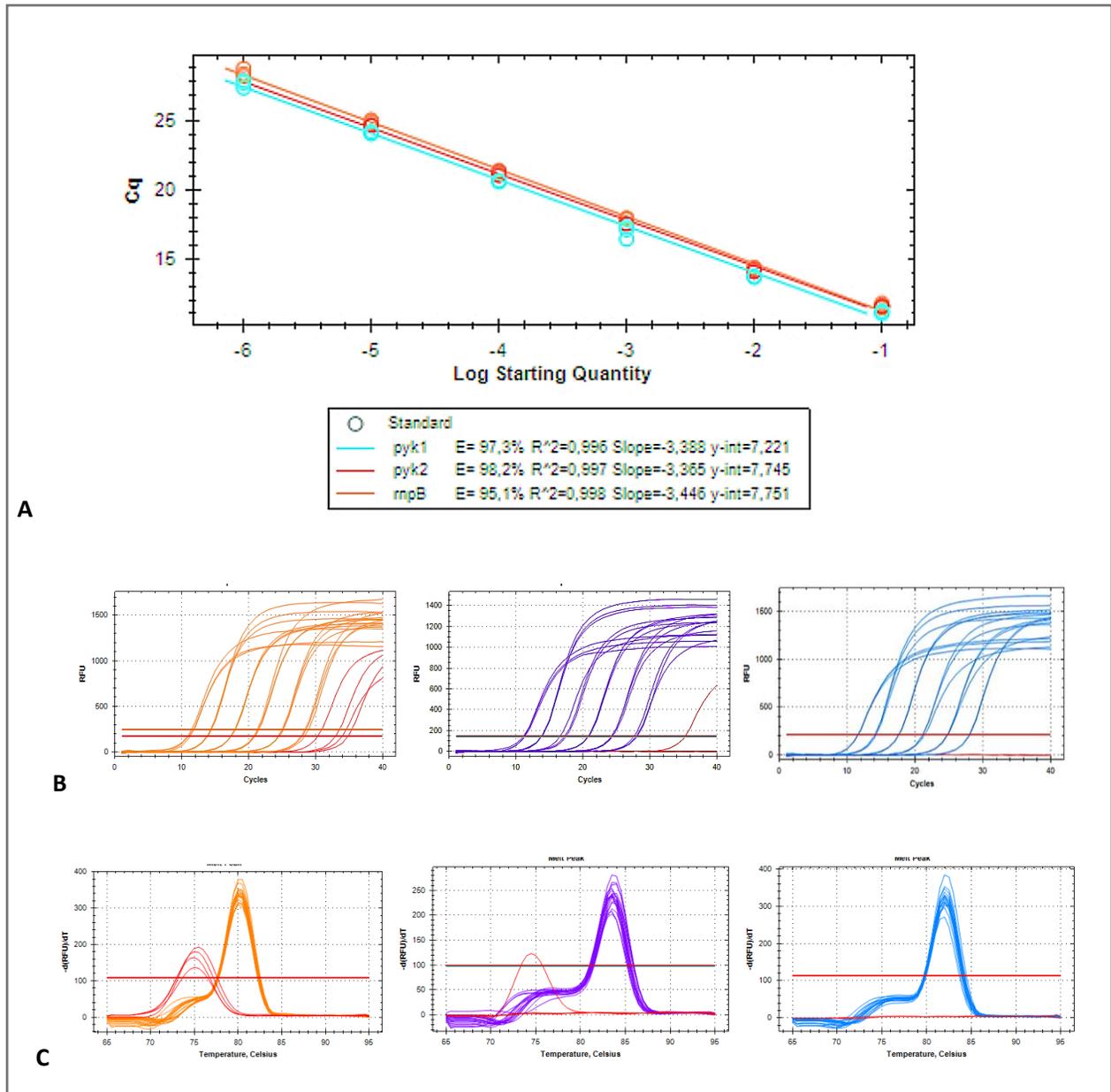


Figura 21. Curvas estándar en qPCR para los genes *rnpB*, *pyk1* y *pyk2*. A) Curva estándar para los genes *rnpB*, *pyk1*, *pyk2*. B) Curvas de amplificación y C) Curvas de disociación de los genes *rnpB* (naranja), *pyk1* (morado), *pyk2* (azul).

3.4.4.5 Cuantificación de la expresión de genes *pyk1* y *pyk2* en las muestras de *Synechocystis* en diferentes medios de cultivo

Los niveles de expresión de los genes *pyk1* y *pyk2* fueron normalizados al gen de referencia *rnpB*. Los niveles de expresión relativa de los genes *pyk1* y *pyk2* presentaron diferencias entre los cultivos en diferentes medios (Figura 22.). En el cultivo N- se encontró la mayor expresión del gen *pyk1* con 1.47 ± 0.05 , y en contraste la menor expresión del gen *pyk2* con 0.62 ± 0.08 en comparación con los niveles de expresión en los demás cultivos ($p < 0.5$).

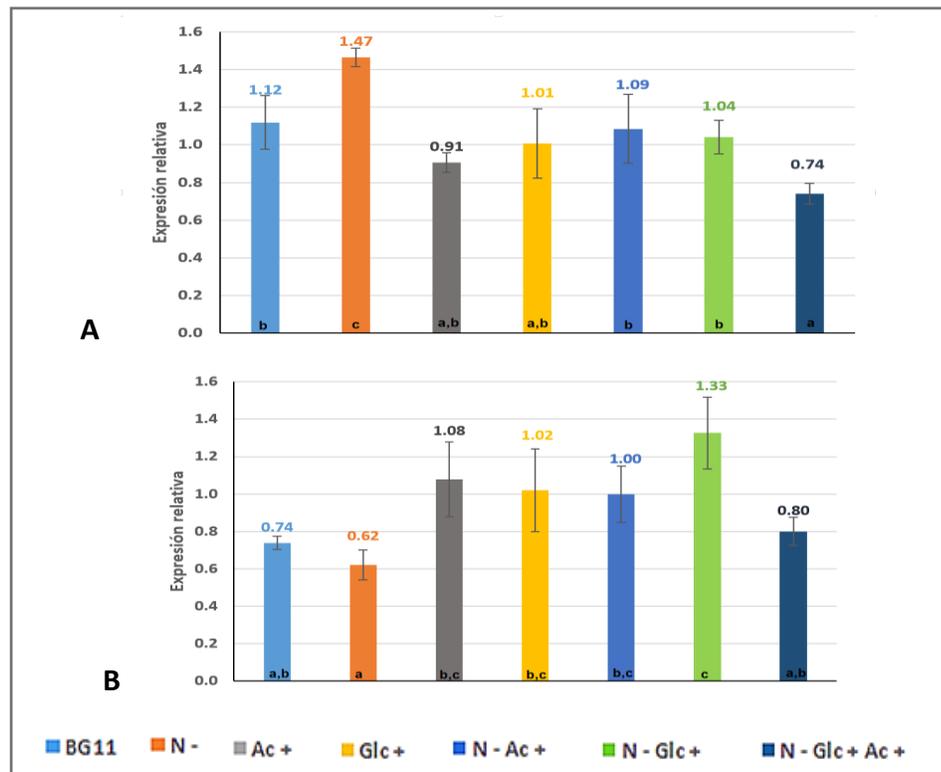


Figura 22. Expresión de los genes *pyk1* y *pyk2* en diferentes medios de cultivo. A) *pyk1* y B) *pyk2*. Las muestras corresponden al día 5 posterior al cambio de medio. Las letras muestran los grupos homogéneos según las diferencias significativas en la prueba de Turkey ($\alpha > 0.05$).

Para el gen *pyk1* no se observaron diferencias significativas ($p > 0.5$) entre los cultivos en BG-11, Ac+, Glc+, N- Ac+, y N- Glc+, en los cuales el nivel de expresión fue de aproximadamente 1.0. Por su parte, en el cultivo N- Ac+ Glc+ se observó la expresión de *pyk1* en con 0.74 ± 0.05 . En el caso del gen *pyk2*, la mayor expresión se registró en el cultivo N- Glc + con un valor de 1.33 ± 0.19 . Sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.5$) entre este y los cultivos Ac+, Glc+ y N- Ac+, en los cuales el

nivel de expresión fue de aproximadamente 1.0; pero si una diferencia significativa ($p < 0.5$) con los cultivos BG-11, N- y N- Ac+ Glc+ donde el nivel de expresión fue menor a 1.

Para visualizar mejor el efecto de los diferentes medios de cultivo, se normalizaron y graficaron los datos de expresión relativa de los genes *pyk* con respecto a la expresión obtenida en el cultivo con medio BG-11. Como se observa en la Figura 23, los valores de expresión obtenidos para los genes *pyk1* y *pyk2* mostraron diferencias importantes entre sí y con los distintos medios utilizados. Para el gen *pyk1* se obtuvo un aumento del 31 % en la condición N-, en todas las demás condiciones se obtuvo una disminución: de 19 % para Ac+, 10% para Glc+, 3 % para N- Ac+, 7 % para N- Glc+ y 34 % para N- Ac+ Glc+, en relación con el nivel de expresión obtenido en el medio BG-11. Para el gen *pyk2* de forma contraria la condición N- fue la única que presentó un menor nivel de expresión en un 16 %, mientras que en todas las demás condiciones se obtuvo un incremento: de 46 % para Ac+, 38 % para Glc+, 35 % para N- Ac+, 80 % para N- Glc+ y 8 % para N- Ac+ Glc+, en relación con nivel del expresión obtenido en el medio BG-11.

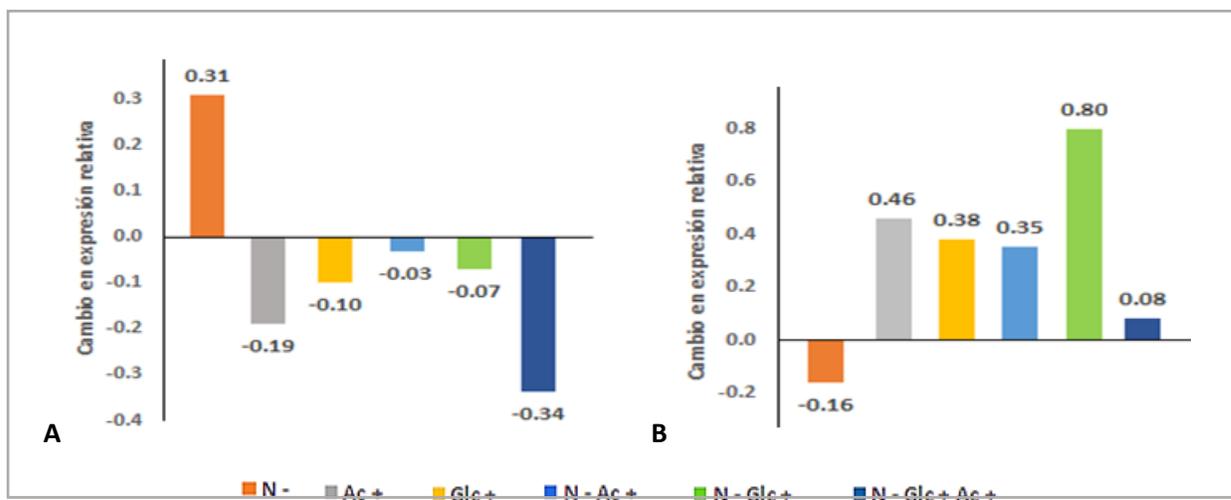


Figura 23. Cambio en los niveles de expresión de *pyk1* y *pyk2* al día 5 de cultivo en los diferentes medios en relación con la expresión obtenida en el medio BG-11. A) Cambio en los niveles de expresión relativa del gen *pyk1*. B) Cambios en los niveles de expresión relativa del gen *pyk2*.

Por otro lado, un aspecto interesante es el hecho de que en la muestra del tiempo cero, que fue tomada del pre-cultivo del medio BG-11 previo al cambio de medio, la expresión de ambos genes *pyk* fue mayor a los valores encontrados en las muestras en las diferentes condiciones de cultivo incluyendo el medio BG-11 al día 5. El nivel de expresión del pre-cultivo en BG-11 fue de 1.89 ± 0.82 para *pyk1* y de 1.87 ± 0.23 para *pyk2*. Al comparar los valores del pre-cultivo con el nivel de expresión obtenido para los genes

pyk en BG-11 (día 5), se observó una disminución del 41% para *pyk1* y 61 % para *pyk2*. Estas diferencias pueden deberse a la manera como se hicieron los cultivos ya que el pre-cultivo en BG-11 inició a una OD_{730} de 0.05 y fue cosechado a una $OD_{730} \approx 1.0$ (que es la mitad de la fase exponencial) e inoculado en los diferentes medios de cultivo, los cuales iniciaron a una $OD_{730} \approx 0.8$.

3.5 Relación entre la acumulación de PHB y la expresión de *pyk1* y *pyk2*

El análisis de correlación entre el contenido de PHB y la expresión de los genes *pyk* por la dispersión de las muestras en la Fig. 23 ($p > 0.05$) indicó una relación negativa débil en el caso del gen *pyk1* con un valor de $r = -0.2811$; mientras que en el gen *pyk2* se tiene una relación positiva moderada con un valor de $r = 0.5563$. Esto sugiere que el gen *pyk2* es más relevante para la acumulación de PHB en comparación con el gen *pyk1*.

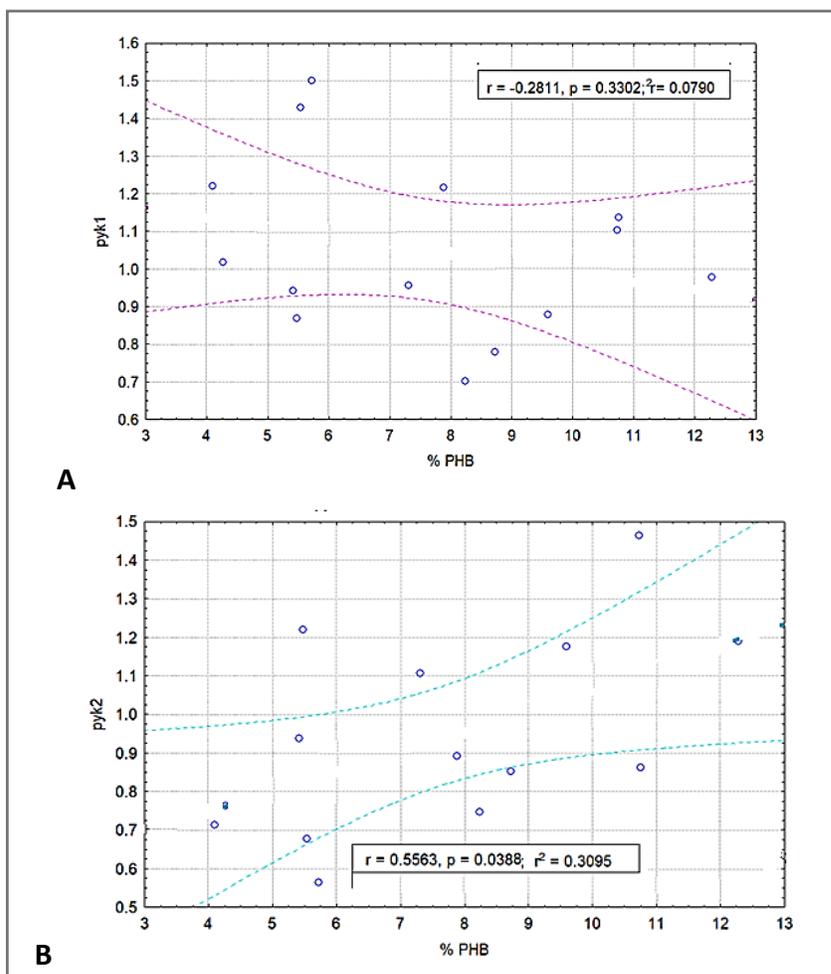


Figura 24. Relación entre contenido de PHB y expresión de los genes *pyk1* y *pyk2*. Gráfica de dispersión de los valores de contenido de PHB en las muestras de diferentes medios y los niveles de expresión relativa de los genes: A) *pyk1* y B) *pyk2*.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Efecto de las condiciones de luz y agitación en la acumulación de PHB

Los cultivos de *Synechocystis* presentaron un color verde-azul característico de la cepa, sugiriendo un estado metabólico óptimo, como se vio reflejado en la cinética de crecimiento, la cual entró directamente a una fase de crecimiento exponencial. Este comportamiento es característico de microorganismos fotosintéticos que son luz-limitantes más que nutriente limitantes como las bacterias heterotróficas (Burnap, 2015; Chen et al., 2016). Posteriormente los cultivos entraron a una fase lineal de crecimiento, donde a causa del incremento en el número de células ocurre un efecto de sombreado, donde hay una limitación de luz (Schuurmans, Matthijs, & Hellingwerf, 2017). A los 20 días de cultivo no se llegó a la fase estacionaria, lo que sugiere que las células se encontraban aun con nutrientes suficientes para continuar su crecimiento. En la cinética de crecimiento obtenida por Panda et al. (2006) con *Synechocystis* en medio BG-11 y con las mismas condiciones de fotoperiodo y temperatura, los máximos valores de pesos seco fueron obtenidos cuando el cultivo alcanzó la fase estacionaria de crecimiento (21 días).

Las cianobacterias son consideradas organismos de crecimiento rápido al presentar tiempos de duplicación de 3 a 24 h, de acuerdo a la especie y factores ambientales como intensidad de luz, concentración de CO₂ y nutrientes (Angermayr et al., 2014; Ducat et al., 2011; Griese and Lange, 2011; Vermaas, 1996; Yu et al., 2013). Para *Synechocystis* se han reportado valores desde 6 h en condiciones de iluminación continua a 300 $\mu\text{mol fotonm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Hihara et al., 2001) hasta 84 h en condiciones heterotróficas en oscuridad (Williams, 1988). En el presente experimento, los tiempos de duplicación variaron entre 10 h a 22 h, valores que concuerdan con otros trabajos realizados en condiciones de fotoperiodo donde reportan t_d de 24 h (Knoop & Steuer, 2015; Zilliges et al., 2013).

Los cultivos a los que se suministró flujo de aire (FA y LA) tuvieron los menores tiempos de duplicación y alcanzaron una mayor cantidad de biomasa debido a la mayor disponibilidad de CO₂, el cual es la fuente de carbono para la fotosíntesis por la célula. En el aire atmosférico hay de 0.03 a 0.06 % CO₂ (Eberly & Ely, 2012). Al suministrarse aire a los cultivos el CO₂ permanece en el medio por difusión donde es absorbido por la célula a una mayor velocidad en comparación con los cultivos estáticos, tal que puede ser metabolizado más rápidamente para la formación de biomasa (Vermaas, 1996; Williams, 1988; Yu et al., 2013).

Sin embargo, la infraestructura disponible consistió en la regulación manual del flujo de aire suministrado a cada matraz, lo que ocasionó problemas de reproducibilidad. Una consecuencia del uso de la aireación fue la pérdida de volumen por evaporación, lo cual provocó una mayor concentración de células, en comparación con los otros tratamientos. Por lo tanto, se descartó como condición a usar en ensayos posteriores.

Los cultivos con agitación orbital (LO) presentaron el mismo comportamiento que los cultivos estáticos con agitación manual (FE y LE). Sin embargo, debido a que la biomasa en el cultivo LO se asentaba parcialmente, se sugiere que la velocidad de agitación con que cuenta el equipo no fue suficiente para el intercambio de gases adecuado y la homogenización de las células. Así mismo, la placa de agitación no permite mantener la misma intensidad lumínica de forma homogénea.

Con respecto a la acumulación de PHB, los valores obtenidos se encuentran dentro del rango reportado para *Synechocystis* en medio BG-11 que es de 1 a 4.5 %, (Khetkorn et al., 2016; B. Panda & Mallick, 2007; Bhabatarini Panda et al., 2006). En todos los casos, el mayor contenido de PHB se registró en el día 9, ya que para el día 16 el contenido de PHB disminuyó significativamente en un 15 % en los tratamientos LE y LO, un 60 % en FA, y un 70 % en FE y LA. La máxima acumulación de PHB en este ensayo fue de 3.17 y 2.78 % PHB (w/w) en los tratamientos LA y FE, entre los cuales no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$).

En el caso de la aireación, Takahashi et al. (1998) reportan un aumento en el contenido de PHB en *Synechococcus* con aire enriquecido con CO₂ al 5 %, que sugieren es por un mayor flujo metabólico causado por el CO₂ que estimula la síntesis de PHB. De forma similar, en varias especies de microalgas se reporta un mayor crecimiento y producción de biomasa y contenido de lípidos bajo altas condiciones de CO₂ (Singh & Singh, 2014).

En nuestro caso, los datos sugieren que el CO₂ tiene un efecto estimulante en *Synechocystis* para la acumulación de PHB. Sin embargo, se requiere de más información para determinar su efecto, como sería el probar diferentes concentraciones de CO₂ administrado al cultivo y diferente tiempo de suministro. Por ello, se mantiene como un factor inductor a considerarse en ensayos futuros, siempre y cuando se disponga de un manómetro para la regulación precisa del CO₂ administrado a los cultivos.

Con respecto a la condición de fotoperiodo, debido a que tanto FE (2.78%) como FA (1.93%) mostraron una acumulación de PHB mayor a LO (1.13%) y LE (0.82%), se sugiere que el fotoperiodo

favorece la acumulación de PHB en las células en comparación con la luz continua. Esto concuerda con lo reportado por otros autores como Panda et al. (2006) quienes obtuvieron mayor acumulación de PHB en fotoperiodo 14:10 (4.5 %) en comparación con una condición de iluminación continua (2.4 %); así como Ansari y Fatma (2016), quienes reportan que las células en fotoperiodo 14:10 son mejores acumuladoras de PHB con un 7.63 % en contraste con la iluminación continua (3.31 %).

Se ha sugerido que los periodos de oscuridad son necesarios para la acumulación de PHB, debido a que la actividad PHB sintasa se encuentra exclusivamente asociada a la membrana tilacoidal que es fotosintéticamente activa, tal que la síntesis de gránulos de PHB debe ser más eficiente en condiciones desfavorables para la fotosíntesis (Asada, Miyake, Miyake, Kurane, & Tokiwa, 1999). Así mismo, el fotoperiodo induce cambios en el crecimiento, contenido de proteína, lípidos y pigmentos de las células (Krzemińska, Pawlik-Skowrońska, Trzcińska, & Tys, 2014), y una mayor eficiencia de crecimiento (Singh & Singh, 2015). Esto se sugiere que es debido a que la regulación del metabolismo de azúcares en cianobacterias está en estrecha relación con la regulación circadiana, la cual tiene un papel crítico en la supervivencia de las células y el almacenamiento de compuestos de reserva como el PHB (Knowles & Plaxton, 2003; Knowles et al., 2001; Kucho et al., 2005; B. Panda & Mallick, 2007; Bhabatarini Panda et al., 2006).

De esta manera, se seleccionó utilizar una condición de fotoperiodo 14:10 en los ensayos posteriores, tanto por su papel en la acumulación de PHB, como para estudiar el efecto de los genes *pyk1* y *pyk2*, los cuales se sugiere tienen una regulación circadiana.

Debido al cambio significativo entre el contenido de PHB en el día 9 y el día 16 de incubación, se optó por realizar un seguimiento de la acumulación de PHB en más puntos de la cinética de crecimiento para determinar su tendencia, ya que identificar el máximo punto de producción de un compuesto de interés en relación con la cinética de crecimiento del microorganismo utilizado es un aspecto clave para la obtención eficiente del producto.

4.2 Acumulación de PHB en *Synechocystis* en relación con el crecimiento

Para la acumulación de PHB en *Synechocystis* se ha descrito un incremento gradual en la acumulación de PHB durante la fase exponencial de crecimiento, alrededor del día 20 de incubación, que declina

progresivamente al alcanzar la fase estacionaria de crecimiento (Monshupanee & Incharoensakdi, 2013; Bhabatarini Panda, Jain, Sharma, & Mallick, 2006; L. Sharma & Mallick, 2005). Sin embargo, los datos obtenidos en este ensayo difieren a los estudios mencionados, ya que la mayor acumulación de PHB se observó en los primeros días de la fase exponencial (día 5), y se mantuvo sin cambios significativos hasta nuestro segundo punto de evaluación (día 10). Sin embargo, el contenido de PHB (w/w) disminuyó un 75 % en el siguiente punto de evaluación (día 15), aunque el cultivo aún se encontraba en una fase lineal de crecimiento. Una posible explicación a lo observado en los cultivos, puede ser que las células utilizaron un mayor flujo de carbono hacia la formación de biomasa y componentes celulares para crecimiento y reproducción, como refleja la curva de crecimiento en incremento, en lugar de dirigirlo a la formación de compuestos de almacenaje como el PHB. Así mismo, es posible que las reservas de carbono sintetizadas fueran glicógeno o lípidos, los cuales son productos mayoritarios de almacenamiento de carbono en cianobacterias, con un mayor tiempo de acumulación a comparación del PHB, como describe Monshupanee y Incharoensakdi (2013).

Otro factor que influye significativamente en el comportamiento de las células son las condiciones de cultivo utilizadas en cada caso. Panda et al. (2006) trabajaron con cultivos de *Synechocystis* sp. PCC 6803 en 50 ml de medio BG-11 con pH mantenido a 8.0, en una incubadora a 25 °C y con una intensidad lumínica de 75 $\mu\text{mol fotón}/\text{m}^2\text{s}$ con fotoperiodo 14:10. Por su parte Sharma y Mallick (2005), manejaron condiciones similares, cultivos de *Synechocystis* en 50 ml de medio BG-11 con pH de 8.5, una incubadora a 28 °C y una intensidad lumínica de 75 $\mu\text{mol fotón}/\text{m}^2\text{s}$ con fotoperiodo 14:10. Por último, Monshupanee y Incharoensakdi (2013) trabajaron con cultivos de *Synechocystis* sp. PCC 6803 en 150 ml de medio BG-11 a pH 7.5, a una temperatura de 28 °C, con luz continua de 50 $\mu\text{mol fotón}/\text{m}^2\text{s}$ y agitación a 160 rpm en condiciones de. Esto sugiere que las diferencias en tiempo de iluminación y condiciones de agitación e irradiancia tienen un efecto importante en la acumulación de PHB en *Synechocystis*.

Así mismo, un factor importante es el pH del cultivo. En nuestro caso se ajustó el cultivo a un pH inicial de 8.2 como se sugiere para esta especie; sin embargo, no se realizó un monitoreo de pH ni un ajuste para mantenerlo constante como se ha hecho en otros estudios. Se estima que al final del cultivo el pH se encontraba alrededor de 10, en concordancia con un monitoreo previo realizado (ver Figura 37 en anexo 6). Este cambio de pH concuerda con los valores establecidos como óptimos para el crecimiento de *Synechocystis*, que van de pH 7 a 10 con una afectación mínima a los parámetros fisiológicos celulares (Touloupakis, Cicchi, Margarita, Benavides, & Torzillo, 2016). Así mismo, los valores de pH coinciden con los reportes de la literatura que mencionan que la variación en el pH del medio en cultivos de cianobacterias y microalgas tiende a la alcalinización, por el consumo de ácidos orgánicos como el HCO_3^-

en el proceso de fotosíntesis, dando origen a la producción de CO₂ (Shiraiwa, Goyal, & Tolber, 1993). No se descarta que el cambio en el pH del medio afectará el proceso de acumulación de PHB de forma negativa ya que se ha reportado que la acumulación de PHB es mayor a valores de pH de 7.5 y 8.5 (4.22 y 4.55 % PHB (w/w)), mientras que en pH alcalino de 9.5 y 10.5 (2.86 y 2.31 % PHB (w/w)) disminuye en un 50 % (Bhabatarini Panda et al., 2006). Sin embargo, en estudios realizados en el grupo del laboratorio con *Synechocystis* en medio BG-11 con suplemento de agua de desecho de la producción de aceite de oliva, la mayor acumulación de PHB se obtuvo en cultivos en donde el pH fue mantenido entre 7.5 y 8.0 a lo largo del cultivo (3.9 % PHB (w/w)) en comparación con los cultivos donde el pH fue ajustado a 8.0 solamente al inicio del cultivo (5.4 % PHB (w/w)) (datos no publicados).

4.3 Efecto de fotomixotrofia y limitación de N en la acumulación de PHB

Con el objetivo de estudiar la relación de los genes *pyk* de *Synechocystis* en la acumulación de PHB, se utilizaron condiciones fotomixotróficas para el cultivo. Esto debido a que diversos estudios sugieren que se presenta una mayor acumulación de PHB en la célula al estimular las vías glicolíticas (Iijima, Watanabe, Takanobu, Hirai, & Osanai, 2014; T Monshupanee & Incharoensakdi, 2013; Nakajima et al., 2014; Osanai et al., 2006; Osanai, Iijima, & Hirai, 2016).

En este ensayo se iniciaron los cultivos con una alta biomasa celular, por lo que se inició con un valor de OD_i de 1.0, en contraste con los ensayos anteriores donde la OD_i fue de 0.05. De acuerdo a lo observado en los ensayos anteriores a una OD de 1 el cultivo se encuentra en fase lineal (Schuurmans, Matthijs, & Hellingwerf, 2017), por lo que se manejó como inóculo para el ensayo un cultivo de *Synechocystis* en medio BG-11, en el cual al alcanzarse una OD ≈ 1 se colectaron las células y se hizo el cambio de medio de forma similar a Hondo et al. (2015), Lau et al. (2014) y Xu et al. (2002) entre otros.

Se ha demostrado que para adaptarse a las variaciones de las condiciones ambientales las cianobacterias llevan a cabo cambios en la redirección del flujo de carbono en el metabolismo central de las cianobacterias. Uno de los más drásticos es el cambio de condición fotoautotrófica a fotomixotrófica, es decir, la presencia de azúcares como glucosa (Glc+) y acetato (Ac+); y la limitación de nutrientes esenciales como el Nitrógeno (N-) (Nakajima et al., 2014; Osanai, Iijima, & Hirai, 2016; Takahashi, Uchimiya, & Hihara, 2008). De igual forma, en varios estudios se ha determinado que estas condiciones

pueden favorecer la acumulación y acumulación de compuestos como el PHB (Khetkorn et al., 2016; Osanai et al., 2007; B. Panda & Mallick, 2007; Xu et al., 2002).

Los resultados obtenidos sugieren un cambio de metabolismo de las células, que se vio reflejado en el cambio de color del cultivo en cada una de las condiciones analizadas. El cambio más evidente se observó en la condición N-, la cual presentó un blanqueamiento de azul-verde a amarillo. Esto sugiere una probable degradación de los ficobilisomas, que a su vez conlleva a una reducción del metabolismo central, y por consiguiente una disminución del crecimiento celular (Iijima, Watanabe, Takanobu, Hirai, & Osanai, 2014; Nakajima et al., 2014). Sin embargo, en esta condición se ha reportado que ocurre una mayor inducción de las vías catabólicas de azúcares como la vía EMP, la vía OPP y el metabolismo de glicógeno, como resultado de una cascada de señalización que involucra a los factores transcripcionales *NtcA*, *SigE* y *Rre37*. El regulador *NtcA* es inducido por N- y se une a la región promotora de *Rre37*, que a su vez se une a las regiones promotoras de genes codificantes de enzimas relacionadas al catabolismo de glicógeno, glicólisis y metabolismo de aminoácidos (Iijima et al., 2014; Lau et al., 2014; Osanai et al., 2005, 2007).

En los experimentos realizados en este trabajo la condición N- favoreció la acumulación de PHB en un 36 % en comparación con el obtenido en medio BG-11. Sin embargo, el contenido de PHB obtenido (7.62 %) fue menor a los valores reportados por Xu et al. (2002) y Panda y Mallick (2007) quienes obtuvieron un 10.9 y 8.1 % de PHB, respectivamente. Sin embargo, un aspecto interesante es que el contenido de PHB permaneció constante e incluso con un ligero incremento a lo largo de la cinética de crecimiento. Se ha sugerido que el cultivo de *Synechocystis* en condiciones de N- promueve la activación de las vías catabólicas del carbono, principalmente la vía OPP (Osanai et al., 2013, 2016), que a su vez incrementa el flujo metabólico hacia la producción de acetil-CoA, el cual puede ser utilizado para la síntesis de compuestos de almacenamiento de carbono y energía, para la supervivencia de la célula, como son lípidos y PHB (Gigova & Ivanova, 2015).

Diversos estudios sugieren que el uso de fuentes de carbono exógenas tiene un gran potencial para la acumulación de PHB en cianobacterias, lo que se ha visto reflejado en el valor teórico máximo de eficiencia de conversión celular de glucosa o acetato a PHB de 48 % (w/w), que es comparable al descrito en bacterias heterotróficas (Tanakarn Monshupanee, Nimdach, & Incharoensakdi, 2016). Así mismo, la suplementación de carbono en cianobacterias tiene un efecto positivo en la acumulación de PHB en concentraciones de 10 a 20 veces menores de las requeridas por bacterias heterotróficas (Lau et al., 2014).

La presencia de fuentes de carbono como Glc y Ac provee un incremento en la disponibilidad de metabolitos y energía, independientemente de la fotosíntesis, permitiendo un crecimiento más rápido y producción continua en condiciones diurnas (Kanno et al., 2017). Esto se vio reflejado en la acumulación de PHB, en donde los valores de mayor acumulación se registraron en los medios con Glc+, tanto en N- como en el medio BG-11 estándar, con una acumulación de 11.02 % y 10.34 % PHB (w/w) respectivamente. Estos valores son muy similares a los valores reportados por Monshupanee e Incharoensakdi (2013) para estas mismas condiciones con un 13.1 % y 9.2% PHB (w/w) respectivamente.

Xu et al (2002) sugieren que las células de *Synechocystis* asimilan las fuentes de carbono exógenas como Glc y Ac prioritariamente a la fijación de CO₂ por fotosíntesis, al encontrar que la tasa de evolución de O₂ disminuye en condiciones fotomixotróficas. Sin embargo, You et al. (2014) observaron que en presencia de Glc el flujo de fijación de CO₂ por el ciclo CBB es seis veces mayor a la utilización de Glc. Así mismo encontraron que el flujo relativo en la vía OPP y ciclo TCA fue bajo. Esto como una forma de conservar energía, ya que al obtener suficiente poder reductor (NADPH) de las reacciones lumínicas, el paso por el ciclo TCA conlleva a una síntesis de enzimas innecesaria, siendo utilizado en baja proporción y únicamente para la generación de intermediarios metabólicos necesarios para alcanzar el balance metabólico. De forma similar, la vía OPP es balanceada de acuerdo a la cantidad de NADPH. Esto es importante ya que el NADPH es requerido para la síntesis de PHB.

En los cultivos con Glc+ se sugiere que tanto en el ciclo de CBB como las vías para el catabolismo de la glucosa (EMP, OPP y ED) están activas. En nuestro caso no fue posible obtener toda la cinética de crecimiento en la condición Glc+ debido a la contaminación repetida que sufrieron los cultivos. Esto probablemente se debió a que se trabajó con cultivos mono-cianobacterianos no axénicos, tal que los microorganismos presentes utilizaron la glucosa y crecieron más rápidamente que la cianobacteria. No obstante la contaminación, en los puntos que se logró muestrear del cultivo se observó un mayor crecimiento en comparación con los otros tratamientos. Esto no coincide con lo mencionado por Xu et al. (2002) quienes al obtener un bajo crecimiento en BG-11 adicionado con Glc sugieren que el flujo metabólico se dirigió a la síntesis de compuestos de reserva como el PHB. Sin embargo, los rendimientos de PHB obtenidos en Glc+ mostraron un alto contenido de PHB, que es 3 veces mayor en comparación con la condición fotoautotrófica. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Monshupanee y Incharoensakdi (2013), como se mencionó anteriormente.

En el caso de la presencia de Ac como fuente de carbono exógena, éste entra más directamente al flujo metabólico celular en comparación a la glucosa, ya que entra en un punto más cercano de la vía de

síntesis de PHB al combinarse con el CoASH libre y formar acetil-CoA. Sin embargo, los niveles de PHB obtenidos con Ac⁺ fueron menores a los obtenidos con Glc⁺. Wu et al. (2002) sugieren que la Glc es más fácilmente permeable a la membrana y asimilada que el Ac, efecto que se ve incrementado en condiciones mixótroficas como sugiere Osanai et al. (2005). El contenido de PHB en la condición de Ac⁺ fue de 5.30 % PHB (w/w), la cual es baja en comparación con otros estudios donde se obtuvieron valores de 7 % PHB (w/w) (Sudesh et al., 2002) y 9.9 % PHB (w/w) (Wu, Shen, & Wu, 2002). Aun así, en este ensayo se tuvo un aumento del 27 % en el contenido de PHB en comparación con la condición fotoautotrófica. Debido a que el Acetil-CoA puede ser dirigido a la síntesis de compuestos como lípidos, tetrapirroles, aminoácidos, así como PHB (B. Panda & Mallick, 2007; Bhabatarini Panda et al., 2006; Wu et al., 2002; Xu et al., 2002). Por ello, se sugiere que en los cultivos Ac⁺ el flujo metabólico se dirigió hacia la síntesis de componentes celulares, como lo refleja el incremento en la tasa de crecimiento.

La combinación de fotomixotrofia y limitación de N tuvo un efecto acumulativo en la acumulación de PHB en el caso de la presencia de Ac. Por separado el N y el Ac tuvieron un incremento en la acumulación de PHB del 36% y 27% respectivamente, mientras que en forma conjunta el incremento fue del 72 %. Esto concuerda con lo observado por Panda et al. (2006) quienes en cultivo mixotrófico con N⁻ donde obtuvieron un incremento del 55 % en comparación con el cultivo N⁻. En el caso de la limitación de N con Glc⁺ no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) en la acumulación de PHB en comparación con sólo la suplementación de Glc, que concuerda con lo observado por Monshupanee y Incharoensakdi (2013). En nuestro ensayo, la diferencia entre los cultivos Glc⁺ y N⁻ fue de 0.69 % PHB (w/w), y en promedio en ambos el incremento en la acumulación de PHB fue del 156 % en comparación con el medio BG-11. Por su parte, en el ensayo de Monshupanee y Incharoensakdi (2013) la diferencia entre ambas condiciones fue de 3 % PHB y en promedio el incremento de PHB en estas condiciones es de 227 % en comparación con el control (BG-11).

Los datos sugieren que el tipo de fuente de carbono utilizada en condición de N⁻ es relevante para la acumulación de PHB. Se sugiere que el ingreso de la Glc y Ac en la vía metabólica es el principal factor en la diferencia de comportamiento de mixotrofia con N⁻, debido a que ambas tienen un efecto positivo de forma individual, como se ha observado en otros estudios como son Lau et al. (2014), Monshupanee y Incharoensakdi (2013), Panda et al. (2006), Panda y Mallick (2007), Sharma et al. (2007), y Xu et al. (2002), entre otros.

La disminución en el contenido de PHB en los días 10,15 y 20 podría ser causada por la menor síntesis de PHB en la célula, y/o su degradación para la síntesis de biomasa, así como otros compuestos de reserva

de carbono como glicógeno y lípidos. Sin embargo, el hecho de que en la condición de N- la acumulación se mantenga más estable a lo largo de los días de muestreo, sugiere un efecto inductor a nivel metabólico y transcripcional en la célula promovido por la limitación de N. En forma similar, el hecho de haber obtenido valores más altos de PHB en la condición de Glc+, sugiere un flujo de carbono activo en el metabolismo celular en comparación a condiciones donde no hay una fuente de carbono exógena.

4.4 Expresión de los genes *pyk1* y *pyk2*

4.4.1 Estandarización de condiciones de qPCR

Los ensayos realizados para la optimización de la reacción de PCR cuantitativo fueron importantes para la obtención de resultados con una alta sensibilidad, especificidad y reproducibilidad. Estos incluyeron gradientes de temperatura, de la concentración de oligonucleótidos, y de la concentración de templado, así como curvas estándar para el cálculo de la eficiencia de amplificación (Nolan, Hands, & Bustin, 2006).

El gradiente de temperatura de alineamiento permitió identificar la mejor temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos para la obtención de un producto específico, así como identificar una temperatura que permitiera amplificar los diferentes genes simultáneamente (Fraga, Meulia, & Fenster, 2008). En nuestro caso correspondió a 60 °C para los tres genes.

La concentración de oligonucleótidos óptima es aquella que da el menor valor de C_q, ya que corresponde a la producción más eficiente del producto. En nuestro caso consistió en la utilización de la mayor concentración de 500 nM. Se realizó un ensayo a 900 nM, pero no se obtuvo diferencia con la concentración de 500 nM. Este valor se encuentra entre el rango de 50 a 900 nM reportado como el típico, como menciona Fraga (2008) y Nolan (2006). Estos autores mencionan que una mayor concentración de oligonucleótidos puede mejorar la detección de un producto, pero también puede llevar a la formación de dímeros de oligonucleótidos; lo cual fue observado en algunas reacciones de los controles negativos.

Por su parte, la concentración del templado es importante por la presencia de inhibidores presentes como residuos tras la preparación de la muestra, siendo generalmente mejor el uso de una menor cantidad

de templado por la dilución de los inhibidores (Fraga et al., 2008). En nuestro caso la mejor eficiencia se obtuvo con una dilución 1:10.

Diversos autores recomiendan determinar la eficiencia de amplificación para cada par de oligonucleótidos, ya que esta es afectada por los sitios de unión de los oligonucleótidos, la secuencia del producto de amplificación y el tamaño del producto de PCR (Fraga et al., 2008). Además, tiene un gran impacto en la exactitud de los cálculos para los resultados de expresión, ya que como se menciona en Pfaffl (2004), pequeñas diferencias en la eficiencia entre los genes blanco y genes de referencia pueden generar proporciones de expresión falsas. Debido a esto se sugiere que la diferencia en la eficiencia de amplificación entre los genes blanco y genes de referencia sea menor a 3 %. Los ensayos realizados en este trabajo mostraron una diferencia en la eficiencia de amplificación de 0.9 % para *pyk1* y *pyk2*; mientras que entre estas y *rnpB* se obtuvo una diferencia máxima de 3.1 %, asegurando de esta manera que las condiciones utilizadas sean adecuadas para realizar los cálculos de expresión requeridos por las guías para ensayos de qPCR (Bustin et al., 2009; Nolan et al., 2006).

Otro aspecto fundamental en un protocolo de qPCR es la estrategia de normalización de datos a través de genes de control interno, denominados genes de referencia. En este trabajo se trabajó únicamente con un gen de referencia, el gen *rnpB*, el cual ha sido validado por Pinto et al. (2012) y es uno de los genes recomendados para *Synechocystis* para regímenes de luz continua y en fotoperiodo. Además, el gen *rnpB* ha sido usado satisfactoriamente en diversos estudios como único gen de referencia (Dong et al., 2015; Osanai et al., 2014; Ren, Shi, Chen, Wang, & Zhang, 2014; Schlebusch & Forchhammer, 2010; Tabei, Okada, & Tsuzuki, 2007).

4.4.2 Expresión de genes *pyk1* y *pyk2*

Existe poca información respecto a los niveles de expresión de los genes *pyk1* y *pyk2* en *Synechocystis*. Entre los trabajos que han realizado estudios de expresión están el de Iijima et al. (2014), quienes observaron un aumento en el número de transcritos de *pyk1*, y una disminución en el de *pyk2* después de 4 h en la condición de N-. Por su parte Osanai et al. (2005) reportan una proporción de expresión de 1.18 para *pyk2* y 0.32 para *pyk1* en una cepa mutante de *Synechocystis* con disrupción del factor *SigE* en condición fotomixotrófica, en comparación con la cepa silvestre, lo cual demuestra la regulación del gen

pyk1 por el factor *SigE*. Además, en esta cepa observaron una reducción del 30 % de la tasa de asimilación de Glc, lo que refleja la importancia del N en el metabolismo del C.

Iijima et al. (2014) y Osanai et al. (2005) concuerdan en el efecto inductor que presentan los genes relacionados al catabolismo de glucosa por los factores *rre37* y *SigE*, ambos activados en condiciones de insuficiencia de N-, en particular del gen *pyk1*. Esto concuerda con lo observado en nuestros datos, ya que en el cultivo N- se obtuvieron los niveles más altos de expresión relativa del gen *pyk1*, siendo estos el doble en comparación con los del gen *pyk2*, que a su vez presentó el nivel más bajo de expresión.

Por su parte Tabei et al. (2007) mencionan la inducción y posible regulación de *pyk1* en condiciones de luz y fotomixotrofia en un tiempo de 180 min por el gen *sll1330*, que codifica a un regulador transcripcional potencial, con un dominio de unión para *NtcA*, el cual como se mencionó anteriormente este es un factor transcripcional clave en la regulación del catabolismo de azúcares.

Con respecto al cambio de condición fotoautotrófica a fotomixotrófica, Dong et al. (2015) observaron una reducción significativa de la transcripción relativa del gen *pyk2* a las 24 h del cambio de condición en una cepa con delección de una proteína periplásmica, así como de otros genes relacionados con la glicólisis, catabolismo de glicógeno, y la vía OPP tras 24 h. Por lo que en condiciones de la cepa silvestre se esperaría que se presente un incremento en los niveles de expresión de las vías antes mencionadas a causa de un mayor flujo a través de ellas, denotado por la presencia de Glc en el medio. En nuestro caso, no se encontraron diferencia en la expresión de *pyk1* en el día 5 en los cultivos Glc+ y Ac+ en comparación con el medio BG-11. Por su parte en el gen *pyk2* tuvo un incremento en el nivel de expresión, en particular en el cultivo N- Glc+.

La comparación entre los estudios de expresión mencionados anteriormente que involucran a los genes *pyk*, se complica debido a la gran diferencia en los tiempos de evaluación de cada estudio, ya que estos se llevan a cabo en cuestión de horas, en contraste con el presente trabajo que se evaluó después de 5 días. Esta pudiera ser la razón de no haber observado diferencias de expresión de los genes *pyk* más evidentes entre los diferentes cultivos, debido a que los mayores cambios de expresión ocurren en las primeras horas después de enfrentar a la célula a las condiciones de estrés. De esta forma la limitación de N provoca la activación y desactivación de diversas vías metabólicas, particularmente las vías de catabolismo de azúcares, para ajustar el metabolismo a las condiciones del ambiente, y mantener un punto de equilibrio en la regulación genética. De tal forma que después de 5 días el efecto observado en la

expresión de los genes *pyk* fue menor. Esto es coherente con el gran grado de plasticidad metabólica que presenta esta cianobacteria.

4.5 Relación entre los genes *pyk1* y *pyk2* y la acumulación de PHB

El piruvato es un componente clave en el metabolismo del carbono, por lo que se esperaba observar un efecto significativo en los niveles de expresión relativa de los genes *pyk1* y *pyk2*, asociado a la mayor acumulación de PHB en los diferentes medios de cultivo. Esto debido a que los reportes en la literatura sugieren que aquellas condiciones que estimulan el metabolismo catabólico de azúcares, como son la limitación de N y suplementación con fuentes de carbono exógena son favorables para la acumulación de PHB. Sin embargo, independientemente de las diferencias significativas en la acumulación de PHB no se determinó una relación clara entre estas variables, ya que el valor de correlación entre los datos fue bajo, en particular para el gen *pyk1*.

En general, ambos genes *pyk* son relevantes para la síntesis de PHB, debido a que tanto *pyk1* como *pyk2* reportan actividad en presencia de glucosa (Tabei et al., 2007). Esto se puede apreciar en los activadores alostéricos que ambos presentan, ya que tanto el F1,6-BP como el AMP son activadores alostéricos de la glicólisis. Se sugiere que debido a la alta regulación de los genes *pyk* por su papel crítico en la distribución del carbono no sea visible el efecto de estos en la formación del PHB, así como por las múltiples formas de regulación tanto genética, como enzimática que se ven involucrados en la regulación de los puntos clave del metabolismo para la supervivencia celular.

En condiciones de N-, se sugiere que el gen *pyk1* tiene un papel fundamental para la síntesis de PHB, al ser inducido directamente por los factores *SigE* y *NtcA*. Esto fue observado en nuestros datos al ser la condición con el mayor nivel de expresión de *pyk1*. Por su parte, en condición de suplementación con Glc, el gen *pyk2* sugiere ser más relevante, por el papel que desempeña en condiciones heterotróficas tanto en condiciones de luz como de oscuridad. Este efecto fue notable en todos los cultivos con presencia de Glc o Ac, y en particular la condición N- Glc+.

La distribución del flujo metabólico es difícilmente estimada a partir de la expresión génica, debido a que el control de este es un proceso complejo que involucra diferentes puntos de control. En este caso, para la síntesis de PHB se han identificado como reguladores metabólicos la concentración de acetyl-CoA

y poder reductor, los cuales se ven incrementados en el metabolismo en condiciones con mayor disponibilidad y utilización de Glc. Sin embargo, a nivel genético el proceso, así como otras proteínas reguladoras y factores transcripcionales involucrados en el proceso de síntesis y formación de los gránulos de PHB no han sido completamente elucidados en cianobacterias.

Nakajima et al. (2014) reportan que hay un drástico cambio en el flujo metabólico central de las células entre una condición fotoheterotrófica y una fotomixotrófica, de forma contrastante con el pequeño cambio acontecido en los niveles de expresión de genes de las vías glicolíticas como *pgi* (glucosa 6-fosfato isomerasa), *zwf* (glucosa 6-fosfato 1-dehidrogenasa), *prk* (fosforibulocinasa), y los genes *rbcl* y *rbcs* (subunidad grande y pequeña de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa), pero una diferencia significativa en las concentraciones de los metabolitos correspondientes y en la distribución del flujo metabólico. Estos autores concluyen que el cambio en el flujo no es causado por los niveles de expresión de los genes correspondientes, sino por una interacción compleja de componentes celulares. Por ello, es posible que el pequeño cambio observado en el nivel de expresión de *pyk1* y *pyk2* sea significativo a nivel metabólico.

De esta manera, se sugiere que la modificación de los genes *pyk* como una estrategia para incrementar la acumulación de PHB en *Synechocystis*, es una opción atractiva. En particular, se considera interesante el efecto que puede tener la sobreexpresión y/o la disrupción de los genes *pyk1* y *pyk2* en el flujo metabólico y la acumulación celular de PHB.

Capítulo 5. Conclusiones

1. Las condiciones de cultivo como el tiempo de iluminación y el tipo de agitación influyeron en la acumulación de PHB, siendo las mejores condiciones el uso de fotoperiodo 14:10 y agitación por flujo de aire.
2. El contenido de PHB en las células mostró una relación inversa con el crecimiento del cultivo, obteniéndose una mayor acumulación en la fase exponencial de crecimiento (d 5).
3. El cambio de una condición fotoautotrófica a fotomixotrófica con glucosa al 0.4 % promovió la acumulación de PHB en *Synechocystis*, obteniéndose hasta un 11.0 % PHB (w/w) en Glc+ N-
4. El crecimiento en medio con limitación de nitrógeno permitió la acumulación de PHB por un mayor tiempo durante el cultivo en comparación con las otras condiciones probadas.
5. La mayor expresión relativa del gen *pyk1* se obtuvo en la condición de limitación de N, mientras que en el gen *pyk2* se obtuvo en la condición en limitación de N con suplemento de Glc.
6. La correlación entre la acumulación de PHB y la expresión de los genes *pyk* fue baja, donde para el gen *pyk1* se sugiere una relación negativa, mientras que para el gen *pyk2* una relación positiva.
7. El uso de los genes *pyk1* y *pyk2* como blanco en ingeniería metabólica es una estrategia potencial para incrementar la acumulación de PHB en *Synechocystis*.

Literatura citada

- Abed, R. M. M., Dobretsov, S., & Sudesh, K. (2009). Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 1–12. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03918.x>
- Adebiyi, A. O., Jazmin, L. J., & Young, J. D. (2014). 13C flux analysis of cyanobacterial metabolism. *Photosynthesis Research*, 126(1), 19–32. <http://doi.org/10.1007/s11120-014-0045-1>
- Albuquerque, M. G. E., Martino, V., Pollet, E., Avérous, L., & Reis, M. A. M. (2011). Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: Effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties. *Journal of Biotechnology*, 151(1), 66–76. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.10.070>
- Albuquerque, P. B. S., & Malafaia, C. B. (2017). Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.026>
- Angermayr, S. A., Gorchs Rovira, A., & Hellingwerf, K. J. (2015). Metabolic engineering of cyanobacteria for the synthesis of commodity products. *Trends in Biotechnology*, 33(6), 352–361. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.03.009>
- Angermayr, S. A., van der Woude, A. D., Correddu, D., Vreugdenhil, A., Verrone, V., & Hellingwerf, K. J. (2014). Exploring metabolic engineering design principles for the photosynthetic production of lactic acid by *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 99. <http://doi.org/10.1186/1754-6834-7-99>
- Ansari, S., & Fatma, T. (2016). Cyanobacterial Polyhydroxybutyrate (PHB): Screening , Optimization and Characterization, 11(6), 1–20. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168>
- Arredondo-Vega, B. O., & Voltolina, D. (2007). Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico. In *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal* (pp. 22–26).
- Asada, Y., Miyake, M., Miyake, J., Kurane, R., & Tokiwa, Y. (1999). Photosynthetic accumulation of poly-(hydroxybutyrate) by cyanobacteria - The metabolism and potential for CO₂ recycling. *International Journal of Biological Macromolecules*, 25(1–3), 37–42. [http://doi.org/10.1016/S0141-8130\(99\)00013-6](http://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00013-6)
- Balaji, S., Gopi, K., & Muthuvelan, B. (2013). A review on production of polyhydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics. *Algal Research*, 2(3), 278–285. <http://doi.org/10.1016/j.algal.2013.03.002>
- Bornscheuer, U. T. (2016). Feeding on plastic. *Science*, 351(6278), 1154–1155.
- Branco, F. (2014). *Synechocystis* : not just a plug-bug for CO₂ , but a green e. COLI. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 4, 1–6. <http://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00036>
- Burnap, R. L. (2015). Systems and photosystems : cellular limits of autotrophic productivity in cyanobacteria. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3(1), 1–13. <http://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00001>

- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., ... Shipley, G. L. (2009). The MIQE Guidelines : Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments, *Clinical chemistry*, 55(4), 611-622. <http://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Cameron, J. C., Wilson, S. C., Bernstein, S. L., & Kerfeld, C. A. (2013). Biogenesis of a Bacterial Organelle : The Carboxysome Assembly Pathway. *Cell*, 155(5), 1131–1140. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.044>
- Chen, X., Schreiber, K., Appel, J., Makowka, A., Fähnrich, B., & Roettger, M. (2016). The Entner – Doudoroff pathway is an overlooked glycolytic route in cyanobacteria and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(19), 5441–5446. <http://doi.org/10.1073/pnas.1521916113>
- Chomczynski, P. (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Extraction. *Analytical biochemistry*, 162(1), 159, 156–159.
- Dong, L., Li, Q., Wu, D., Sun, Y., Zhou, M., & Zhao, K. (2015). A novel periplasmic protein (Slr0280) tunes photomixotrophic growth of the cyanobacterium , *Synechocystis* sp . PCC 6803. *Gene*, 575(2), 313-320. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2015.09.015>
- Eberly, J. O., & Ely, R. L. (2012). Photosynthetic accumulation of carbon storage compounds under CO₂ enrichment by the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(6), 843–850. <http://doi.org/10.1007/s10295-012-1092-2>
- Elain, A., Le Grand, A., Corre, Y. M., Le Fellic, M., Hachet, N., Le Tilly, V., ... Bruzaud, S. (2016). Valorisation of local agro-industrial processing waters as growth media for polyhydroxyalkanoates (PHA) production. *Industrial Crops and Products*, 80, 1–5. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.052>
- Emadian, S. M., Onay, T. T., & Demirel, B. (2017). Biodegradation of bioplastics in natural environments. *Waste Management*, 59, 526–536. <http://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.10.006>
- Fraga, D., Meulia, T., & Fenster, S. (2008). Real-Time PCR. In *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 10-3. <http://doi.org/10.1002/9780470089941.et1003s08>
- Gigova, L. G., & Ivanova, N. J. (2015). Microalgae respond differently to nitrogen availability during culturing. *Journal of Biosciences*, 40(2), 365–374. <http://doi.org/10.1007/s12038-015-9510-z>
- Griese, M., Lange, C., & Soppa, J. (2011). Ploidy in cyanobacteria. *FEMS microbiology letters*, 323(2), 124-131. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02368.x>
- Hauf, W., Watzer, B., Roos, N., Klotz, A., & Forchhammer, K. (2015). Photoautotrophic Polyhydroxybutyrate Granule Formation Is Regulated by Cyanobacterial Phasin PhaP in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(13), 4411–4422. <http://doi.org/10.1128/AEM.00604-15>
- Hihara, Y., Kamei, A., Kanehisa, M., Kaplan, A., & Ikeuchi, M. (2001). DNA Microarray Analysis of Cyanobacterial Gene Expression during Acclimation to High Light. *The Plant Cell*, 13(4), 793-806. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.13.4.793>

- Hondo, S., Takahashi, M., Osanai, T., Matsuda, M., Hasunuma, T., Tazuke, A., ... Asayama, M. (2015). Genetic engineering and metabolite profiling for overproduction of polyhydroxybutyrate in cyanobacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120(5), 510–517. <http://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.03.004>
- Iijima, H., Watanabe, A., Takanobu, J., Hirai, M. Y., & Osanai, T. (2014). rre37 Overexpression Alters Gene Expression Related to the Tricarboxylic Acid Cycle and Pyruvate Metabolism in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *The Scientific World Journal*, 1–10. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/921976>
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., & Asamizu, E. (1996). Sequence Analysis of the Genome of the Unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. II. Sequence Determination of the Entire Genome and Assignment of Potential Protein-coding Regions, *DNA research*, 3(3), 109–136.
- Kanno, M., Carroll, A. L., & Atsumi, S. (2017). Global metabolic rewiring for improved CO₂ fixation and chemical production in cyanobacteria. *Nature Communications*, 8, 1–11. <http://doi.org/10.1038/ncomms14724>
- Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40(2), 607–619. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.053>
- Khetkorn, W., Incharoensakdi, A., Lindblad, P., & Jantaro, S. (2016). Enhancement of poly-3-hydroxybutyrate production in *Synechocystis* sp. PCC 6803 by overexpression of its native biosynthetic genes. *Bioresource Technology*, 214, 761–768. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.014>
- Knoop, H., & Steuer, R. (2015). A computational analysis of stoichiometric constraints and trade-offs in cyanobacterial biofuel production. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3, 47. <http://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00047>
- Knowles, V. L., & Plaxton, W. C. (2003). From Genome to Enzyme : Analysis of Key Glycolytic and Oxidative Pentose- Phosphate Pathway Enzymes in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant and Cell Physiology*, 44(7), 758–763.
- Knowles, V. L., Smith, C. S., Smith, C. R., & Plaxton, W. C. (2001). Structural and Regulatory Properties of Pyruvate Kinase from the Cyanobacterium *Synechococcus* PCC 6301. *Journal of Biological Chemistry*, 276(24), 20966–20972. <http://doi.org/10.1074/jbc.M008878200>
- Krzemińska, I., Pawlik-Skowrońska, B., Trzcińska, M., & Tys, J. (2014). Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(4), 735–741. <http://doi.org/10.1007/s00449-013-1044-x>
- Kucho, K., Okamoto, K., Tsuchiya, Y., Nomura, S., Nango, M., Kanehisa, M., ... Pcc, S. (2005). Global Analysis of Circadian Expression in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Global Analysis of Circadian Expression in the Cyanobacterium. *Journal of Bacteriology*, 187(6), 2190–2199. <http://doi.org/10.1128/JB.187.6.2190>
- Lai, M., & Lan, E. (2015). Advances in Metabolic Engineering of Cyanobacteria for Photosynthetic Biochemical Production. *Metabolites*, 5(4), 636–658. <http://doi.org/10.3390/metabo5040636>

- Lau, N. S., Foong, C. P., Kurihara, Y., Sudesh, K., & Matsui, M. (2014). RNA-Seq Analysis provides insights for understanding photoautotrophic polyhydroxyalkanoate production in recombinant *Synechocystis* sp. *PLoS ONE*, *9*(1), 1–11. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0086368>
- Luengo, J. M., García, B., Sandoval, A., Naharro, G., & Olivera, E. R. (2003). Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*, *6*(3), 251–260. [http://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00040-7](http://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00040-7)
- Madison, L. L., & Huisman, G. W. (1999). Metabolic Engineering of Poly (3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *63*(1), 21–53. <http://doi.org/10.1093/mmb/63.1.21>
- Masek, T., Vopalensky, V., Suchomelova, P., & Pospisek, M. (2005). Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. *Analytical biochemistry*, *336*(1), 46–50. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2004.09.010>
- Monshupanee, T., & Incharoensakdi, A. (2013). Enhanced accumulation of glycogen , lipids and polyhydroxybutyrate under optimal nutrients and light intensities in the cyanobacterium *Synechocystis* sp . PCC. *Journal of Applied Microbiology*, *116*(4), 830–838. <http://doi.org/10.1111/jam.12409>
- Monshupanee, T., Nimdach, P., & Incharoensakdi, A. (2016). Two-stage (photoautotrophy and heterotrophy) cultivation enables efficient production of bioplastic poly-3-hydroxybutyrate in auto-sedimenting cyanobacterium. *Nature Publishing Group, Scientific reports*, *6*, 3712. <http://doi.org/10.1038/srep37121>
- Mozejko-Ciesielska, J., & Kiewisz, R. (2016). Bacterial polyhydroxyalkanoates : Still fabulous ? *Microbiological Research*, *192*, 271–282. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2016.07.010>
- Muñoz, M. E., & Ponce, E. (2003). Pyruvate kinase: current status of regulatory and functional properties. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, *135* (2), 197–218. <http://doi.org/10.1016/S1096-4959>
- Nakajima, T., Kajihata, S., Yoshikawa, K., Matsuda, F., Furusawa, C., Hirasawa, T., & Shimizu, H. (2014). Integrated metabolic flux and omics analysis of *Synechocystis* sp. PCC 6803 under mixotrophic and photoheterotrophic conditions. *Plant and Cell Physiology*, *55*(9), 1606–1612. <http://doi.org/10.1093/pcp/pcu091>
- Nakaya, Y., Iijima, H., Takanobu, J., Watanabe, A., Hirai, M. Y., & Osanai, T. (2015). One day of nitrogen starvation reveals the effect of sigE and rre37 overexpression on the expression of genes related to carbon and nitrogen metabolism in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *120*(2), 128–134. <http://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.12.020>
- Nolan, T., Hands, R. E., & Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, *1*(3), 1559–1582. <http://doi.org/10.1038/nprot.2006.236>
- Noor, E., Eden, E., Milo, R., & Alon, U. (2010). Central Carbon Metabolism as a Minimal Biochemical Walk between Precursors for Biomass and Energy. *Molecular Cell*, *39*(5), 809–820. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.031>
- North, E. J., & Halden, R. U. (2014). Plastics and Environmental Health : The Road Ahead. *Reviews on environmental health*, *28*(1), 1–8. <http://doi.org/10.1515/reveh-2012-0030>.Plastics

- Oliver, J. W. K., & Atsumi, S. (2014). Metabolic design for cyanobacterial chemical synthesis. *Photosynthesis Research*, 120(3), 249–261. <http://doi.org/10.1007/s11120-014-9997-4>
- Osanai, T., Azuma, M., & Tanaka, K. (2007). Sugar catabolism regulated by light- and nitrogen-status in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 6(5), 508–514. <http://doi.org/10.1039/b616219n>
- Osanai, T., Iijima, H., & Hirai, M. Y. (2016). Understanding Sugar Catabolism in Unicellular Cyanobacteria Toward the Application in Biofuel and Biomaterial Production. *Lipids in Plant and Algae Development*, 86, 511–523. <http://doi.org/10.1007/978-3-319-25979-6>
- Osanai, T., Imamura, S., Asayama, M., Shirai, M., Suzuki, I., Murata, N., & Tanaka, K. (2006). Nitrogen induction of sugar catabolic gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Research*, 13(5), 185–195. <http://doi.org/10.1093/dnares/dsl010>
- Osanai, T., Kanesaki, Y., Nakano, T., Takahashi, H., Asayama, M., Shirai, M., ... Tanaka, K. (2005). Positive regulation of sugar catabolic pathways in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 by the group 2 ?? factor SigE. *Journal of Biological Chemistry*, 280(35), 30653–30659. <http://doi.org/10.1074/jbc.M505043200>
- Osanai, T., Numata, K., Oikawa, A., Kuwahara, A., Iijima, H., Doi, Y., ... Hirai, M. Y. (2013). Increased bioplastic production with an RNA polymerase sigma factor SigE during nitrogen starvation in *synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Research*, 20(6), 525–535. <http://doi.org/10.1093/dnares/dst028>
- Osanai, T., Oikawa, A., Numata, K., Kuwahara, A., Iijima, H., Doi, Y., ... Hirai, M. Y. (2014). Pathway-level acceleration of glycogen catabolism by a response regulator in the cyanobacterium *Synechocystis* species PCC 6803. *Plant Physiology*, 164(4), 1831–41. <http://doi.org/10.1104/pp.113.232025>
- Panda, B., Jain, P., Sharma, L., & Mallick, N. (2006). Optimization of cultural and nutritional conditions for accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Bioresource Technology*, 97(11), 1296–1301. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.05.013>
- Panda, B., & Mallick, N. (2007). Enhanced poly-??-hydroxybutyrate accumulation in a unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Letters in Applied Microbiology*, 44(2), 194–198. <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02048.x>
- Pfaffl, M. W. (2004). Relative quantification. *Real-Time PCR*, 63–82.
- Pinto, F., Pacheco, C. C., Ferreira, D., Moradas-ferreira, P., & Tamagnini, P. (2012). Selection of Suitable Reference Genes for RT-qPCR Analyses in Cyanobacteria, *PLoS One*, 7(4), e34983. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0034983>
- PlasticsEurope. (2016). *Plastics – the Facts 2016*. <http://www.plasticseurope.es/Document/plastics---the-facts-2016-15787.aspx?Page=DOCUMENT&FolID=2>
- Pötter, M., & Steinbüchel, A. (2005). Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: Impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation. *Biomacromolecules*, 6(2), 552–560. <http://doi.org/10.1021/bm049401n>

- Rehm, B. H. a. (2003). Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *The Biochemical Journal*, *376* (1), 15–33. <http://doi.org/10.1042/BJ20031254>
- Rehm, B. H. a. (2010). Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(8), 578–592. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2354>
- Rehm, B. H. A. (2006). Biogenesis of Microbial Polyhydroxyalkanoate Granules : a Platform Technology for the Production of Tailor-made Bioparticles. *Current issues in molecular biology*, *9*(1), 41–62.
- Ren, Q., Shi, M., Chen, L., Wang, J., & Zhang, W. (2014). Integrated proteomic and metabolomic characterization of a novel two-component response regulator Slr1909 involved in acid tolerance in *Synechocystis* sp . PCC 6803. *Journal of Proteomics*, *109*, 76–89. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.06.021>
- Ruffing, A. M. (2011). Engineered cyanobacteria: Teaching an old bug new tricks. *Bioengineered Bugs*, *2*(3), 136-149. <http://doi.org/10.4161/bbug.2.3.15285>
- Ruffing, A. M. (2016). Cyanobacteria : the Green E . coli. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, *4*., 3389–3390. <http://doi.org/10.1038/srep08132>
- Schlebusch, M., & Forchhammer, K. (2010). Requirement of the nitrogen starvation-induced protein s110783 for polyhydroxybutyrate accumulation in *synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(18), 6101–6107. <http://doi.org/10.1128/AEM.00484-10>
- Schuurmans, R. M., Matthijs, J. C. P., & Hellingwerf, K. J. (2017). Transition from exponential to linear photoautotrophic growth changes the physiology of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynthesis Research*, *132*(1), 69–82. <http://doi.org/10.1007/s11120-016-0329-8>
- Sharma, L., Kumar Singh, A., Panda, B., & Mallick, N. (2007). Process optimization for poly- β -hydroxybutyrate production in a nitrogen fixing cyanobacterium, *Nostoc muscorum* using response surface methodology. *Bioresource Technology*, *98*(5), 987–993. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.04.016>
- Sharma, L., & Mallick, N. (2005). Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Nostoc muscorum*: Regulation by pH, light-dark cycles, N and P status and carbon sources. *Bioresource Technology*, *96*(11), 1304–1310. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.10.009>
- Sharma, N. K., Rai, A. K., & Stal, L. J. (2014). *Cyanobacteria an economic perspective*. John Wiley & Sons, Ltd Registered.
- Shiraiwa, Y., Goyal, A., & Tolber, N. E. (1993). Alkalization of the Medium by Unicellular Green Algae during Uptake Dissolved Inorganic Carbon. *Plant and Cell Physiology*, *34*(2), 649–657. <http://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078467>
- Shrivastav, A., Kim, H., & Kim, Y. (2013). Advances in the Applications of Polyhydroxyalkanoate Nanoparticles for Novel Drug Delivery System. *BioMed research international*, 2013.
- Singh, S. P., & Singh, P. (2014). Effect of CO₂ concentration on algal growth : A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *38*, 172–179. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2014.05.043>

- Singh, S. P., & Singh, P. (2015). Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50, 431–444. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.024>
- Steinhauser, D., Fernie, A. R., & Arau, W. L. (2012). Unusual cyanobacterial TCA cycles : not broken just different. *Trends in Plant Science*, 17(9), 503–509. <http://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.05.005>
- Stubbe, J., Tian, J., He, A., Sinskey, A. J., Lawrence, A. G., & Liu, P. (2005). Nontemplate -dependent polymerization processes : Polyhydroxyalkanoate Synthases as a. *Annu. Rev. Biochem.*, 3. <http://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133013>
- Sudesh, K., & Iwata, T. (2008). Sustainability of biobased and biodegradable plastics. *Clean - Soil, Air, Water*, 36(5–6), 433–442. <http://doi.org/10.1002/clen.200700183>
- Sudesh, K., Taguchi, K., & Doi, Y. (2002). Effect of increased PHA synthase activity on polyhydroxyalkanoates biosynthesis in *Synechocystis* sp. PCC6803. *International Journal of Biological Macromolecules*, 30(2), 97–104. [http://doi.org/10.1016/S0141-8130\(02\)00010-7](http://doi.org/10.1016/S0141-8130(02)00010-7)
- Summerfield, T. C., & Sherman, L. A. (2008). Global Transcriptional Response of the Alkali-Tolerant Cyanobacterium *Synechocystis* sp . Strain PCC 6803 to a pH 10 Environment. *Applied and environmental microbiology*, 74(17), 5276–5284. <http://doi.org/10.1128/AEM.00883-08>
- Suzuki, T., Miyake, M., Tokiwa, Y., Saegusa, Harusaito, T., & Asada, Y. (1996). A recombinant cyanobacterium that accumulates poly-(hydroxybutyrate) Taro. *Biotechnology Letters*, 18(9), 1047–1050.
- Tabei, Y., Okada, K., & Tsuzuki, M. (2007). Sll1330 controls the expression of glycolytic genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 355(4), 1045–1050. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.02.065>
- Takahashi, H., Miyake, M., Tokiwa, Y., & Asada, Y. (1998). Improved accumulation of poly- 3-hydroxybutyrate by a recombinant cyanobacterium. *Biotechnology letters*, 20(2), 183–186.
- Takahashi, H., Uchimiya, H., & Hihara, Y. (2008). Difference in metabolite levels between photoautotrophic and photomixotrophic cultures of *Synechocystis* sp . PCC 6803 examined by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Experimental Botany*, 59(11), 3009–3018. <http://doi.org/10.1093/jxb/ern157>
- Touloupakis, E., Cicchi, B., Margarita, A., Benavides, S., & Torzillo, G. (2016). Effect of high pH on growth of *Synechocystis* sp . PCC 6803 cultures and their contamination by golden algae (*Poterioochromonas* sp .). *Applied microbiology and biotechnology*, 100 (3), 1333–1341. <http://doi.org/10.1007/s00253-015-7024-0>
- Tyo, K. E. J., Espinoza, F. A., & Stephanopoulos, G. (2009). Identification of Gene Disruptions for Increased Poly-3-hydroxybutyrate Accumulation in *Synechocystis* PCC 6803. *Biotechnology Progress*, 25(5), 1236–1243. <http://doi.org/10.1002/btpr.228>
- Valle, F., Mufioz, E., Ponce, E., Flores, N., & Bolivar, F. (1996). Basic and Applied Aspects of metabolic diversity: the phosphoenolpyruvate node. *Journal of Industrial Microbiology*, 17, 458–462. <http://doi.org/10.1007/BF01574776>

- Vermaas, W. (1996). Molecular genetics of the cyanobacterium *Synechocystis* sp . PCC 6803 : Principles and possible biotechnology applications. *Journal of Applied Phycology*, 8(4), 263–273.
- Wang, B., Pugh, S., Nielsen, D. R., Zhang, W., & Meldrum, D. R. (2013). Engineering cyanobacteria for photosynthetic production of 3-hydroxybutyrate directly from CO₂. *Metabolic Engineering*, 16(1), 68–77. <http://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.01.001>
- Williams, J. G. K. (1988). [85] Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. *Methods in Enzymology*, 167(C), 766–778. [http://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)67088-1](http://doi.org/10.1016/0076-6879(88)67088-1)
- Wu, G. F., Shen, Z. Y., & Wu, Q. Y. (2002). Modification of carbon partitioning to enhance PHB production in *Synechocystis* sp. PCC6803. *Enzyme and microbial technology*, 30(6), 710–715.
- Xu, J., Wang, K., Wang, C., Hu, F., Zhang, Z., Xu, S., & Wu, J. (2002). Sodium Acetate Stimulates PHB Biosynthesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Tsinghua Science and Technology*, 20(20), 435–438. [http://doi.org/10.1016/S1007-0214\(08\)70020-8](http://doi.org/10.1016/S1007-0214(08)70020-8)
- You, L., Berla, B., He, L., Pakrasi, H. B., & Tang, Y. J. (2014). 13C-MA delineates the photomixotrophic metabolism of *Synechocystis* sp . PCC 6803 under light- and carbon-sufficient conditions. *Biotechnology Journal*, 9, 684–692. <http://doi.org/10.1002/biot.201300477>
- Yu, Y., You, L., Liu, D., Hollinshead, W., Tang, Y. J., & Zhang, F. (2013). Development of *synechocystis* sp. PCC 6803 as a phototrophic cell factory. *Marine Drugs*, 11(8), 2894–2916. <http://doi.org/10.3390/md11082894>
- Zhang, S., & Bryant, D. A. (2011). The Tricarboxylic Acid Cycle in Cyanobacteria. *Science*, 334, 1551–1554.
- Zhang, S., Qian, X., Chang, S., Dismukes, G. C., Bryant, D. A., Berg, I., ... Bryant, D. A. (2016). Natural and Synthetic Variants of the Tricarboxylic Acid Cycle in Cyanobacteria : Introduction of the GABA Shunt into *Synechococcus* sp . PCC 7002. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–13. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01972>
- Zilliges, Y., Lehmann, R., Hoffmann, S., Knoop, H., Gru, M., Lockau, W., & Steuer, R. (2013). Flux Balance Analysis of Cyanobacterial Metabolism : The Metabolic Network of *Synechocystis* sp . PCC 6803, *PLoS computational biology*, 9(6), e1003081. <http://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003081>

Anexos

1. Datos de crecimiento y peso seco para ensayo de efecto de la agitación y luz en la acumulación de PHB

Tabla 6. Valores de μ y td para *Synechocystis* en diferentes condiciones de iluminación y agitación.

Día	LO		LE		FE		LA		FA	
	μ	td								
3	0.321	0.94	0.353	0.85	0.409	0.74	0.350	0.86	0.701	0.43
5	0.283	1.07	0.308	0.98	0.328	0.92	0.314	0.96	0.536	0.56
7	0.274	1.10	0.283	1.06	0.294	1.02	0.259	1.16	0.457	0.66
9	0.243	1.24	0.247	1.22	0.254	1.18	0.273	1.10	0.368	0.82
12	0.205	1.47	0.213	1.42	0.215	1.40	0.242	1.24	0.285	1.06
14	0.197	1.53	0.204	1.47	0.204	1.47	0.251	1.20	0.260	1.16
16	0.181	1.66	0.188	1.60	0.188	1.60	0.232	1.30	0.241	1.25
20	0.160	1.88	0.168	1.79	0.170	1.77	0.203	1.48	0.193	1.56
22	0.154	1.96	0.171	1.76	0.169	1.78	0.199	1.51	0.189	1.59

Tabla 7. Valores de peso seco y PHB de *Synechocystis* en diferentes condiciones de luz y agitación.

Cultivo	M	Día 9				Día 16			
		TWD (mg)	ADW (mg)	ODW (mg)	[PHB] $\mu\text{g/ml}$	TWD (mg)	ADW (mg)	ODW (mg)	[PHB] $\mu\text{g/ml}$
LO	1	1.8	0.1	1.7	17.06	3.7	0.5	3.1	32.14
	2	2.2	0.3	1.9	24.18	3.8	0.1	3.6	20.07
	3	2.4	0.6	1.8	20.29	3.1	0.5	2.2	27.70
LE	1	1.8	0.7	1.1	12.99	4.3	0.7	3.1	22.79
	2	1.2	0.1	1.1	7.49	3.8	0.3	3	24.30
	3	1.7	0.4	1.3	7.75	4.1	0.4	3.5	18.74
FE	1	1.3	0.2	1.1	15.07	3.8	0.5	3.2	26.89
	2	1.3	0.1	1.2	31.91	3.7	0.9	2.7	22.72
	3	1.6	0.4	1.2	34.72	4.6	0.7	3.7	32.12
LA	1	1.3	0.1	1.2	13.92	8.8	0.6	8	74.67
	2	1.4	0.2	1.2	29.27	9.2	0.8	8.2	66.74
	3	1.6	0.5	1.1	42.93	11.4	2.0	9.3	93.59
FA	1	1.5	0.2	1.3	23.96	15.1	1.7	13.2	56.57
	2	1.9	0.6	1.3	26.22	6.1	0.7	5.3	55.98
	3	2.5	0.3	2.2	42.14	10.2	0.6	9.3	68.78

2. Curva estándar de PHB

Tabla 8. . Valores para la curva estándar de PHB.

[] $\mu\text{g/ml}$	$\text{OD}_{235\text{nm}}$
0.5	0.1216
1	0.2061
1.5	0.2876
2	0.3787
2.5	0.4469
3	0.5671
3.5	0.6311
4	0.7406
4.5	0.8381
5	0.9247

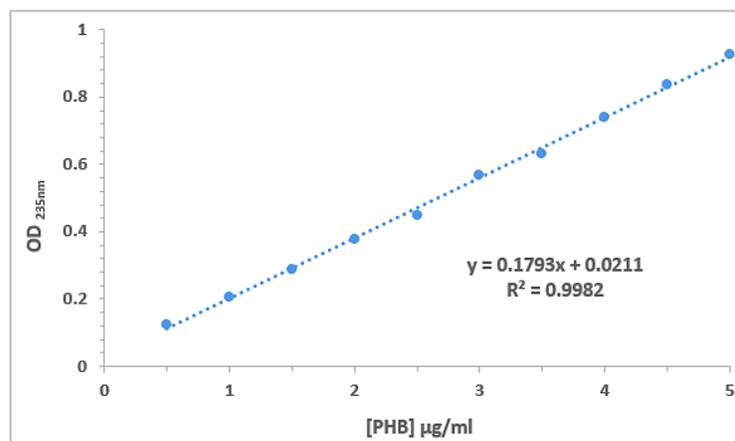


Figura 25. Curva estándar de PHB

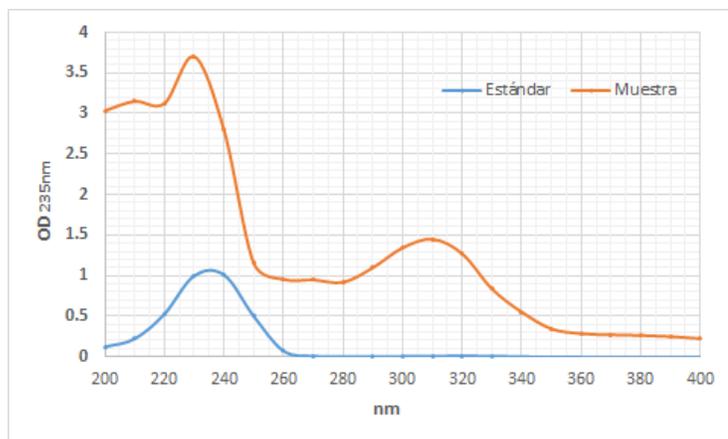


Figura 26. Espectro de absorción de PHB en estándar y muestra

3. Datos de crecimiento y peso seco de ensayo de acumulación de PHB en relación con el crecimiento en *Synechocystis*

Tabla 9. Valores de μ y td para cultivo de *Synechocystis*

Día	μ	td
2	0.6265	0.4805
4	0.0727	4.1429
6	0.0646	4.6622
8	0.0202	14.9218
10	0.0184	16.3510
12	0.0215	14.0006
14	0.0098	30.6498
16	0.0091	32.9624
18	0.0143	20.9944
20	0.0134	22.4996

Tabla 10. Valores de peso seco y PHB en cultivo de *Synechocystis*.

Día	TDW (mg)	ADW (mg)	ODW (mg)	[PHB] $\mu\text{g/ml}$
5	1.133	0.367	0.767	17.02
	1.133	0.400	0.733	17.717
	1.400	0.700	0.700	18.504
10	1.933	0.500	1.433	30.751
	2.000	0.567	1.433	29.831
	2.133	0.533	1.600	31.705
15	4.533	0.567	3.967	16.256
	4.300	0.567	3.733	16.368
	4.433	0.800	3.633	17.282
20	8.200	0.433	7.767	13.205
	8.700	0.633	8.067	13.027
	8.400	0.600	7.800	16.803

4. Datos de peso seco y PHB de ensayo de efecto de fuentes de carbono y limitación de N₂

Tabla 11. Valores de μ de cultivos en fotomixotrofia y/o limitación de N

μ							
Día	BG-11	N-	Ac+	Glc+	N- Ac+	N- Glc+	N- Ac+ Glc+
2	0.032	0.048	0.056	0.198	0.103	0.136	0.183
4	0.041	0.041	0.068	0.102	0.068	0.052	0.067
6	0.044	0.035	0.044	0.056	0.050	0.042	0.031
8	0.055	0.044	0.057	0.041	0.051	0.029	0.026
10	0.057	0.045	0.065	0.042	0.058	0.023	0.022
12	0.055	0.032	0.069		0.046	0.024	0.009
14	0.054	0.039	0.070		0.034	0.026	0.013
16	0.059	0.039	0.067		0.028	0.020	0.014
18	0.060	0.036	0.063		0.027	0.015	0.012
20	0.060	0.034	0.061		0.021	0.014	0.008

Tabla 12. Valores de td de cultivos en fotomixotrofia y/o limitación de N

TD							
Día	BG-11	N-	Ac+	Glc+	N- Ac+	N- Glc+	N- Ac+ Glc+
2	9.47	6.31	5.36	1.52	2.92	2.21	1.65
4	7.38	7.34	4.45	2.96	4.41	5.81	4.53
6	6.80	8.58	6.88	5.38	6.03	7.16	9.59
8	5.44	6.86	5.30	7.26	5.90	10.45	11.50
10	5.26	6.75	4.63	7.17	5.23	13.01	13.39
12	5.50	9.37	4.36		6.56	12.49	35.30
14	5.53	7.79	4.32		8.79	11.58	24.07
16	5.10	7.76	4.51		10.72	15.10	21.18
18	5.04	8.32	4.76		11.17	20.63	24.36
20	5.02	8.97	4.92		14.03	22.16	35.48

Tabla 13. Peso seco de *Synechocystis* en diferentes medios de cultivo.

Trat	No. Filtro	D5			D10			D15			D20		
		TDW	ADW	ODW	TDW	ADW	ODW	TDW	ADW	ODW	TDW	ADW	ODW
BG11	1	4.97	0.55	4.42	6.01	0.40	5.61	7.10	0.79	6.31	11.01	1.04	6.31
	2	4.95	0.59	4.36	2.76	2.40	5.16	7.16	0.56	6.60	11.07	1.10	6.60
	3	5.05	0.63	4.42	5.94	0.61	5.33	7.28	0.71	6.58	10.40	1.07	6.58
N-	4	4.40	0.66	3.74	4.85	0.77	4.08	5.87	0.39	5.48	6.10	0.51	5.48
	5	3.67	0.47	3.20	4.60	0.75	3.85	5.23	0.44	4.79	6.04	0.43	4.79
	6	4.01	0.37	3.64	5.07	0.75	4.32	5.57	0.34	5.24	6.57	0.44	5.24
	7	4.64	0.44	4.20	8.07	0.93	7.14	9.98	0.99	8.99	11.73	0.38	8.99
	8	4.70	0.60	4.10	7.44	0.75	6.69	9.16	0.80	8.36	10.98	-0.60	8.36
	9	4.95	0.66	4.29	7.22	0.69	6.53	9.75	1.01	8.74	13.83	0.39	8.74
Glc+	10	3.81	0.62	3.19	4.50	0.50	4.00						
	11	4.16	0.56	3.61	4.28	0.24	4.04						
	12	3.72	0.54	3.18	4.05	0.36	3.69						
N- Ac+	13	4.63	0.49	4.14	5.66	0.30	5.36	6.83	0.74	6.09	6.90	0.87	6.09
	14	4.16	0.41	3.75	5.89	0.39	5.50	6.06	0.71	5.35	5.33	0.78	5.35
	15	5.25	0.48	4.76	6.04	1.28	4.76	6.37	0.85	5.52	7.41	0.75	5.52
N- Glc+	16	2.57	0.54	2.02	4.03	0.40	3.63	3.62	0.46	3.16	3.75	0.58	3.16
	17	2.86	0.57	2.29	5.81	0.44	5.37	3.15	0.36	2.79	3.66	0.60	2.79
	18	2.89	0.41	2.47	5.44	0.47	4.97	3.59	0.40	3.20	3.99	0.49	3.20
N- Ac+ Glc+	19	3.86	0.53	3.33	4.16	0.41	3.75	3.34	0.38	2.96	2.73	0.53	2.96
	20	3.38	0.57	2.81	3.93	0.44	3.49	2.74	0.48	2.26	3.08	0.66	2.26
	21	3.65	0.64	3.01	3.68	0.36	3.32	2.79	0.34	2.45	3.35	0.62	2.45

Tabla 14. Valores de PHB para *Synechocystis* en diferentes medios de cultivo.

Trat	No. Filtro	D5			D10			D15			D20		
		OD ₅₅₅	[PHB] µg/ml	% PHB	OD ₅₅₅	[PHB] µg/ml	% PHB	OD ₅₅₅	[PHB] µg/ml	% PHB	OD ₅₅₅	[PHB] µg/ml	% PHB
BG11	1	0.35	183.55	4.16	0.46	245.60	4.38	0.15	75.68	1.20	0.19	95.94	0.96
	2	0.35	185.98	4.26	0.49	260.11	5.04	0.15	76.73	1.16	0.20	100.61	1.01
	3	0.34	181.61	4.10	0.46	246.32	4.62	0.15	75.01	1.14	0.20	104.38	1.12
N-	4	0.38	203.77	5.45	0.52	276.90	6.79	0.72	390.75	7.14	0.25	128.42	2.30
	5	0.37	195.18	6.10	0.49	260.94	6.78	0.74	398.67	8.31	0.27	139.61	2.49
	6	0.38	201.16	5.53	0.51	271.14	6.28	0.72	388.14	7.41	0.23	120.89	1.97
Ac +	7	0.42	223.60	5.32	0.51	276.29	3.87	0.86	467.98	5.21	0.39	208.37	1.84
	8	0.42	222.27	5.42	0.50	265.71	3.97	0.84	458.23	5.48	0.35	185.21	1.60
	9	0.42	221.33	5.16	0.48	258.56	3.96	0.78	423.55	4.85	0.31	164.71	1.23
Glc +	10	0.64	343.38	10.76	0.42	224.27	5.61						
	11	0.64	346.15	9.59	0.40	213.74	5.29						
	12	0.63	339.45	10.67	0.38	203.27	5.51						
N- Ac+	13	0.56	302.83	7.31	0.32	168.20	3.14	0.35	185.82	3.05	0.45	240.17	3.98
	14	0.55	296.01	7.88	0.34	180.22	3.28	0.33	174.68	3.27	0.46	245.26	5.40
	15	0.56	302.11	6.35	0.35	184.21	3.87	0.32	171.25	3.10	0.49	264.49	3.97
N- Glc+	16	0.46	248.14	12.28	0.30	156.01	4.30	0.46	248.59	7.87	0.27	138.39	4.36
	17	0.46	245.43	10.72	0.26	133.46	2.49	0.45	241.61	8.64	0.24	124.76	4.09
	18	0.46	248.14	10.05	0.24	125.87	2.53	0.44	232.47	7.28	0.27	140.94	4.03
N- Ac+ Glc+	19	0.24	248.14	7.45	0.22	112.47	3.00	0.42	221.94	7.50	0.25	128.92	5.86
	20	0.24	245.43	8.73	0.18	91.19	2.61	0.40	213.74	9.46	0.23	116.23	4.81
	21	0.24	248.14	8.24	0.21	105.98	3.19	0.37	198.01	8.08	0.23	117.51	4.30

5. Datos de extracción de RNA

Tabla 15. Valores de extracción de RNA día 0

<i>Cultivo</i>	Muestra	[] ng/μl	260/280	206/230
<i>BG-11</i>	1	542.2	1.72	0.33
	2	514.2	1.93	1.89
	3	579.4	1.71	0.36

Tabla 16. Valores de extracción de RNA día 5

Cultivo	Muestra	[] ng/μl	260/280	206/230
BG-11	1	465.1	1.67	0.26
	2	467.5	1.66	0.25
	3	410.9	1.86	2.11
N -	4	531.4	1.68	0.53
	5	536.5	1.66	0.37
	6	466.6	1.62	0.36
Ac +	7	1 107.0	1.81	1.24
	8	643.3	1.74	0.43
	9	785.5	1.73	0.57
Glc +	10	1 102.9	1.6	0.44
	11	1 198.8	1.87	0.43
	12	1 075.4	1.67	0.47
N – Ac +	13	599.0	1.81	0.47
	14	432.3	1.87	0.42
	15	463.2	1.78	0.43
N – Glc +	16	618.7	1.78	0.31
	17	614.5	1.74	0.31
	18	639.0	1.70	0.45
N – Ac + Glc +	19	631.4	1.74	0.34
	20	329.8	1.69	0.83
	21	1 415.9	1.88	3.79

Tabla 17. Valores de extracción de RNA día 10

Cultivo	Muestra	[] ng/ μ l	260/280	206/230
BG-11	1	1 566.9	1.62	1.85
	2	1 749.0	1.73	1.67
	3	1 103.5	1.69	1.66
N -	4	438.9	1.76	0.24
	5	349.4	1.79	0.43
	6	1 319.3	1.89	2.67
Ac +	7	972.4	1.77	0.56
	8	1 265.2	1.78	0.72
	9	934.9	1.79	0.47
Glc +	10	1 703.3	1.72	1.48
	11	2 866.6	1.89	2.62
	12	661.8	1.77	2.03
N - Ac +	13	1 118.2	1.66	1.11
	14	1 198.9	1.86	1.51
	15	3 039.7	1.78	1.29
N - Glc +	16	1 730.0	2.01	1.13
	17	893.8	1.70	1.08
	18	750.0	1.53	0.70
N - Ac + Glc +	19	1 145.2	1.76	1.27
	20	487.2	1.62	0.24
	21	1 418.3	1.89	2.78

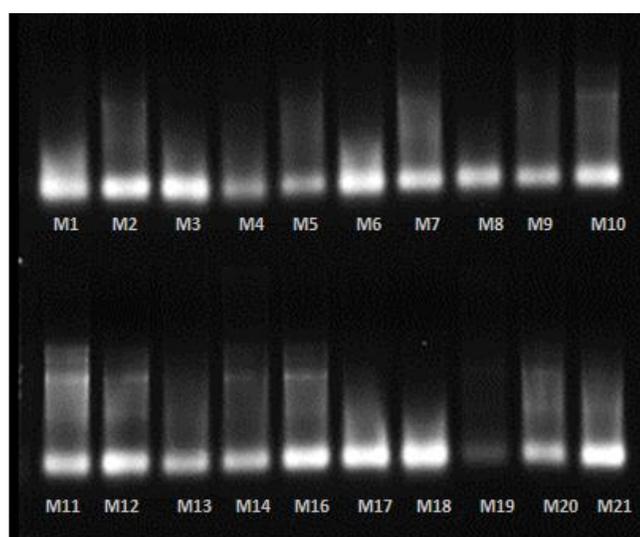


Figura 27. Extracción de RNA día 10

Tabla 18. Valores de extracción de RNA día 15

Cultivo	Muestra	[] ng/ μ l	260/280	206/230
BG-11	1	1 057.3	1.75	0.64
	2	1 166.4	1.74	0.54
	3	1 176.5	1.75	0.81
N -	4	629.4	1.60	0.58
	5	321.7	1.71	3.75
	6	329.3	1.71	3.43
Ac +	7	1 524.5	1.92	3.16
	8	822.8	1.78	0.45
	9	1 012.6	1.78	1.64
N - Ac +	13	608.4	1.65	0.33
	14	211.6	0.80	1.99
	15	487.5	1.60	0.27
N - Glc +	16	589.4	1.59	0.32
	17	574.2	1.56	0.32
	18	1 014.8	1.89	3.77
N - Ac + Glc +	19	394.1	1.55	0.22
	20	590.1	1.56	0.34
	21	323.0	1.0	2.98

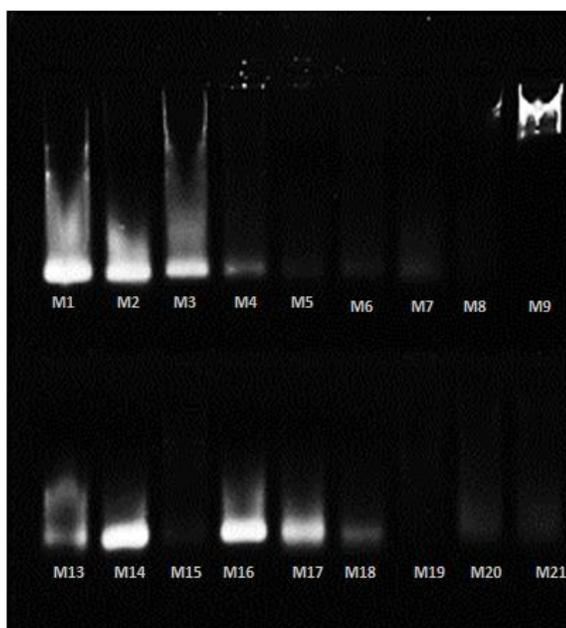


Figura 28. Extracción de RNA día 15

Tabla 19. Valores de extracción de RNA día 20

Cultivo	Muestra	[] ng/ μ l	260/280	206/230
BG-11	1	1 343.6	1.92	3.92
	2	1 193.8	1.77	3.89
	3	1 173.2	1.64	3.11
N -	4	637.7	1.65	0.50
	5	355.8	1.87	2.06
	6	323.8	1.84	1.66
Ac +	7	1 376.9	1.71	0.97
	8	2 957.9	1.91	8.67
	9	3 077.3	1.93	8.22
N – Ac +	13	1 824.5	2.09	4.23
	14	3 800.3	1.85	1.69
	15	1 458.3	1.95	7.00
N – Glc +	16	1 703.1	1.97	8.34
	17	2 886.0	1.96	8.17
	18	3 416.8	2.02	4.76
N – Ac + Glc +	19	617.9	1.65	0.46
	20	1 528.1	1.90	1.65
	21	446.3	1.61	0.21

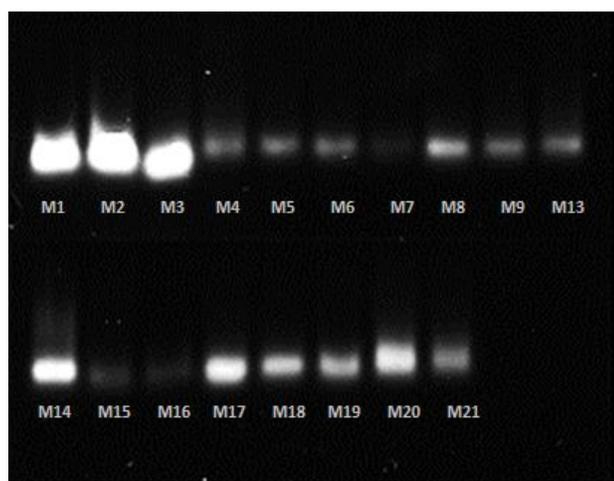


Figura 29. Extracción de RNA día 20

6. Cinética de pH de cultivo de *Synechocystis*

En tres cultivos de *Synechocystis* en medio BG-11 se siguió la cinética de pH durante el tiempo de cultivo. Las condiciones que se manejaron fueron las mencionadas en materiales y métodos. En la Figura 30 se observa la curva de crecimiento y el cambio de pH.

Se observó el proceso de alcalinización en el medio a partir del día 2, donde se mantuvo constante hasta el día 24 donde se presentó un pico de acidificación. Se sugiere que es debido a un cambio en el metabolismo relacionado al cambio de fase lineal a fase estacionaria.

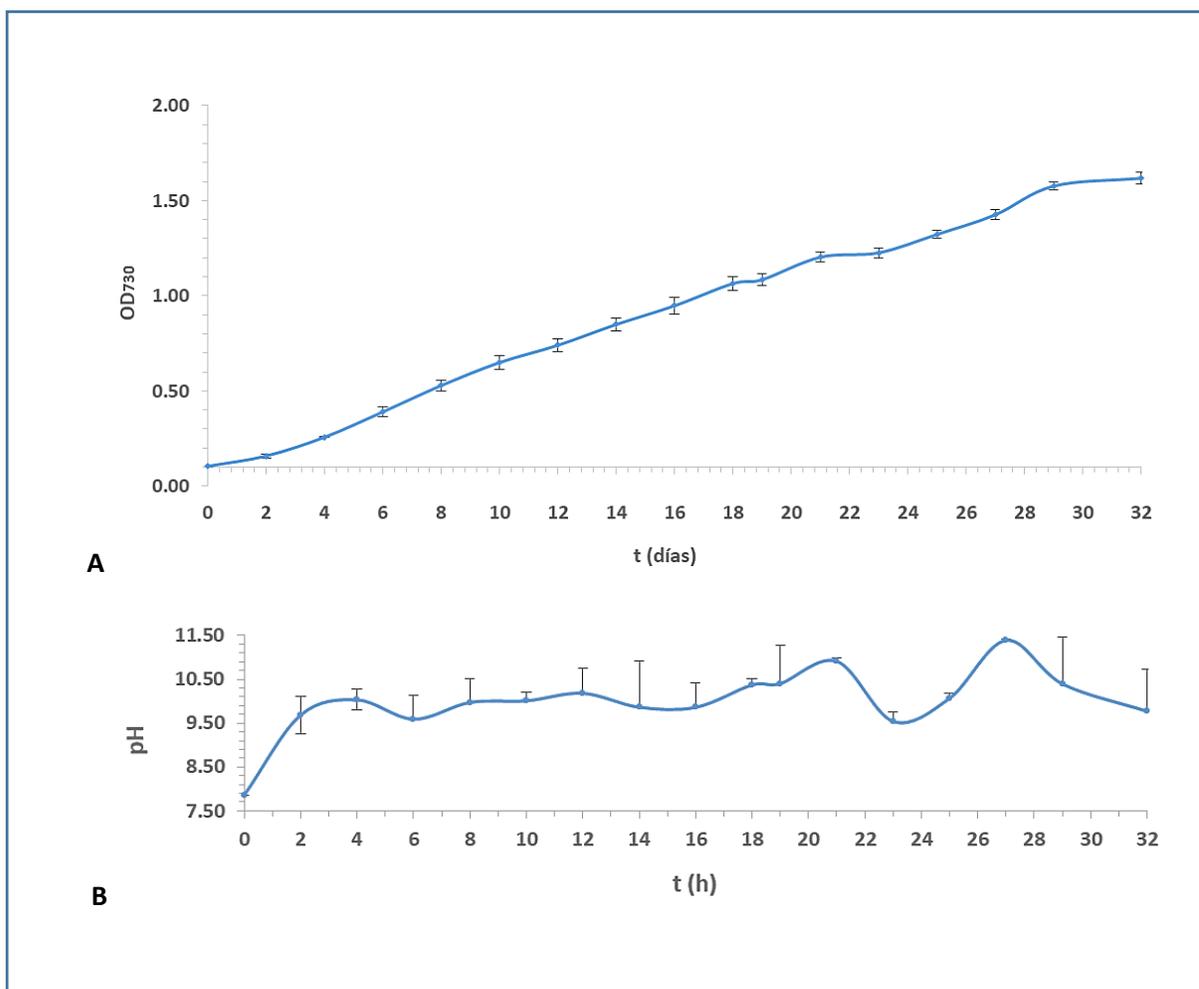


Figura 30. Cambio de pH durante la cinética de crecimiento en el cultivo de *Synechocystis*. A) Cinética de crecimiento de cultivo de *Synechocystis*, y B) Cinética de pH del cultivo.

6. Fase de crecimiento lineal en cultivos de cianobacterias

En los cultivos en lote de bacterias fotótrofas, a diferencia de las bacterias heterótrofas, se presenta una fase de crecimiento adicional distintiva entre la fase exponencial y estacionaria, denominada fase lineal. Esta fase de transición ocurre cuando hay limitación energética debido al efecto de sombreado por el creciente número de células. La tasa de crecimiento se reduce, tal que describe un crecimiento lineal. Cuando además se presenta limitación de nutrientes es que se alcanza la fase estacionaria (Schuurmans, Matthijs, & Hellingwerf, 2017). En la Figura 38 se esquematizan las tres fases de crecimiento en el cultivo de la Figura 37. Se muestra en escala logarítmica, así como en escala lineal en la cual se enfatiza la presencia y diferencia de esta fase adicional de crecimiento, como muestran Schuurmans et al. (2017).

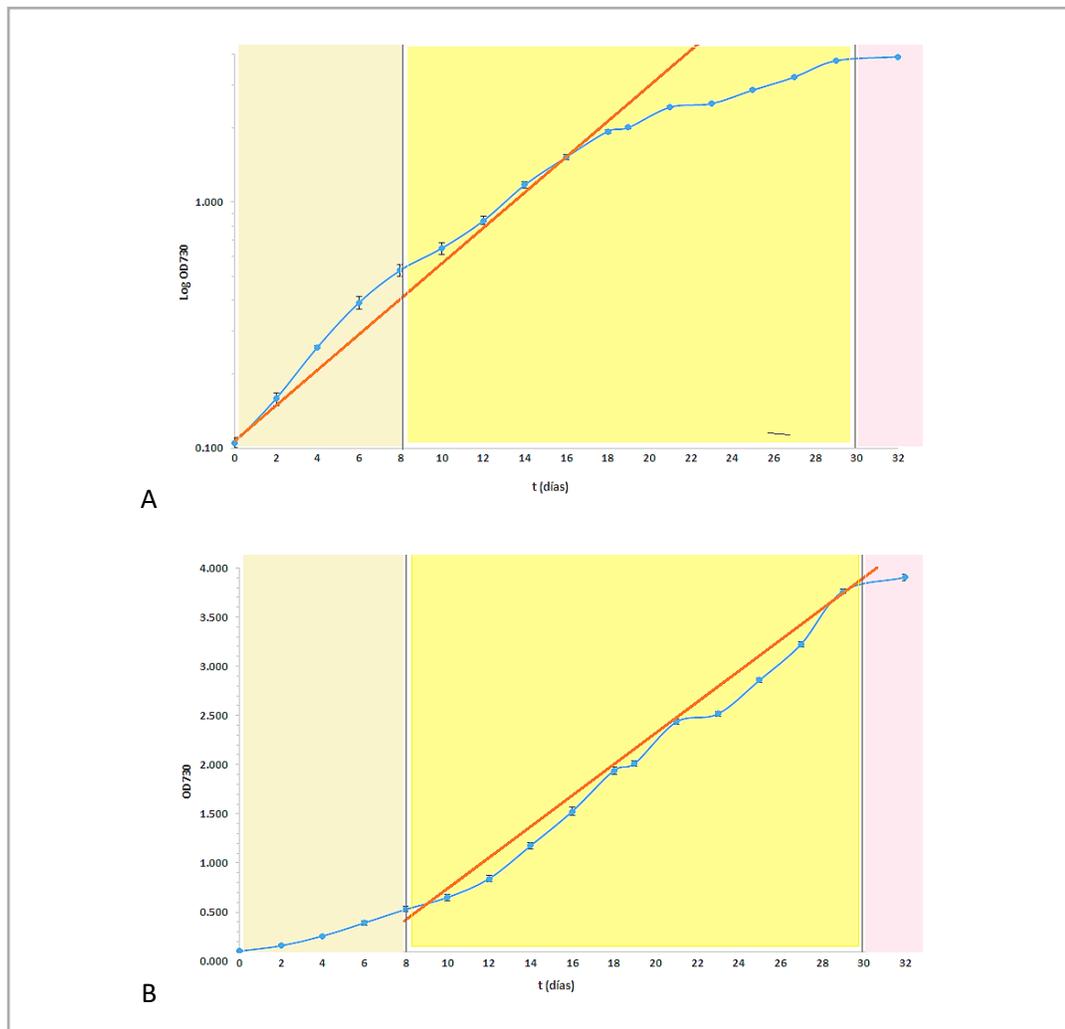


Figura 31. Fases de crecimiento en cultivo de *Synechocystis*. Se muestran las tres fases de crecimiento: exponencial, lineal y estacionaria. A) Curva de crecimiento en escala logarítmica. B) Curva de crecimiento en escala lineal.